



Universidad de Valladolid

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE PEDIATRÍA E INMUNOLOGÍA

LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DE LAS MUCOSAS

TESIS DOCTORAL:

**Modulación de la inmunidad innata y
adaptativa por los probióticos**

Presentada por Beatriz Martínez Abad para
optar al grado de
Doctora por la Universidad de Valladolid

Dirigida por:

Dr. Eduardo Arranz Sanz

Dr. José Antonio Garrote Adrados

Index :

Abbreviation list	I
I. Thesis summary	VII
In English	IX
In Spanish	XIII
II. Introduction	1
1. Intestinal microbiota and probiotics	3
1. 1. Role of the intestinal microbiota in the immune system	3
1. 2. Probiotics: definition and characteristics	5
2. Intestinal epithelium	7
2. 1. Mucus	7
2. 2. Enterocytes	8
2. 2. 1. Tight junctions in enterocytes	9
2. 2. 2. Antigen presentation by enterocytes	11
3. Dendritic cells: regulation of the immune response	12
3. 1. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells	12
3. 1. 1. Recognition and antigen uptake	12
3. 1. 2. Dendritic cell maturation	13
3. 1. 3. Polarization of T cells	15
3. 2. Subsets of dendritic cells	18
3. 3. Origin	19
4. Pattern-Recognition Receptors	20
4. 1. Toll-like receptors: characteristics and functions	21
4. 2. NOD-like receptors: characteristics and functions	28
4. 3. Role of Pattern-Recognition Receptors in enterocytes	31
5. How does the epithelium influence dendritic cells?	35
III. Objectives	43
IV. Justification	47
V. Materials and Methods	49
1. Generation of monocyte-derived dendritic cells	51
2. Growth and maintenance of bacterial strains	53
3. Flow cytometry in bacteria-stimulated monocyte-derived dendritic cells	54

4. Gene expression analysis of TLR-mediated signal transduction in bacteria-stimulated monocyte-derived dendritic cells	55
4.1. RNA isolation by Trizol® method	56
4.2. Reverse transcription from RNA to complementary DNA	56
5. Immunofluorescence staining of p65 NF-κB subunit in bacteria-stimulated monocyte-derived dendritic cells	59
6. Bacterial staining with fluorescein isothiocyanate	60
7. Allogenic cultures: mixed lymphocyte reaction	61
7.1. Generation of bacteria-stimulated monocyte-derived dendritic cells	61
7.2. Isolation of naïve T cells	62
7.3. Staining of naïve T cells with carboxyfluorescein succinimidyl ester	62
7.4. Staining of intracellular cytokines in lymphocytes	63
8. Maintenance of the Caco-2 cell line	64
9. Gene expression analysis of chemokines in bacteria-stimulated Caco-2 cells	66
10. Measurements of transepithelial electrical resistance in Caco-2 cell monolayer	67
11. Immunofluorescence staining of Zonula Occludens-1 in Caco-2 monolayer	68
12. Bacteria adhesion assay to Caco-2 cell.	69
13. Co-culture of monocyte-derived dendritic cells with Caco-2 cells	70
VI. Results	73
1. Effects of probiotic and two pathogen strains on monocyte-derived dendritic cells	75
1.1. Molecules of the major histocompatibility complex and co-stimulatory molecules	75
1. 2. Expression of genes related to TLR-mediated signal transduction	84
1.2.1. Pattern-Recognition Receptors	85
1.2.2. Mediator and adaptor molecules	87
1.2.3. Signaling pathways	88
1.2.4. Th1 cytokine profile	90
1.2.5. Th2 and regulatory cytokine profile	91
1.2.6. Pro-inflammatory cytokines	93
1.2.7. Growth factors	95

1.2.8. Antiviral cytokines	96
1.3. NF- κ B activation and phagocytic analysis	98
1.4. Proliferation of naïve T cells and IFN γ production in allogenic culture	104
2. Effects of probiotic and two pathogen strains on Caco-2 cells	107
2.1. Effects on gene expression of <i>IL8</i> , <i>CXCL10</i> and <i>CCL20</i>	107
2.1.1. Non-polarized Caco-2 cells (7 days culture)	108
2.1.2. Polarized Caco-2 cells (21 days de culture)	112
2.2. Effects on the stability of the Caco-2 monolayer	115
2.2.1. Measurements of the transepithelial electrical resistance for 48 hours	116
2.2.2. Zonula Occludens-1 expression	119
2.3. Bacteria adhesion to Caco-2 cell surface	121
3. Effects of Caco-2 cell supernatants on monocyte-derived dendritic cells	122
VII. Discussion	129
1. Probiotic effects on maturation of monocyte-derived dendritic cells	131
2. Probiotic effects on Caco-2 cells	144
VIII. Conclusions	153
In English	155
In Spanish	157
Annex I	159
References	175
Notes	193

Índice :

Listado de abreviaturas	I
I. Resumen de la Tesis	VII
En Inglés	IX
En Castellano	XIII
II. Introducción	1
1. Microbiota intestinal y probióticos	3
1. 1. Papel de la microbiota intestinal en el sistema inmunológico	3
1. 2. Probióticos: definición y características	5
2. Epitelio intestinal	7
2. 1. El mucus	7
2. 2. Los enterocitos	8
2. 2. 1. Complejos de unión entre los enterocitos	9
2. 2. 2. Presentación antigénica mediada por los enterocitos	11
3. Células dendríticas: regulación de la respuesta inmunológica	12
3. 1. Presentación de antígenos y activación de los linfocitos T por las células dendríticas	12
3. 1. 1. Reconocimiento y captura de los antígenos	12
3. 1. 2. Maduración de las células dendríticas	13
3. 1. 3. Polarización de los linfocitos T	15
3. 2. Tipos de células dendríticas	18
3. 3. Origen	19
4. Receptores de reconocimiento de patrones	20
4. 1. Receptores tipo Toll: características y funciones	21
4. 2. Receptores tipo NOD: características y funciones	28
4. 3. Papel de los receptores de reconocimiento de patrones en los enterocitos	31
5. Cómo influye el epitelio intestinal en las células dendríticas	35
III. Objetivos	43
IV. Justificación	47
V. Material y métodos	49

1. Obtención de células dendríticas derivadas de monocitos	51
2. Crecimiento y mantenimiento de las bacterias	53
3. Citometría de flujo en las células dendríticas derivadas de monocitos estimuladas con bacterias	54
4. Análisis de la expresión de genes involucrados en la ruta de los TLR en células dendríticas derivadas de monocitos estimuladas con bacterias	55
4.1. Extracción del ARN mediante el método del Trizol®	56
4.2. Transcripción reversa de ARN a ADN complementario	56
5. Inmunofluorescencia de la subunidad p65 del NF-κB en células dendríticas derivadas de monocitos estimuladas con las bacterias	59
6. Marcaje de las bacterias con el Isomero I de Isotiocianato de fluoresceína	60
7. Cultivos alogénicos: reacción mixta de linfocitos	61
7.1. Obtención de las CDmo estimuladas con las bacterias	61
7.2. Obtención de los linfocitos T vírgenes	62
7.3. Marcaje de los linfocitos vírgenes con el ester succinimidil diacetato carboxifluoresceína	62
7.4. Marcaje de citocinas intracelulares en los linfocitos	63
8. Mantenimiento de la línea celular Caco-2.	64
9. Análisis de la expresión de genes que codifican para quimiocinas en células Caco-2 estimuladas con bacterias.	66
10. Medida de la resistencia transepitelial eléctrica en la monocapa creada por las células Caco-2.	67
11. Inmunofluorescencia de la proteína Zonula Occludens-1 en la monocapa creada por las células Caco-2.	68
12. Ensayos de adherencia de las bacterias a las células Caco-2.	69
13. Cocultivo de las células dendríticas derivadas de monocitos con células Caco-2.	70
VI. Resultados	73
1. Efecto de los probióticos y dos especies patógenas sobre las células dendríticas derivadas de monocitos.	75
1.1. Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad y moléculas coestimuladoras.	75
1. 2. Expresión de genes relacionados con la vía de señalización	

activada por TLR.	84
1.2.1. Receptores de reconocimiento de patrones.	85
1.2.2. Intermediarios y adaptadores de la ruta	87
1.2.3. Vías desencadenadas	88
1.2.4. Moléculas de perfil Th1	90
1.2.5. Moléculas relacionadas con el perfil Th2 y linfocitos T reguladores	91
1.2.6. Moléculas pro-inflamatorias	93
1.2.7. Factores de crecimiento	95
1.2.8. Moléculas antivirales	96
1.3. Activación del NF- κ B y análisis de la capacidad fagocítica.	98
1.4. Proliferación de linfocitos T vírgenes y su producción de IFN γ en un cultivo alogénico.	104
2. Efecto de los probióticos y dos especies patógenas sobre las células Caco-2	107
2.1. Efectos sobre los niveles de expresión de <i>IL8</i> , <i>CXCL10</i> y <i>CCL20</i> .	107
2.1.1. Células Caco-2 no polarizadas (7 días de cultivo)	108
2.1.2. Células Caco-2 polarizadas (21 días de cultivo)	112
2.2. Efectos sobre la estabilidad de la monocapa epitelial	115
2.2.1. Medición de la Resistencia Transepitelial Eléctrica durante 48 horas	116
2.2.2. Expresión de la Zonula Occludens-1	119
2.3. Adherencia de las bacterias sobre la superficie de las células Caco-2	121
3. Efecto del sobrenadante de las células Caco-2 sobre la diferenciación y maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos	122
VII. Discusión	129
1. Efecto de los probióticos sobre la maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos	131
2. Efecto de los probióticos sobre las células Caco-2	144
VIII. Conclusiones	153
En Inglés	155
En Castellano	157
Anexo I	159
Bibliografía	175
Notas	193

Listado de abreviaturas.

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN complementario.

AP-1: proteína activadora (*activator protein*).

AR: ácido retinoico.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

ASB: albúmina sérica bovina.

BAL: bacterias acidolácticas

BFS: bacterias filamentosas segmentadas.

CCL: ligando de quimiocina (motivo C-C) (*chemokine (C-C motif) ligand*).

CECT: colección española de cultivos tipo.

CD: célula dendrítica.

CDc: célula dendrítica convencional.

CDi: célula dendrítica inmadura.

CDm: célula dendrítica madura.

CDp: células dendríticas plasmacitoides.

CDmo: célula dendrítica derivada de monocito.

CEI: células del epitelio intestinal.

CFSE: ester succinimidil diacetato carboxifluoresceína (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*).

CLR: receptores tipo C-lectina (*C-type Lectin Receptor*).

CMSP: células mononucleares de sangre periférica.

CPA: célula presentadora de antígeno.

Ct: ciclo umbral (*cycle threshold*)

CTL: linfocito T citotóxico (*cytotoxic T lymphocytes*)

CTLA-4: antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico (*cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*)

CXCL: ligando para quimiocinas (motivo C-X-C) (*chemokine (C-X-C motif) ligand*).

DMEM: *Dulbeccos's modified Eagle Medium*.

DO: densidad óptica.

DSS: sulfato de dextrano sódico (*dextran sodium sulfate*).

ECN: enterocolitis necrotizante.

EAF: epitelio asociado al folículo.

EDTA: ácido etilendiaminetetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid*).

EEA: encefalomiелitis experimental autoinmune.

EII: enfermedad inflamatoria intestinal.

ERK: quinasas reguladas por señales extracelulares (*extracellular signal-regulated kinases*).

FAO: organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (*food and agriculture organization of the united nations*).

FC: *fold change*.

FITC: isotiocianato de fluoresceína (*fluorescein isothiocyanate*).

FoxP3: *forkhead box P3*.

GADPH: gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*).

GALT: tejido linfoide asociado al intestino.

GM-CSF: factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (*granulocyte macrophage colony-stimulating factor*).

GRAS: bacterias generalmente reconocidas como seguras (*generally recognized as safe*).

HEPES: ácido hidroxietil piperazina etanosulfónico (*hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid*)

HLA: antígeno leucocitario humano (*human leukocyte antigen*).

IFN: interferón.

IFR: zona interfolicular de la placa de Peyer.

IL: interleucina.

Ig: inmunoglobulina.

IgAs: IgA secretora.

IκB: inhibidor del NF-κB.

IKK: quinasa del IκB (*IKK, IκB-kinase*).

IRAK: quinasa asociadas al IL-1R (*IL-1R-associated kinase*).

IRF: factor regulador del IFN (*IFN regulaory factor*).

L: ligando.

LABIP: plataforma industrial para las bacterias acidolácticas (*lactic acid bacteria industrial platform*)

LB: Luria Bertani.

L-Gln: L-Glutamina.

LP: lámina propia.

LPS: lipopolisacárido.

MAMP: patrones moleculares asociados a microorganismos (*microbe-associated molecular pattern*.)

MAPK: quinasa activadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases*).

m-DAP: ácido meso-diaminopimélico.

MDP: muramil dipéptido.

MHC: complejo mayor de histocompatibilidad (*major histocompatibility complex*).

MIIc: compartimentos ricos en MHC-II (*MHC class II-rich compartments*).

MIF: mediana de la intensidad de fluorescencia

MDI: multiplicidad de infección.

PCD: precursores comunes de las DCs (*common DCs precursor*).

PM: precursor mielóide.

MRS: medio de Man, Rogosa y Sharpe.

MYD88: proteína de respuesta primaria de diferenciación mielóide 88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*)

NaCl: cloruro de sodio.

NEMO: modulador esencial del NF- κ B (*NF- κ B essential modulator*).

NF- κ B: factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*).

NKT: células T citolíticas naturales (*natural killer T cell*)

NLM: nódulo linfático mesentérico.

NLR: receptores tipo dominio de oligomerización de nucleótidos (NOD: *nucleotide-binding oligomerization domain*) (*NOD-Like Receptor*).

PAMP: patrones moleculares asociados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*).

PBS: tampón salino fosfato (*phosphate buffered saline*).

PCD: precursores comunes de las CD.

PFA: p-formaldehído.

PGE-2: prostaglandina E2.

PGN: peptidoglicano.

PKC: proteína quinasa C (*protein kinase C*).

PL: precursor linfoide.

PMA: acetato de forbol miristato (*phorbol myristate acetate*).

PMD: precursores de monocitos/macrófagos y células dendríticas.

PMI: solución de PMA, monensina e ionomicina.

PP: placa de Peyer.

PPAR: receptor gamma activado por los proliferadores de los peroxisomas (*peroxisome proliferation activated-receptor*).

PRR: receptor de reconocimiento de patrones.

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*).

R: receptor.

RALDH2: retinaldehído deshidrogenada de tipo 2.

RDH10: retinol deshidrogenasa 10.

RLM: reacción linfocitaria mixta.

RLR: receptores tipo gen-I inducible por ácido retinoico (RIG-I, *Retinoic Acid-Inducible Gene 1*) (*RIG-I-Like Receptor*).

RIP: proteína que interacciona con el receptor (*receptor-interacting protein*).

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*.

RT: *reverse transcription*.

RTE: resistencia transepitelial eléctrica.

SED: zona subepitelial del domo de la placa de Peyer.

SFB: suero fetal bovino.

SII: síndrome del intestino irritable.

SOCS: proteínas supresoras de la señalización por citocinas (*suppressor of cytokine signalling*).

TA: temperatura ambiente.

TAB: proteínas de unión a TAK-1 (*TAK-1-binding protein*).

TAK: quinasa activada por el TGF β (*TGF- β -activated kinase*).

TCR: receptor de células T (*T cell receptor*).

TGF β : factor transformante de crecimiento beta (*transforming growth factor beta*).

Th: linfocito T cooperador (*T helper*).

TIR: dominio homólogo al receptor de la IL-1R (*Toll/IL-1 receptor*).

TIRAP: adaptador que contiene el dominio TIR (*TIR domain containing adaptor protein*).

TLR: receptores tipo Toll (*toll-like receptor*).

TNF α : factor de necrosis tumoral alpha (*tumor necrosis factor alpha*).

TRAF6: factor 6 asociado al receptor del TNF (*TNF receptor-associated factor*).

TRAM: adaptador para TRIF (*TLR4 adaptor protein*).

Treg: linfocitos T reguladores.

iTreg: linfocitos Treg inducibles (*induced Treg cells*).

nTreg: linfocitos T reguladores naturales (*natural Treg cells*).

TRIF: adaptador inductor de IFN- β que contiene el dominio TIR (*TIR-domain-containing adapter-inducing IFN- β*).

TSLP: linfopoyetina del estroma tímico (*thymic stromal lymphopoietin*).

U: unidades.

ufc: unidad formadora de colonias.

ZO-1: zonula occludens-1.

I. Resumen/Summary

Thesis Summary

Introduction

Probiotics are by definition, “live microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host”. Due to the great variety of probiotics, they can act upon different systems and having heterogeneous effects.

Probiotics can regulate the immune response in different ways. Dendritic cells (DC) are antigen presenting cells (APC) that act as a bridge between innate and adaptive immune responses. First, DCs capture and process the antigen; second, DCs undergo a maturation process and migrate to the mesenteric lymph nodes, where they present antigens to T cells; and finally, DCs act as adjuvant upon T cells polarization.

The intestinal epithelium constitutes a selective cellular barrier that allows the transport of nutrients, but avoids the crossing of microbes from the lumen, which would trigger a pro-inflammatory response in the lamina propia. The enterocytes are the predominant cells in the epithelium, and these cells are also involved in the immune response to invading agents.

Objectives

In this thesis, we have two main objectives aiming to study how several probiotic strains affect on both the immune cells (**objective 1**) and the intestinal epithelium (**objective 2**).

Materials and Method

To carry out these objectives, I used different experimental approaches, such as, cell culture (primary cell culture, cell line and co-culture) and bacterial culture (6 probiotic strains and 2 pathogen strains, in aerobic/anaerobic conditions), flow cytometry (surface markers, lymphoproliferation, intracellular cytokines), gene expression analysis, immunofluorescence (transcription factors and tight junctions proteins), measurements of epithelial monolayer resistance, and assays of bacterial adhesion to epithelial cells.

Results and conclusions

For the **objective 1**, I used monocyte-derived dendritic cells (moDC) as a culture model, because moDCs have similar properties than conventional DCs. Several bacteria were used: 4 *Lactobacillus* spp. (*L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. fermentum* and *L. salivarius*), 2 *Bifidobacterium* spp. (*B. lactis* Bb12 y *B. lactis* BI07), pathogen Gram-positive bacteria control (*Clostridium perfringens*) and pathogen Gram-negative bacteria control (*Salmonella typhimurium*).

The probiotic capacity to promote the maturation of moDCs was studied by analyzing changes affecting from the innate to the adaptive immunity. The maturation process entails morphological and functional changes on DCs. Probiotics triggered different degree of expression levels of major histocompatibility complex class II (MHC-II) and co-stimulatory molecules, which are required for antigen presentation to T cells. Among the probiotics studied in this thesis, *B. lactis* BI07 down-regulated the expression of these markers.

Changes in the expression of genes related to the Toll-like receptors (TLR) pathway were analyzed by quantitative PCR (qPCR). TLRs are pattern recognition receptors (PRR) present in different cells of immune system, like DCs, which recognize microbe-associated molecular patterns (MAMP). The activation of these receptors quickly triggers an innate response according to the foreign nature of the antigen. The type of signals triggered by probiotics will determine the maturation process. In general, *Lactobacillus* spp. induced a greater response on moDCs than *Bifidobacterium* spp. Among the probiotic studied, *L. fermentum* and *Bifidobacterium* spp. showed the more relevant effects on gene expression. *L. fermentum* increased the expression of genes involved in the regulation of the immune response such as *CSF3*, *IL10*, etc., and *Bifidobacterium* spp. had the opposite effect on the expression of genes involved in the maturation process, such as *CXCL10*, *NOD2*, *IFNB1*, etc.

NF- κ B is a transcription factor that translocates to the nucleus in response to several stimuli, for example bacteria. NF- κ B promotes the synthesis of pro-inflammatory cytokines and it is necessary for the maturation process to take place. In spite of the differences observed in gene expression and surface maturation markers, Gram-positive bacteria triggered a similar early NF- κ B activation. Moreover, to

elucidate if the differences observed could be due to a lower phagocytic capacity of moDCs, bacteria were stained with FITC and culture with moDCs afterwards. These cells were able to carry out the phagocytic function.

Finally, the ability of bacteria-stimulated moDCs of inducing proliferation and effector T cell responses in an allogenic co-culture model was also analyzed. Monocyte-derived dendritic cells stimulated with *L. acidophilus* decreased the proliferation of T cells, and moDCs stimulated with *L. fermentum* and *B. lactis* BI07 triggered a lower production of IFN γ by T cells compared to the other bacteria.

For the **objective 2**, I used the cell line Caco-2 originated from human colon adenocarcinoma. The intestinal epithelium participates actively in the immune response, due to its ability to attract effector T cells and neutrophils, by means of producing several chemokines (IL-8, CXCL10 and CCL20) in response to antigens.

Caco-2 cells become differentiated and polarized under standard *in vitro* culture conditions. Caco-2 cells cultured for 7 days are not polarized and are similar to enterocytes from the intestinal crypt, while Caco-2 cells culture for 21 days are totally differentiated and polarized like villus tip enterocytes. Non-polarized Caco-2 cells were more sensitive to stimuli than polarized cells, and in the same way as bacteria-stimulated moDCs, probiotics triggered different profiles of chemokine expression.

Caco-2 cells in culture form a cell monolayer. The integrity of this monolayer depends on the stability of tight junctions. Zonula occludens-1 (ZO-1) is one of the proteins forming the tight junctions. *L. salivarius* gradually increased the electrical resistance of the Caco-2 cell monolayer, though, there is not a relationship between re-distribution of ZO-1 and increase in the electrical resistance.

The adherence of probiotic bacteria to Caco-2 cells was also analyzed, and differences between bacteria were found.

Soluble factors produced by the epithelium prime DCs to trigger tolerogenic responses on T cells. Monocyte-derived dendritic cells differentiated in Caco-2 culture supernatants were not sensitive to pro-inflammatory responses triggered by these

Summary.

Caco-2 cells stimulated with *S. typhimurium*. Nevertheless, when monocytes were differentiated to moDCs in presence of intestinal epithelial pro-inflammatory factors, these cells showed different profiles from moDCs differentiated in basal culture medium.

General conclusion

Some of probiotic studied were able to modulate the innate and adaptive immune response through acting on different pathways and different cells.

Resumen de la Tesis

Introducción

Los probióticos son, por definición, “microorganismos vivos, que administrados en la cantidad adecuada confieren beneficios a la salud del hospedador”. Debido a la gran variedad de probióticos que existen, los sistemas sobre los que actúan y los efectos que desencadenan son muy diversos.

Los probióticos son capaces de modular la respuesta inmunológica, incrementándola o disminuyéndola. Las células dendríticas (CD) son células presentadoras de antígeno (CPA) que actúan como nexo de unión entre la inmunidad innata y la adaptativa. Las CD actúan en tres pasos: 1) capturan y procesan los antígenos; 2) maduran y migran hacia los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) donde realizan la presentación antigénica a los linfocitos T; 3) actúan como adyuvantes en la activación de los linfocitos T.

El epitelio intestinal constituye una barrera celular selectiva que permite el paso de nutrientes pero impide que los microorganismos del lumen alcancen la lámina propia, donde desencadenarían una fuerte respuesta inflamatoria. Los enterocitos, que son las principales células que constituyen el epitelio intestinal, también participan activamente en la respuesta inmunológica hacia los agentes invasores.

Objetivos

En esta tesis nos planteamos, mediante dos objetivos principales, estudiar cómo afectarían distintas especies probióticas al sistema inmunológico (**objetivo 1**) y al epitelio intestinal (**objetivo 2**).

Material y Métodos

Para llevar a cabo estos objetivos se utilizaron técnicas de cultivo celular (cultivos primarios, línea celular y cocultivos) y bacteriano (6 especies probióticas y 2 patógenas en condiciones de aerobiosis o anaerobiosis), citometría de flujo (marcadores de superficie, linfoproliferación, citocinas intracitoplasmáticas), análisis de expresión génica, inmunofluorescencia (factores de transcripción y uniones

estrechas), ensayos de resistencia de la monocapa epitelial y adherencia bacteriana al epitelio intestinal.

Resultados

Para el **objetivo 1**, se utilizó como modelo CD derivadas de monocitos (CDmo), que poseen características similares a las CD convencionales. Se utilizaron 4 especies de lactobacilos (*L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. fermentum* y *L. salivarius*), 2 especies de bifidobacterias (*B. lactis* Bb12 y *B. lactis* BI07), un control patógeno Gram-positivo (*Clostridium perfringens*) y un control patógeno Gram-negativo (*Salmonella typhimurium*). Se estudió la capacidad de los probióticos para inducir la maduración de las CDmo analizando los cambios desde la inmunidad innata hasta la inmunidad adaptativa. El proceso de maduración conlleva una serie de cambios en las CD a nivel morfológico y funcional. Los probióticos, desencadenaron distintos grado de expresión de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (MHC-II) y moléculas coestimuladoras, necesarias para la presentación antigénica. Entre los probióticos utilizados destacó *B. lactis* BI07 que fue capaz de disminuir la expresión de estos marcadores.

Mediante PCR cuantitativa (qPCR) se analizaron los cambios en la expresión de genes relacionados con la ruta de los receptores tipo Toll (TLR). Los TLR son receptores de reconocimiento de patrones (PRR) presentes en células del sistema inmunológico, como las CD, que reconocen patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMP). La activación de estos receptores genera una respuesta innata rápida según la naturaleza del agente foráneo. El tipo de señales y de citocinas que desencadenaran estos probióticos influirá en el proceso de maduración. En general, los lactobacilos desencadenaron una mayor respuesta sobre las CDmo que las bifidobacterias. Entre los probióticos estudiados destacaron los efectos de *L. fermentum* y las bifidobacterias, el primero, por incrementar los niveles de ARNm de genes cuyos productos son capaces de regular la respuesta inmune como *CSF3*, *IL10*, etc. y las segundas, por disminuir la expresión de numerosos genes como *CXCL10*, *NOD2*, *IFNB1*, etc.

El NF- κ B es un factor de transcripción que ante numerosos estímulos, como bacterias, sufre una translocación al núcleo, y es el responsable de la síntesis de

numerosas citocinas proinflamatorias e indispensable para la maduración de las CD. A pesar de las diferencias encontradas en los análisis de expresión génica y en los marcadores de maduración, las bacterias Gram-positivas desencadenaron una activación temprana similar del NF- κ B. Además, para determinar si las diferencias observadas podrían deberse a una menor capacidad de las CDmo de fagocitar determinadas especies bacterianas, se marcaron las bacterias con FITC y se cultivaron con las CDmo. Se observó que las CDmo eran capaces de fagocitar las bacterias sin problemas.

Como última parte del análisis de maduración, se estudió la capacidad de proliferación y el perfil efector que inducían las CDmo estimuladas con los probióticos sobre linfocitos T vírgenes en un ensayo alogénico. El lactobacilo *L. acidophilus* disminuyó la capacidad proliferativa de las CDmo. De nuevo, las CDmo estimuladas con *L. fermentum* y *B. lactis* BI07 desencadenaron un aumento más moderado de la producción de IFN γ por parte de los linfocitos.

Para el **objetivo 2**, se utilizó la línea celular Caco-2 procedente de un adenocarcinoma de colon humano. El epitelio intestinal participa de manera activa en la respuesta inmunológica, ya que, ante determinados estímulos, desencadena la producción de quimiocinas (IL-8, CXCL10, CCL20) que atraen al lugar de la inflamación células del sistema inmunológico, como linfocitos T efectores y neutrófilos. La principal característica de las células Caco-2 es su capacidad de polarización y diferenciación *in vitro* bajo condiciones estándar de cultivo. Las células Caco-2 cultivadas durante 7 días no están polarizadas y se asemejan a los enterocitos de las criptas vellositarias. En cambio, las células Caco-2 de 21 días están completamente diferenciadas y polarizadas como los enterocitos de la punta de la vellosidad. Las células Caco-2 no polarizadas fueron más sensibles ante los estímulos, y al igual que en las CDmo, los probióticos desencadenaron diversos perfiles de expresión de las quimiocinas estudiadas.

Otra de las características de las células Caco-2 es que crecen formando una monocapa celular. En el análisis de la resistencia de esta monocapa, se observó que *L. salivarius* incrementó de manera gradual la resistencia. Uno de los factores que interviene en la integridad de la monocapa es la estabilidad de las uniones estrechas

Resumen.

entre las células. Entre las proteínas que forman las uniones estrechas se encuentra la Zonula Occludens 1 (ZO-1). Sin embargo, en las células Caco-2 estimuladas con *L. salivarius* no se observó una relación entre el incremento en la resistencia y una redistribución de ZO-1.

Además de estos estudios se realizaron ensayos de adherencia para determinar la capacidad de adherencia de cada especie bacteriana al epitelio, y se observó que las bacterias probióticas fueron capaces de adherirse al epitelio en distinta medida.

Los factores solubles producidos por el epitelio intestinal otorgan a las CD de la mucosa intestinal un perfil tolerogénico. Las CDmo diferenciadas en cocultivo con las células Caco-2 son insensibles a la respuesta proinflamatoria de las células Caco-2, inducida por un patógeno como *S. typhimurium*. Sin embargo, los monocitos que se encuentran en un ambiente proinflamatorio intestinal dan lugar a CDmo con un perfil totalmente distinto al que presentan las CDmo diferenciadas en medio de cultivo basal.

Conclusión general

Algunos de los probióticos utilizados presentaron un efecto modulador sobre la inmunidad innata y adaptativa actuando en diferentes rutas y distintas células.

II. Introducción

1. MICROBIOTA INTESTINAL Y PROBIÓTICOS.

1.1. Papel de la microbiota intestinal en el sistema inmunológico.

El cuerpo humano alberga un complejo ecosistema formado por microorganismos, que constituyen en torno al 90% del total de células presentes en el organismo. El conjunto de estos microorganismos se denomina **microbiota**, y en el tracto gastrointestinal se halla la mayor concentración que se va incrementando según nos acercamos al intestino grueso, hasta alcanzar las 10^{12} unidades formadoras de colonias (ufc)/cm³ (Hooper et al., 2002). La microbiota se adquiere en el momento del nacimiento y se va modificando en las primeras etapas de la vida del individuo hasta que se establece y pierde esa plasticidad (Koenig et al., 2011). La microbiota está compuesta por bacterias, arqueas, levaduras, hongos e incluso virus. Las bacterias constituyen uno de los grupos más diversos, formado principalmente por los filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacterias y en menor medida por las Proteobacterias. El número y la identidad de estas especies bacterianas no se conoce con exactitud y algunos autores lo estiman en torno a 800 filotipos, de acuerdo con su secuencia del ARN ribosomal 16s (Rajilic-Stojanovic et al., 2007).

En 1885, Pasteur, postuló la idea de que la vida sin microbiota intestinal no podría ser posible debido al principio de supervivencia del mejor adaptado, por lo tanto, si no existiera esta cooperación otras formas sin microbiota intestinal habrían permanecido filogenéticamente. Como se observó más adelante, los animales sin microbiota eran más resistentes a desarrollar la tolerancia oral y su intestino presentaba unas placas de Peyer más pequeñas, menos linfocitos intraepiteliales y unos niveles menores de IgA secretora (IgAs) (Pollard and Sharon, 1970, Lozupone et al., 2013). Teniendo en cuenta estas observaciones, se concluyó que la presencia de la microbiota era necesaria para el correcto desarrollo del sistema inmunológico sistémico (Cebra, 1999), y especialmente, para el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (Pollard and Sharon, 1970).

La microbiota establece diversas relaciones biológicas con su hospedador, por lo que en el intestino se pueden encontrar bacterias comensales, simbióticas o patógenos oportunistas. El desequilibrio entre las bacterias que forman la microbiota a favor de las que resultan más perjudiciales, se denomina **disbiosis**. Hay varios factores que pueden afectar al establecimiento de la microbiota o al ecosistema ya existente, como la dieta, geografía, edad, embarazo, herencia genética, enfermedades metabólicas, antibióticos, enfermedades o patógenos (Lozupone et al., 2013).

Debido a la gran carga antigénica con la que el intestino está en contacto, es importante que su sistema inmunológico asociado mantenga un estado de **homeostasis**, entendiéndose homeostasis como equilibrio entre los distintos tipos de respuestas desencadenadas. En un extremo de este equilibrio se encuentran los ratones libres de gérmenes, que presentan una respuesta inmunológica débil en el intestino debido al predominio de células T reguladoras (Treg), por lo que son más propensos a las infecciones. En el otro extremo, se hayan los ratones en cuya microbiota predomina un tipo de bacteria, las bacterias filamentosas segmentadas (**BFS**), las cuales favorecen un ambiente proinflamatorio mediante los linfocitos T cooperadores (Th, *helper*) 17. Estos ratones, aunque están más preparados ante una posible infección, son más vulnerables ante las enfermedades autoinmunes (Ivanov and Littman, 2010). Se ha observado que en los ratones B6, que proceden de granjas distintas, la microbiota participaba de manera activa en el tipo de respuesta desencadenada en el intestino. Los ratones procedentes de una de las granjas, presentaban una elevada concentración de BFS en su microbiota, y en la lámina propia se observaba una respuesta predominante Th17. Mientras que, el mismo tipo de ratones procedentes de otra granja, no presentaban este tipo de microbiota ni tampoco ese tipo de respuesta. Las BFS pertenecen al filo Firmicutes, no se han podido cultivar y forman esporas. Estas bacterias son capaces de contactar directamente con el epitelio y mediante la estimulación de la secreción de sustancias antimicrobianas lo protegen frente a la colonización por agentes patógenos. Además, el trasplante de materia fecal de ratones con BFS a ratones libres de gérmenes desencadena una respuesta Th17 por parte de las células T CD4⁺ de la lámina propia, sin afectar a la proporción de linfocitos Th1 y Treg (Ivanov et al., 2009).

En una situación de disbiosis, la microbiota puede favorecer el desarrollo de enfermedades de tipo alérgico (Sjogren et al., 2009); autoinmune, como la encefalomiелitis experimental autoinmune (EEA) (Berer et al., 2011), artritis (Sinkorova et al., 2008) y colitis (Feng et al., 2010); o metabólico, como la diabetes (Larsen et al., 2010) y obesidad (Ridaura et al., 2013). Debido a esta bipolaridad de la microbiota, algunos autores la consideran como *tu mejor amienemigo*. En este marco, los probióticos podrían corregir la homeostasis intestinal actuando a distintos niveles.

1.2. Probióticos: definición y características.

A principios del siglo XX, Elie Metchnikoff observó que los campesinos búlgaros, que ingerían grandes cantidades de leche agria, llegaban a una edad muy avanzada, y pensó, que esta observación podría tener alguna utilidad cuando se producía el *envenenamiento de los tejidos* provocado por los microorganismos del intestino. El término probiótico comenzó a utilizarse en 1965 por Lilly y Stillwell como “sustancias producidas por un microorganismo que favorecen el crecimiento de otros”, usándose como término contrario a **antibiótico**. Posteriormente, Parker definió los probióticos como organismos y sustancias que contribuyen al **balance intestinal**. Y en 1989, Fuller, introdujo en la definición los conceptos de microorganismos **vivos** y con **efectos positivos** sobre el hospedador (Fuller, 1992). En la actualidad, según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO), los probióticos son “microorganismos vivos, que administrados en la cantidad adecuada confieren beneficios a la salud del hospedador” (FAO/WHO., 2002).

Los microorganismos que forman parte de los probióticos son fundamentalmente bacterias acidolácticas (BAL) Gram-positivas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Otras bacterias pertenecientes a los géneros *Streptococcus* (*S. thermophilus*), *Bacillus* (*B. cereus*), *Escherichia* (*E. coli* Nissle), *Enterococcus* (*E. faecalis*, *E. faecium*), *Propionibacterium* (*P. freudenreichii*) y *Pediococcus* (*P. pentosaceus* NB-17) tienen también propiedades probióticas. Aparte de bacterias, se han descrito hongos con propiedades probióticas pertenecientes a los géneros *Saccharomyces* (*S. boulardii*) y *Aspergillus* (*A. oryzae*) (Williams, 2010). Los

diferentes efectos de los probióticos son dependientes de la cepa, por lo tanto, no se pueden generalizar los efectos positivos de una cepa a toda la especie.

Para ser consideradas bacterias probióticas, los microorganismos deben reunir ciertas características como, haber sido reconocidas como bacterias seguras (GRAS) por distintos grupos investigadores, ser estables en el almacenamiento, tolerar el ácido y la bilis en el proceso de digestión, colonizar el epitelio intestinal del hospedador y reproducirse, tener una actividad antagonista contra bacterias patógenas y mantener el balance de la microbiota. Según la plataforma industrial para las bacterias acidolácticas (LABIP), hay que realizar ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* en animales para determinar la resistencia de los probióticos al ácido y a la bilis, la adherencia a la mucosa intestinal, los efectos sobre células inmunocompetentes y su antimutagenicidad. Estos estudios ayudarían a seleccionar microorganismos como probióticos potenciales para ser ensayados *a posteriori* en humanos (Guarner and Schaafsma, 1998).

Los probióticos no solo ejercen efectos beneficiosos a nivel local en el intestino, sino también a nivel sistémico. En el intestino, los probióticos incrementan la resistencia de la barrera epitelial, favorecen la secreción de mucus, poseen actividad antimicrobiana, compiten con los patógenos por el espacio y por los nutrientes y activan la inmunidad innata y adaptativa (Sherman et al., 2009). Además de estas funciones, los probióticos son capaces de paliar los síntomas de varias enfermedades gastrointestinales, como diarreas (causadas por rotavirus, antibióticos o la diarrea del viajero), infecciones por *Clostridium difficile*, síndrome del intestino irritable (SII), enterocolitis necrotizante (ECN), enfermedad celiaca y enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Los probióticos también pueden actuar sobre infecciones del aparato genitourinario, eccema atópico, hígado graso y asma (Williams, 2010). Cuando el sistema inmunológico está comprometido, la administración de probióticos puede ser perjudicial desencadenando una bacteremia, aunque son muy pocos los casos clínicos en lo que esto ha sucedido (Williams, 2010).

2. EPITELIO INTESTINAL.

El epitelio intestinal posee varios mecanismos para evitar que los microorganismos del lumen lo atraviesen. En las zonas del intestino donde la carga bacteriana es mayor, hay una estratificación de la microbiota, generada por el mucus, y una compartimentalización de la respuesta inmunológica en la lámina propia (Hooper et al., 2012).

2.1. El mucus.

El **mucus**, es secretado por las células caliciformes presentes tanto en el intestino delgado como en el grueso. Su principal función es separar la carga bacteriana presente en el lumen de las células epiteliales intestinales (CEI). A lo largo del colon, el mucus forma dos capas, una en contacto con los enterocitos que permanece estéril y otra más superficial donde están alojadas las bacterias. Sin embargo en el intestino delgado, no se aprecia esta división en capas (Johansson et al., 2011). El mucus está formado por distintos tipos de proteínas denominadas mucinas, principalmente por MUC2. Los probióticos favorecen la expresión de mucus en el intestino, por ejemplo, la mezcla de probióticos VSL#3 (que incluye 4 especies de lactobacilos: *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*; 3 especies de bifidobacteria: *B. infantis*, *B. breve*, *B. longum*; y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*) incrementa la secreción de Muc2 en el colon de ratas (Caballero-Franco et al., 2007). Este efecto también se ha observado en la línea HT-29 procedente de un adenocarcinoma colorectal humano, donde *L. acidophilus* A4 indujo un incremento en la expresión de *MUC2* impidiendo por lo tanto la adherencia de una cepa patógena de *E. coli* (Kim et al., 2008a). Además de mucinas, las células caliciformes también secretan otro tipo de sustancias, como los factores Trefoil, que participan en la reparación del epitelio (Hoffmann, 2005) e incrementan la resistencia de la barrera epitelial (Meyer zum Buschenfelde et al., 2006). Aunque en este caso, VSL#3 no afectó a su expresión en el colon de ratas (Caballero-Franco et al., 2007). Las células de Paneth, presentes en las criptas, y los enterocitos, son capaces de sintetizar distintos compuestos con capacidad antimicrobiana que degradan la pared bacteriana (lisozima, fosfolipasa A₂, defensinas, etc.), ARN (Angiogengina-4), o

impiden el uso de metales esenciales (lipocalina 2) por parte de las bacterias (Bevins and Salzman, 2011, Mukherjee et al., 2008). Además de las células presentes en el epitelio, las células de la lámina propia, como macrófagos o neutrófilos, también participan en la síntesis de estas moléculas (Mukherjee et al., 2008). Otra molécula implicada en el control de la propagación bacteriana en el mucus es la IgAs, que es sintetizada por las células plasmáticas y forma agregados bacterianos impidiendo su paso hacia el epitelio. Ciertos probióticos, además de ser capaces de inducir la producción de moléculas antimicrobianas, como la β -defensina 2 por parte del epitelio (Schlee et al., 2008), o IgAs por las células plasmáticas (Ibnou-Zekri et al., 2003), pueden actuar directamente también sobre otras bacterias secretando sustancias bactericidas (Tejero-Sarinena et al., 2012).

2.2. Los enterocitos.

Los enterocitos constituyen el 80% de las células del epitelio intestinal. Son células altamente polarizadas con distintos dominios bioquímicos y funcionales en la membrana plasmática. La superficie apical del enterocito está cubierta por microvellosidades que forman el borde en cepillo, aumentando la superficie de absorción. El borde apical está cubierto por una capa de glicoproteínas, denominada glicocáliz, que forma una barrera. La composición del glicocáliz, abundante en enzimas pancreáticas, facilita la digestión y la absorción de nutrientes. Las microvellosidades están formadas por filamentos de actina que aporta rigidez y ayuda a mantener el paralelismo entre las microvellosidades. Si las microvellosidades se mueven de manera simultánea hacia la misma dirección, la distancia entre ellas disminuye hasta los 25 nM (rango de las macromoléculas). Por estas características, las microvellosidades y el glicocáliz constituyen otra barrera que deben pasar los antígenos (Snoeck et al., 2005).

Las células madre de los enterocitos se encuentran en las criptas y migran hacia la punta de la vellosidad mientras se van diferenciando a enterocitos funcionales. La homeostasis epitelial del intestino se basa en un delicado equilibrio entre la renovación y la proliferación. Bajo condiciones de inflamación, se acelera la proliferación y la renovación del epitelio, incrementándose la permeabilidad de la

barrera (Vereecke et al., 2011, van der Flier and Clevers, 2009). Además, varios factores como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α), interferón gamma (IFN γ), interleucina (IL)-1 β o IL-13, pueden afectar a la barrera intestinal incrementando su permeabilidad (Capaldo and Nusrat, 2009).

2.2.1. Complejos de unión entre los enterocitos.

Los enterocitos constituyen por sí mismos una barrera gracias a los **complejos de unión** que se forman entre las células y que se localizan a distintas alturas de la membrana lateral. Estas uniones están constituidas por proteínas transmembrana y citosólicas que se anclan al citoesqueleto celular mediante proteínas de soporte. En los enterocitos, los complejos de unión se clasifican principalmente en uniones estrechas, adherentes y desmosomas. Las uniones adherentes y los desmosomas establecen puentes entre las células vecinas para facilitar la formación de las uniones estrechas, que se localizan en la zona más apical de la membrana lateral. Las uniones estrechas están formadas por un complejo multiproteico y dinámico que controla el transporte paracelular de solutos e iones, e impide el paso de antígenos y microorganismos desde el lumen. Tanto la formación como la desestabilización de las uniones estrechas están controladas por procesos de fosforilación. Las uniones estrechas que se encuentran entre las células del epitelio intestinal están formadas principalmente por claudinas, ocludinas y proteínas de adhesión de unión. Las proteínas de soporte que unen estas proteínas al citoesqueleto son las zonula occludens (**ZO**) (Fig. 1) (Groschwitz and Hogan, 2009).

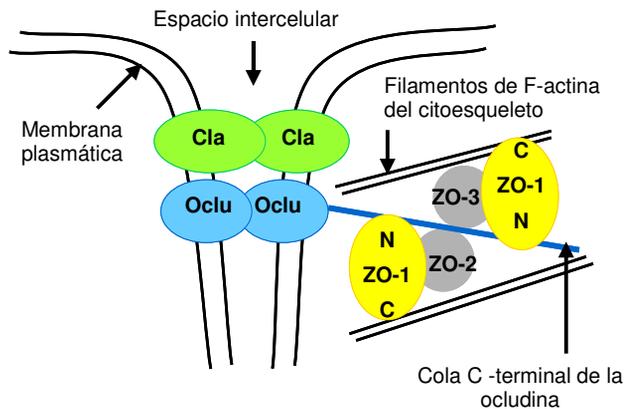


Figura 1. Esquema de la interacción de las distintas proteínas que forman las uniones estrechas. La cola C-terminal de la ocludina sirve de anclaje para las proteínas de soporte ZO. La proteína ZO-1 sirve de unión entre la ocludina y los filamentos de actina, en cambio ZO-2 y ZO-3 interaccionan con ZO-1 y con la ocludina. La ocludina también puede unirse directamente al citoesqueleto. Basado en Ward *et al* (2000).

Clau: claudina; Oclu: ocludina; ZO: zonula occludens.

La ZO-1 une su extremo C-terminal a los filamentos de F-actina del citoesqueleto, mientras que su extremo N-terminal se une a la cola citosólica C-terminal de la ocludina. La ZO-2 se une tanto a la ocludina como a ZO-1, al igual que la ZO-3. Sin embargo, ZO-2 y ZO-3 no interaccionan entre sí (Fig. 1) (Ward et al., 2000). Además de participar en las funciones de transporte, las uniones estrechas también son importantes para la polarización celular de los enterocitos (Pinto and Zweibaum, 1983). La inflamación crónica, como la que se observa en la EII, suele estar asociada a fallos en las uniones estrechas que hacen que la barrera intestinal sea más permeable a los antígenos del lumen (Schulzke et al., 2009). Debido a este incremento en la permeabilidad, el sistema inmunológico asociado a la mucosa intestinal desencadena una reacción exacerbada hacia la microbiota, alterando de este modo la homeostasis intestinal. Factores como las citocinas inflamatorias (Capaldo and Nusrat, 2009), toxinas o bacterias (Berkes et al., 2003) pueden influir negativamente en el estado de las uniones estrechas. Los probióticos pueden actuar sobre el epitelio incrementando la resistencia de la barrera o contrarrestando los efectos negativos que estos factores desencadenan. Por ejemplo, la mezcla probiótica VSL#3 mantiene la estabilidad de la barrera intestinal evitando la reestructuración de las uniones estrechas en un modelo de colitis en ratón (Mennigen et al., 2009). Otro

ejemplo es el probiótico *L. plantarum*, que contrarresta la disminución de la resistencia transepitelial eléctrica (RTE) en células Caco-2 estimuladas con *E. coli* enteroinvasiva evitando la redistribución de las uniones estrechas (Qin et al., 2009).

2.2.2. Presentación antigénica mediada por los enterocitos.

Aunque en el apartado 3 se explicará más en profundidad la presentación antigénica, aquí comentaremos brevemente las características de los enterocitos como células presentadoras de antígeno.

En un primer momento, se observó que las CEI eran capaces de procesar y presentar los antígenos a los linfocitos T. Debido a la alta proporción de enterocitos presentes en el epitelio, se consideró que probablemente fueran estas células las que actuaran como células presentadoras de antígeno (CPA) (Campbell et al., 1999). Los enterocitos son capaces de capturar antígenos solubles vía endolisosomal, procesarlos mediante los complejos ricos en el complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II (MHC-II) (MIIC) y presentarlos mediante las moléculas MHC-II en la membrana basolateral. En condiciones basales, los enterocitos no presentan moléculas coestimuladoras en la superficie, por lo tanto, no son eficaces realizando la presentación antigénica e inducen un estado de anergia o tolerancia sobre los linfocitos T (Snoeck et al., 2005). En condiciones de inflamación, se incrementa la expresión de las moléculas MHC-II y los enterocitos presentan los antígenos a los linfocitos T intraepiteliales y de la lámina propia. La activación de los linfocitos CD4⁺ se realiza mediante el receptor CD58, presente en los enterocitos, y CD2, presente en los linfocitos CD4⁺. En cambio, para los linfocitos CD8⁺, la presentación se realiza mediante moléculas MHC de clase Ib presentes en los enterocitos (Snoeck et al., 2005, Hershberg and Mayer, 2000).

3. CÉLULAS DENDRÍTICAS: regulación de la respuesta inmunológica.

Las células dendríticas (CD) fueron descubiertas en la década de los años 70 por Ralph Steinman y Zanvil Cohn. Se identificaron en cultivos adherentes de células del bazo de ratón, ya que poseían una morfología distinta al resto de células, porque emitían una serie de prolongaciones alargadas como las dendritas (Steinman and Cohn, 1973). En la actualidad, se conoce que las CD tienen un papel clave en el desarrollo de la inmunidad y son el eslabón de unión entre la inmunidad innata y la adaptativa.

3.1. Presentación de antígenos y activación de los linfocitos T por las células dendríticas

El **modo de acción** de las CD se puede dividir en 3 partes. Primero, capturan y procesan los antígenos. Segundo, maduran y migran hacia los nódulos linfáticos, donde realizan la presentación antigénica a los linfocitos. Y por último, actúan como adyuvantes en la activación de los linfocitos (Steinman, 1991, Cella et al., 1997b).

3.1.1. Reconocimiento y captura de los antígenos.

Las CD se originan en la médula ósea y migran a los tejidos periféricos que presentan una gran carga antigénica como la piel, el intestino o los pulmones. En estos tejidos, las CDi se encuentran en un estado inmaduro actuando como centinelas ante los antígenos que encuentran. En presencia de patógenos o antígenos dañinos, las CD inmaduras (CDi) secretan rápidamente grandes cantidades de citocinas y quimiocinas para atraer a CDi y otras células de la inmunidad innata, como neutrófilos, macrófagos, granulocitos etc., al lugar de la agresión. En los tejidos, las CDi son muy eficientes capturando los antígenos, pero al poseer pocas moléculas MHC-II y moléculas coestimuladoras no son eficaces realizando la función de presentación antigénica a los linfocitos T. Las CDi disponen de varios mecanismos para capturar los antígenos, como fagocitosis, macropinacitosis (extendiendo vesículas pinocíticas), o

endocitosis adsorptiva mediada por receptores. Una vez que las CDi han capturado el antígeno, éste es procesado y comienza el proceso de maduración (Banchereau et al., 2000).

Las CD están equipadas con receptores de reconocimiento de patrones (PRR) mediante los cuales reconocen un amplio rango de antígenos presentes en diversos microorganismos.

3.1.2. Maduración de las células dendríticas.

La maduración de las CDi puede ser desencadenada por varios factores, como: estructuras que forman parte de los microorganismos (lipopolisacárido (LPS), peptidoglicano (PGN), material genético, etc.), moléculas pro-inflamatorias (TNF α , IL-1 β , prostaglandina E2 (PGE-2)), señales procedentes de los linfocitos T, inmunoglobulinas, o incluso muerte celular (Banchereau et al., 2000). Una vez que las CD entran en contacto con los antígenos se ponen en marcha dos mecanismos, la maduración de las CD y un incremento en la supervivencia de la célula, que involucran la activación de las quinasas reguladas por señales extracelulares (ERKs) y al factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF- κ B). El NF- κ B es imprescindible para la maduración de las CD, aunque no influye en su supervivencia (Rescigno et al., 1998). El proceso de maduración también implica cambios morfológicos en las CDs, un incremento en la expresión de receptores de quimiocinas y moléculas de adhesión, y cambios en el citoesqueleto que favorecen la migración de las CD desde los tejidos periféricos hacia los ganglios linfáticos secundarios (Banchereau et al., 2000).

Las CD son CPA, pero a diferencia de otras células que también fagocitan, como los macrófagos, en las CDi los antígenos no son degradados del todo hasta aminoácidos, sino que se procesan y se unen a moléculas MHC, de tipo I (MHC-I) o de tipo II (MHC-II). La presentación antigénica a los linfocitos T se realiza a través de los MHCs. Para el **MHC-I**, los antígenos capturados se procesan mediante el proteosoma y se dirigen hacia el retículo endoplasmático, donde se cargan en el MHC-I y se exponen en la superficie celular para ser reconocidos por el receptor de

las células T (TCR) de los linfocitos CD8⁺. En cambio, los péptidos cargados en el **MHC-II** son procesados mediante el endosoma y dirigidos hacia los compartimentos MHC, donde se produce la unión del péptido al MHC-II. Posteriormente, el MHC-II unido al péptido viaja a la superficie celular para ser reconocido por el TCR de los linfocitos CD4⁺ (Banchereau et al., 2000, Banchereau and Steinman, 1998). La activación de las CD incrementa el número y la vida media de las moléculas MHC sobre la superficie celular, incrementando de esta manera, el número de epítomos expuestos durante la presentación antigénica (Cella et al., 1997a).

Para que se complete la activación de los linfocitos T, además del reconocimiento de los antígenos mediado por las moléculas MHCs, es necesario un incremento de moléculas coestimuladoras (CD40, CD86 y CD80) en la superficie de las CD. La ausencia de estas señales coestimuladoras impide la proliferación de los linfocitos T, entrando en un estado de anergia (Corthay, 2006).

Las moléculas **CD86** y **CD80** intervienen en una de las principales rutas coestimuladoras, ya que la unión de estas moléculas a su ligando CD28, en los linfocitos T, estabiliza el ARN e incrementa la síntesis de IL-2, necesaria para la expansión de los linfocitos (Lanier et al., 1995, Hubo et al., 2013). Por otro lado, estas mismas moléculas tienen también una función reguladora, ya que su unión al receptor CTLA-4 (antígeno 4 asociado a linfocito T citotóxico), presente en los linfocitos T activados, inhibe su activación. Otra molécula coestimuladora, el **CD40**, presente en las CDs activadas, desencadena dos tipos de respuestas cuando se une a su ligando (CD40L) expresado sobre los linfocitos T. Si el CD40L se expresa débilmente, se induce la síntesis de IL-10 y los linfocitos T entran en estado de anergia. En cambio, si la interacción CD40-CD40L es fuerte, se favorece la presentación antigénica mediante el incremento de la expresión del MHC, moléculas coestimuladoras, moléculas de adhesión y citocinas como la IL-12 (Tuettenberg et al., 2010, Hubo et al., 2013). La molécula **CD83**, aunque no forma parte de las moléculas coestimuladoras típicas, participa activamente en la activación de las CD, y en la proliferación y síntesis de IFN γ por parte de los linfocitos T (Aerts-Toegaert et al., 2007). Además, CD83 también puede actuar como modulador de la respuesta inmunológica, ya que su forma soluble

es capaz de inhibir la interacción de las CD con los linfocitos T (Lechmann et al., 2002).

3.1.3. Polarización de los linfocitos T.

El proceso de maduración implica la migración de las CD hacia los nódulos linfáticos donde transmiten la información recibida en los tejidos a los linfocitos T. El tipo de respuesta que producirán las CD depende de tres señales: los antígenos que han procesado (señal 1), la expresión de moléculas coestimuladoras (señal 2) y la presencia de factores solubles, como por ejemplo IL-4, IFN γ , TNF α , IL-12, o IL-6, (señal 3). Estos factores solubles pueden ser producidos por las mismas CDs, otras células del sistema inmunitario innato o por células tisulares. El conjunto de estas 3 señales influirá en el tipo de respuesta de los linfocitos (Corthay, 2006, Kalinski et al., 1999).

El tipo de respuesta que inducirán las CD maduras (CDm) sobre los linfocitos T se puede clasificar en 4 tipos (Fig. 2):

- **Th1:** este tipo de respuesta es desencadenada por diversos tipos de agentes infecciosos como virus, bacterias y protozoos. Su diferenciación depende principalmente de la IL-12, que a su vez depende del IFN γ . Los linfocitos Th1 producen principalmente factores de carácter proinflamatorio como INF γ , TNF α/β , IL-2, etc. Los linfocitos Th1 tienen un papel muy importante en las infecciones por virus, ya que además de producir IFN γ , participan en la activación de linfocitos CD8⁺ citotóxicos (CTL) que matan a las células infectadas por el virus (Banchereau and Steinman, 1998, Kapsenberg, 2003, Walsh and Mills, 2013).
- **Th2:** los linfocitos Th2 tienen un papel muy importante en infecciones por helmintos y producen principalmente IL-4, IL-5 e IL-13, y el principal factor desencadenante es la IL-4. Algunos factores tisulares secretados por las células epiteliales, como la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP), IL-33 e IL-25, favorecen la diferenciación hacia un perfil de tipo Th2 (Kapsenberg, 2003, Soumelis et al., 2002, Pulendran et al., 2010, Walsh and Mills, 2013).

· **Th17**: los linfocitos Th17 están involucrados en procesos autoinmunes. Producen principalmente IL-17A, IL-17F, IL-22 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF). En su diferenciación participan la IL-23, la IL-6 y el TGF β . Otras citocinas, como la IL-21 y la IL-1 β , promueven la diferenciación y la expansión de este perfil. Como se mencionó anteriormente en el apartado 1.1 (página 4), la microbiota intestinal puede influir en la diferenciación de los linfocitos Th17 (Walsh and Mills, 2013).

· **T reguladores (Treg)**: existen 3 poblaciones distintas de linfocitos Treg de acuerdo con su origen. Por un lado, los linfocitos Treg pueden ser generados directamente en el timo y presentan el factor de transcripción FoxP3 (*forkhead box P3*), denominándose linfocitos Treg naturales (nTreg) Foxp3⁺. Sin embargo, su diferenciación también puede ocurrir en la periferia gracias al TGF β y a la IL-10, dando lugar a dos tipos diferentes de linfocitos Treg inducibles (iTreg). El TGF β es capaz de inducir la expresión de Foxp3 en linfocitos Foxp3⁻, dando lugar a los linfocitos Th3 que producen grandes cantidades de TGF- β . En cambio, la IL-10 favorece la diferenciación de linfocitos denominados Tr1, que producen IL-10 y cuya diferenciación puede estar asociada a procesos de infección (Thompson and Powrie, 2004, Jonuleit and Schmitt, 2003).

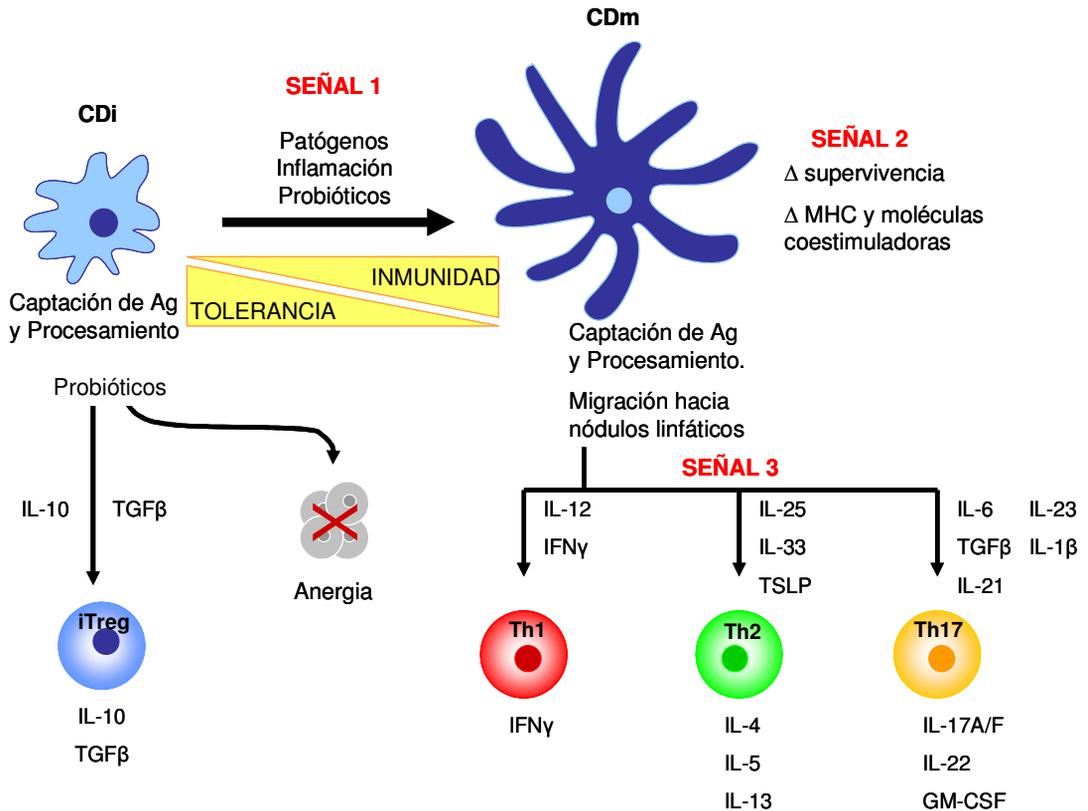


Figura 2. Esquema de los diferentes perfiles que pueden adoptar los linfocitos en función de las señales que reciben. En condiciones de inflamación, desencadenada por diversos factores, se produce la activación y maduración de las CDi. Dependiendo de la naturaleza de estos factores (señal 1), desencadenarán un determinado perfil sobre los linfocitos T vírgenes. Si durante el proceso de maduración las CD han incrementado el número de moléculas MHC-II y de moléculas coestimuladoras (señal 2), y si en el ambiente hay factores solubles que favorezcan la polarización de los linfocitos T vírgenes (señal 3), estos se diferenciarán hacia linfocitos Th1, Th2 o Th17. Sin embargo, si alguna de estas señales se encuentra ausente, las CDs pueden inducir un estado de anergia (no proliferación de linfocitos T) o la diferenciación de linfocitos Treg. De este modo las CDm favorecen un proceso de inmunidad, y las CDi favorecen la tolerancia hacia los antígenos. Ag: antígeno; CD: célula dendrítica; CDi: CD inmadura; CDm: CD madura.

Aunque a nivel general las funciones y características de los linfocitos anérgicos y reguladores son similares, se identificaron diferencias importantes cuando se analizó su perfil genético, lo cual explicaba que en determinadas situaciones tuvieran un comportamiento dispar (Knoechel et al., 2006). Algunos probióticos inducen un estado semimadurativo en las CD ya que son capaces de incrementar los

niveles de MHC-II y de las moléculas coestimuladoras en las CD, pero sin embargo, esas CD no son capaces de inducir la expansión de los linfocitos. Se ha observado, que esta falta de respuesta por parte de los linfocitos podría ser debido a la falta de factores solubles como la IL-12 (Walsh and Mills, 2013, Lutz and Schuler, 2002).

3.2. Tipos de células dendríticas.

Las células dendríticas se pueden clasificar, según sus funciones y características fenotípicas, en dos subpoblaciones: las células dendríticas plasmacitoides (CDp), y las células dendríticas convencionales (CDc) que abarcan al resto de CD.

- **Células dendríticas plasmocitoides:** las CDp forman una pequeña población y tienen un origen similar al de las CDc, aunque su ciclo de vida es distinto. Se encuentran principalmente en la sangre y en los tejidos linfoides, y son capaces de migrar hacia los nódulos linfáticos a través de la sangre. En condiciones basales expresan bajos niveles de MHC-II, de moléculas coestimuladoras y de la integrina CD11c. Las CDp tienen un papel muy importante en el reconocimiento de virus y del material genético derivado de virus, ya que secretan grandes cantidades de IFN de tipo I (IFN α/β). Además, son potentes inductoras de linfocitos Treg en el timo (Reizis et al., 2011).

- **Células dendríticas convencionales:** las CDc están presentes en los tejidos y, debido a sus características, son capaces de inducir una respuesta inmunológica hacia cualquier antígeno que produzca una agresión. Estas características son: poseer una capacidad superior de procesamiento y presentación de antígeno que otras CPA como linfocitos B o monocitos; capacidad para migrar a los nódulos linfáticos cargadas con los antígenos, tanto en condiciones basales como en condiciones de inflamación; polarizar a linfocitos T hacia diversos perfiles dependiendo de los estímulos que hayan recibido y las características que hayan adoptado al madurar (Merad et al., 2013).

Los monocitos pueden ser precursores de las CDs y, bajo determinadas condiciones de cultivo se diferencian *in vitro* hacia CDs (**CDs derivadas de**

monocitos, CDmo). Las CDmo poseen características comparables a las CDc en cuanto a las funciones de procesamiento, maduración y presentación de antígeno a los linfocitos. Debido a estas características, las CDmo son utilizadas ampliamente como modelo de CD. Sin embargo, aunque los monocitos y las CD comparten un precursor mielóide común (que se explicará a continuación), en condiciones basales los monocitos no se diferencian *in vivo* hacia CD, sino que esto ocurre bajo condiciones de inflamación (Liu and Nussenzweig, 2010, Andersson et al., 2012).

3.3. Origen.

Los modelos actuales proponen que los monocitos, los macrófagos y las CD, procedentes de la sangre, tienen su origen en las células madre hematopoyéticas que se diferencian en la médula ósea a precursores mieloides (PM) y a precursores linfoides (PL). Los PM dan lugar a los precursores de monocitos/macrófagos y CD (PMD), los cuales a su vez se diferenciarán en monocitos y en precursores comunes de las CD (PCD). Los PCD, darán lugar a las CDp y a pre-CDc. En condiciones basales, las pre-CDc migran por la sangre hacia tejidos linfoides (bazo) y tejidos no linfoides como la lámina propia, donde terminarán de diferenciarse y madurar. Mientras que en condiciones de inflamación, los monocitos pueden migrar desde la sangre hacia el tejido dañado y diferenciarse a macrófagos o a CD inflamatorias (Geissmann et al., 2010).

4. RECEPTORES DE RECONOCIMIENTO DE PATRONES .

Como se ha comentado en el apartado anterior, las CD actúan como centinelas reconociendo eficazmente los antígenos gracias a los receptores de reconocimiento de patrones (**PRR**). Las CD, mediante los PRR, son capaces de reconocer distintos patrones moleculares asociados a microorganismos (**MAMP**). Aunque la nomenclatura original para este concepto es PAMP (patrones moleculares asociados a patógenos), he preferido utilizar el término MAMP que utilizan algunos autores, debido a que las bacterias comensales y probióticas también son reconocidas por los PRR pero no son patógenos. Estos receptores forman parte del sistema de defensa innato y mediante distintas combinaciones, las CD reconocen un amplio rango de estructuras derivadas de los microorganismos, del propio individuo e incluso sustancias sintéticas.

Los PRR incluyen 4 familias de proteínas:

- Receptores tipo Toll (TLR, *Toll-like receptor*): receptores transmembrana presentes tanto en la membrana externa como en vesículas citoplasmáticas. Reconocen la presencia de diversos componentes de los microorganismos.
- Receptores tipo Dominio de Oligomerización de Nucleótidos (NLR, *nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like Receptor*): receptores citoplasmáticos que pueden desencadenar tanto la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , como una respuesta basada en el IFN de tipo I.
- Receptores tipo C-lectina (CLR, *C-type Lectin Receptor*): receptores de membrana que reconocen un amplio rango de MAMP pertenecientes a bacterias y hongos.
- Receptores tipo Gen-I Inducible por Acido Retinoico (RLR, *Retinoic Acid-Inducible Gene I-Like Receptor*): helicasas de ARN que reconocen el ARN de virus que se ha liberado al citoplasma y activan IFNs de tipo I.

A continuación se explicarán más en detalle los TLR y los NLR.

4.1. Receptores tipo Toll: características y funciones.

El descubrimiento de los TLR se asocia a los receptores Toll que se identificaron por primera vez en *Drosophila*, donde su función se relacionó primero con su desarrollo embrionario (Hashimoto et al., 1988) y posteriormente con la inmunidad antifúngica del insecto (Lemaitre et al., 1996). A finales de la década de los 90 se identificó su homólogo en humanos (hToll) y se observó que su activación inducía la síntesis de citocinas y de moléculas coestimuladoras como CD86 (Medzhitov et al., 1997).

Los TLR son proteínas transmembrana de tipo I altamente conservadas en la evolución. Poseen un dominio extracelular con repeticiones ricas en leucinas y un dominio citoplasmático homólogo al receptor de la IL-1 (IL-1R), denominado TIR (Anderson, 2000). En humanos, se han identificado 10 proteínas (TLR1-10) y se encuentran presentes de manera variable y específica tanto en los leucocitos (Muzio et al., 2000) (Tabla 1), como en células no relacionadas con el sistema inmunológico como el endotelio vascular (Faure et al., 2001), el epitelio intestinal (Gribar et al., 2008), cardiomiocitos (Chao, 2009) y adipocitos (Vitseva et al., 2008). En conjunto, los diferentes miembros de esta familia son capaces de reconocer múltiples antígenos (LPS, PGN, lípidos, etc.) presentes en gran variedad de microorganismos (bacterias, virus, hongos, protozoos), moléculas propias del organismo (hsp60, fibronectina) o compuestos sintéticos (taxol). Además, pueden incrementar la especificidad del reconocimiento de diversos antígenos formando heterodímeros como los formados por TLR2 con TLR6 y con TLR1 (Tabla 1).

Los TLR se encuentran tanto en la superficie celular (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5 y TLR6), donde se encargan de reconocer estructuras y componentes de la pared microbiana, como en el interior celular (TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9) anclados a vesículas, donde reconocen principalmente material genético de virus y bacterias procedentes de la endocitosis (Kumar et al., 2009). La localización vesicular de los TLR intracelulares, que reconocen material genético, es muy importante para evitar

reacciones autoinmunes con el propio material genético del organismo (Barton et al., 2006).

La unión de los TLR con sus correspondientes ligandos desencadena en el citoplasma la unión del dominio TIR con diferentes adaptadores. Estos adaptadores son: la proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (**MYD88**); la proteína adaptadora que contiene el dominio TIR (**TIRAP**), que une MYD88 con TLR2 y con TLR4; el adaptador inductor de IFN β que contiene el dominio TIR (**TRIF**) para TLR3 y para TLR4; y la molécula adaptadora para TRIF (**TRAM**) para el TLR4 (Tabla 1).

El adaptador **MYD88**, que sirve para todos los TLR a excepción del TLR3, recluta proteínas de la familia de las quinasas asociadas al IL-1R (IRAK), que una vez fosforiladas se separan de MYD88 y se unen al factor 6 asociado al receptor del TNF α (TRAF6), una E3 ligasa que a su vez se une a un complejo enzimático de ubiquitinas (Ubc13-Uev1A) que mediante poliubiquitinación, activan a la quinasa activada por el TGF β (TAK-1). TAK-1, en combinación con las proteínas de unión a TAK1 (TAB1, TAB2 y TAB3), activa tanto la ruta de la proteína activadora (AP-1) mediante las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), como la ruta del NF- κ B, mediante el complejo de quinasas del inhibidor del NF- κ B (IKKs) (Fig. 2).

El adaptador **TRIF**, que se une al TLR3 y al TLR4 (al TLR4 a través de **TRAM**), es indispensable para la ruta independiente de MYD88. Activa a los promotores del IFN β , al NF- κ B y a las MAPK. TRIF puede unirse a TRAF6, o bien a la proteína-1 que interacciona con el receptor (RIP-1), cuya finalidad es activar a TAK-1 y desencadenar la subsiguiente activación del NF- κ B. La vía TRIF puede también activar los promotores para los IFNs de tipo I formando un complejo con TRAF3 e IKKs no canónicas (IKKi y TBK1), que fosforilarán al factor regulador del IFN-3 (IRF3). IRF3 forma un dímero que se translocará al núcleo y activará los genes de IFNs de tipo I y genes inducidos por el IFN. La activación mediante IRF3 está relacionada con la activación del NF- κ B tardía, que requiere la síntesis de *nov*o de TNF α .

Los TLR7/8 y TLR9 pueden activar tanto las rutas del NF- κ B y del AP-1, a través de la vía dependiente de MYD88-TRAF6, como la síntesis de IFN de tipo I y de genes inducidos por el IFN mediante la translocación al núcleo de distintos IRFs. Uno de los IRFs que activan el TLR7/8 y el TLR9 es IRF7, que dimeriza y se transloca al núcleo mediante fosforilación por IRAK1 o mediante ubiquitinación por TRAF6 (Fig. 2) (Kawai and Akira, 2007b, Kawai and Akira, 2006, Takeda and Akira, 2004).

La inducción de IFN de tipo I es imprescindible para la activación de la inmunidad innata y su producción se regula a nivel transcripcional mediante los IRF. Los interferones (denominados así porque interfieren en la replicación de los virus) se clasifican en 3 tipos. Dentro de los IFNs de tipo I, el más estudiado es el IFN β (Honda et al., 2006). El IFN β además de participar en las infecciones virales, tiene también un papel importante en infecciones por otros tipos de patógenos. Además, puede cooperar en la respuesta desencadenada por algunos TLR en las CDmo (Gautier et al., 2005).

Como se ha mencionado, el **NF- κ B** es un factor de transcripción que se activa mediante la unión de los TLR a sus ligandos correspondientes (Kawai and Akira, 2007a). El NF- κ B está formado por homodímeros o heterodímeros de proteínas pertenecientes a la familia REL, la cual está formada por 5 miembros (RELA, RELB, C-REL, p50 y p52). En condiciones basales, el dímero NF- κ B se mantiene de manera inactiva en el citoplasma celular gracias a su unión con proteínas inhibitoras I κ Bs, una familia de 7 miembros. Diversos estímulos como patógenos, citocinas (TNF α , IL-1 β) o moléculas de estrés, son capaces de desencadenar la activación del complejo IKK encargado de fosforilar a las proteínas inhibitoras I κ Bs, marcándolas para su posterior ubiquitinación. De este modo, el dímero NF- κ B es capaz de translocarse al núcleo y se une a determinados promotores en función de las proteínas que formen el dímero. El NF- κ B activa la transcripción de numerosos genes involucrados en la inmunidad innata y también aquellos relacionados con factores de crecimiento y supervivencia (Kumar et al., 2004a). Aunque hay estudios que han demostrado la capacidad antiapoptótica de la activación del NF- κ B, también se ha observado lo contrario cuando su acción se une junto a la de AP-1 (Hawiger, 2001, Tripathi and Aggarwal, 2006, Pasparakis, 2009).

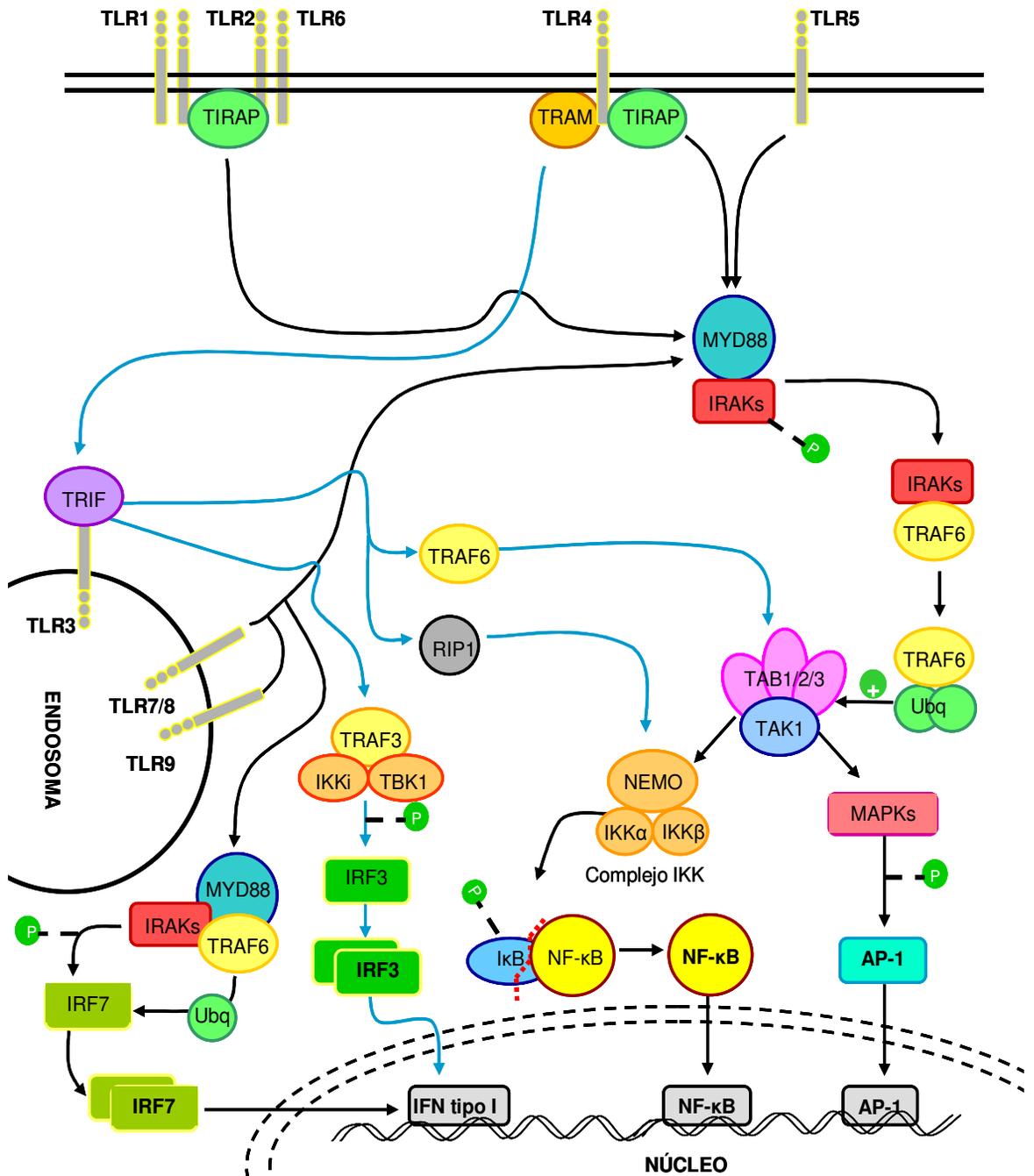


Figura 3. Esquema de la ruta de activación de los TLR. Los TLR están localizados en la superficie celular y en vesículas citoplasmáticas como los endosomas. La unión de sus ligandos desencadena la activación de dos rutas principales según los adaptadores que se vean involucrados, la dependiente de MYD88 (flecha negra) y la dependiente de TRIF (flecha azul). El adaptador MYD88 es común a todos los TLR, excepto a TLR3 cuyo adaptador es TRIF. La ruta de MYD88 recluta proteínas de la familia IRAK, que una vez fosforiladas se separan de MYD88 y se unen a TRAF6, que a su vez, se une a un complejo enzimático de ubiquitinas (Ubc13-Uev1A) que, mediante poliubiquitinación, activan a TAK-1. TAK-1, en combinación con las proteínas de unión TAB1, TAB2 y TAB3, activa tanto la ruta AP-1 mediante las MAPK, como la ruta del NF- κ B, mediante el complejo IKK. Los TLR7/8 y TLR9 pueden activar tanto las rutas del NF- κ B y del AP-1, a través de la vía dependiente de MYD88-TRAF6, como la síntesis de IFN de tipo I y de genes inducidos por el IFN mediante la translocación al núcleo de distintos IRF. Uno de los IRF que activan el TLR7/8 y el TLR9 es IRF7, que dimeriza y se transloca al núcleo mediante fosforilación por IRAK1 o mediante ubiquitinación por TRAF6. TRIF también puede activar los mismos mecanismos pero solo a través del TLR3 y el TLR4. TRIF, que se une al TLR3 y al TLR4 (al TLR4 a través de TRAM), es indispensable para la ruta independiente de MYD88. Activa a los promotores del IFN β , al NF- κ B y a las MAPK. TRIF puede unirse a TRAF6, o bien a RIP-1, cuya finalidad es activar a TAK-1 y desencadenar la subsiguiente activación del NF- κ B. La vía TRIF puede también activar los promotores para los IFNs de tipo I formando un complejo con TRAF3 e IKKs no canónicas (IKKi y TBK1), que fosforilarán al IRF3. IRF3 forma un dímero que se translocará al núcleo y activará los genes de IFNs de tipo I y genes inducidos por el IFN. (Kawai and Akira, 2007b, Kawai and Akira, 2006, Takeda and Akira, 2004).

RECEPTOR	LIGANDOS					
	Bacterias	Hongos	Protozoos	Virus	Humano	Sintético
TLR2	+ TLR1: triacil lipopéptido + TLR6: diacil lipopéptido Lipopéptido (micoplasma) PGN, LPS	Zimosan	<i>Tripanosoma cruzi</i>			
TLR3				ARNdc	HSP60 EDA (fibronectina)	Taxol (antimicótico).
TLR4	LPS			Proteína F (virus sincital)		
TLR5	Flagelina					Imidazoquinolina. Análogos guanosina. ARNsi.
TLR7				ARNss (VIH-1, VSV, Influenza)		Imidazoquinolina.
TLR8				ARNss		
TLR9	Motivos CpG no metilados		Hemozoína de <i>Plasmodium falciparum</i> (malaria)	Motivos CpG no metilados		
TLR10	<i>Lysteria monocytogenes</i>					

RECEPTOR	TIPO DE RESPUESTA	CÉLULAS
TLR2	NF-κB / AP-1	Linfocitos B (Agrawal and Gupta, 2011), macrófagos, linfocitos T, monocitos, PMN, CD (Muzio et al., 2000), queratinocitos, células de Langerhans (Flacher et al., 2006), ep. uterino (Schaefer et al., 2004), ep. intestinal (Otte et al., 2004), ep. retinal (Kumar et al., 2004b), adipocito (Vitseva et al., 2008). Solo TLR1: células NK (Muzio et al., 2000).
TLR3	IRF / NF-κB / AP-1	CD (Muzio et al., 2000), queratinocitos, células de Langerhans (Flacher et al., 2006), ep. uterino (Schaefer et al., 2004), ep. intestinal (Otte et al., 2004), ep. retinal (Kumar et al., 2004b).
TLR4	IRF / NF-κB / AP-1	Monocitos, PMN, CD (Muzio et al., 2000), queratinocitos (Flacher et al., 2006), ep. uterino (Schaefer et al., 2004), ep. intestinal (Otte et al., 2004), ep. retinal (Kumar et al., 2004b), adipocito (Vitseva et al., 2008), endotelio (Faure et al., 2000).
TLR5	NF-κB / AP-1	Monocitos, CD (Muzio et al., 2000), queratinocitos, células de Langerhans (Flacher et al., 2006), ep. uterino (Schaefer et al., 2004), ep. intestinal (Otte et al., 2004), ep. retinal (Kumar et al., 2004b).
TLR7	IRF / NF-κB / AP-1	Linfocitos B (Agrawal and Gupta, 2011), queratinocitos (Flacher et al., 2006), ep. uterino (Schaefer et al., 2004), ep. retinal (Kumar et al., 2004b), CD (Ito et al., 2005, Makela et al., 2011).
TLR8	IRF / NF-κB / AP-1	Epitelio uterino (Schaefer et al., 2004), intestinal (Otte et al., 2004), monocitos, CDs (Ito et al., 2005).
TLR9	IRF / NF-κB / AP-1	Linfocitos B (Agrawal and Gupta, 2011), ep. uterino (Schaefer et al., 2004), ep. intestinal (Otte et al., 2004), ep. retinal (Kumar et al., 2004b), CD (Ito et al., 2005, Makela et al., 2011, Hoene et al., 2006).
TLR10	NF-κB (+TLR2)	Linfocitos B (Agrawal and Gupta, 2011), queratinocitos, células de Langerhans (Flacher et al., 2006), ep. retinal (Kumar et al., 2004b).

Tabla 1. Receptores pertenecientes a la familia de los TLR, ligandos, localización celular, adaptadores, rutas activadas y células en las que están presentes. En conjunto, estos PRR reconocen una gran variedad de antígenos, los cuales no solo tienen origen microbiano, sino que también pueden reconocer compuestos sintéticos o del propio ser humano. Los TLR localizados en la superficie de la célula reconocen principalmente componentes estructurales de los microorganismos, mientras que, los que se encuentran acoplados a la membrana de los endosomas reconocen principalmente material genético. La activación de los TLR puede seguir distintas rutas que culminan principalmente en la activación de 3 factores de transcripción: el NF- κ B, el AP-1 y distintos IRF. El NF- κ B y el AP-1 desencadenarán la transcripción de factores proinflamatorios, y los IRFs la transcripción de IFNs de tipo I.

ep: epitelio; LPS: lipopolisacárido; ARNdc: ARN de doble cadena; ARNs: ARN de cadena simple; ARNsi: ARN pequeño de interferencia; CD: célula dendrítica; EDA: dominio extra A de la fibronectina; HSP60: proteína de choque térmico 60; PMN: célula polimorfonuclear; VSV: virus de la estomatitis vesicular.

4.2. Receptores tipo NOD: características y funciones.

Los NLR son receptores citosólicos que se identificaron por primera vez en plantas, donde se observó, que eran cruciales para la resistencia contra los patógenos. Al igual que los TLR, están altamente conservados filogenéticamente en la evolución, y en los humanos consta de 23 miembros. Los NLR están formados por un dominio N-terminal efector, un dominio central NOD necesario para su activación, y un dominio C-terminal rico en leucinas que reconoce a los MAMP. Los NLR reconocen distintos antígenos como flagelina, componentes del PGN, toxinas, ARN bacteriano y viral, LPS, cristales de ácido úrico, etc (Franchi et al., 2009).

Dentro de los NLR, **NOD1** y **NOD2** son los más estudiados. NOD1 es expresado por muchos tipos celulares y órganos, mientras que, NOD2 tiene una localización más restringida. NOD2 está presente en macrófagos, células dendríticas, células de Paneth, queratinocitos, y células epiteliales de intestino, pulmón y cavidad oral. En concreto, NOD1 y NOD2 reconocen distintos fragmentos del PGN. El PGN es un polímero de disacáridos alternos formado por cadenas de N-acetilglucosamina y N-acetilmurámico unidas entre sí por pequeños péptidos. El ligando de NOD1 es el ácido meso-diaminopimélico (m-DAP), que forma parte de los péptidos que unen las cadenas de disacáridos, y está presente sobre todo en las bacterias Gram-negativas.

Mientras que NOD2, reconoce el muramil dipéptido (MDP), un derivado del PGN presente tanto en bacterias Gram-negativas como Gram-positivas (Franchi et al., 2009).

Aunque NOD1 y NOD2 se encuentran en el citosol celular, ante la presencia de sus ligandos son reclutados a la membrana plasmática para su activación (Kufer et al., 2008, Barnich et al., 2005). La activación de NOD1 y NOD2 desencadena la síntesis de proteínas proinflamatorias y de péptidos antimicrobianos a través de la ruta de las MAPK y el NF- κ B. Tras la unión a sus ligandos, NOD1 y NOD2 reclutan a RIP2, que mediante la degradación de la subunidad reguladora modulador esencial del NF- κ B (NEMO) del complejo IKK, promueve la activación de las subunidades catalíticas IKK, que fosforilarán a la subunidad inhibidora I κ B marcándola para su degradación, permitiendo la activación del NF- κ B. Además, RIP2 puede reclutar a TAK1 para activar el NF- κ B (Franchi et al., 2009).

Los receptores NOD1/NOD2 y los TLR comparten varios ligandos y su activación desencadena las mismas rutas de acción (NF- κ B y MAPK). Esto implica un incremento en la sensibilidad ante los antígenos y una colaboración sinérgica en la inducción de la respuesta. Por ejemplo, la producción de citocinas proinflamatorias en monocitos humanos estimulados con agonistas de NOD1 y NOD2 es mayor cuando se añade a las condiciones del cultivo un ligando del TLR4, como el LPS (Fritz et al., 2005). Además de estas rutas, NOD2 es capaz de desencadenar la síntesis de IFN β ante bacterias invasoras como *Listeria monocytogenes* y *Mycobacterium tuberculosis* (Leber et al., 2008).

Para evitar que un exceso de proteínas proinflamatorias, desencadenado por la activación continuada de los PRR, pueda dañar los tejidos, las células que presentan estos receptores sufren un proceso de tolerancia hacia sus ligandos. Esta característica se observó en macrófagos murinos, que estimulados una primera vez con LPS o MDP activaban de manera correcta las MAPK y el NF- κ B. Sin embargo, cuando eran reestimulados con los mismos ligandos no se inducía ninguna respuesta. No obstante, si se re-estimulaba con MDP los macrófagos que previamente habían sido estimulados con LPS y viceversa, sí que se producía una respuesta. Este

proceso de tolerancia-activación tendría un papel muy importante en las infecciones por patógenos invasores (Kim et al., 2008b).

Un ejemplo de la importancia del receptor NOD2 en la homeostasis intestinal se encuentra en la enfermedad de Crohn. Entre el 30% y el 50% de los pacientes con dicha enfermedad presentan mutaciones en al menos uno de los alelos del gen *NOD2*. Estas mutaciones afectan a la región rica en leucinas encargada de reconocer a los antígenos. Los pacientes con la enfermedad de Crohn presentan una sobreactivación del NF- κ B, que podría deberse a una ganancia de función del receptor o a un fallo en la regulación de la activación de los TLR llevada a cabo por NOD2 (Noguchi et al., 2009, Netea et al., 2005).

4.3. Papel de los receptores de reconocimiento de patrones en los enterocitos.

Los enterocitos forman parte del epitelio intestinal, pero no actúan simplemente formando una barrera y transportando moléculas. Los enterocitos, al igual que las CD, presentan también PRR. Expresan varios TLR, como el TLR2, TLR4, TLR3, TLR5 y TLR9, pero a una baja concentración para evitar una sobreestimulación del sistema inmunológico desencadenada por la gran carga antigénica del intestino. Se ha planteado, que la pérdida de expresión de los TLR, una vez que los enterocitos se han diferenciado, sería la consecuencia de un proceso de **tolerancia** hacia sus ligandos que formarían parte de la microbiota (Otte et al., 2004). Debido a que los enterocitos son células polarizadas presentan distintos TLR en distintas localizaciones celulares, favoreciendo la discriminación entre comensales y patógenos con capacidad para atravesar la barrera.

En los enterocitos sanos, TLR2 y TLR4 aparecen en una baja concentración, y además, la baja expresión de sus proteínas adaptadoras también limita su activación. La concentración de los TLR también varía en función de la zona de la mucosa donde se expresen. En las criptas, donde los enterocitos se encuentran en un estado indiferenciado y no polarizado, la expresión del TLR2 y el TLR4 es mayor que en las vellosidades. En cambio, TLR3 se encuentra presente en las vellosidades intestinales

y ausente en las criptas (Furrie et al., 2005). Sin embargo, en condiciones de inflamación, como la que se observa en pacientes con EII, la expresión de TLR4 y su adaptador MD-2 se encuentra incrementada, desencadenando una respuesta exacerbada hacia la microbiota. Además, TLR4 podría tener una localización también basolateral, al igual que TLR5, que se activaría solo cuando los microorganismos han atravesado el epitelio (Vamadevan et al., 2010). Curiosamente, TLR9 se expresa en toda la superficie de la célula, pero la respuesta que se desencadena es totalmente distinta dependiendo de si la estimulación es apical o basolateral. La activación del TLR9 en la zona basolateral induce una respuesta proinflamatoria vía NF- κ B, en cambio, una activación apical es capaz de revertir esta inflamación (Lee et al., 2008). Además, estudios en modelos de colitis han demostrado que el TLR9 es indispensable para que el efecto beneficioso de VSL#3 tenga lugar (Rachmilewitz et al., 2004).

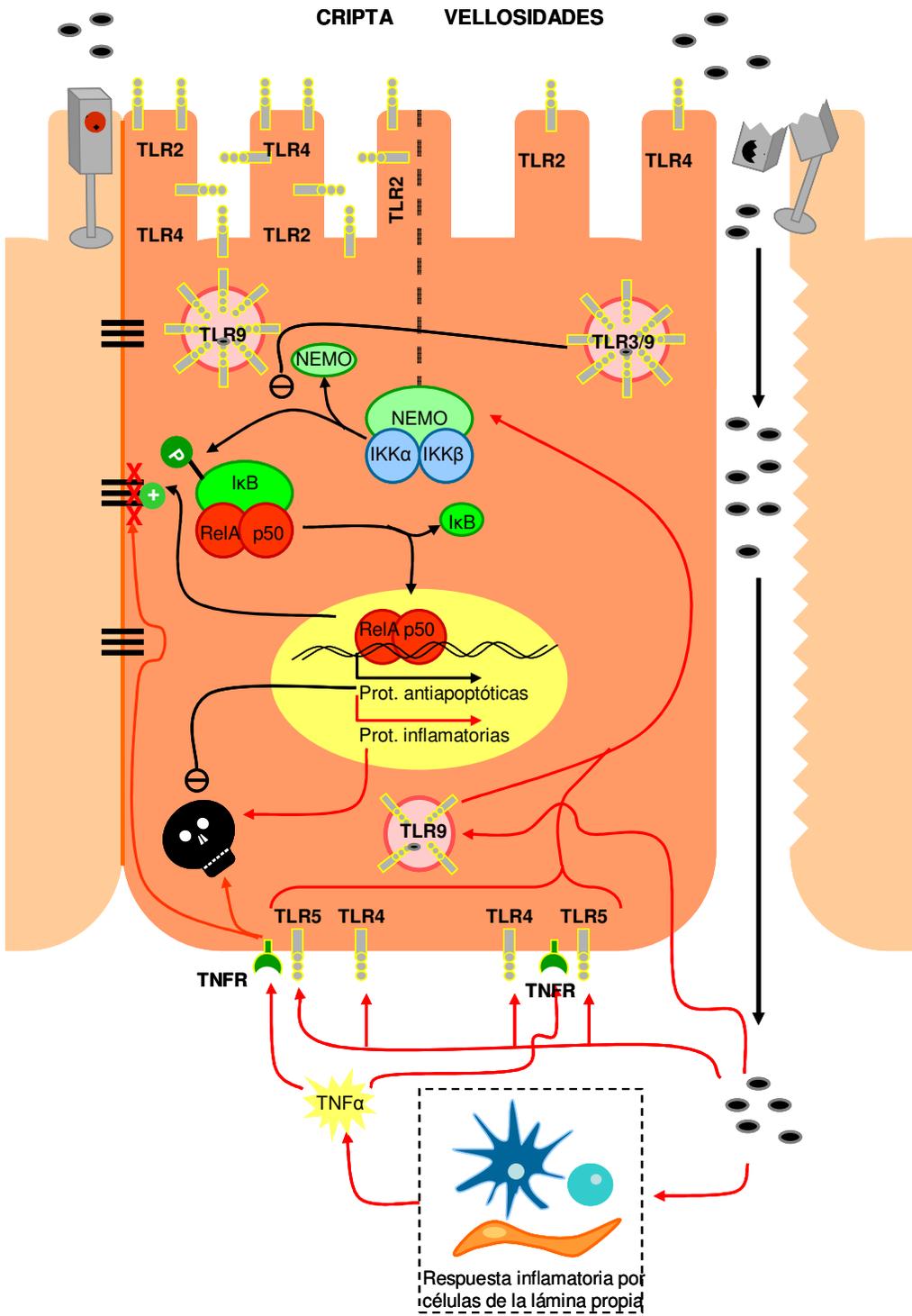


Figura 4. Esquema de la distribución de los TLR y activación de los enterocitos. La microbiota estimula el sistema inmunológico innato del epitelio a través de los TLR, que tienen distintas localizaciones en las células polarizadas y están presentes en distinta concentración según se encuentran en las criptas o en las vellosidades. De este modo, en la parte apical de las células se encuentran los TLR2, TLR4 y TLR9, mientras que en la membrana basolateral abundan los TLR5 y TLR4. En las criptas, donde se localizan las células epiteliales sin diferenciar, la concentración de los TLR2 y TLR4 es mayor, sin embargo en las vellosidades, donde las células epiteliales están completamente diferenciadas, la concentración de TLR2 y TLR4 es menor. Además, en las vesículas citoplasmáticas se encuentra también el TLR3 y el TLR9. Dependiendo de que la activación del TLR9 sea apical o basolateral se producirá inhibición o activación del NF- κ B respectivamente. Uno de los mecanismos por el que los probióticos ejercen un efecto positivo sobre el epitelio es la activación del sistema innato del epitelio a través del NF- κ B que inhibe la apoptosis celular y fortalece las uniones estrechas entre los enterocitos.

TNFR: receptor del TNF α .

La presencia de los TLR en el epitelio es de suma importancia, ya que aunque los TLR se encuentren en una baja concentración en los enterocitos, su activación por parte de la microbiota es necesaria para mantener la integridad del epitelio intestinal. En ratones, se observó que la ausencia del adaptador MyD88 incrementa la mortalidad, la cual no es dependiente ni del sobrecrecimiento bacteriano, ni de un incremento en la concentración de los linfocitos intraepiteliales. Además, tanto si se elimina la microbiota mediante antibióticos o se suprime la expresión de MyD88, la síntesis de TNF α e IL-6 es abolida, y estos ratones son más propensos a una colitis inducida por sulfato de dextrano sódico (DSS) (Rakoff-Nahoum et al., 2004). Aunque el TNF α y la IL-6 están principalmente relacionadas con situaciones proinflamatorias, también pueden ejercer una función protectora en el epitelio intestinal (Rakoff-Nahoum et al., 2004). Se ha demostrado que la mezcla probiótica VSL#3 activa el sistema innato del epitelio induciendo la ruta del NF- κ B y la síntesis de TNF α , siendo imprescindible para que no se desarrolle la enfermedad de Crohn en un modelo murino (Pagnini et al., 2010). El carácter protector del NF- κ B se ha confirmado en ratones *knockout* para la subunidad reguladora NEMO en las células del epitelio intestinal. Estos ratones eran más susceptibles a desarrollar una colitis de manera

espontánea debido a la apoptosis de los enterocitos y a la entrada de las bacterias a la lámina propia desencadenando una inflamación aguda (Nenci et al., 2007). Por lo tanto, en individuos sanos la activación basal del NF- κ B y la síntesis de citocinas con un carácter típicamente proinflamatorio, ayudaría a mantener la homeostasis y la integridad de la barrera intestinal inhibiendo la apoptosis de los enterocitos. Sin embargo, una activación exagerada del NF- κ B, provocada por mutaciones en el gen *NOD2*, activación de los TLR basolaterales o por la disrupción de la barrera epitelial, convierte esta función protectora en inflamatoria.

5. CÓMO INFLUYE EL EPITELIO INTESTINAL EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS .

El intestino soporta una gran presión antigénica y para que esta presión no desencadene una respuesta inflamatoria, las CD intestinales, en condiciones basales, poseen un perfil tolerogénico. Las propiedades de las CD intestinales dependen del ambiente tisular en el que se encuentren. De este modo se observó que cuando CDmo humanas eran cultivadas en presencia de sobrenadantes procedentes de la línea celular epitelial Caco-2, éstas inducían un perfil Th2 sobre linfocitos T vírgenes. Además, este efecto era dependiente del **TSLP**, cuya producción se incrementa bajo la activación del NF- κ B (Rimoldi et al., 2005). El TSLP tiene también un papel importante en la diferenciación de linfocitos Treg Foxp3⁺ en el timo humano (Hanabuchi et al., 2010), y favorece la diferenciación de CDs CD103⁺ tolerogénicas, las cuales inducen la generación de linfocitos Treg Foxp3⁺ en los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM). Sin embargo, la presencia de TSLP no es imprescindible para la generación de linfocitos Treg Foxp3⁺ (Iliev et al., 2009a).

El **ácido retinoico** (AR) es un compuesto derivado del metabolismo de la vitamina A y es capaz de inducir un perfil tolerogénico en las CDs, aumentar la expresión de marcadores de migración al intestino en linfocitos T e incrementar la secreción de IgA. En este contexto, la activación del receptor gamma activado por los proliferadores de los peroxisomas (PPAR γ) induce la síntesis de retinol y de enzimas como la retinol deshidrogenasa 10 (RDH10) y la retinaldehído deshidrogenada de tipo 2 (RALDH2), incrementando de esta manera la síntesis de AR (Szatmari et al., 2006). En ratones, se ha observado que el AR es capaz de inhibir la diferenciación hacia un perfil Th1 o Th17. Sin embargo, este efecto inhibitor solo se produce a dosis altas de AR (10 μ M), mientras que a una concentración baja (1 nM), el AR estimula la diferenciación de linfocitos Th17 (Uematsu et al., 2008). Además del TSLP y el AR, la **IL-10** y el **TGF β** son factores importantes para la inducción de un ambiente tolerogénico. Otras células presentes en la lámina propia, como macrófagos o células estromáticas, pueden ser una fuente de estos factores (Scott et al., 2011).

En CDmo humanas se observó que cuando eran cultivadas en presencia de TSLP, AR y TGF β por separado, solo se conseguía una inducción de linfocitos Treg FoxP3⁺ similar a la producida por el sobrenadante del cultivo de las células Caco-2, cuando se usaban las concentraciones más altas. Por lo tanto, la acción conjunta de estos 3 factores es necesaria para que la inducción linfocitos Treg se realice de manera eficaz (Iliev et al., 2009b).

En el intestino, las CD incluyen varias poblaciones con distintas características (Tabla 2), y se encuentran distribuidas en el tejido linfoide asociado al intestino (GALT) -el cual está formado por las placas de Peyer, NLM y folículos linfoides aislados- o distribuidas por la lámina propia a lo largo del intestino delgado y grueso. Estudios en ratones demostraron que las CD intestinales, en comparación con las localizadas en otros tejidos como el bazo, eran más eficaces promoviendo la diferenciación de linfocitos con un perfil Th2 caracterizado por una mayor producción de IL-4 e IL-10 (Iwasaki and Kelsall, 1999).

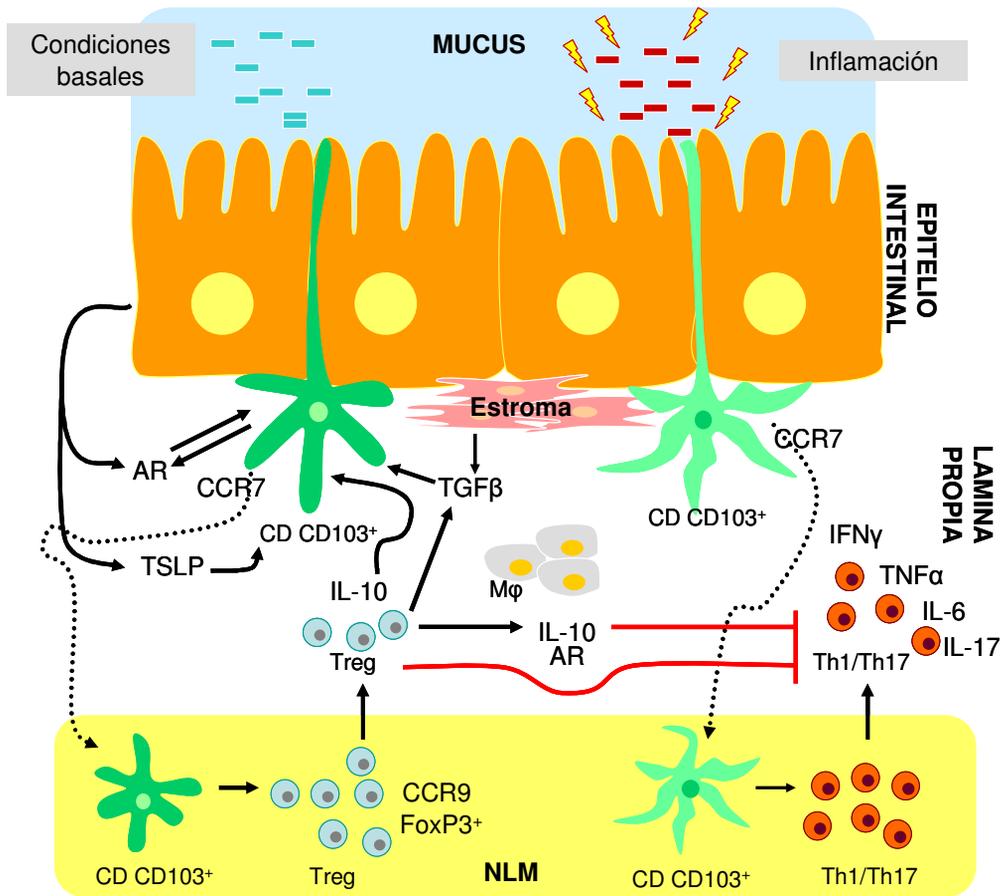


Figura 5. Esquema de la acción condicionante de factores solubles procedentes del epitelio sobre las CDs intestinales. El epitelio es capaz de producir TSLP y AR, que junto con la IL-10 y el TGF-β condicionan a las CD CD103⁺ intestinales dándoles un perfil tolerogénico. En condiciones basales, las CD CD103⁺ inducen la diferenciación de linfocitos Treg Foxp3⁺ en el GALT e inducen la expresión de marcadores de migración al intestino (CCR9) en los linfocitos. De este modo se mantiene la homeostasis entre las respuesta reguladoras (Treg) y las efectoras (Th). Sin embargo, bajo condiciones inflamatorias, desencadenada por ejemplo por patógenos, las CD CD103⁺ dejan de ser tolerogénicas e inducen un perfil Th1/Th17. Otras células presentes en la lámina propia, como los macrófagos, ayudan a mantener la homeostasis y a regular las respuestas proinflamatorias gracias a la IL-10 y al AR que sintetizan en grandes cantidades.

AR: ácido retinoico; CD: células dendrítica; GALT: tejido linfoide asociado al intestino; Mφ: macrófago; NLM: nódulo linfático mesentérico; TGF-β: factor de crecimiento transformante beta; TSLP: linfopoyetina del estroma tímico.

Las CD intestinales pueden captar los antígenos del lumen mediante diversos mecanismos: a través de las células M, en las placas de Peyer, las cuales transportan los antígenos vía transcitosis a la lámina propia; mediante el receptor neonatal Fc (FcRn) que capta complejos IgG-antígeno (Yoshida et al., 2004); a través de las células caliciformes (McDole et al., 2012); o por las mismas CD, las cuales extienden sus dendritas entre los enterocitos hacia el lumen (Rescigno et al., 2001, Farache et al., 2013). Aunque en un principio la capacidad de extender las dendritas a través del epitelio se identificó como una característica exclusiva de las CD CX3CR1⁺ (Rescigno et al., 2001), estudios posteriores en ratones demostraron que las CD CD103⁺ también eran capaces de migrar hacia el epitelio y extender sus dendritas entre los enterocitos ante un estímulo bacteriano (Farache et al., 2013). En condiciones basales, las CD CD103⁺ de la lámina propia y las que se encuentran presentes en los NLM, son las principales responsables de la generación de linfocitos Treg (Sun et al., 2007). No obstante, experimentos *in vitro* demostraron que, ante estímulos vía TLR como la flagelina, las CD CD103⁺ eran capaces de inducir una respuesta Th1 y Th17 (Fujimoto et al., 2011, Uematsu et al., 2008). Además, en condiciones de inflamación disminuye el número de CD CD103⁺ en la mucosa intestinal y se incrementa el de CD maduras que presentan el marcador CD80 (Strauch et al., 2010). Aunque en condiciones basales las CD CD103⁺ ejercen una función homeostática, otras células presentes en la lámina propia, como los macrófagos, son capaces de sintetizar grandes cantidades de IL-10 y RA, contribuyendo al mantenimiento de la homeostasis, e incluso, podrían favorecer la diferenciación de linfocitos Treg Foxp3⁺ *in situ*. A diferencia de las CD CD103⁺, los macrófagos de la lámina propia sintetizan IL-10 ante ligandos de los TLR, regulando de este modo la producción de citocinas proinflamatorias (Denning et al., 2007).

MARCADORES	UBICACIÓN	PROPIEDADES
CD11b ⁺ CD8 α ⁻	PP	Secretan IL-10 e inducen un perfil Th2 (Iwasaki and Kelsall, 2000, Iwasaki and Kelsall, 2001). CCR6 ⁺ (Salazar-Gonzalez et al., 2006).
CD11b ⁻ CD8 α ⁺	PP	CCR6 ⁻ CCR7 ⁺ . Migran a compartimentos linfoides secundarios. Secretan IL-12p70 e inducen un perfil Th1 (Iwasaki and Kelsall, 2000).
CD11b ⁻ CD8 α ⁻	PP/NLM	Secretan IL-12p70 en respuesta a estímulos microbianos e inducen un perfil Th1 (Iwasaki and Kelsall, 2001). Son CCR6 ⁺ (Iwasaki and Kelsall, 2000).
CX3CR1 ⁺	PP/LP/ Ausentes en los NLM	CCR6 ⁻ CD103 ⁻ (Salazar-Gonzalez et al., 2006). Poca capacidad estimuladora de linfocitos T (Schulz et al., 2009). Más similar a macrófagos.
CD103 ⁺	LP/NLM	Migran desde la LP hasta los NLM (CCR7 ⁺). Inducen expresión de α 4 β 7 y CCR9 en linfocitos T vírgenes (Johansson-Lindbom et al., 2005). En condiciones basales inducen la expansión de linfocitos Treg FoxP3 ⁺ mediante el AR y TGF- β (Coombes et al., 2007). Subpoblaciones: · CD103 ⁺ CD8 α ⁻ CD11b ⁺ : inducen respuestas Th1/Th17 ante flagelina (TLR5 ^{hi}). <i>In vitro</i> (Uematsu et al., 2008). · CD103 ⁺ CD8 α ⁺ CD11b ⁻ : inducen respuesta Th1 y linfocitos CTL ante ligandos de TLR. No poseen el gen <i>Raldh2</i> . <i>In vitro</i> (Fujimoto et al., 2011).

Tabla 2. Clasificación de las CD intestinales de acuerdo a la expresión de marcadores de superficie. Las CD intestinales presentan un comportamiento distinto en función de sus marcadores de superficie como CD11b y CD8 α . Para su clasificación, se utilizan también el receptor de quimiocinas CX3CR1 y la subunidad CD103 (integrina α E). La expresión de estas dos moléculas sobre las CD es excluyente, y estas CD difieren en su capacidad de migración y de estimulación de los linfocitos vírgenes.

CTL: linfocitos citotóxicos; LP: lámina propia; NLM: nódulo linfático mesentérico; PP: placa de Peyer.

III. Objetivos

Esta tesis consta de dos objetivos principales que tienen unos protagonistas comunes, los probióticos, en dos ambientes distintos aunque muy relacionados entre sí, las células dendríticas y el epitelio intestinal. A continuación, se señalan los objetivos específicos dentro de cada uno de los objetivos principales.

Objetivo 1: comparar los efectos de los probióticos y de dos especies de bacterias patógenas sobre las células dendríticas derivadas de monocitos.

- 1a. Cuantificar los cambios en la expresión de los marcadores superficiales de maduración.
- 1b. Cuantificar los cambios de expresión en moléculas implicadas en la ruta de los TLR o relacionadas con el reconocimiento de bacterias.
- 1c. Analizar la activación del NF- κ B y la capacidad fagocítica de las células dendríticas derivadas de monocitos.
- 1d. Cuantificar la proliferación de linfocitos T vírgenes y la producción de IFN γ en cocultivo con células dendríticas previamente estimuladas con las bacterias.

Objetivo 2: comparar los efectos de los probióticos y dos especies patógenas sobre el epitelio intestinal utilizando como modelo la línea celular humana Caco-2.

- 2a. Cuantificar los cambios inducidos por las bacterias en la expresión de quimiocinas. Comparar los resultados obtenidos con células Caco-2 no polarizadas y polarizadas.
- 2b. Evaluar cómo afectan las bacterias a la integridad de la monocapa de las células Caco-2.
- 2c. Cuantificar el número de bacterias que se adhieren a la monocapa de células Caco-2.
- 2d. Analizar los efectos del sobrenadante del cultivo de las células Caco-2 en la diferenciación y maduración de las células dendríticas.

IV. Justificación

Como se ha comentado en la introducción, los probióticos poseen efectos beneficiosos para el hospedador actuando sobre su sistema inmunológico de diversas maneras y a distintos niveles. A lo largo de esta tesis se pretendió describir el modo de acción de 4 especies de lactobacilos (*L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. fermentum* y *L. salivarius*) y 2 cepas distintas de *Bifidobacterium lactis*; y comparar sus efectos con 2 especies de bacterias patógenas (*Salmonella typhimurium* y *Clostridium perfringens*).

Los probióticos tienen efectos específicos dependientes de cepa, no de especie, por lo que la variedad de bacterias con propiedades probióticas es enorme. Para estudiar los efectos de los probióticos sobre el sistema inmunológico se eligieron las CD, y en concreto el modelo de CDmo que poseen características similares a las CDc. Las células dendríticas nos permiten estudiar tanto aspectos de la inmunidad innata como de la inmunidad adaptativa, por lo que nos da una visión del ambiente que se crea y de si la respuesta final hacia los probióticos será inmunogénica o tolerogénica. Dentro de la inmunidad innata, se decidió analizar los aspectos relacionados con los PRR, y en particular, la ruta de señalización de los TLR ya que reconocen varios componentes de las bacterias. Un factor común a la activación de los PRR, es el factor de transcripción NF- κ B, cuya translocación al núcleo desencadena la transcripción de numerosos genes implicados en la respuesta inmunológica. La activación de este factor de transcripción también tiene un papel importante en la maduración de las CD. Para estudiar cuáles podrían ser los efectos de las bacterias probióticas sobre la inmunidad adaptativa, se llevó a cabo una reacción linfocitaria mixta (RLM). Se eligió este modelo debido al hecho de que la procedencia de las CD y los linfocitos T de donantes distintos desencadena una proliferación basal. Dentro de las bacterias probióticas, hay especies que poseen un efecto hiporespondedor sobre los linfocitos CD4⁺ (Baba et al., 2008), por lo que se planteó analizar si alguno de los probióticos utilizados podría modular la respuesta inmunológica cuando ya se está produciendo una proliferación basal.

Como modelo de epitelio intestinal se eligió la línea celular Caco-2. En cultivo, las células Caco-2 son capaces de diferenciarse y presentar una estructura polarizada de manera espontánea, similar a un enterocito completamente funcional. Estas características permitieron estudiar tanto los efectos de las bacterias sobre las células

Caco-2 en un estado indiferenciado y no polarizado, como en un estado ya diferenciado donde las células han sufrido una polarización. La barrera epitelial separa la carga antigénica, en la luz intestinal, de las células inmunológicas de la lámina propia. Una brecha en esta barrera desencadena una intensa respuesta inflamatoria como respuesta frente a los antígenos que la han atravesado. Teniendo en cuenta que las células Caco-2 crecen formando una monocapa, estas células sirvieron de modelo para estudiar la permeabilidad cuando eran estimuladas con diversas bacterias. Uno de los factores que intervienen en la integridad de la monocapa epitelial son los complejos de unión entre las células, por lo que se analizaron los cambios inducidos por las distintas bacterias en la proteína de soporte ZO-1.

Además de las CD, el epitelio intestinal juega un papel muy importante en la homeostasis intestinal generando, en condiciones basales, un ambiente tolerogénico. Debido a estas propiedades del epitelio, se estudió también como afectarían los sobrenadantes de cultivo de las células Caco-2 en la diferenciación de los monocitos hacia CD y en la maduración de las CD ya diferenciadas.

V. Material y Métodos

1. Obtención de células dendríticas derivadas de monocitos.

Medio de cultivo y soluciones:

- **RPMI completo:** RPMI 1640 (Lonza, Bélgica) suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, L-Glutamina 2mM (Sigma, EEUU), Penicilina 100 U/ml - Estreptomina 0,1 mg/ml (Sigma, EEUU) y Anfotericina B 2,5 µg/ml (Sigma, EEUU).
- **Ficoll** (Biochrom, Alemania).
- **Solución de Percoll de baja densidad:** a 90 ml de Percoll (GE Healthcare, EEUU) se añaden 10 ml de NaCl 1,5 M (Sigma, EEUU) para tener un volumen de 100 ml, al que se añaden 95,2 ml de NaCl 0,15 M (densidad final = 1,063 g/ml).
- **Solución de lavado:** tampón salino fosfato (PBS) (Lonza, Bélgica) con SFB al 5% (Life Technologies, EEUU) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1 mM (Sigma, EEUU).
- **Citocinas:** IL-4 (R&D Systems, EEUU) y GM-CSF (Santa Cruz, EEUU).

Anticuerpos citometría:

- **CD14-PE** (Clon: M5E2) (BD, EEUU).
- **CD11c-APC** (Clon: B-ly6) (BD, EEUU).

Como fuente de células mononucleares se utilizaron las capas leucoplaquetarias procedentes del Centro de Hemoterapia de Castilla y León. Primero, se diluyó un volumen de sangre con RPMI completo en una proporción 1:1 y la sangre diluida se depositó cuidadosamente sobre un volumen de ficoll (1,077 g/ml). Mediante una centrifugación en gradiente de densidad (836 g, 20 min., sin freno, 22 °C) se obtuvieron las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) que se depositaron formando un halo encima del ficoll. Las CMSP se lavaron una primera vez con la solución de lavado para eliminar los restos de Ficoll (301 g, 10 min.) y varias veces después, hasta un total de 5 (169 g, 5 min.), para eliminar las plaquetas adheridas a los monocitos. Las CMSP se resuspendieron en un volumen de RPMI completo, se depositaron cuidadosamente sobre un volumen de la solución de Percoll de baja densidad y se centrifugaron (409 g, 40 min., sin freno, 22 °C). Se recogió el halo de monocitos depositado encima de la solución de Percoll y se lavó dos veces con RPMI

completo (209 g, 5 min.). Los monocitos se resuspendieron en RPMI completo y se sembraron en *flask* (Nuncclon, Dinamarca) a una concentración de $1,5 \times 10^6$ células/ml durante 1 hora a 37 °C, 5% CO₂ para permitir que se adhirieran al plástico. Transcurrido este tiempo, se eliminaron las células no adherentes y se añadió RPMI completo suplementado con GM-CSF (1000 U/ml) e IL-4 (500 U/ml). Los monocitos se incubaron a 37 °C, 5% CO₂ durante 5 días y al tercer día se añadió un extra de GM-CSF (500 U/ml) e IL-4 (250 U/ml).

El GM-CSF favorece la supervivencia de las células, mientras que la IL-4 impide la diferenciación de los monocitos hacia macrófagos (O'Neill and Bhardwaj, 2005).

Para comprobar que los monocitos se habían diferenciado correctamente a CDmo se analizó la presencia del marcador CD11c-APC y la pérdida de CD14-PE mediante citometría de flujo. En la figura 6, se observan las diferencias en los marcadores de superficie entre monocitos y CDmo inmaduras.

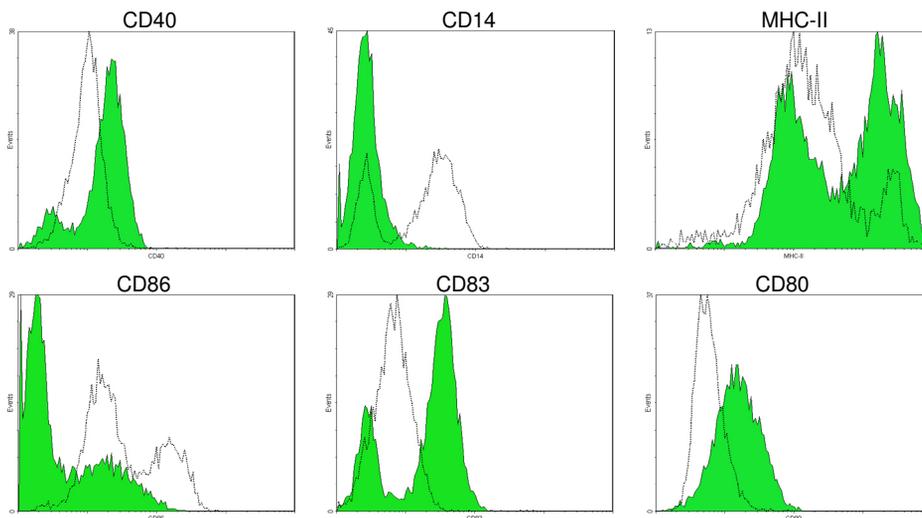


Figura 6. Monocitos y CDmo inmaduras marcados con CD40, CD14, MHC-II, CD86, CD83 y CD80. Los monocitos (línea negra) son CD40⁺, CD14⁺, MHC-II⁺, CD86^{hi}, CD83⁻ y CD80⁻; mientras que, las CDmo inmaduras (histograma verde) no presentan CD14, y a excepción de CD86, presentan niveles más elevados de las otras moléculas.

Además del marcador CD14, los monocitos presentan CD86 y CD80 está ausente en monocitos recién extraídos (Fleischer et al., 1996). En condiciones basales, CD83 se encuentra en el interior celular tanto en CDi como en monocitos (Cao et al., 2005).

2. Crecimiento y mantenimiento de las bacterias.

Medio de cultivo para las bacterias.

- **Luria Bertani (LB)** (Sigma, EEUU): triptona, extracto de levadura y NaCl. Medio de cultivo para *S. typhimurium*.

- **Man, Rogosa y Sharpe (MRS)** (Difco, EEUU): proteasa peptona nº 3, extracto de carne, extracto de levadura, dextrosa, polisorbato 80, citrato de amonio, acetato de sodio, sulfato de magnesio, sulfato de manganeso y fosfato dipotásico. Medio de cultivo para los probióticos utilizados.

- **Tioglicolato** (BioMérieux, Francia): digerido pancreático de caseína, extracto de levadura, dextrosa, NaCl, L-cisteína y tioglicolato de sodio. Medio de cultivo líquido para *C. perfringens*.

- **Columbia Agar con 5% de sangre de cordero** (BioMérieux, Francia): digerido pancreático de caseína, peptona, extracto de levadura, extracto de carne, almidón de maíz y NaCl. Medio de cultivo sólido para *C. perfringens*.

Las bacterias utilizadas durante esta tesis han sido las siguientes: 6 especies de probióticos: *Lactobacillus rhamnosus* DR20 Howaru (Danisco), *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Danisco), *Lactobacillus fermentum* CECT 5716 Hereditum (Puleva Biotech), *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 Hereditum (Puleva Biotech), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 (Chr. Hansen), *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BI07 (Danisco); un control patógeno Gram-negativo: *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotipo Typhimurium CECT 443 (*S. typhimurium*); y un control patógeno Gram-positivo: *Clostridium perfringens* CECT 376.

El patógeno Gram-negativo *S. typhimurium*, utilizado como control, es una bacteria muy estudiada por los problemas entéricos que desencadena, además de ser un gran inductor de la respuesta inmunológica (Coburn et al., 2007, Kiama et al.,

2006). El hecho de que sea una bacteria Gram-negativa aporta otro punto de vista con respecto a los probióticos utilizados, que son Gram-positivos. En cambio, *C. perfringens* es una bacteria Gram-positiva que puede encontrarse de manera natural en el intestino humano, aunque en determinadas ocasiones es capaz de producir toxinas responsables de la gangrena gaseosa y la ECN en humanos (Sobel et al., 2005, Flores-Diaz and Alape-Giron, 2003).

Las especies probióticas fueron crecidas en MRS, *S. typhimurium* en medio LB, y *C. perfringens* en Columbia Agar cuando se creció en placa y en tioglicolato cuando se pasó a medio líquido. Las especies bacterianas que no toleraban bien el oxígeno fueron crecidas en jarras de anaerobiosis con un generador de atmósfera anaerobia y un indicador de anaerobiosis (Todos ellos de Oxoid, Reino Unido). Mientras no se estaban utilizando, las bacterias se mantuvieron congeladas en criobolas (Abtek, Reino Unido) a -80 °C.

Para determinar la concentración de bacterias (ufc/ml), éstas se crecieron en placas de agar y, posteriormente, se resuspendieron en su correspondiente medio líquido. Cuando las bacterias alcanzaron la fase exponencial de crecimiento (densidad óptica (DO)_{600nm}= 0,6), se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de cultivo agar para cuantificar el número de ufc y determinar cual era su concentración a esa densidad óptica concreta.

3. Citometría de flujo en las células dendríticas derivadas de monocitos estimuladas con bacterias.

Medios de cultivo y soluciones:

- **Tampón de tinción para citometría:** PBS con SFB al 1%.
- **RPMI completo.**

Anticuerpos citometría:

- **CD40-FITC** (Clon: HI40a), (Inmunostep, España).
- **HLA-(DR, DP, DQ)-FITC** (Clon: Tu39) (BD, EEUU).
- **CD86-PE** (Clon: FUN-1) (BD, EEUU).
- **CD80-PE** (Clon: L307.4) (BD, EEUU).

- **CD83-FITC** (Clon: HB15e) (BD, EEUU).
- **CD14-PE.**
- **CD11c-APC.**

Las CDmo se resuspendieron en medio RPMI completo a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml. Las bacterias se crecieron hasta que alcanzaron la fase exponencial, se lavaron dos veces con medio RPMI completo (13000 g, 5 min.) y se añadieron a las CDmo con una multiplicidad de infección (MDI) de 10 (10 bacterias / 1 CDmo) durante 13 horas a 37 °C, 5% CO₂. Al día siguiente, las CDmo se lavaron con el tampón para tinción (209 g, 5 min.), se añadieron los anticuerpos para citometría a una dilución 1:10 y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a 4 °C. Para cada condición se añadieron los isotipos correspondientes a cada anticuerpo. Transcurrido este tiempo, las CDmo se lavaron con el tampón de tinción para eliminar el exceso de anticuerpo y se analizaron mediante el citómetro Beckman Coulter FC500 con el software CXP. La región a analizar se determinó según el tamaño y la complejidad celular utilizando el software Kaluza ® (Becman Coulter). Los experimentos de maduración se realizaron de manera independiente utilizando la sangre periférica de hasta 6 donantes distintos. Estos resultados fueron analizados de forma pareada con respecto a su basal utilizando un t test no paramétrico pareado de dos colas (test de Wilcoxon).

4. Análisis de la expresión de genes involucrados en la ruta de los TLR en células dendríticas derivadas de monocitos estimuladas con bacterias

Medios de cultivo y soluciones:

- **RPMI completo.**
- **Trizol ®** (Life Technologies, EEUU).
- **Cloroformo** (Panreac, España).
- **2-propanol** (Panreac, España).
- **Etanol** (Panreac, España).
- **Agua libre de ARNasas** (Fisher Scientific, EEUU).

Las CDmo se sembraron a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml en RPMI completo y se estimularon con los distintos probióticos y los patógenos vivos en su fase exponencial, a una MDI de 50 durante 6 horas a 37 °C y 5% CO₂. Transcurrido este tiempo, las CDmo se lavaron con RPMI completo para eliminar las bacterias y se resuspendieron en Trizol®, que se guardó a -80 °C hasta la extracción del ARN.

4.1. Extracción del ARN mediante el método del Trizol®.

Siguiendo las instrucciones del fabricante, se repipeteó el volumen de trizol donde están resuspendidas las CDmo y se dejó 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Se añadieron 200 µl de cloroformo, se mezcló con el trizol y la mezcla se dejó reposar a TA hasta que se separaron 2 fases. La mezcla se centrifugó (12000 g, 15 min., 4 °C), se recogió la fase superior, que es donde se encuentra el ARN, y se transfirió a un tubo libre de ARNasas. Se añadieron 500 µl de 2-propanol para precipitar el ARN, se dejó reposar 10 minutos, se centrifugó (7500 g, 10 min.) y se hicieron dos lavados con Etanol al 70 % (7500 g, 5 min.) para eliminar el exceso de sales procedentes del trizol. El ARN se secó durante 10 minutos y se resuspendió en agua libre de ARNasas. El ARN se guardó en tubos *ependorf* libres de ARNasas a -80 °C hasta su uso.

4.2. Transcripción reversa de ARN a ADN complementario.

Para las PCR cuantitativas (qPCR) de la ruta de los TLR (PHAS-18) (SABioscience, Quiagen, Alemania), el ARN extraído fue purificado con el *RNA Easy Mini Kit* (Quiagen, Alemania) mediante un sistema de columnas siguiendo las instrucciones del fabricante. Posteriormente, se midió el ARN mediante un NanoDrop ND-1000 y se utilizó 1 µg total para la transcripción reversa (RT) con el *RT² First Strand Kit* (Quiagen, Alemania), que incluye la eliminación del ADN genómico. Para las moléculas no incluidas en este grupo, la RT-PCR se realizó utilizando también 1 µg de ARN total con el *High Capacity cDNA RT Kit*, utilizando cebadores al azar e inhibidor de las ARNasas (Applied, EEUU).

Una vez que se obtuvo el ADN complementario (ADNc), las qPCR de la ruta de los TLR se llevaron a cabo utilizando *RT² SYBR Green Mastermix* (Quiagen, Alemania) mediante el termociclador *Light Cycler 480* (Roche, Alemania). Para el resto de qPCR se utilizó el equipo *Light Cycler 2.0* (Roche, Alemania), con el kit *Light Cycler FastStart DNA Master, SYBR Green I* (Roche, Alemania).

Material y métodos.

Los cebadores utilizados fueron diseñados mediante el software *Primer Blast* (NCBI).

Para el diseño de los cebadores se tuvo en cuenta que estuvieran diseñados en diferentes exones de la secuencia del gen, que el tamaño del amplicón fuera similar al del gen de referencia, que hubiera poca complementariedad entre los cebadores evitando las repeticiones en tándem, que el %CG estuviera en torno al 50-60% y que su temperatura de anillamiento fuera similar. Se comprobó, mediante electroforesis en geles de agarosa, que cada par de cebadores diseñado amplificara el amplicón con el tamaño correcto.

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el método del $\Delta\Delta Ct$ (Livak and Schmittgen, 2001), utilizando la media del ciclo de amplificación que cruza el umbral de fluorescencia, denominado ciclo umbral (Ct), de las muestras basales como grupo control frente al cual normalizar. Como gen de referencia se utilizó el gen de la gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (*GADPH*). En el caso de las qPCR de la ruta de los TLR, se utilizó el software facilitado por Quiagen *RT² Profiler PCR Array Data Analysis* Versión 3.5 que se basa igualmente en el método del $\Delta\Delta Ct$. El gen de referencia elegido en este caso fue el gen de la proteína ribosomal L13a (*RPL13A*).

Los cebadores utilizados en esta parte de la tesis, que no estaban incluidos en el kit de TLR, fueron los siguientes:

Gen	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	NCBI Locus
<i>GADPH</i>	GAAGGTGAAGGTCCGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTTC	NM_002046
<i>NOD2</i>	CTGCCTTGCCGTGGTGTCTG	GCGGCAGTGATGTAGTTATTCC	NM_022162
<i>IL17A</i>	Sonda UPL (Universal Probe Library, Roche)		
<i>TGFB1</i>	GGACACCAACTATTGCTTCAG	TCCAGGCTCCAATGTAGG	NM_000660
<i>TSLP</i> (variantes 1 y 2)	CGCGTCGCTCGGCAAAGAAAT	TGAAGCGACGCCACAATCCTTG	NM_138551 NM_033035
<i>ALDH1A2</i>	Sonda UPL (Universal Probe Library, Roche)		
<i>PPARG</i> (variantes 1-4)	TCTCCAGCATTTCTACTCCA	GCTTTATCTCCACAGACACG	NM_138712 NM_015869 NM_138711 NM_005037
<i>STAT3</i> (variantes 1-3)	GCCAGAGAGCCAGGAGCA	ACACAGATAAACTTGGTCTTCAGGTATG	NM_139276 NM_003150 NM_213662
<i>SOCS2</i> (variantes 1-6)	AGTGTGGTTCATCTGATCG	ACATTTGTTAATGGTGAGCCT	NM_003877 NM_0012704667 NM_0012704668 NM_0012704669 NM_0012704670 NM_0012704671
<i>SOCS3</i>	GGCCACTCTTCAGCATCTC	ATCGTACTGGTCCAGGAACTC	NM_003955
<i>SOCS4</i> (variantes 1-2)	CCTATGACTGGCTCTGT	GCTTCGGCTGCGTATT	NM_199421 NM_080867

Tabla 3. Secuencia de cebadores utilizados para las CDmo estimuladas con las bacterias.

Los cebadores se diseñaron mediante el *Primer Blast*. Se muestra la secuencia 5'-3' de cada cebador. También se indica el número de la secuencia de referencia para ese gen en el NCBI.

5. Inmunofluorescencia de la subunidad p65 del NF- κ B en células dendríticas derivadas de monocitos estimuladas con las bacterias.

Medios de cultivo y soluciones:

- **RPMI completo.**
- **Poli-L-lisina** (Sigma, EEUU).
- **PBS** (Sigma, EEUU).
- **Solución de p-formaldehído (PFA) 4%:** para diluir el PFA (Sigma, EEUU) en H₂O hay que calentarlo, sin que la temperatura pase de los 59 °C, y añadir unas gotas de NaOH 5M.
- **Solución de cloruro de amonio (NH₄Cl) 0,1 mM** (Sigma, EEUU).
- **Solución de Bloqueo/Permeabilización:** PBS con suero de cabra (Sigma, EEUU) al 3% y Tritón X-100 al 0,25% (Biorad, EEUU).
- **Solución de lavado:** PBS con Tritón X-100 al 0,25%.

Anticuerpos inmunofluorescencia:

- **Primario: ratón anti-NF κ B (subunidad p65) humano 0,5 μ g/ml** (Clon: 20/NF- κ B/p65) (BD, EEUU).
- **Secundario: cabra anti-ratón (1:1000) marcado en Alexa 594** (Abcam, Reino Unido).
- **Núcleos: DAPI (1:1000)** (Sigma, EEUU).

Se sembraron 100.000 CDmo en cristales de 12mm (Thermo Scientific, EEUU) tratados con poli-L-lisina y se dejaron toda la noche a 37 °C, 5% CO₂. Las bacterias se crecieron en su medio de cultivo correspondiente hasta que alcanzaron la fase exponencial, se lavaron con PBS y se añadieron a las CDmo a una MDI de 50 durante 90 minutos. Transcurrido este tiempo, se lavaron las CDmo con PBS y se fijaron con PFA al 4% durante 30 minutos a TA. Después, se realizó un lavado con PBS y se añadió la solución de NH₄Cl 0,1 mM durante 10 minutos para eliminar la autofluorescencia del PFA. Posteriormente, las muestras se incubaron durante 30 minutos con la solución de bloqueo/permeabilización y tras este periodo, se incubaron con el anticuerpo ratón anti-NF κ B (subunidad p65) humano a una concentración de

0,5 µg/ml en la solución de bloqueo/permeabilización toda la noche a 4 °C. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados de 10 minutos con PBS para eliminar el exceso de anticuerpo y se añadió el anticuerpo secundario de cabra anti-ratón (1:1000) marcado con Alexa 594, junto con el marcador de núcleos DAPI (1:1000) durante 1 hora. Se hicieron 3 lavados con la solución de lavado durante 10 minutos para eliminar los restos del anticuerpo secundario, y se realizó un último lavado con H₂O destilada para eliminar las sales del PBS. Los cristales se montaron sobre el portaobjetos con el líquido de montaje Vectashield (Vector Labs, EEUU) y se sellaron con laca de uñas.

Las muestras fueron analizadas con un microscopio confocal Leica sp5 con el objetivo de 40x. Las imágenes fueron procesadas con el software Leica *Application Suite Advanced Fluorescent (LAS AF) Lite*. Los experimentos se llevaron a cabo con CDmo obtenidas de 3 donantes por duplicado. En cada experimento se tomaron un total de 4 fotos de campos seleccionados de manera aleatoria y se cuantificó el porcentaje de células que presentaban la subunidad p65 dentro del núcleo con respecto al total de células en cada campo. Los resultados fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y la corrección de Dunn.

6. Marcaje de las bacterias con el Isomero I de Isotiocianato de fluoresceína.

Soluciones:

- **Solución de Isomero I de Isotiocianato de fluoresceína (FITC):** se preparó un tampón carbonato (NaHCO₃) 0,1 M (Panreac, España) a pH 9 en el que se disolvió el Isomero I de Isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Sigma, EEUU) a una concentración de 0,1 mg/ml. Se filtró con un filtro de tamaño de poro de 0,2 µm (Thermo Scientific, EEUU).
- **PBS.**

Las bacterias se crecieron en su medio de cultivo correspondiente hasta que alcanzaron la fase exponencial, se lavaron con PBS y se resuspendieron, a una concentración de 10⁸ ufc/ml, en la solución de FITC durante 1 hora en agitación. Posteriormente, las bacterias se lavaron con PBS hasta eliminar completamente el FITC (4 lavados) (Campbell et al., 2001). Las bacterias marcadas con FITC se

añadieron a las CDmo a una MDI de 50 durante 1 hora. Transcurrido este tiempo, las CDmo se prepararon para el marcaje de la subunidad p65 del NF- κ B como se ha explicado en el apartado 5.

Las muestras fueron analizadas con un microscopio confocal Leica sp5 con el objetivo de 40x. Se tomaron imágenes secuenciales a lo largo del eje Z y posteriormente se procesaron con el software *Image J*. Los experimentos se llevaron a cabo con CDmo obtenidas de 2 donantes por duplicado, realizando dos secuencias de fotos por cada duplicado.

7. Cultivos alogénicos: reacción mixta de linfocitos.

7.1. Obtención de las CDmo estimuladas con las bacterias.

Las CDmo se estimularon con las distintas especies de bacterias con una MDI de 10 durante 13 horas en RPMI completo. Tras este periodo, las CDmo se lavaron con RPMI completo suplementado con gentamicina (100 μ g/ml) (Sigma, EEUU), para matar las bacterias tanto extracelulares como intracelulares, y se sembraron 75.000 CDmo en 100 μ l de RPMI completo en una placa de 96 pocillos con fondo en U (BD, EEUU). (La obtención de las CDmo fue igual que en el apartado 1).

Estos experimentos fueron realizados con las CDmo de tres donantes distintos en triplicado. Al analizar los resultados mediante citometría, se juntaron las células de cada donante para cada condición.

7.2. Obtención de los linfocitos T vírgenes.

Medios de cultivo y soluciones:

- **RPMI completo.**
- **Tampón de lavado:** PBS suplementado con EDTA 2 mM y albúmina sérica bovina (ASB) al 0,5% (Sigma, EEUU).

Anticuerpos separación magnética:

- **CD14** (Miltenyi Biotec, Alemania).
- **CD19** (Miltenyi Biotec, Alemania).
- **HLA-DR** (Miltenyi Biotec, Alemania).
- **CD45RO** (Miltenyi Biotec, Alemania).

Los linfocitos T vírgenes se obtuvieron a partir de CMSP (*obtenidos como en el apartado 1*) procedentes de donantes alogénicos mediante selección negativa, utilizando los marcadores CD14 (monocitos), CD19 (linfocitos B), HLA-DR (células presentadores de antígenos) y CD45RO (linfocitos de memoria). Las CMSP se incubaron con los anticuerpos unidos a las bolitas magnéticas en el tampón de lavado durante 15 minutos a 4 °C. A continuación, se pasaron a través de una columna MS (Miltenyi Biotec, Alemania), previamente humedecida con el tampón de lavado, acoplada a un soporte imantado. Las células que eluyeron a través de la columna fueron los linfocitos T vírgenes, que se sembraron junto con las CDmo en una proporción de 1 CDmo : 5 linfocitos T vírgenes, en 200 µl finales de medio de cultivo RPMI completo durante 5 días.

7.3. Marcaje de los linfocitos vírgenes con el ester succinimidil diacetato carboxifluoresceína.

Medios de cultivo y soluciones:

- **RPMI completo.**
- **Ester succinimidil diacetato carboxifluoresceína (CFSE) 5 µM** (Molecular Probes, EEUU).
- **SFB.**

En paralelo, se marcaron linfocitos T vírgenes con CFSE para analizar la proliferación tras los 5 días de cultivo. Para marcar los linfocitos vírgenes con CFSE, se incubaron las células en CFSE diluido en PBS a una concentración de 5 µM durante 3 minutos. Para parar la reacción, las células se incubaron con SFB y se lavaron dos veces con medio de cultivo RPMI completo (470 g, 5 min.). Después, los linfocitos T vírgenes marcados con CFSE se cultivaron con las

CDmo en una proporción 1 CDmo : 5 linfocitos T vírgenes en 200 µl finales de medio RPMI completo durante 5 días.

Tras el periodo de cultivo, las células marcadas con CFSE se lavaron con el tampón de tinción y se analizaron mediante citometría de flujo utilizando el citómetro Beckman Coulter FC500 y el software CXP. El análisis se realizó sobre la región linfocitaria según tamaño y complejidad celular utilizando el software Kaluza ®. Los resultados fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y la corrección de Dunn.

El CFSE en esta forma no es fluorescente y es capaz de introducirse en el interior de las células porque es permeable a la membrana. Una vez dentro de la célula, las esterasas endógenas actúan sobre el CFSE eliminando los grupos acetato, adquiriendo la fluorescencia y haciéndolo no permeable a la membrana, por lo que, de esta manera ya no puede salir de la célula. Además, mediante los grupos succinimidil éster, el CFSE se une covalentemente con los grupos aminos libres de las proteínas. De este modo, cuando se produce la división celular el CFSE se reparte entre las células hijas sin degradarse. El CFSE permite identificar las nuevas generaciones celulares porque las células hijas van teniendo cada vez menos CFSE. Estas características convierten al CFSE en un método adecuado para estudiar la proliferación celular in vitro mediante citometría de flujo, ya que posee el mismo espectro de excitación y emisión que FITC (Lyons, 2000).

7.4. Marcaje de citocinas intracelulares en los linfocitos.

Medios de cultivo y soluciones:

- **Solución PIM:** RPMI completo suplementado con acetato de forbol miristato (PMA) 10 ng/ml (Sigma, EEUU), ionomicina 2 µM (Merck Millipore, EEUU) y monensina 3 µM (Merck Millipore, EEUU).
- **Solución de saponina:** saponina 0,1% (Sigma, EEUU) diluida en el tampón de tinción para citometría.
- **Tampón de tinción para citometría:** PBS con SFB al 1%.

Anticuerpos citometría:

- **IFN γ** (Clon: 25723.11) (BD, EEUU).
- **IL-10** (Clon: JES3-19F1) (BD, EEUU).
- **IL-13** (Clon: JES10-5A2) (BD, EEUU).

Para el estudio de la expresión de citocinas intracelulares, las células se resuspendieron en una solución PIM durante 4 horas. Tras este periodo, las células se lavaron con el tampón de tinción (409 g, 5 min.) y las células se fijaron con PFA al 2% (gota a gota en agitación, 10 min., TA). Tras la fijación, se realizó un primer lavado con el tampón de tinción y un segundo lavado con una solución de saponina para permeabilizar las células. Posteriormente, se realizó la tinción de las citocinas intracelulares en 100 μ l de la solución de saponina con una dilución 1:20 de los anticuerpos anti-IFN γ , anti-IL10 y anti-IL13, durante 30 minutos, TA y en agitación suave. Tras la incubación, las células se lavaron con la solución de saponina y se procedió a analizarlas mediante el citómetro Beckman Coulter FC500 con el software CXP. Para el posterior análisis se utilizó el software Kaluza[®]. Los resultados fueron analizados mediante un t test paramétrico.

La PMA y Ionomicina son utilizadas para inducir la expresión de citocinas mediante la activación de la proteína quinasa C (PKC) y el incremento de la liberación de calcio. La monensina es un inhibidor del transporte de proteínas. La saponina es un detergente cuya acción es reversible, por lo que es importante que una vez que se realiza la permeabilización, se incluya la saponina en todos los lavados posteriores.

8. Mantenimiento de la línea celular Caco-2.

Medios de cultivo:

- **DMEM completo:** DMEM con alto contenido en glucosa (Fisher Scientific, EEUU) suplementado con HEPES 10mM (Fisher Scientific, EEUU), aminoácidos no esenciales 1% (Termo Scientific Hyclone, EEUU), Penicilina (100 U/ml)-Estreptomicina (0,1 mg/ml) y SFB al 15%.
- **Solución de tripsina *Tryple Express*** (Gibco, EEUU).

- **DMEM 2%:** DMEM completo pero con SFB al 2% en vez de al 15%.

Las células Caco-2 proceden de un adenocarcinoma de colon humano y fueron obtenidas de *Health Protection Agency Culture Collections* (Reino Unido). Las células Caco-2 se caracterizan por diferenciarse espontáneamente *in vivo*, crecer formando monocapa, y por presentar características similares a los enterocitos como el borde en cepillo, morfología cilíndrica, uniones estrechas y determinadas enzimas presentes en los enterocitos intestinales (Sambuy et al., 2005).

Para el mantenimiento de la línea celular, las células Caco-2 se cultivaron en placas de 100 mm de diámetro (BD, EEUU) en medio DMEM completo. El medio se cambió cada dos días y cuando las células alcanzaron el 80% de confluencia se realizó un pase. Las células Caco-2 son adherentes, por lo que para despegarlas del plástico fueron tratadas con la solución de tripsina *Tryple Express* durante 2 minutos a 37 °C. Tras este periodo, la tripsina se inactivó con SFB utilizando el medio DMEM completo. Mientras no se utilizaban, las células Caco-2 se mantuvieron congeladas en el medio de congelación Bambanker (Lymphotec, Japón) a -80 °C.

Las células Caco-2 fueron estimuladas en dos momentos de su diferenciación, a los 7 días y a los 21 días.

- **7 días.** Las células Caco-2 se sembraron a una concentración de 50.000 células/ml en placas de 24 pocillos y se cultivaron durante 7 días cambiando el medio de cultivo cada 2 días. Antes de realizar los estímulos las células fueron lavadas con PBS y se añadió medio DMEM 2%.
- **21 días.** Para los estudios con células Caco-2 de 21 días, las células se sembraron en DMEM completo a una concentración de 50.000 células/ml en insertos de cultivo (Corning, Japón). Estos insertos están compuestos por una membrana de poliestireno con un tamaño de poro de 0,4 μm y una superficie de 0,33 cm^2 . Al igual que con otros cultivos con Caco-2, el medio de cultivo se cambió cada dos días y antes de realizar el estímulo con las bacterias el medio completo se sustituyó por DMEM 2%.

Las propiedades de las células Caco-2 pueden variar de acuerdo con el número de pases que se hagan a las células (Sambuy et al., 2005), por lo que los experimentos se realizaron dentro del mismo rango de pases evitando llegar a pases muy altos.

9. Análisis de la expresión de genes que codifican para quimiocinas en células Caco-2 estimuladas con bacterias.

Medios de cultivo y soluciones:

- **DMEM completo y al 2%.**
- **Trizol®.**
- **Cloroformo.**
- **2- Propanol.**
- **Etanol.**
- **H₂O libre de ARNasa.**

Estos estudios se realizaron con células Caco-2 de 7 días y de 21 días. Las células Caco-2 de 7 días se estimularon con las bacterias a 3 concentraciones: 10^6 ufc/ml, 10^7 ufc/ml y 10^8 ufc/ml. En cambio, para las células de 21 días solo se utilizó la concentración de 10^8 ufc/ml. Las bacterias se crecieron en su medio líquido correspondiente hasta que alcanzaron la fase exponencial, se lavaron con PBS, se resuspendieron en DMEM 2% a la concentración deseada y se añadieron al cultivo de las células Caco-2 durante 4 horas. Antes de añadir los estímulos, se cambió el medio de cultivo completo de las Caco-2 por DMEM 2%. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS, se resuspendieron en Trizol® y se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la extracción de su ARN. La extracción del ARN, RT-PCR, qPCR y análisis, fueron realizados como se explica en el apartado 4. Antes de estimular las células Caco-2 de 21 días crecidas sobre los insertos se comprobó, mediante el voltímetro, que la monocapa tenía la resistencia adecuada.

Los experimentos se realizaron en triplicado y los resultados fueron analizados mediante el t test de Mann-Whitney.

Los cebadores utilizados para este ensayo fueron los siguientes:

Gen	Forward (5' - 3')	Reverse (5' - 3')	NCBI Locus
<i>CXCL10</i>	TGAGCCTACAGCAGAGGAA	TACTCCTTGAATGCCACTTAGA	NM_001565
<i>IL8</i>	TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG	ACTTCTCCACAACCCTCTGC	NM_000584
<i>CCL20</i>	AGCAAGCAACTTTGACTGCTGTC	GGATTTGCGCACACAGACAAC	NM_001130

Tabla 4. Secuencia de cebadores utilizados para las células Caco-2 estimuladas con las bacterias. Los cebadores se diseñaron mediante el *Primer Blast*. Se muestra la secuencia 5'-3' de cada cebador. También se indica el número de la secuencia de referencia para ese gen en el NCBI.

10. Medida de la resistencia transepitelial eléctrica en la monocapa creada por las células Caco-2.

Medios de cultivo:

- **DMEM completo y al 2%.**

Las células Caco-2, cultivadas sobre insertos durante 21 días, se estimularon con las bacterias a 2 concentraciones (10^7 ufc/ml y 10^8 ufc/ml) durante 48 horas. Para la medición de la resistencia transepitelial eléctrica (RTE) se utilizó un voltímetro Millicell ERS-2 (Merck Millipore, EEUU) que mide la resistencia (Ohm) que ofrece la monocapa celular al paso de la corriente eléctrica. Para los cálculos de la RTE hay que tener en cuenta la superficie del inserto.

$$RTE = \text{Ohm} \times \text{Área inserto (0,33cm}^2\text{)}$$

Los experimentos se hicieron por duplicado y la RTE se midió en intervalos de 12 horas durante un total de 48 horas. Debido a que la temperatura puede afectar a la medición de la RTE (Hubatsch et al., 2007), todas las lecturas se hicieron a TA.

11. Inmunofluorescencia de la proteína Zonula Occludens-1 en la monocapa creada por las células Caco-2.

Medios de cultivo y soluciones:

- **DMEM completo y al 2%.**
- **Metanol** (Panreac, España).
- **Acetona** (Panreac, España).
- **PBS**
- **Solución de bloqueo:** PBS con BSA al 5%.
- **Solución de lavado:** PBS con Tritón X-100 al 0,25%.

Anticuerpos fluorescencia:

- **Primario: conejo anti-ZO-1 humano 0,2 µg/ml** (Abcam, Reino Unido).
- **Secundario: cabra anti-conejo (1: 1500) marcado con Alexa 594** (Abcam, Reino Unido).
- **Núcleos: DAPI (1:1000).**

En las mismas monocapas en las que se midió la RTE, se analizó la proteína ZO-1. Tras 48 horas de estímulo con las bacterias, las células Caco-2 se lavaron, se fijaron y se permeabilizaron con metanol durante 10 minutos a -20 °C, añadiendo después acetona durante 30 segundos a -20 °C. Las células se lavaron 3 veces con PBS durante 5 minutos y se bloquearon con la solución de bloqueo durante 30 minutos a TA. Posteriormente, las membranas de poliestireno con las células se retiraron del soporte del inserto y se incubaron con el anticuerpo primario de conejo anti-ZO-1 humano a una concentración de 0,2 µg/ml durante toda la noche a 4 °C. Tras este periodo, las células se lavaron 3 veces con PBS durante 10 minutos y se incubaron con el anticuerpo secundario de cabra anti-conejo (Abcam, Reino Unido) marcado con Alexa 594 y con el marcador de núcleos DAPI a una dilución 1:500 y 1:1000 respectivamente, durante 2 horas a TA y en oscuridad. Las membranas con las células se lavaron 3 veces con una solución de PBS con Tritón X-100 al 0,25% durante 10 minutos, se realizó un último lavado con H₂O destilada para eliminar las sales del PBS y se montaron sobre los portaobjetos con el líquido de montaje Vectashield.

Las muestras fueron analizadas con un microscopio confocal Leica sp5 con el objetivo de 40x. Se tomaron imágenes secuenciales a lo largo del eje Z a las que se les aplicó la proyección máxima con el software Leica *Application Suite Advanced Fluorescent (LAS AF) Lite*. Se realizaron dos secuencias de fotos por cada duplicado.

12. Ensayos de adherencia de las bacterias a las células Caco-2.

Medios de cultivo y soluciones:

- **DMEM completo.**
- **DMEM al 2% sin antibióticos.**
- **Tampón de lisis:** PBS con Tritón X-100 al 0,1% a 4 °C.

Para estos experimentos, se utilizaron Caco-2 de 21 días que se crecieron en placas de 24 pocillos (BD, EEUU). Las bacterias se crecieron hasta que alcanzaron la fase exponencial y se utilizaron a una concentración de 10^8 ufc/ml. Antes de añadir los estímulos, las células se lavaron con PBS y el medio completo se sustituyó por DMEM 2% sin antibióticos. Se añadieron las bacterias al cultivo y se dejó durante 1 hora a 37 °C y 5% CO₂. Tras este periodo, se realizaron 3 lavados con PBS y se lisaron las células Caco-2 con una solución de PBS con Tritón X-100 al 0,1% a 4 °C durante 3 minutos. El lisado celular se resuspendió y se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en placas de medio de cultivo agar. Las bacterias se mantuvieron en cultivo durante el tiempo necesario a 37 °C y 5% CO₂ o en condiciones anaerobias a 37 °C. Se cuantificaron las ufc y se determinó la concentración de bacterias de acuerdo con la dilución y el volumen de lisado sembrado.

13. Cocultivo de las células dendríticas derivadas de monocitos con células Caco-2.

Medios de cultivo y soluciones:

- DMEM completo.
- DMEM al 2%.
- RPMI completo.

Marcadores citometría:

- CD40-FITC.
- CD14-PE.
- HLA-(DR, DP, DQ)-FITC.
- CD80-PE.
- CD86-PE.
- CD103-FITC (Clon: Ber-ACT8) (BD, EEUU).
- CD83-PE (Clon: HB15e) (BD, EEUU).
- CCR7-FITC (Clon: 150503) (R&D Systems, EEUU).
- CD11c-APC.

Por un lado, se obtuvieron los monocitos como previamente se ha descrito en el apartado 1, y se cultivaron 1×10^6 células/ml en RPMI completo con IL-4 y GM-CSF en la parte basolateral del inserto. En la parte apical del inserto, se cultivaron las células Caco-2 en DMEM completo hasta 16 días. Al igual que como se hizo por separado, a las células Caco-2 se les cambió el medio de cultivo cada dos días, y en la parte basolateral del inserto se añadió un extra de citocinas al tercer día de diferenciación de las CDmo. Una vez que los monocitos se diferenciaron en CDmo, se añadieron las bacterias (esta vez se utilizaron *C. perfringens*, *B. lactis* Bb12, *B. lactis* B107; a una concentración de 1×10^8 ucf/ml) en fase exponencial en la parte apical del inserto, cambiando previamente el medio completo a DMEM 2%. Tras 4 horas de estímulo, se retiró el medio de la parte apical con las bacterias, se realizó un lavado y se añadió DMEM 2% suplementado con Gentamicina (100 µg/ml). El cultivo se dejó 24 horas a 37 °C, 5% CO₂. Tras este periodo, se recogieron las CDmo de la parte basolateral y se analizaron mediante citometría de flujo los siguientes marcadores:

Material y métodos.

CD40-FITC, CD14-PE, HLA-(DR, DP, DQ)-FITC, CD80-PE, CD86-PE, CD103-FITC, CD83-PE, CCR7-FITC y CD11c-APC. Para comprobar que las bacterias no habían traspasado la membrana, se sembraron alícuotas del medio de cultivo basolateral en placas de cultivo de bacterias y se comprobó que no creciera ninguna colonia.

En otro tipo de ensayo, los monocitos se diferenciaron utilizando sobrenadantes de 24 horas de células Caco-2 sin estimular y estimuladas con *S. typhimurium*. Para estos ensayos, las células Caco-2 se crecieron sobre los insertos durante 16 días, momento en el que se cambió el medio apical por DMEM 2% y el basolateral por RPMI completo. Las células Caco-2 se estimularon con *S. typhimurium* a una concentración de 10^8 ufc/ml durante 4 horas. Tras este tiempo, se retiró el medio de la parte apical con las bacterias, se realizó un lavado y se añadió DMEM 2% suplementado con Gentamicina (100 µg/ml). El cultivo se dejó 24 horas a 37 °C, 5% CO₂. El sobrenadante de la parte basolateral se recogió y se filtró con un filtro de un tamaño de poro de 0,2 µm y se congeló a -80 °C hasta su uso. Los monocitos se obtuvieron como ya se ha descrito en el apartado 1 y se sembraron a una concentración de $0,5 \times 10^6$ células/ml en el sobrenadante de las células Caco-2 estimuladas, al que añadimos GM-CSF (1000 U/ml) e IL-4 (500 U/ml) a 37 °C, 5% CO₂. Dejamos las células durante 5 días y al tercer día añadimos un extra de citocinas (GM-CSF: 500 U/ml; IL-4: 250 U/ml). Tras estos 5 días, las CDmo fueron lavadas y marcadas con los siguientes anticuerpos para citometría: CD14-PE, CD40-FITC, HLA-(DR, DP, DQ)-FITC, CD86-PE, CD80-PE, CD83-FITC, CD11c-APC.

Para analizar la presencia de estos marcadores en las CDmo, se utilizó un citómetro Beckman Coulter FC500 y el software CXP. La región a analizar se determinó según el tamaño y la complejidad celular utilizando el software Kaluza®.

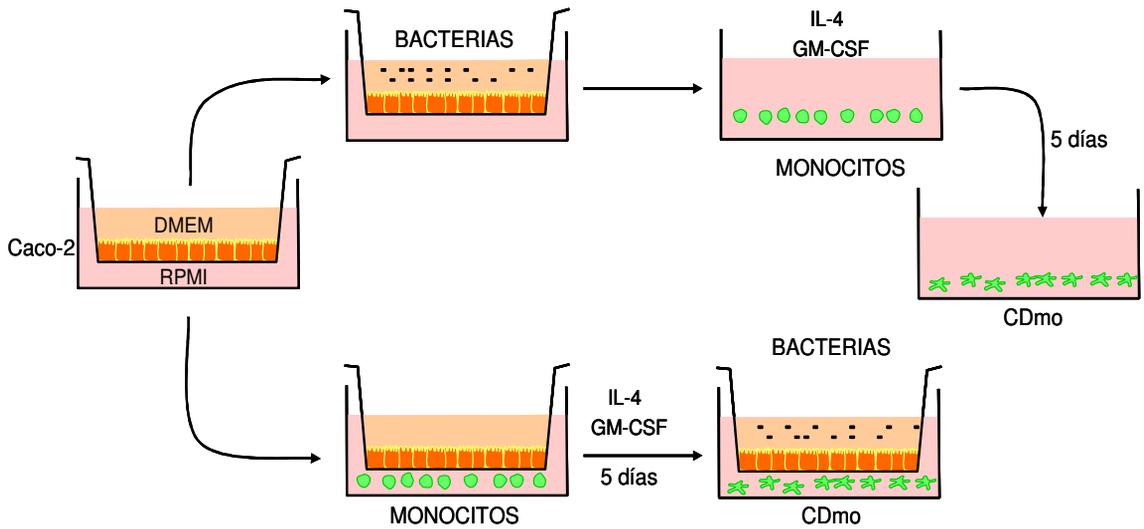


Figura 7. Esquema de los cocultivos de células Caco-2 de 21 días / CD / bacteria. Las células Caco-2 se crecieron sobre unos insertos hasta 16 días o 21 días. Las células Caco-2 de 21 días fueron estimuladas con las bacterias y el sobrenadante del cultivo se recogió a las 24 horas. Este sobrenadante de cultivo se utilizó para diferenciar los monocitos a CDmo añadiendo IL-4 y GM-CSF. Por otro lado, cuando las células Caco-2 llegaron a los 16 días de cultivo, se sembraron en la zona basolateral del inserto los monocitos, los cuales mediante IL-4 y GM-CSF se diferenciaron a CDmo. Al 5º día de diferenciación se añadieron las bacterias en la parte apical del inserto.

VI. Resultados

1. EFECTO DE LOS PROBIÓTICOS Y DOS ESPECIES PATÓGENAS SOBRE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS.

1.1. Moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad y moléculas coestimuladoras.

El proceso de maduración conlleva varios cambios en las CD, entre los que se encuentra un incremento en la expresión de moléculas MHC-II (HLA) y de moléculas coestimuladoras sobre la superficie de la célula. Si se produce únicamente un incremento en la expresión del MHC-II, aunque indique una mayor presentación del antígeno, no es suficiente para inducir una proliferación de los linfocitos T. La expresión reducida de moléculas coestimuladoras se relaciona con procesos de anergia o la inducción de poblaciones de linfocitos Treg.

Las bacterias utilizadas en los experimentos de maduración y activación fueron los probióticos: *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *B. lactis* Bb12 y *B. lactis* BI07; un control patógeno Gram-negativo: *S. typhimurium* y un control patógeno Gram-positivo: *C. perfringens*. Las CDmo se estimularon con las bacterias vivas en fase exponencial durante 13 horas con una MDI de 10. Los marcadores estudiados fueron: CD40, MHC-II, CD86, CD80, y CD83. Cada condición se realizó con CDmo procedentes de entre 4 y 6 donantes distintos, y los experimentos fueron llevados a cabo por triplicado. Los valores están representados como la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF), y cada experimento se analizó de manera pareada con respecto a su basal utilizando un t test no paramétrico pareado (test de Wilcoxon). Los valores de $p \leq 0,05$ fueron considerados significativos. Los valores representados como porcentaje de células positivas para cada marcador, con excepción del MHC-II (el total de la población de CDmo presentaba este marcador), están representados en las figura suplementaria S1.

Se observó que, en general, los probióticos eran capaces de inducir la expresión de moléculas MHC-II y de moléculas coestimuladoras en distinto grado. Incluso, en algunos casos se observó una disminución de la expresión con respecto a los niveles basales.

· *S. typhimurium*

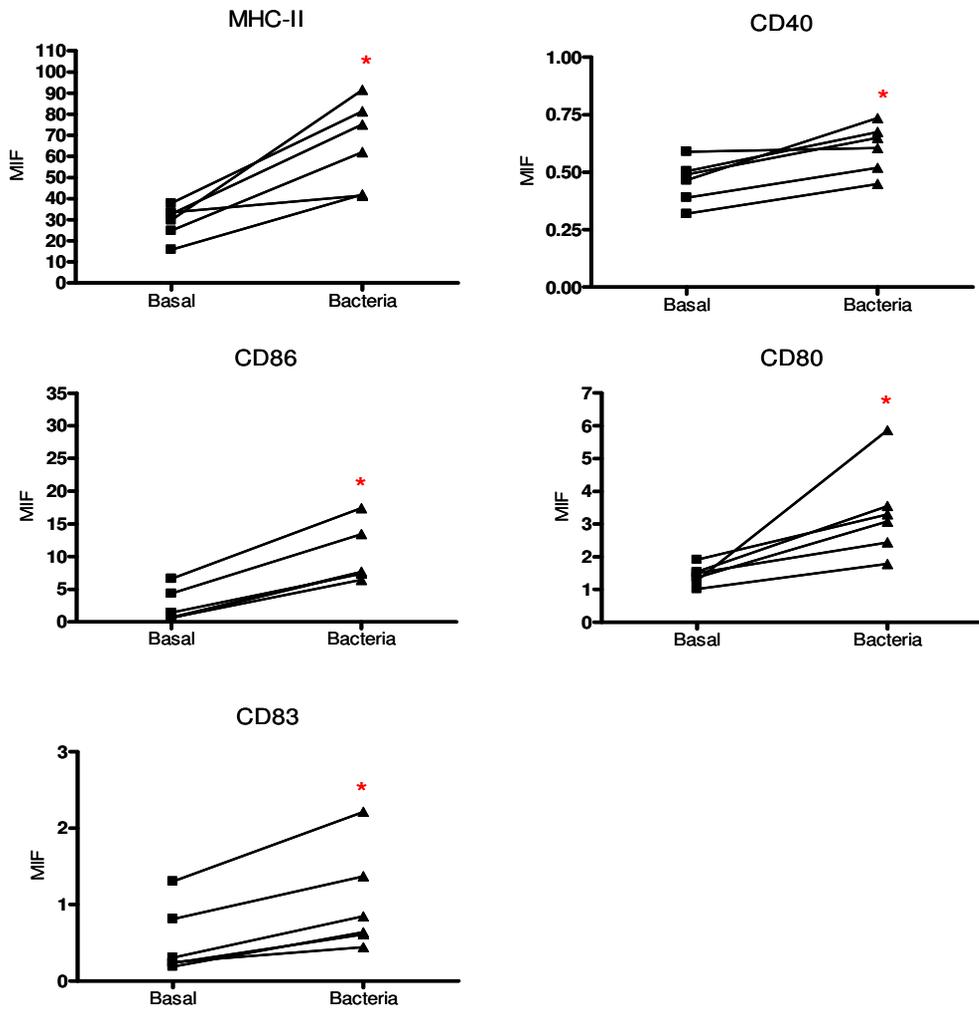


Figura 8. Marcadores de maduración en CDmo estimuladas con *S. typhimurium*. Se observó un incremento significativo en la fluorescencia de MHC-II y de las moléculas coestimuladoras. Los valores se representan como MIF y fueron analizados mediante el test pareado no paramétrico de Wilcoxon. * Resultado estadísticamente significativo. * = $p \leq 0,05$.

Como se observa, *S. typhimurium* indujo una expresión significativa en todos los marcadores. Los valores expresados como porcentajes de células positivas (Fig. S1A) fueron similares.

· *C. perfringens*

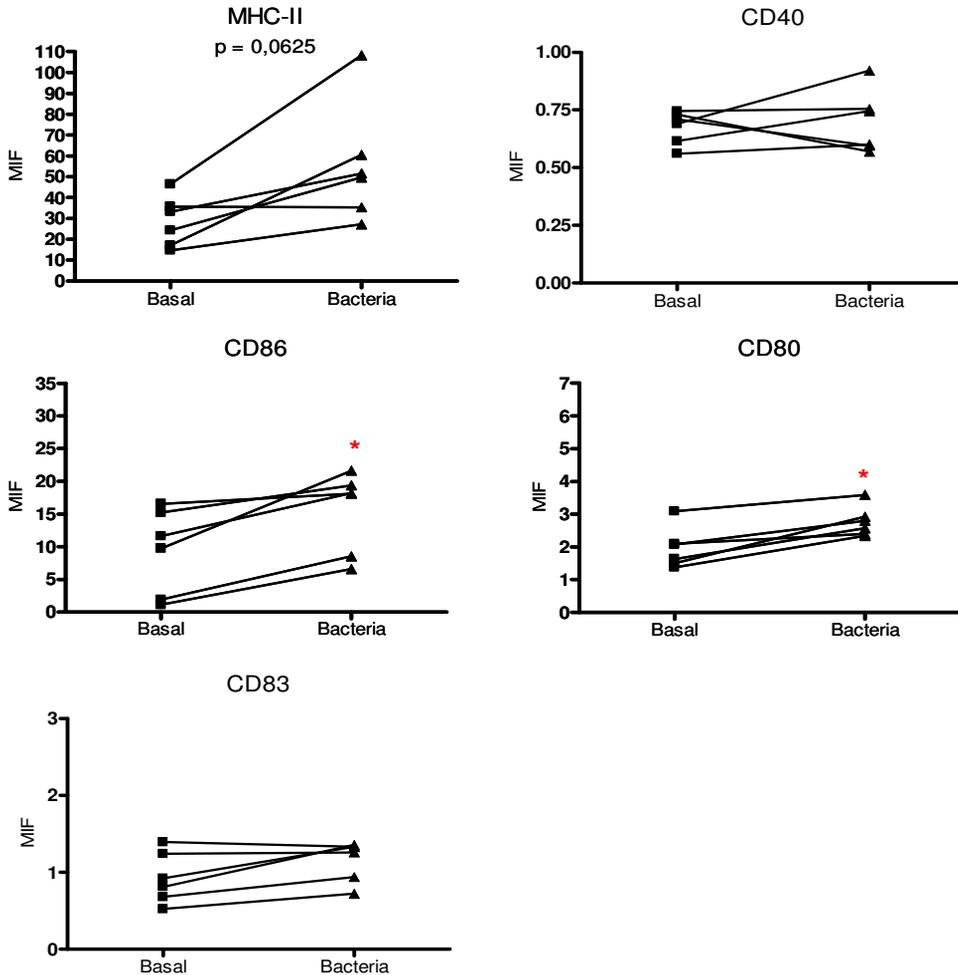


Figura 9. Marcadores de maduración en CDmo estimuladas con *C. perfringens*. Se observó un incremento significativo en la fluorescencia de CD86 y CD80. Los valores se representan como MIF y fueron analizados mediante el test pareado no paramétrico de Wilcoxon.

* Resultado estadísticamente significativo. * = $p \leq 0,05$.

Aunque los valores para el marcador MHC-II no fueron significativos en las CDmo estimuladas con *C. perfringens*, se puede observar que en 5 de los 6 donantes se indujo un aumento en la fluorescencia. Los niveles de fluorescencia de CD83 no fueron significativos, aunque sí lo fueron los porcentajes de CD positivas para este marcador (Fig. S1B).

• *L. rhamnosus*

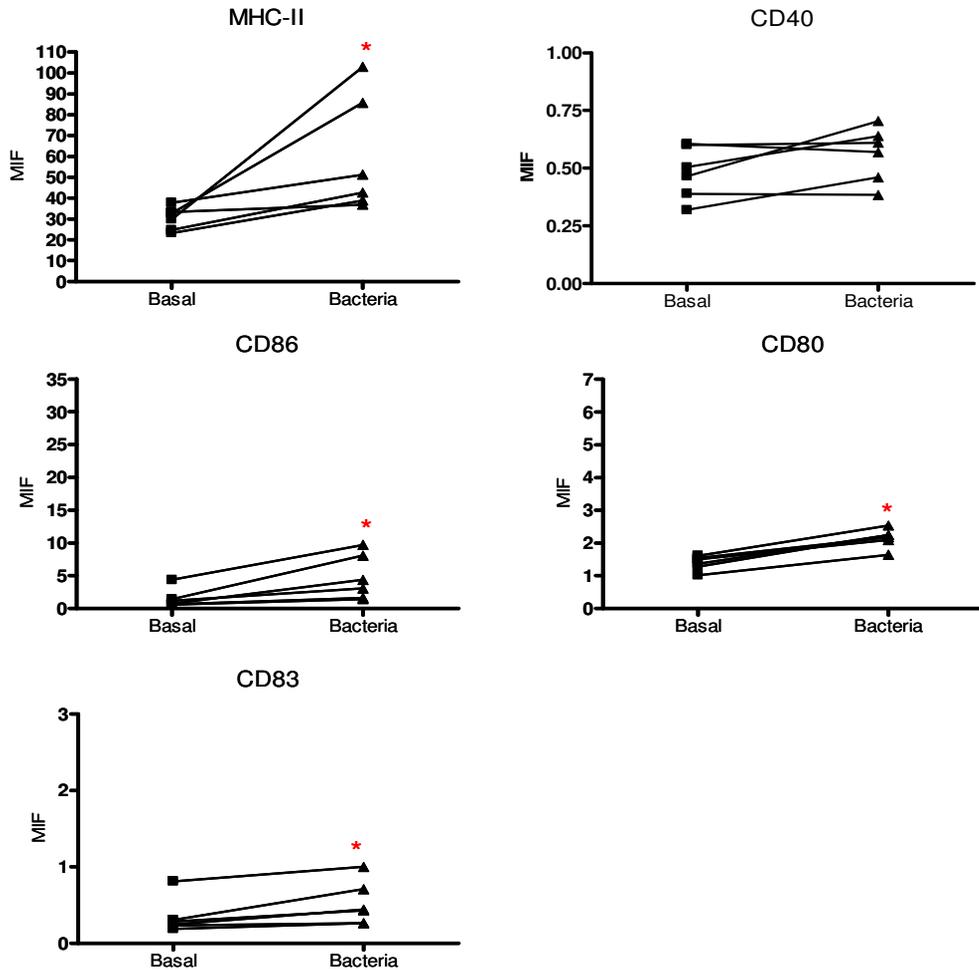


Figura 10. Marcadores de maduración en CDmo estimuladas con *L. rhamnosus*. Se observó un incremento significativo en la fluorescencia de MHC-II, CD86, CD80 y CD83. Los valores se representan como MIF y fueron analizados mediante el test pareado no paramétrico de Wilcoxon.

* Resultado estadísticamente significativo. * = $p \leq 0,05$.

El probiótico *L. rhamnosus* indujo un incremento en la intensidad de la fluorescencia de todos los marcadores a excepción de CD40. Sin embargo, aunque la estadística no resultó significativa, los resultados fueron bastante heterogéneos, observándose, en algunos casos, incrementos tanto en el porcentaje de células CD40⁺ (Fig. S1C), como en la intensidad de la fluorescencia.

• *L. acidophilus*

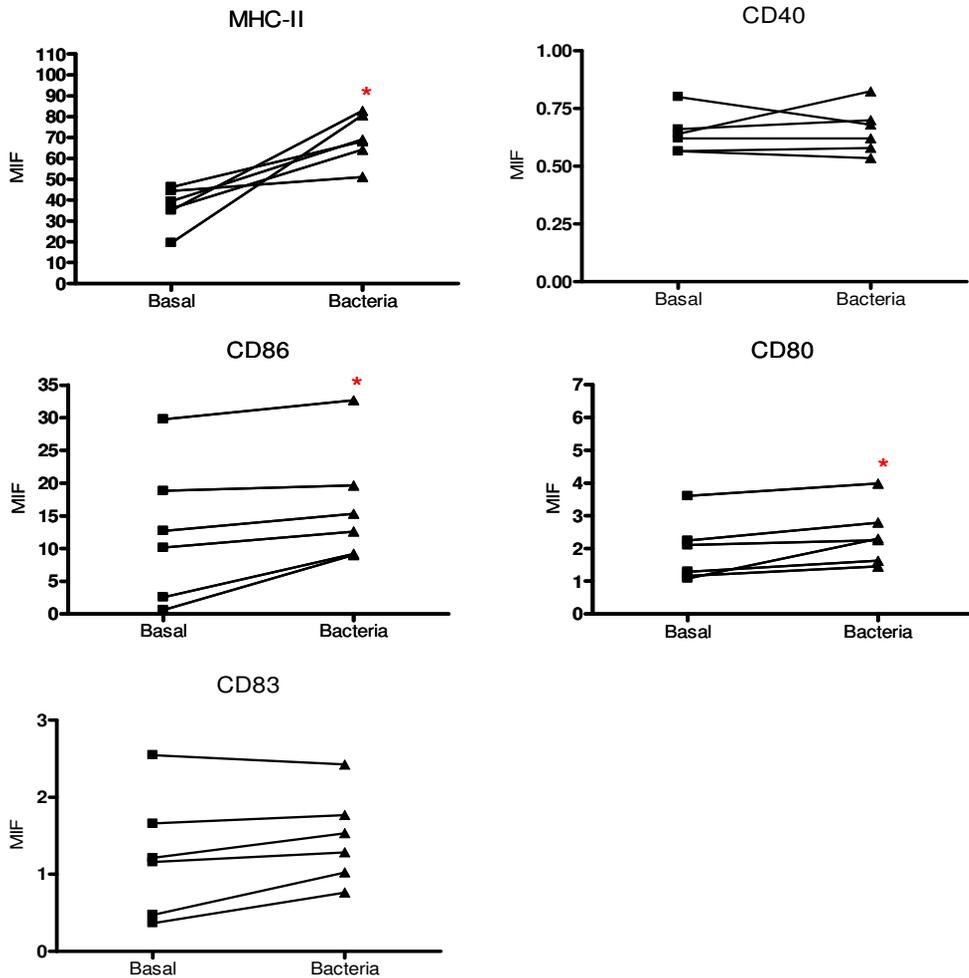


Figura 11. Marcadores de maduración en CDmo estimuladas con *L. acidophilus*. Se observó un incremento significativo en la fluorescencia de MHC-II, CD86 y CD80. Los valores se representan como MIF y fueron analizados mediante el test pareado no paramétrico de Wilcoxon.

* Resultado estadísticamente significativo. * = $p \leq 0,05$.

Los valores para CD83, aunque no resultaron significativos con respecto al basal, fueron mayores en 5 de los 6 donantes, observándose además, un incremento en el porcentaje de CDmo CD83⁺ (Fig. S1D). Para CD40, *L. acidophilus* fue menos eficiente induciendo su expresión. Para el resto de marcadores se observaron diferencias significativas con respecto a la condición basal.

Resultados.

• *L. salivarius*

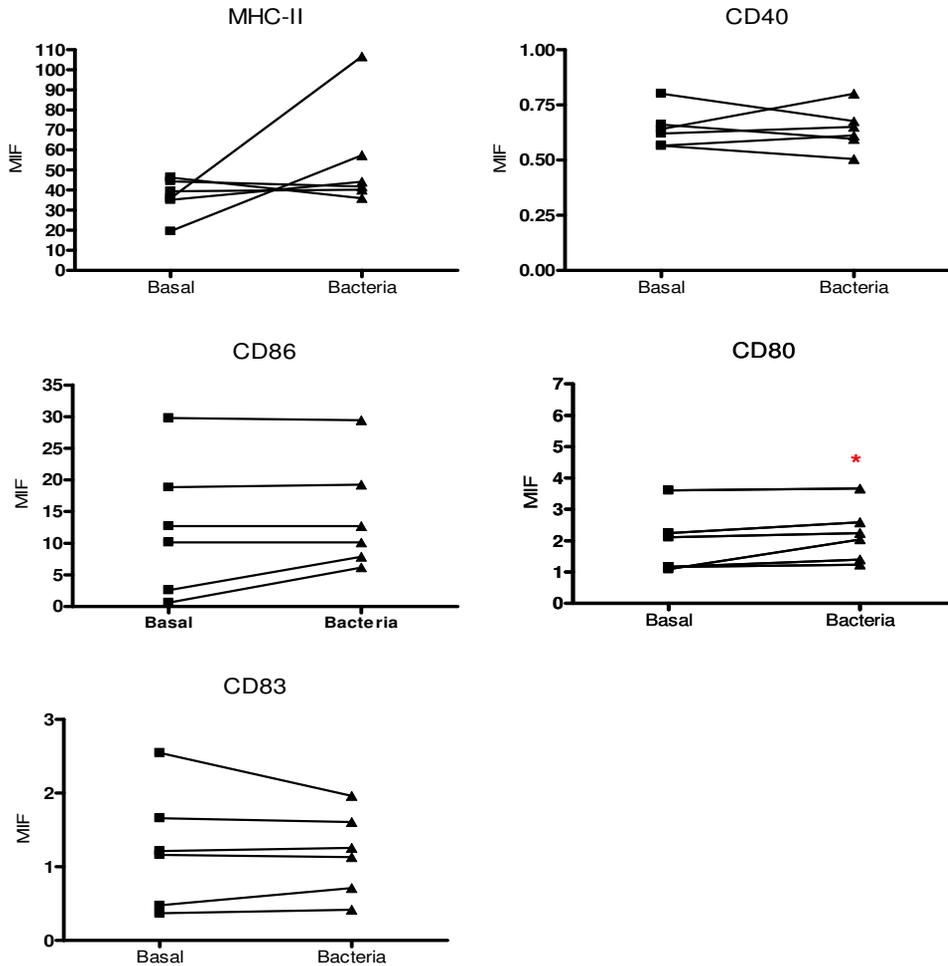


Figura 13. Marcadores de maduración en CDmo estimuladas con *L. salivarius*. *L. salivarius* apenas indujo la expresión de moléculas coestimuladoras sobre las CDmo, induciendo solo un incremento significativo para CD80. Los valores se representan como MIF y fueron analizados mediante el test pareado no paramétrico de Wilcoxon.

* Resultado estadísticamente significativo. * = $p \leq 0,05$.

El marcador MHC-II, cuya expresión fue incrementada por el resto de lactobacilos, solo se vio afectado en 2 de los 6 donantes. Los valores de incremento de MIF para CD80 con respecto al basal resultaron significativos. Para el resto de marcadores no se observaron apenas diferencias. En comparación con el resto de lactobacilos, *L. salivarius* indujo menores niveles en los marcadores estudiados.

• *B. lactis* Bb12

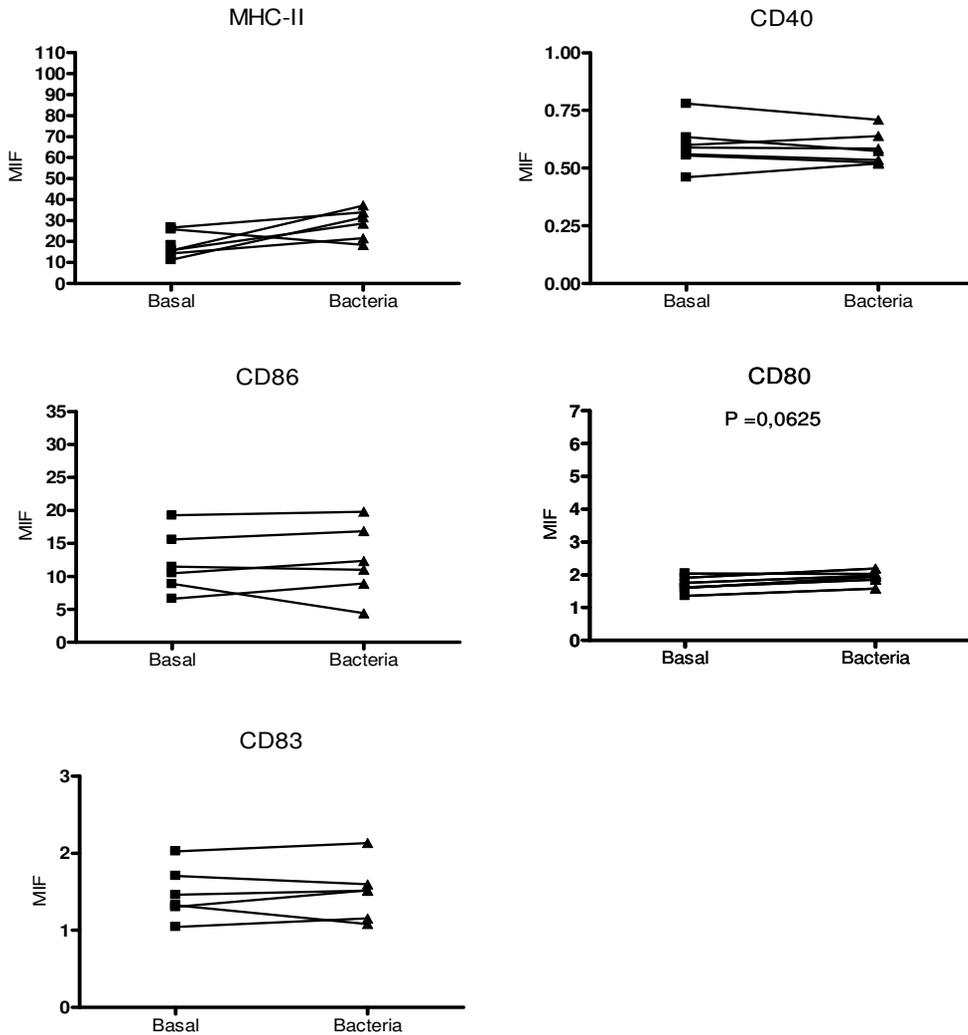


Figura 14. Marcadores de maduración en CDmo estimuladas con *B. lactis* Bb12. *B. lactis* Bb12 apenas indujo variaciones en los marcadores estudiados con respecto a la condición basal. Los valores se representan como MIF y fueron analizados mediante el test pareado no paramétrico de Wilcoxon.

* Resultado estadísticamente significativo. * = $p \leq 0,05$.

La bifidobacteria *B. lactis* Bb12 incrementó los niveles de las moéculas MHC-II en 4 de los 6 donantes, aunque apenas indujo la expresión de moléculas coestimuladoras sobre las CDmo.

Resultados.

• *B. lactis* BI07

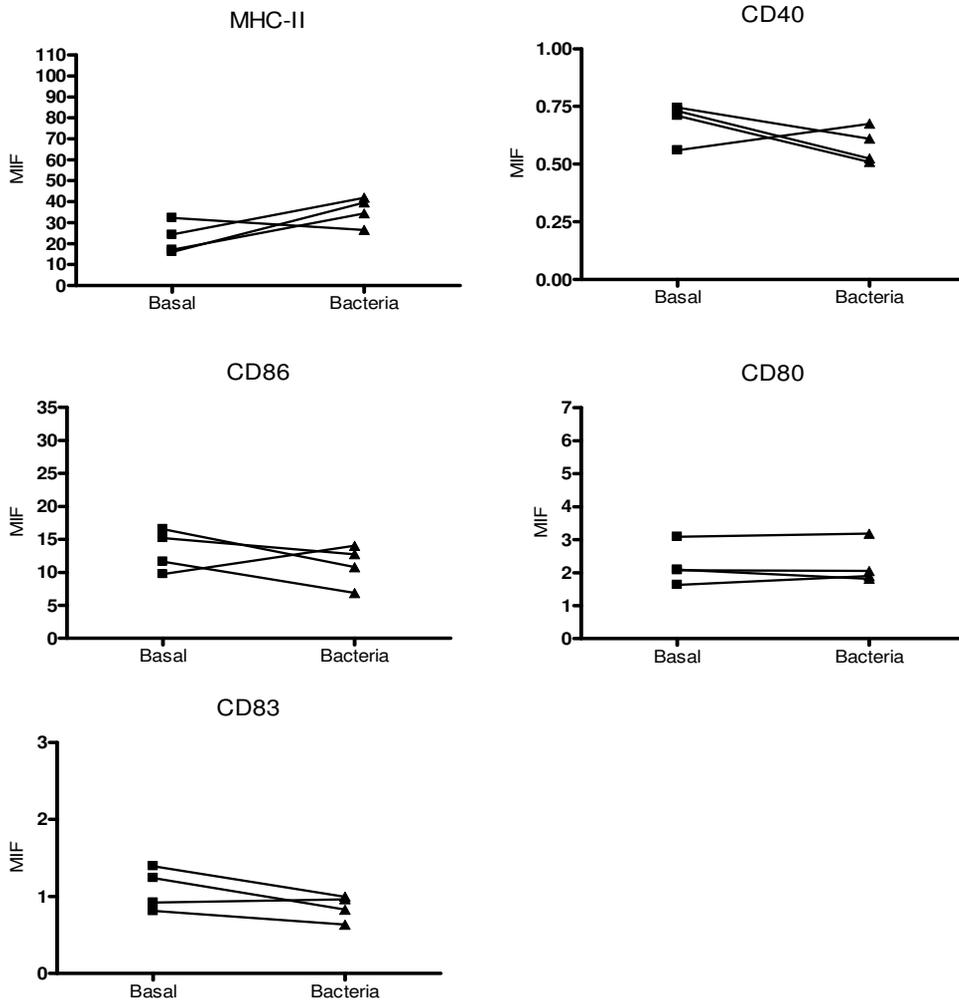


Figura 15. Marcadores de maduración en CDmo estimuladas con *B. lactis* BI07. *B. lactis* BI07 solo incrementó la expresión del MHC-II. Los valores se representan como MIF y fueron analizados mediante el test pareado no paramétrico de Wilcoxon.

* Resultado estadísticamente significativo. * = $p \leq 0,05$.

Las CDmo estimuladas con *B. lactis* BI07 presentaron los niveles más bajos en las moléculas estudiadas. En algunos donantes, disminuyeron incluso los valores de MIF de CD40, CD86 y CD83. Esta disminución también se observó en los porcentajes de células positivas para CD40 y CD83, siendo más notable el efecto sobre CD40, que disminuyó en torno a un 25% (Fig. S1H).

1. 2. Expresión de genes relacionados con la vía de transducción activada por TLR.

Dentro de los distintos tipos de PRR que se encuentran presentes en las CD, se analizaron los genes relacionados con la activación de los TLR debido a la gran variedad de antígenos que reconocen como grupo. Se estudió la expresión de los receptores, adaptadores de la ruta, vías desencadenadas y moléculas cuya expresión es activada por estos receptores (Tabla S1). Además, se analizaron también los niveles de expresión de otros receptores que pueden estar involucrados en el reconocimiento de las bacterias (*NOD2*), intermediarios de otras vías, (*SOCS2*, *SOCS3*, *SOCS4* y *STAT3*) y otras moléculas de interés (*IL17A*, *TGFB*, *TSLP*, *PPARG* y *ALDH1A2*).

Para estos ensayos, las CDmo se estimularon durante 6 horas con las bacterias vivas en fase exponencial a una MDI de 50. Las bacterias usadas para este experimento fueron: los probióticos *L. rhamnosus* (LR), *L. acidophilus* (LA), *L. fermentum* (LF), *L. salivarius* (LS), *B. lactis* Bb12 (Bb12), *B. lactis* BI07 (BI07); el control patógeno Gram-negativo *S. typhimurium* (ST); y el control patógeno Gram-positivo *C. perfringens* (CP). Las CDmo obtenidas de cada donante se estimularon de manera independiente y la extracción de su ARN se realizó también de manera individual. Una vez que se tuvieron todos los ARN, se mezcló la misma cantidad de ARN de cada donante para cada condición. Las qPCR se llevaron a cabo por duplicado y los resultados se analizaron mediante el método del $\Delta\Delta Ct$. Las unidades de las gráficas están representadas como *Fold Change* (FC), normalizadas con el gen de referencia (*RPL13A* o *GADPH*) y con respecto a la condición basal (CDmo sin estimular). Como umbral para determinar si había diferencias con respecto a la condición basal se tomó ± 3 FC.

En conjunto, los probióticos fueron capaces de modificar los niveles de expresión del ARNm de varios de los genes estudiados. Sin embargo, los efectos sobre la expresión de *IFNG*, *IL2*, *IFNB1* y *CXCL10* fueron más específicos para algunos tipos de bacterias.

1.2.1. Receptores de reconocimiento de patrones.

Se representan los PRR en los que se observó algún cambio en los niveles de expresión de su ARNm correspondiente.

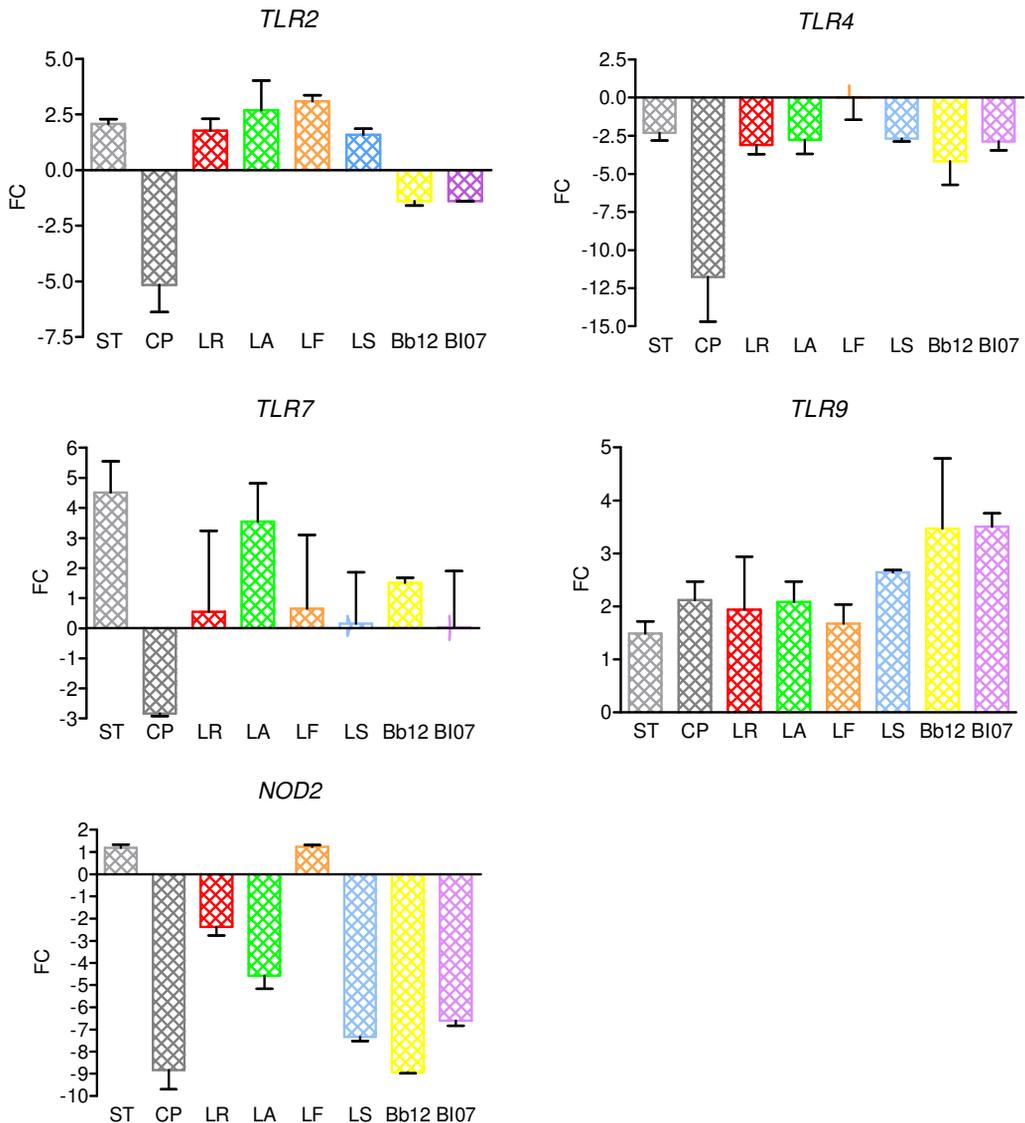


Figura 16. Cambios en los niveles de expresión de ARNm de *TLR2*, *TLR4*, *TLR7*, *TLR9* y *NOD2* en CDmo estimuladas con bacterias. Los valores están representados como FC con respecto a la condición basal. El gen de referencia utilizado para la normalización fue el gen ribosomal *RPL13A*.

ST: *S. typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

Con respecto a los TLR, se observaron pocas diferencias en los niveles de expresión de sus ARNm en comparación con la condición basal. Los niveles de expresión del *TLR2*, cuyo principal ligando es el PGN (componente mayoritario de las bacterias Gram-positivas), fueron ligeramente superiores en las CDmo estimuladas por *L. fermentum* (3,09 FC), mientras que el resto de bacterias apenas modificaron su expresión, a excepción de *C. perfringens* que indujo unos niveles de ARNm por debajo de la condición basal. Los niveles de expresión del *TLR4*, principal receptor del LPS, apenas se vieron modificados, a excepción de CDmo estimuladas con *C. perfringens* (-11,76 FC), *L. rhamnosus* (-3,11 FC) y *B. lactis* Bb12 (-4,17 FC) que presentaron unos niveles de expresión del ARNm por debajo de la condición basal. Las CDmo estimuladas con *L. acidophilus* y *S. typhimurium* presentaron unos niveles ligeramente superiores en la expresión de *TLR7* de 3,54 FC y 4,51 FC respectivamente. Las CDmo estimuladas con las dos bifidobacterias presentaron unos niveles de *TLR9* de 3,47 FC (Bb12) y 3,5 FC (BI07). Respecto al efecto de las diferentes especies de bacterias sobre los niveles de expresión del ARNm de *NOD2*, las variaciones fueron más notables, observándose unos niveles por debajo de la condición basal en las CDmo estimuladas por *C. perfringens* (-8,84 FC), *L. acidophilus* (-4,57 FC), *L. salivarius* (-7,34 FC), *B. lactis* Bb12 (-8,94 FC) y *B. lactis* BI07 (-6,61 FC).

1.2.2. Intermediarios y adaptadores de la ruta

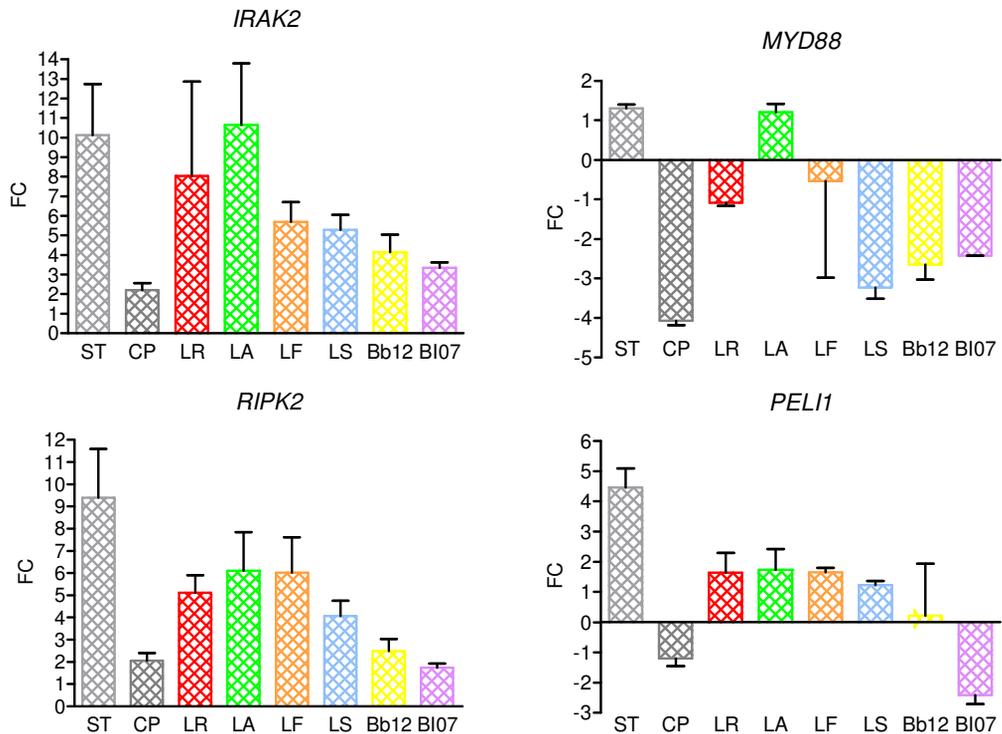


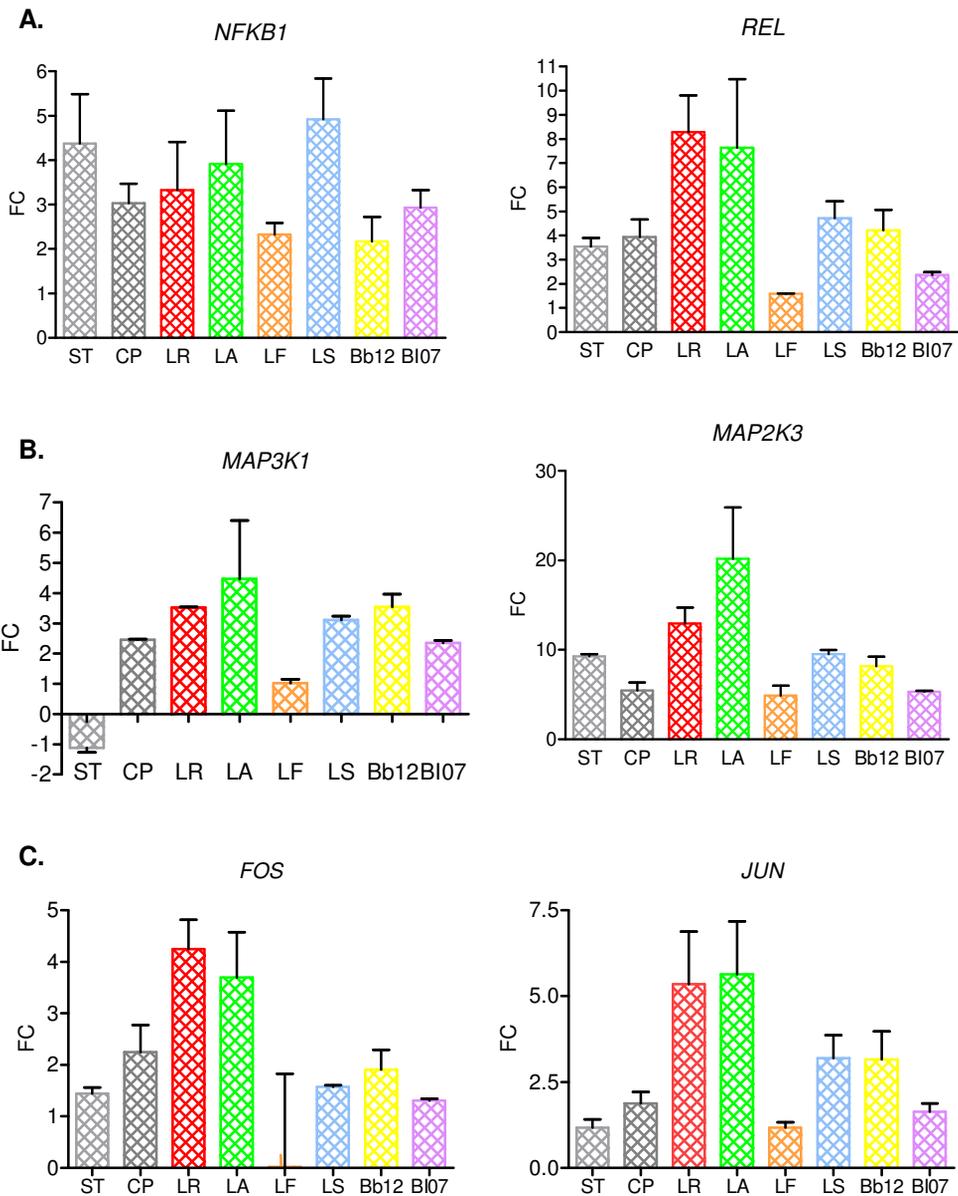
Figura 17. Cambios en los niveles de expresión de ARNm de *IRAK2*, *RIPK2*, *PELI1* y *MYD88* en CDmo estimuladas con bacterias. Los valores están representados como FC con respecto a la condición basal. El gen de referencia utilizado para la normalización fue el gen ribosomal *RPL13A*.

ST: *S. typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

A las 6 horas de estímulo, no se observó ningún cambio en los niveles de expresión de ARNm de *IRAK1*, intermediario que interviene muy pronto en la ruta de los TLR, no obstante, la expresión de *IRAK2*, que actúa más tarde en la ruta, sí se vio modificada por casi todas las bacterias, a excepción de *C. perfringens* y *B. lactis* BI07. El patrón que se encontró para *RIPK2* fue similar al observado en *IRAK2*. Las bifidobacterias y *C. perfringens* no modificaron los niveles de expresión de ARNm de *RIPK2*, mientras que las CDmo estimuladas con *S. typhimurium* presentaron los niveles más altos (9,39 FC), y los lactobacilos de entre 4,06 FC (*L. salivarius*) y 6,11 FC (*L. acidophilus*). La expresión de *PELI1*, un intermediario del TLR3 y del TLR4 que

favorece la ruta a través del intermediario TRIF (Chang et al., 2009), solo se vio modificada en llas CDmo estimuladas con *S. typhimurium*. No se observaron diferencias para el resto de adaptadores e intermediarios.

1.2.3. Vías desencadenadas



Resultados.

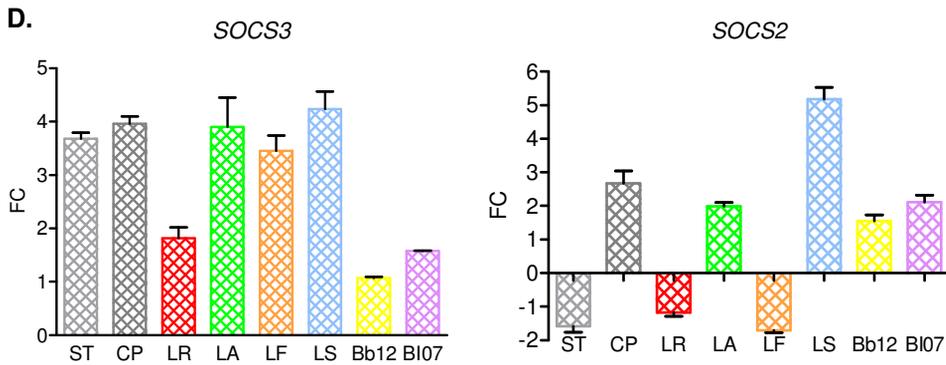


Figura 18. Cambios en los niveles de expresión de ARNm de genes cuyos productos están involucrados en las vías desencadenadas por la activación de los TLR: A. NF- κ B (*NFKB1*, *REL*); B. MAPK (*MAP3K1*, *MAP2K3*); C. AP-1 (*FOS*, *JUN*); D. SOCS (*SOCS3* y *SOCS2*) en CDmo estimuladas con bacterias. Los valores están representados como FC con respecto a la condición basal. El gen de referencia utilizado para la normalización fue el gen ribosomal *RPL13A*, excepto para *SOCS* que se utilizó el *GADPH*. ST: *S. typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

Para las moléculas implicadas en la ruta del NF- κ B (Fig. 18.A), factor que controla la transcripción de numerosos genes, se observó que todas las bacterias produjeron ligeros cambios en la expresión de ARNm de *NFKB1* (gen que codifica para el precursor de p50). Los incrementos en los niveles de ARNm de *REL* (C-REL) fueron mayores en el caso de las CD estimuladas con *L. rhamnosus* (8,3 FC) y *L. acidophilus* (7,6 FC). Se observó, que la vía de las MAPK (Fig. 18.B) fue modificada por las distintas bacterias. Los niveles de expresión de ARNm de *MAP2K3* se situaron por encima de la condición basal en todos los casos, produciéndose el cambio más agudo en las CDmo estimuladas con *L. acidophilus* (20,15 FC) y *L. rhamnosus* (12,95 FC). Los niveles de expresión de ARNm de otras MAPK, como *MAP3K1* también se vio modificada con algunos probióticos como *L. rhamnosus* (3,51 FC), *L. acidophilus* (4,47 FC), *L. salivarius* (3,11 FC) y *B. lactis* Bb12 (3,54 FC). Las proteínas C-FOS y C-JUN pueden constituir el factor de transcripción AP-1, y como se observa en la figura 18.C, *L. rhamnosus* (*FOS*: 4,2 FC; *JUN*: 5,3 FC) y *L. acidophilus* (*FOS*: 3,7 FC; *JUN*: 5,6 FC) desencadenaron los mayores incrementos en sus niveles de ARNm. La expresión de la familia de proteínas supresoras de la señalización por citocinas (SOCS) también puede verse afectada por la activación de los TLR. Los dos controles patógenos y los probióticos *L. acidophilus*, *L. fermentum* y *L. salivarius*, indujeron unos niveles de expresión de ARNm de *SOCS3* por encima de 3 FC, sin embargo ni las

bifidobacterias ni *L. rhamnosus* superaron este umbral. En cambio, los niveles de expresión de ARNm de *SOCS2* solo se incrementaron en las CDmo estimuladas con *L. salivarius*.

1.2.4. Citocinas de perfil Th1

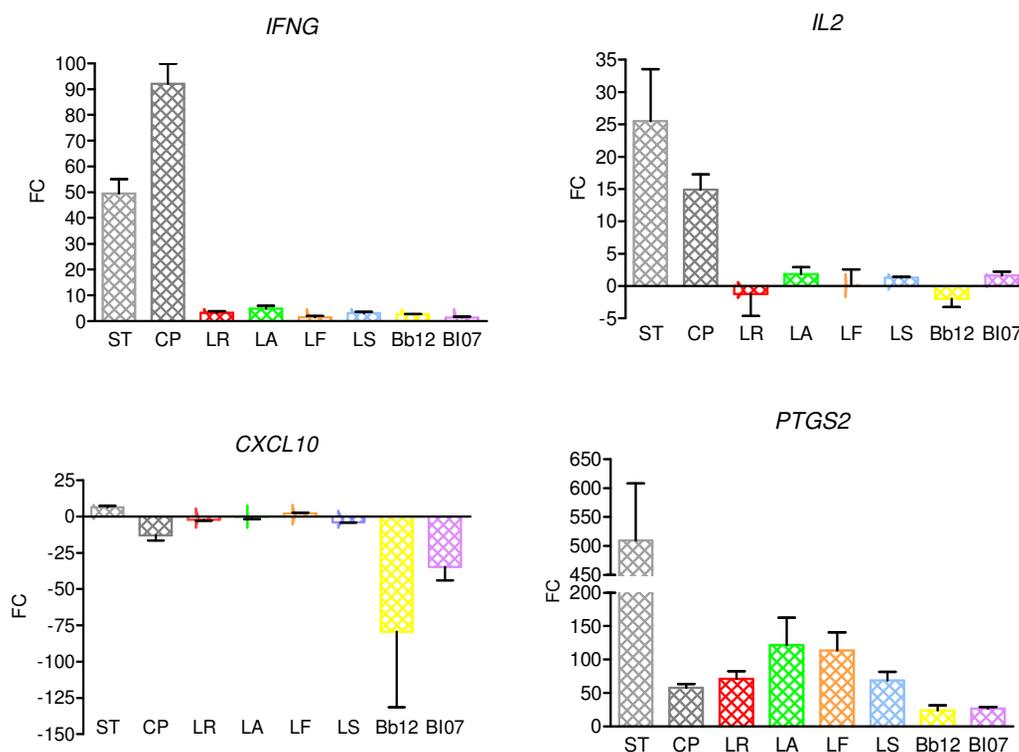


Figura 19. Cambios en los niveles de expresión de ARNm de *IL2*, *IFNG*, *CXCL10* y *PTGS2*- en CDmo estimuladas con bacterias. Los valores están representados como FC con respecto a la condición basal. El gen de referencia utilizado para la normalización fue el gen ribosomal *RPL13A*.

ST: *S. typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

Algunos lactobacilos indujeron un ligero cambio en los niveles de expresión de ARNm de *IFNG* (*L. rhamnosus*: 3,17 FC; *L. acidophilus*: 4,86 FC y *L. salivarius*: 3,06 FC), aunque muy por debajo del producido por los controles *S. typhimurium* y *C. perfringens* (92 FC y 49,4 FC respectivamente). Para el gen de la IL-2, citocina que favorece la proliferación de los linfocitos, no se observaron variaciones en los niveles

de expresión de su ARNm en CDmo estimuladas con los probióticos, en cambio, los controles patógenos sí que desencadenaron un cambio importante (*S. typhimurium*: 25,48 FC y *C. perfringens*: 14,88 FC). Para la quimiocina CXCL10, los mayores cambios se encontraron en las CDmo estimuladas con *C. perfringens*, *B. lactis* Bb12 y *B. lactis* BI07, presentando unos niveles de expresión por debajo de los observados en la condición basal (-12,86 FC, -79,52 FC, -34,87 FC respectivamente). Los niveles de expresión de ARNm de *PTGS2* se vieron afectados por todas las bacterias, aunque el mayor incremento se encontró en las CDmo estimuladas con el control patógeno *S. typhimurium* (509 FC) y el menor con las bifidobacterias (23 FC).

1.2.5. Citocinas relacionadas con el perfil Th2 y linfocitos T reguladores.

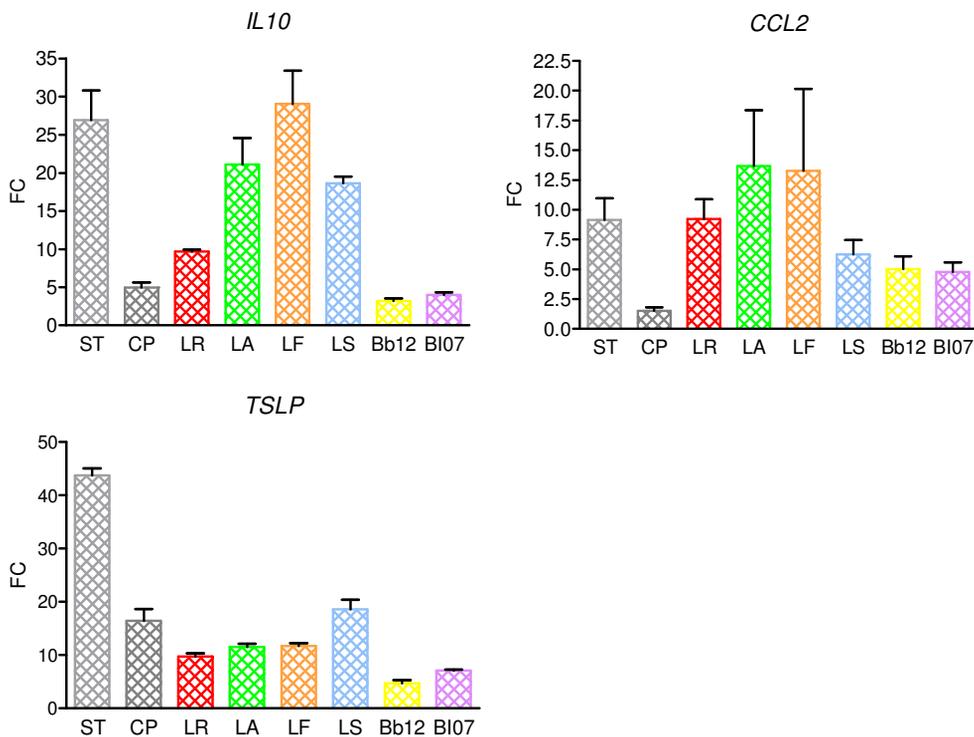


Figura 20. Cambios en los niveles de expresión de ARNm de *CCL2*, *TSLP* e *IL10* en CDmo estimuladas con bacterias. Los valores están representados como FC con respecto a la condición basal. El gen de referencia utilizado para la normalización fue el gen ribosomal *RPL13A*, excepto para *TSLP* que su utilizó el *GADPH*.

ST: *S. typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

Algunos de los lactobacilos utilizados, como *L. acidophilus* (21,08 FC), *L. fermentum* (29,07 FC) y *L. salivarius* (18,64 FC), incrementaron los niveles de expresión de ARNm de *IL10* en las CDmo, sin embargo este incremento también se encontró en las CDmo estimuladas con el control patógeno Gram-negativo *S. typhimurium* (26,92 FC). En relación a la quimiocina CCL2, todas las bacterias, con excepción de *C. perfringens*, afectaron de manera similar a los niveles de expresión de su ARNm. Los niveles de ARNm de *TSLP* se incrementaron de manera notable en las CDmo estimuladas con *S. typhimurium* (43,72 FC). El resto de las bacterias indujeron también un aumento en su expresión, pero en menor grado y con un rango similar, entre 4,69 FC (*B. lactis* Bb12) y 18,61 FC (*L. salivarius*).

1.2.6. Citocinas proinflamatorias

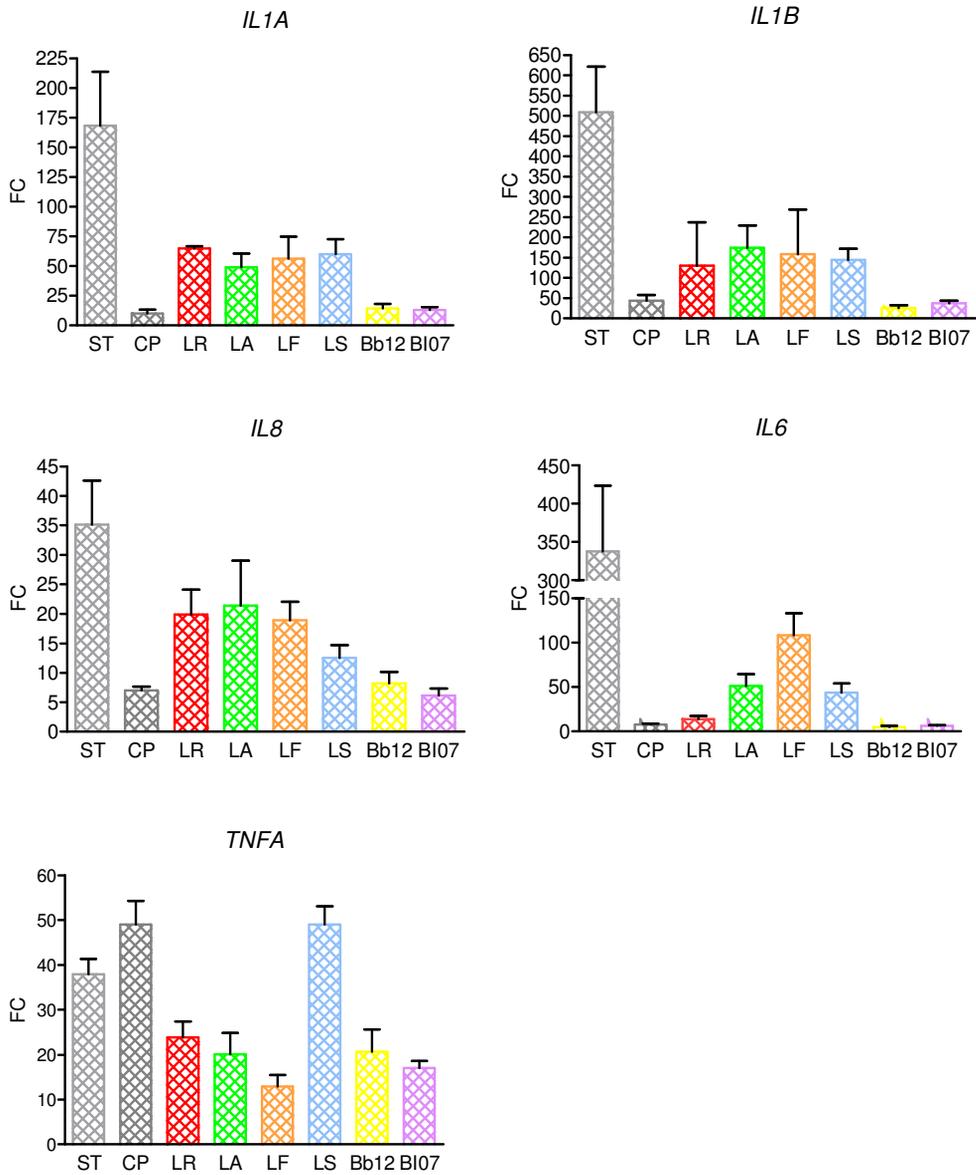


Figura 21. Cambios en los niveles de expresión de ARNm de *IL1A*, *IL1B*, *IL6*, *IL8* y *TNFA* en CDmo estimuladas con bacterias. Los valores están representados como FC con respecto a la condición basal. El gen de referencia utilizado para la normalización fue el gen ribosomal *RPL13A*.

ST: *S. typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

Respecto a *IL1A* e *IL1B*, el control patógeno *S. typhimurium* indujo el mayor incremento en los niveles de expresión de sus ARNm (*IL1A*: 168,41 FC; *IL1B*: 508,71FC), sin embargo, los lactobacilos también incrementaron los niveles de expresión de manera notable, y las bifidobacterias, junto con *C. perfringens*, desencadenaron los niveles más bajos (*IL1A*: *B. lactis* Bb12 = 14,26 FC, *B. lactis* BI07 = 12,94 FC, *C. perfringens* = 10,03 FC; *IL1B*: *B. lactis* Bb12 = 25,59 FC, *B. lactis* BI07 = 37,27 FC, *C. perfringens* = 44,12 FC). Con respecto a *IL6*, los cambios en los niveles de su ARNm fueron más específicos. Las CDmo estimuladas con lactobacilos *L. acidophilus*, *L. fermentum* y *L. salivarius* mostraron unos niveles expresión de ARNm de *IL6* por encima de la condición basal (51,07 FC, 108,26 FC y 43,46 FC respectivamente). No obstante, los mayores incrementos para este gen se observaron con el control patógeno *S. typhimurium* (337,64 FC). El resto de bacterias también indujeron cambios en los niveles de expresión, pero en menor grado. Para la *IL-8*, todas las bacterias utilizadas incrementaron los niveles de expresión de su ARNm, aunque de una manera más moderada que el observado con la *IL1A/B* y la *IL6*. El control patógeno Gram-negativo *S. typhimurium* desencadenó el mayor incremento en los niveles de expresión de ARNm de *IL8* (35,14 FC), mientras que los lactobacilos indujeron un incremento similar entre ellos, en torno a 20 FC. Las CDmo estimuladas con las bifidobacterias y *C. perfringens* se comportaron con respecto a la *IL8* de la misma manera que para *IL1A/B* y la *IL6*, induciendo pocos cambios con respecto a la condición basal que se situaron entre los 6-8 FC. Todas las bacterias tuvieron también un efecto sobre los niveles de expresión de ARNm de *TNFA*. Sin embargo, en este caso, observamos que *L. salivarius* y *C. perfringens* desencadenaron el mayor incremento (48,98 FC y 49,03 FC respectivamente).

1.2.7. Factores de crecimiento

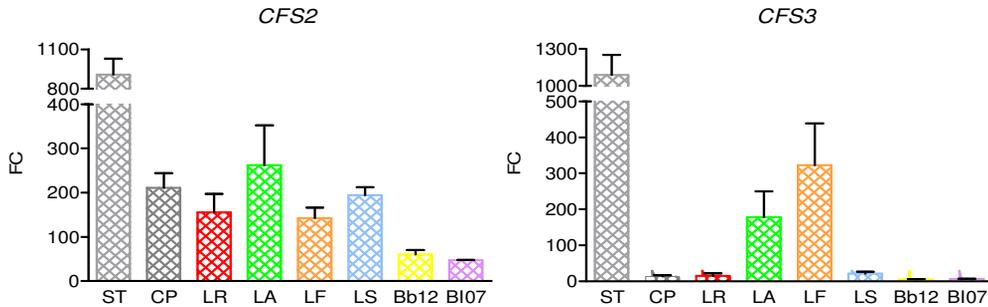


Figura 22. Cambios en los niveles de expresión de ARNm de *CSF2* y *CSF3* en CDmo estimuladas con bacterias. Los valores están representados como FC con respecto a la condición basal. El gen de referencia utilizado para la normalización fue el gen ribosomal *RPL13A*.

ST: *S. typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

Todas las bacterias utilizadas desencadenaron en las CDmo un incremento en los niveles de expresión de ARNm de *CSF2* con respecto a la condición basal, que varió desde los 46 FC (BI07) hasta los 906 FC (*S. typhimurium*). Sin embargo, los efectos sobre el otro factor estimulador de colonias (*CSF3*) fueron más específicos, ya que las bifidobacterias (Bb12 = 5,2 FC; BI07 = 6,2 FC), *L. rhamnosus* (14,6 FC), *L. salivarius* (20,9 FC) y *C. perfringens* (13,3 FC) indujeron un incremento bastante menor que el desencadenado por el resto de bacterias que superaron los 90 FC.

1.2.8. Citocinas antivirales

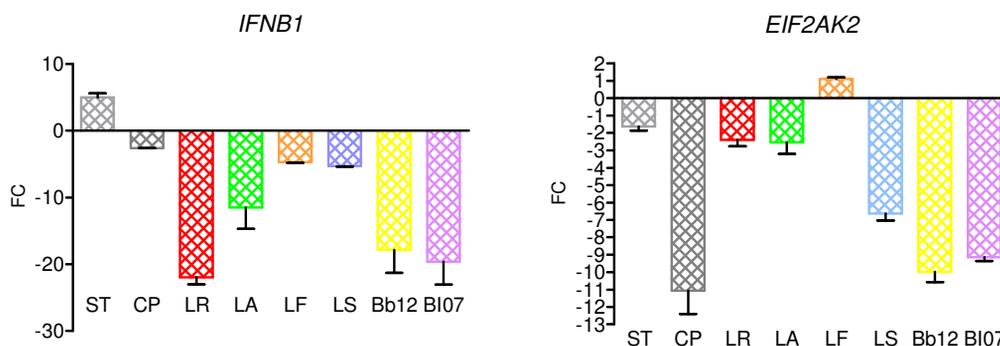
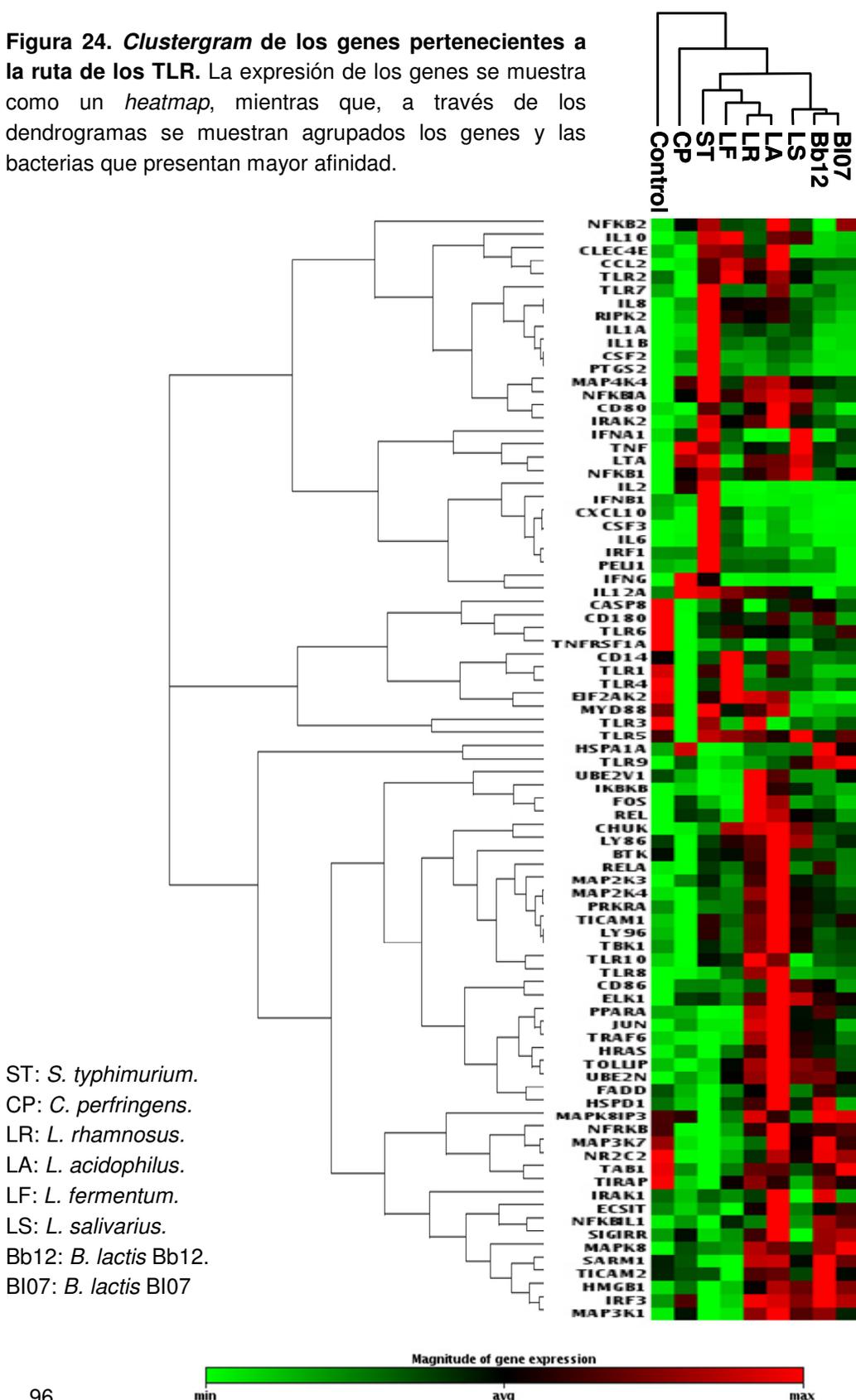


Figura 23. Cambios en los niveles de expresión de ARNm de *IFNB1* y *EIF2AK2* en CDmo estimuladas con bacterias. Los valores están representados como FC con respecto a la condición basal. El gen de referencia utilizado para la normalización fue el gen ribosomal *RPL13A*.

ST: *S. typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

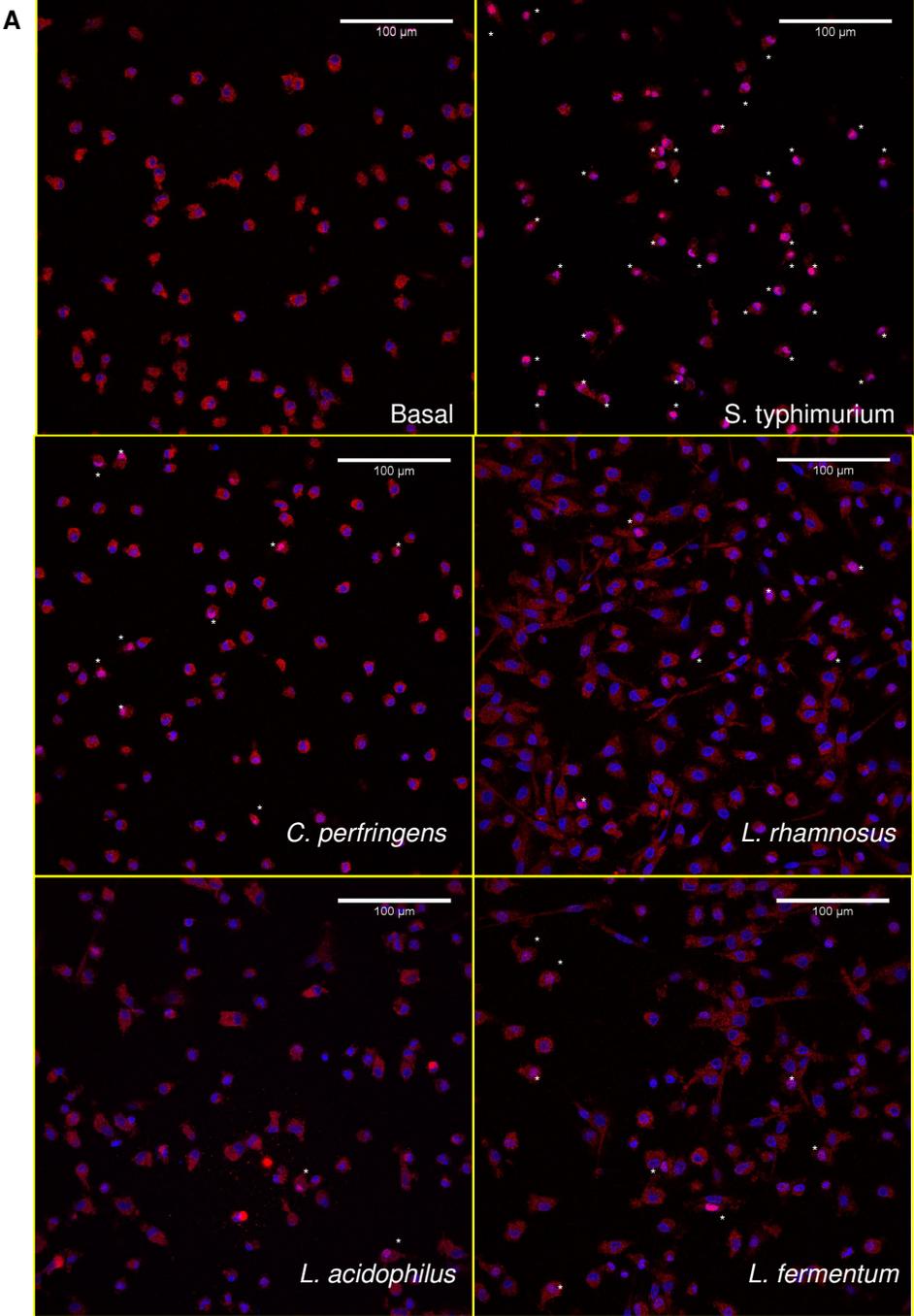
Los probióticos afectaron a los niveles de expresión de ARNm de algunas moléculas antivirales disminuyendo su expresión. En el caso de *IFNB1*, *L. rhamnosus* (-9,78 FC) y las bifidobacterias desencadenaron un mayor descenso (Bb12 = -10,92 FC; BI07 = -15,93 FC) en las CDmo, seguido de *L. acidophilus* (-5,46 FC), y por último de *L. fermentum* (-5,09 FC) y *L. salivarius* (-3,71 FC). En cambio, *S. typhimurium* incrementó los niveles de expresión de su ARNm en 5,26 FC, y *C. perfringens* no tuvo ningún efecto. Para el gen *EIF2AK2*, el lactobacilo *L. salivarius* (-4,64 FC), las bifidobacterias (Bb12 = -6,17 FC; BI07 = -7,5 FC) y *C. perfringens* (-7,6 FC) disminuyeron los niveles de expresión de su ARNm.

Figura 24. Clustergram de los genes pertenecientes a la ruta de los TLR. La expresión de los genes se muestra como un *heatmap*, mientras que, a través de los dendrogramas se muestran agrupados los genes y las bacterias que presentan mayor afinidad.



1.3. Activación del NF- κ B y análisis de la capacidad fagocítica.

El NF- κ B es uno de los principales factores que se puede activar en la ruta de los TLR, desencadenando la transcripción de numerosos genes involucrados en la respuesta inmunológica (Tripathi and Aggarwal, 2006). Por un lado, se analizó la activación del NF- κ B en las CDmo y por otro, si las CDmo eran capaces de fagocitar todas las especies de bacterias por igual.



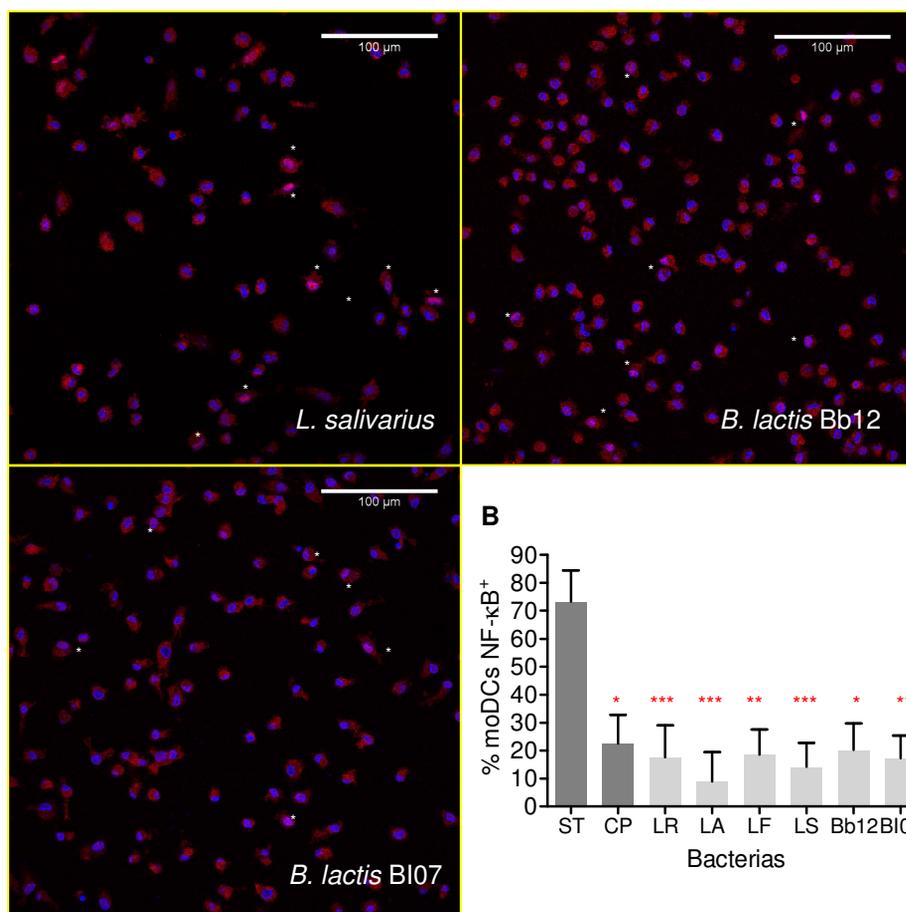


Figura 25. Marcaje del NF-κB (p65) en CDmo estimuladas con las diferentes especies de bacterias. A) Las CDmo fueron incubadas con las bacterias a una MDI de 50 durante 90 minutos. Se muestra una foto representativa de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. En cada experimento se tomó un total de 4 fotos de campos seleccionados de manera aleatoria. Los asteriscos blancos muestran las CDmo que presentan la unidad p65 dentro del núcleo. B) Porcentaje de CDmo que presentaban la subunidad p65 del NF-κB en el núcleo. Los datos fueron analizados mediante el test no paramétrico de Kruskal-Wallis y la corrección de Dunn. * Resultados estadísticamente significativos con respecto a las CDmo estimuladas con ST (* ≤ 0,05; ** ≤ 0,01; *** ≤ 0,001).

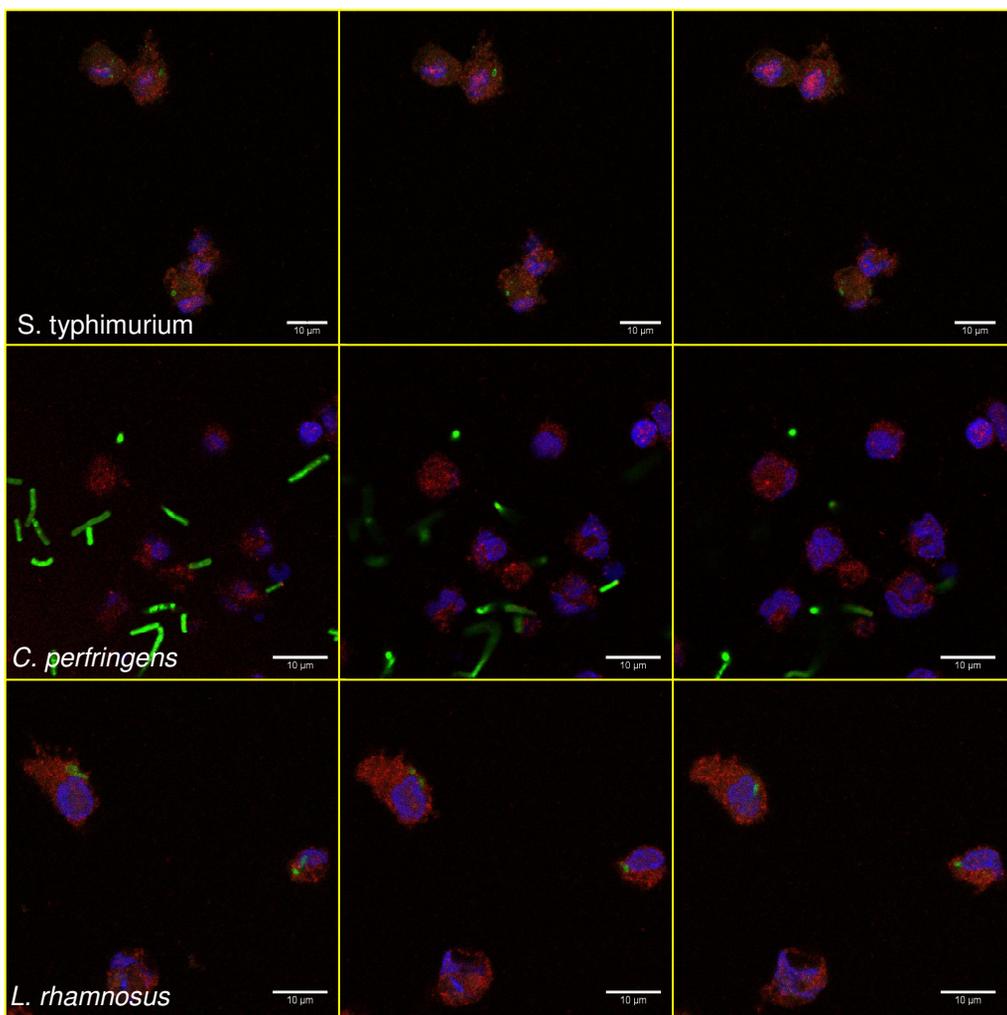
ST: *S. typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

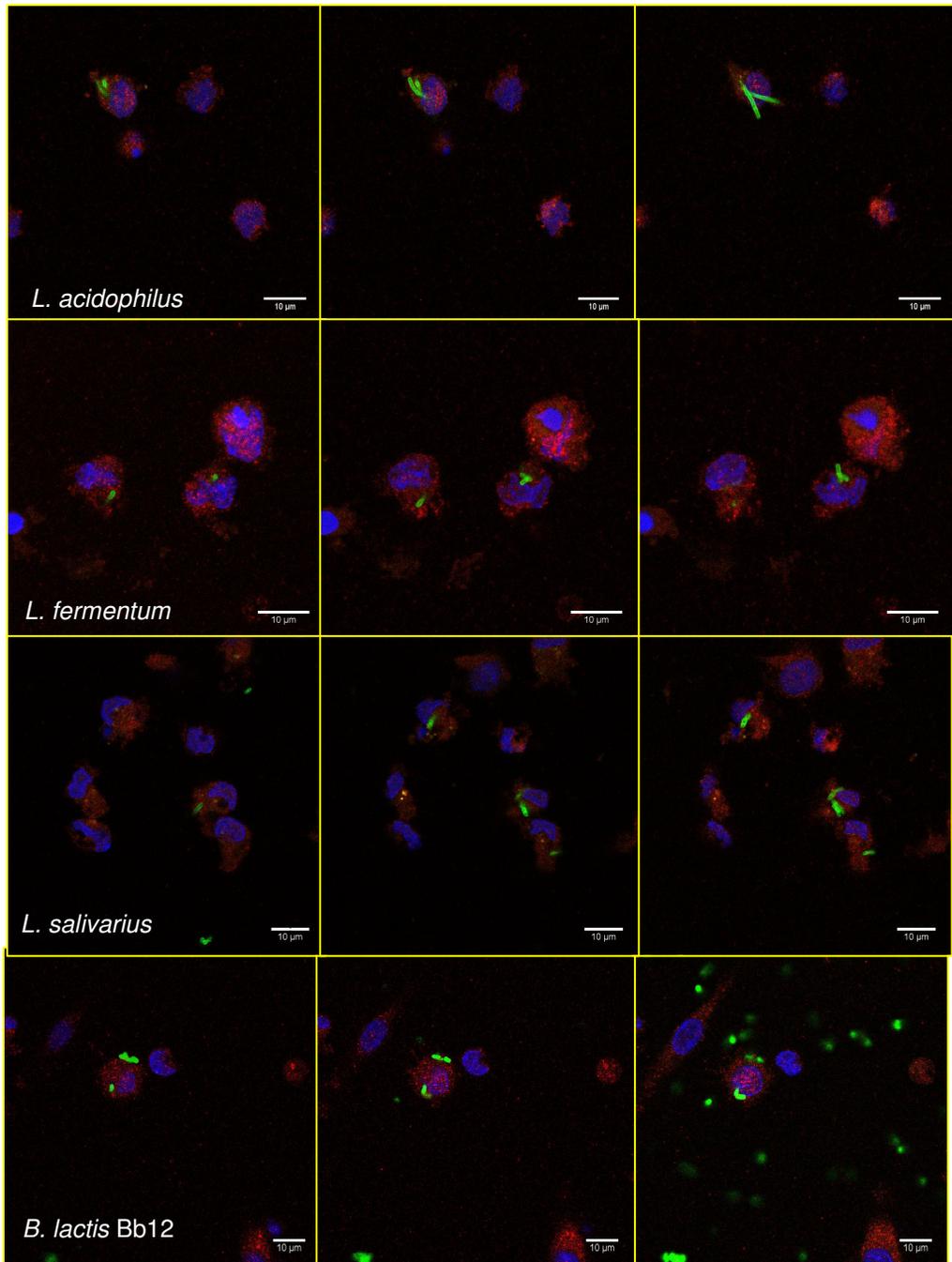
Los probióticos indujeron la traslocación del NF-κB al núcleo, aunque en una menor proporción que en el caso de las CDmo estimuladas con *S. typhimurium*. Con

Resultados.

respecto al patógeno *C. perfringens*, no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las CDmo estimuladas con los probióticos.

Posteriormente, se planteó si esta diferencia en la activación del NF- κ B, maduración y expresión de citocinas tendría algo que ver con la capacidad de las CD de fagocitar bacterias no patógenas. Para lo cual, se marcaron las bacterias con FITC y se cultivaron junto con las CDmo, y se analizó también la traslocación de la subunidad p65 al núcleo.





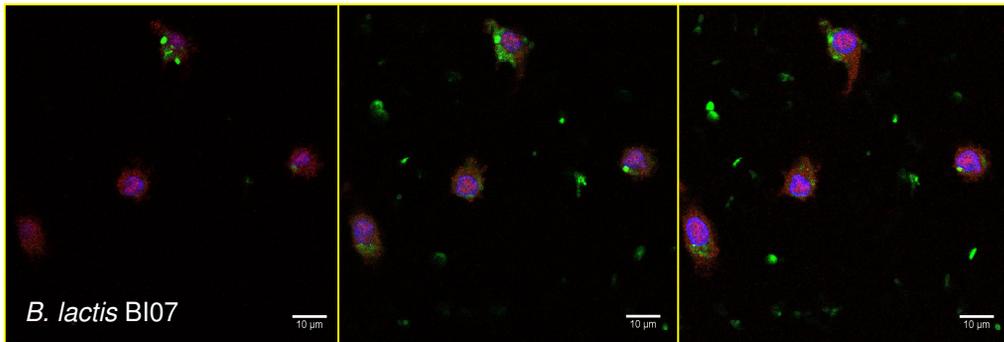


Figura 26. CDmo estimuladas con bacterias marcadas con FITC en las que se estudió la activación del NF- κ B (p65). Las CDmo se incubaron con las bacterias a una MDI de 50 durante 90 minutos. Se realizaron fotografías en cortes secuenciales a lo largo del eje Z para analizar la presencia de las bacterias en el interior celular. Se muestran 3 cortes de una secuencia representativa. Los experimentos se llevaron a cabo por duplicado a partir de sangre de dos donantes.

El control Gram-negativo *S. typhimurium* y los probióticos presentaron una localización intracelular. Sin embargo, el control patógeno Gram-positivo *C. perfringens*, aunque sí que indujo la activación del NF- κ B, no se encontró dentro de las CDmo. Entre los probióticos, se observó que *L. acidophilus* formaba estructuras alargadas que eran más difíciles de localizar intracelularmente que otros probióticos como las bifidobacterias.

1.4. Proliferación de linfocitos T vírgenes y su producción de IFN γ en un cultivo alogénico.

El ensayo alogénico, o reacción linfocitaria mixta (RLM), se realizó estimulando previamente las CDmo con las bacterias a una MDI de 10 durante 13 horas. Posteriormente, las CDmo se lavaron con medio de cultivo suplementado con gentamicina para eliminar las bacterias tanto extracelulares como intracelulares. Se aislaron los linfocitos T vírgenes, de un donante distinto del que provenían las CDmo (reacción alogénica), y se cocultivaron con las CDmo estimuladas en una proporción 1 CDmo : 5 T vírgenes durante 5 días. Al término del cultivo se analizó la proliferación de los linfocitos T vírgenes mediante CFSE y la presencia intracelular de IFN γ , IL-13 e IL-10.

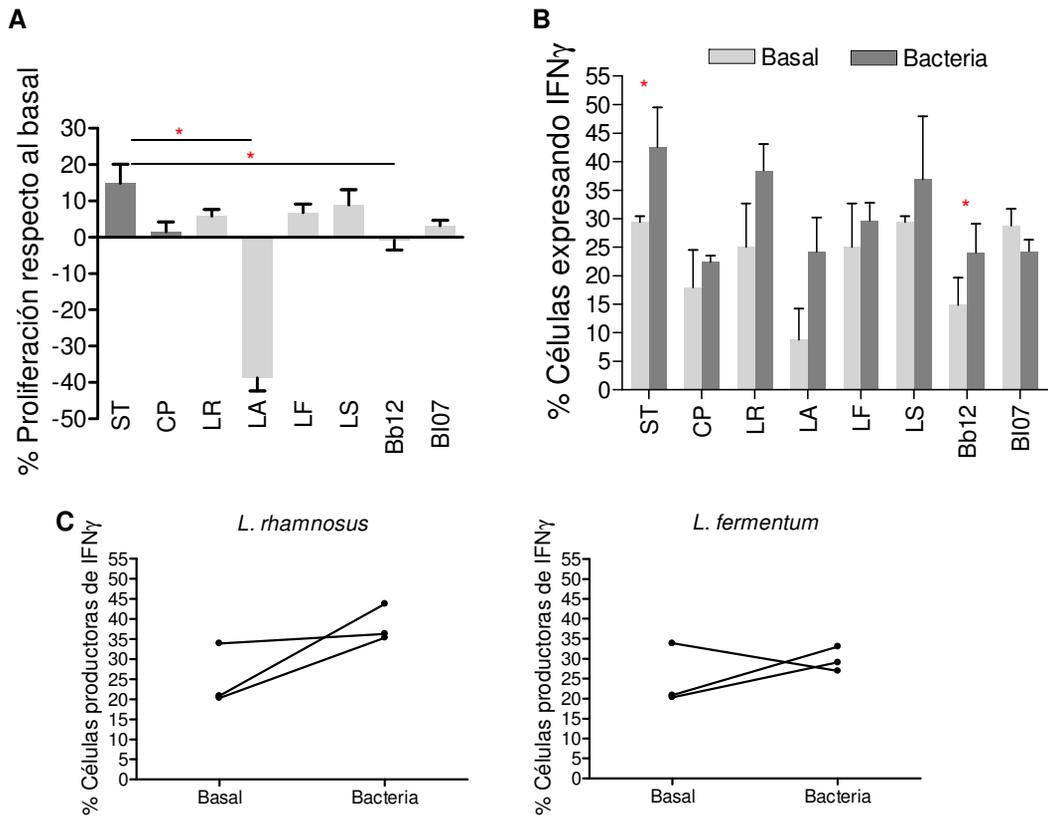


Figura 27. A) Porcentaje de linfoproliferación en un ensayo allogénico con CDmo estimuladas con las diferentes especies bacterianas. Los resultados están representados como la media \pm SD de los porcentajes de células CFSE a los cuales se les ha restado los porcentajes de proliferación de su condición basal. Los resultados se analizaron mediante el test no paramétrico Kruskal-Wallis y se aplicó el post test de Dunn. **B) Porcentaje de linfocitos que expresan IFN γ .** Los resultados están representados como la media \pm SD de los porcentajes de células IFN γ ⁺. Cada condición va acompañada de sus basales correspondientes. Los resultados se analizaron mediante un t test. **C) MLR con *L. fermentum* y *L. rhamnosus*.** Las condiciones basales para *L. rhamnosus* y *L. fermentum* fueron las mismas, sin embargo, las CDmo estimuladas con *L. rhamnosus* desencadenaron una mayor producción de IFN γ en comparación con *L. fermentum*. Además, en el experimento en el que los linfocitos T presentaban unos mayores niveles basales de IFN γ , las CDmo estimuladas con *L. fermentum* modularon la expresión de IFN γ disminuyéndola, efecto que no se observó con *L. rhamnosus*.

Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado. Las repeticiones dentro del mismo experimento se analizaron de manera conjunta. * Resultados estadísticamente significativos (* p < 0,05).

ST: *S. Typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

Como se observa en la figura 27.A, cuando se estimularon las CDmo con *L. acidophilus*, éstas disminuyeron la capacidad de proliferación de los linfocitos T vírgenes alogénicos de manera notable con respecto a su condición basal. No obstante, los linfocitos que proliferaron también expresaron IFN γ (Fig. 26B). En el caso de *L. acidophilus* y *B. lactis* Bb12 las diferencias de proliferación con respecto al control patógeno *S. typhimurium* resultaron significativas. Además de la proliferación, se determinó el perfil que presentaban los linfocitos T. Aunque se analizó la presencia intracelular de IFN γ , IL-10 e IL-13, solo se observaron células productoras de IFN γ . En el caso de *S. typhimurium* y *B. lactis* Bb12, la producción de IFN γ resultó significativa con respecto a su correspondiente condición basal (Fig. 26.B).

Al igual que en los experimentos de maduración de las CDmo (apartado 1.1), la expresión de IFN γ en los linfocitos T varió dependiendo de las condiciones basales en que se encontraran las CDmo cuando fueron estimuladas. De este modo, aunque en una visión global se observó que la producción de IFN γ es incrementada por la mayoría de las bacterias, analizando los experimentos de manera individual, se observaron distintos comportamientos de los probióticos partiendo de las mismas condiciones basales (Fig. 26.C).

2. EFECTO DE LOS PROBIÓTICOS Y DOS ESPECIES PATÓGENAS SOBRE LAS CÉLULAS CACO-2.

2.1. Efectos sobre la expresión de *IL8*, *CXCL10* y *CCL20*.

Las células Caco-2 se utilizaron como modelo de cultivo para analizar cual sería el efecto de los probióticos sobre el epitelio intestinal. Se utilizaron células Caco-2 cultivadas durante 7 días (placas de cultivo de 24 pocillos) y 21 días (insertos) simulando el estado en el que se encontrarían los enterocitos en las criptas y en las vellosidades.

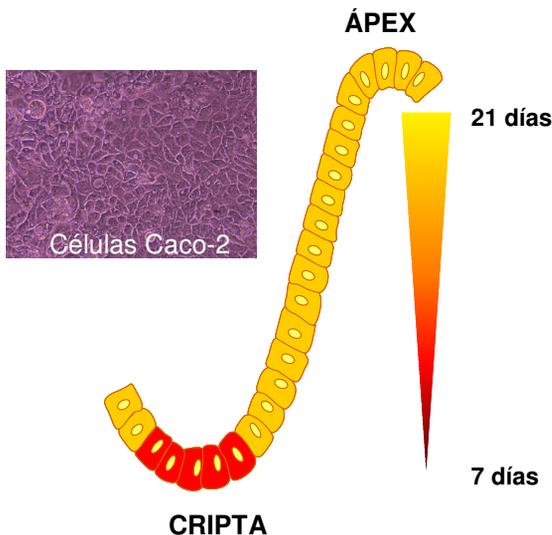
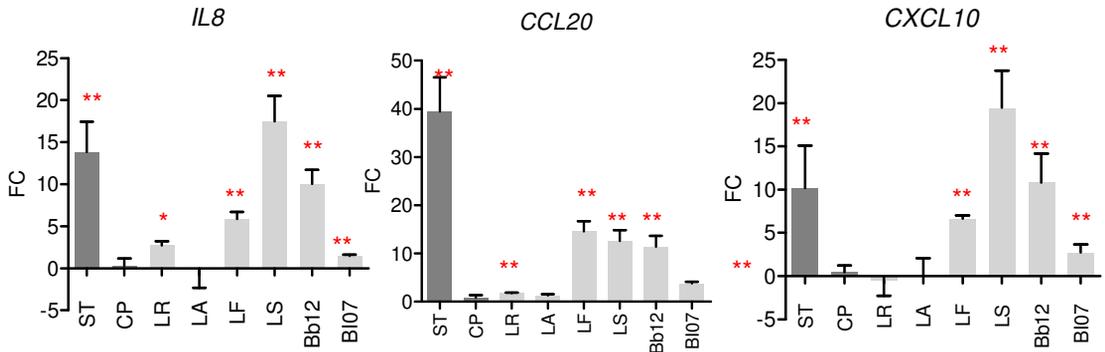


Figura 28. En el proceso de renovación del epitelio intestinal, los enterocitos comienzan como células madre localizadas en las criptas, que van perdiendo su capacidad de proliferación y se van diferenciando a medida que van migrando hacia la punta de la vellosidad. Al inicio del cultivo, las células Caco-2 presentan un estado indiferenciado no polarizado, similar al encontrado en las criptas. La diferenciación empieza una vez que entran en contacto unas células con otras, y finaliza a los 21 días de cultivo.

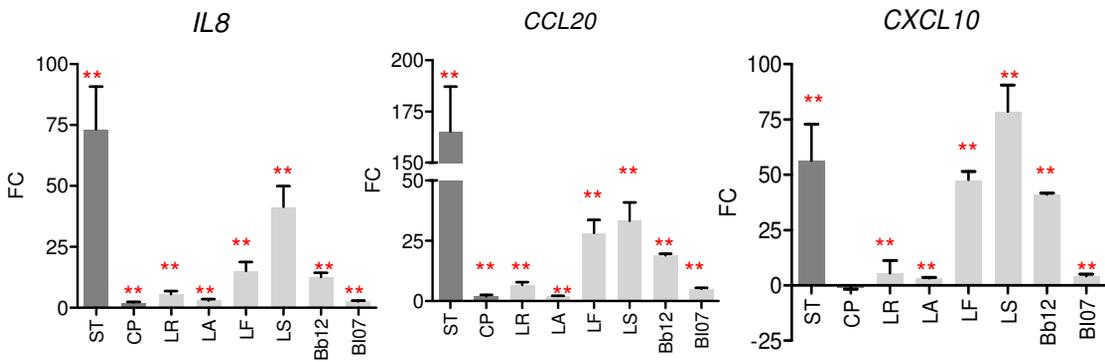
Las células fueron estimuladas con *S. typhimurium* (ST), *C. perfringens* (CP), *L. rhamnosus* (LR), *L. acidophilus* (LA), *L. fermentum* (LF), *L. salivarius* (LS), *B. lactis* Bb12 (Bb12) y *B. lactis* BI07 (BI07). Los resultados se muestran como número de incrementos (FC) normalizados con respecto a la condición basal y al gen de referencia *GADPH*.

2.1.1. Células Caco-2 no polarizadas (7 días de cultivo).

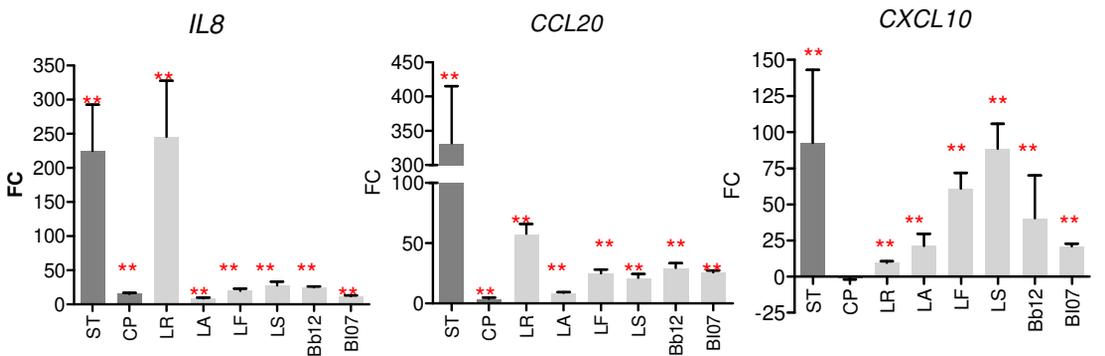
A. 10^6 ufc/ml.



B. 10^7 ufc/ml.



C. 10^8 ufc/ml.



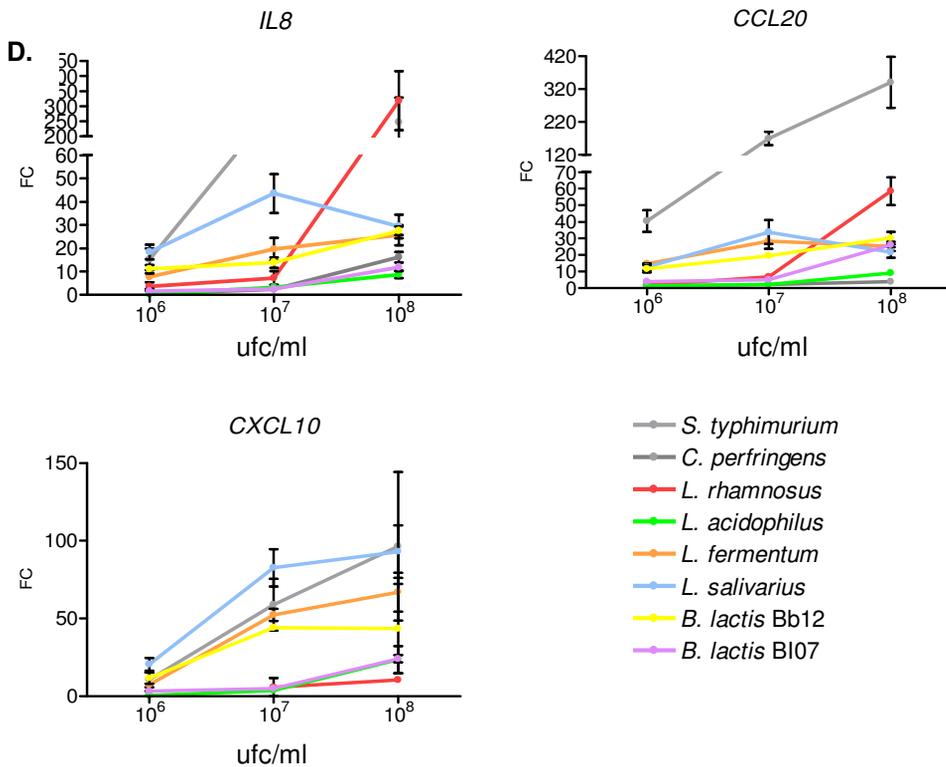


Figura 29. Efecto de las distintas especies bacterianas sobre los niveles de expresión de ARNm de *IL8*, *CXCL10* y *CCL20* en células Caco-2 no polarizadas. Las bacterias se añadieron vivas en fase exponencial a 3 concentraciones: 10^6 ufc/ml (A), 10^7 ufc/ml (B), 10^8 ufc/ml (C) durante 4 horas. Los resultados se muestran como FC normalizados con respecto a la condición basal y al gen de referencia *GADPH*. Los valores se representan como media \pm SD. D) Algunos probióticos como ST, LS, LF, Bb12 muestran un efecto dosis dependiente sobre la expresión de estos genes. Los resultados fueron analizados comparando los dCt de los cultivos estimulados con los dCt de su correspondiente basal mediante el t test no paramétrico Mann-Whitney. * Resultados estadísticamente significativos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

ST: *S. typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

Gen	10 ⁹ ufc/m		10 ⁷ ufc/m		10 ⁹ ufc/ml	
	Comparación	p	Comparación	p	Comparación	p
IL8	ST vs. CP	++	ST vs. CP	+++	ST vs. CP	+
	ST vs. LA	++	ST vs. LA	++	ST vs. LA	+++
	ST vs. BI07	+	ST vs. BI07	+++	ST vs. BI07	++
	CP vs. LR	NS	CP vs. LR	NS	CP vs. LR	++
	CP vs. LF	NS	CP vs. LF	+	CP vs. LF	NS
	CP vs. LS	+++	CP vs. LS	+++	CP vs. LS	NS
	CP vs. Bb12	+	CP vs. Bb12	NS	CP vs. Bb12	NS
	LR vs. LA	NS	LR vs. LA	NS	LR vs. LA	+++
	LR vs. BI07	NS	LR vs. BI07	NS	LR vs. BI07	+++
	LA vs. LS	+++	LA vs. LS	+	LA vs. LS	NS
	LS vs. BI07	++	LS vs. BI07	++	LS vs. BI07	NS
CCL20	ST vs. CP	+++	ST vs. CP	+++	ST vs. CP	+++
	ST vs. LR	++	ST vs. LR	NS	ST vs. LR	NS
	ST vs. LA	+++	ST vs. LA	+++	ST vs. LA	+++
	ST vs. LS	NS	ST vs. LS	NS	ST vs. LS	+
	ST vs. BI07	NS	ST vs. BI07	++	ST vs. BI07	NS
	CP vs. LF	++	CP vs. LF	+	CP vs. LF	NS
	CP vs. LR	NS	CP vs. LR	NS	CP vs. LR	+++
	CP vs. LS	+	CP vs. LS	++	CP vs. LS	NS
	CP vs. Bb12	NS	CP vs. Bb12	NS	CP vs. Bb12	+
	LR vs. LA	NS	LR vs. LA	NS	LR vs. LA	++
	LA vs. LF	++	LA vs. LF	+	LA vs. LF	NS
LA vs. LS	NS	LA vs. LS	++	LA vs. LS	NS	
CXCL10	ST vs. CP	NS	ST vs. CP	+++	ST vs. CP	+++
	ST vs. LR	+	ST vs. LR	NS	ST vs. LR	+
	CP vs. LF	NS	CP vs. LF	++	CP vs. LF	++
	CP vs. LS	+++	CP vs. LS	+++	CP vs. LS	+++
	CP vs. Bb12	+	CP vs. Bb12	NS	CP vs. Bb12	NS
	LR vs. LS	+++	LR vs. LS	++	LR vs. LS	++
	LR vs. Bb12	++	LR vs. Bb12	NS	LR vs. Bb12	NS
	LA vs. LS	+++	LA vs. LS	++	LA vs. LS	NS
LS vs. BI07	NS	LS vs. BI07	+	LS vs. BI07	NS	

Tabla 5. Análisis estadístico de los niveles de expresión de ARNm de IL8, CXCL10 y CCL20 en células Caco-2 no polarizadas estimuladas con las distintas especies de bacterias, agrupando los resultados por concentraciones bacterianas. Los resultados ,para cada concentración bacteriana, fueron analizados mediante el ANOVA test no paramétrico de Kruskal-Wallis y la corrección de Dunn. Se observan como van variando las relaciones entre las especies de bacterias dependiendo de la concentración utilizada. + Resultados estadísticamente significativos (+ p ≤ 0,05; ++ p ≤ 0,01; +++ p ≤ 0,001). ST: *S. typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

Resultados.

Como se observa en la figura 28, el control patógeno Gram-negativo *S. typhimurium* desencadenó los mayores niveles de expresión de ARNm en los 3 genes estudiados. En cambio, *C. perfringens*, utilizado como control Gram-positivo, indujo una respuesta mucho más débil. Como se observa en la figura 28D, *L. fermentum* y *B. lactis* Bb12 tuvieron un efecto directamente proporcional a la concentración de bacterias utilizada. Sin embargo *L. salivarius*, que incrementó de manera notable los niveles de expresión de ARNm a una concentración de 10^7 ufc/ml, indujo una disminución de los niveles de expresión de *IL8* y *CCL20* a la concentración de 10^8 ufc/ml (*IL8* 10^7 ufc/ml: 43,5 FC; 10^8 ufc/ml: 29,4 FC / *CCL20* 10^7 ufc/ml: 33,9 FC; 10^8 ufc/ml: 21,4 FC). Con el resto de probióticos no se observaron cambios a la concentración de 10^7 ufc/ml, sin embargo, sí indujeron ligeros cambios de expresión a la concentración de 10^8 ufc/ml. El probiótico *L. rhamnosus* 10^8 ufc/ml desencadenó un aumento brusco en los niveles de expresión de ARNm de *IL8* y *CCL20*, en cambio, apenas se observaron diferencias para *CXCL10* con respecto a la condición basal.

2.1.2. Células Caco-2 polarizadas (21 días de cultivo).

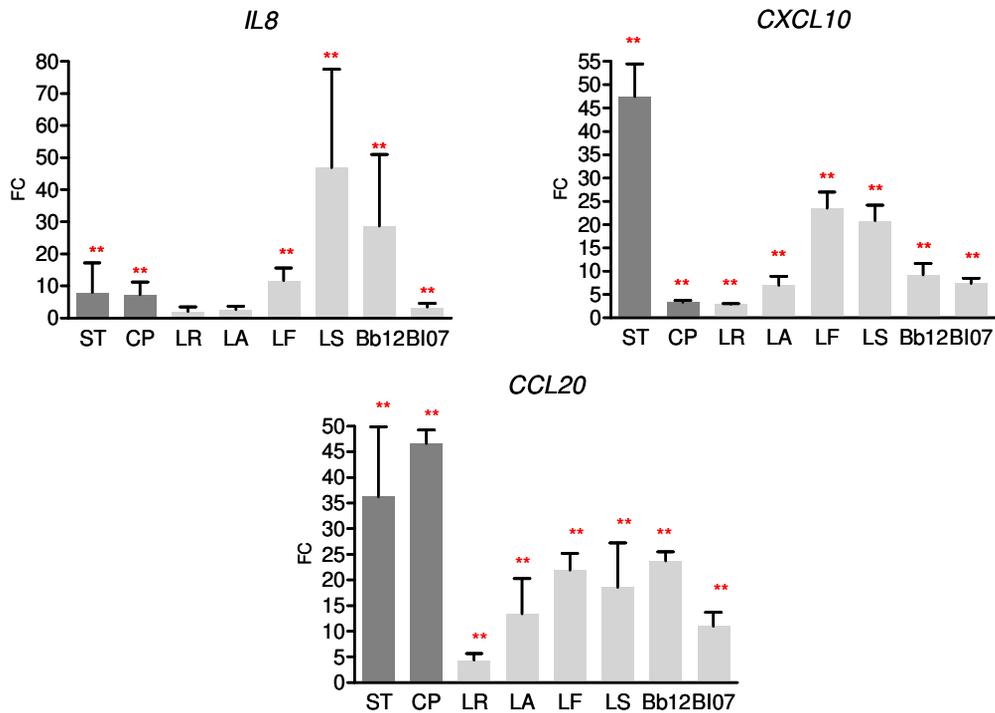


Figura 30. Efecto de las distintas especies bacterianas sobre los niveles de expresión de ARNm de *IL8*, *CXCL10* y *CCL20* en células Caco-2 polarizadas. Las células Caco-2 se cultivaron durante 21 días sobre los insertos. Las bacterias se añadieron vivas en fase exponencial a la concentración de 10^8 ufc/ml durante 4 horas. Los valores están representados como FC con respecto a la condición basal y normalizados con el gen de referencia *GADPH*. Los resultados se analizaron mediante el test de anova no paramétrico Kruskal-Wallis y posteriormente, se analizaron los dCt de cada estímulo con respecto al dCt de su correspondiente basal utilizando con el t test no paramétrico de Mann Whitney. Los valores están representados como media \pm SD. * Resultado significativo con respecto al basal: ** $p \leq 0,01$

ST: *S. typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

<i>IL8</i>		<i>CCL20</i>		<i>CXCL10</i>	
Comparación	p	Comparación	p	Comparación	p
ST vs. CP	NS	ST vs. CP	NS	ST vs. CP	++
ST vs. LR	NS	ST vs. LR	++	ST vs. LR	++
ST vs. LA	NS	ST vs. LA	++	ST vs. LA	++
ST vs. LF	NS	ST vs. LF	+	ST vs. LF	++
ST vs. LS	++	ST vs. LS	NS	ST vs. LS	++
ST vs. Bb12	+	ST vs. Bb12	+	ST vs. Bb12	++
ST vs. BI07	NS	ST vs. BI07	++	ST vs. BI07	++
CP vs. LR	+	CP vs. LR	++	CP vs. LR	+
CP vs. LA	+	CP vs. LA	++	CP vs. LA	++
CP vs. LF	NS	CP vs. LF	++	CP vs. LF	++
CP vs. LS	++	CP vs. LS	++	CP vs. LS	++
CP vs. Bb12	+	CP vs. Bb12	++	CP vs. Bb12	++
CP vs. BI07	NS	CP vs. BI07	++	CP vs. BI07	++
LR vs. LA	NS	LR vs. LA	++	LR vs. LA	++
LR vs. LF	+++	LR vs. LF	++	LR vs. LF	++
LR vs. LS	++	LR vs. LS	++	LR vs. LS	++
LR vs. Bb12	++	LR vs. Bb12	++	LR vs. Bb12	++
LR vs. BI07	NS	LR vs. BI07	++	LR vs. BI07	++
LA vs. LF	++	LA vs. LF	+	LA vs. LF	++
LA vs. LS	++	LA vs. LS	+	LA vs. LS	++
LA vs. Bb12	++	LA vs. Bb12	++	LA vs. Bb12	NS
LA vs. BI07	NS	LA vs. BI07	NS	LA vs. BI07	NS
LF vs. LS	++	LF vs. LS	NS	LF vs. LS	NS
LF vs. Bb12	NS	LF vs. Bb12	NS	LF vs. Bb12	++
LF vs. BI07	++	LF vs. BI07	++	LF vs. BI07	++
LS vs. Bb12	NS	LS vs. Bb12	NS	LS vs. Bb12	++
LS vs. BI07	++	LS vs. BI07	++	LS vs. BI07	++
Bb12 vs. BI07	++	Bb12 vs. BI07	++	Bb12 vs. BI07	NS

Tabla 6. Análisis estadístico de los niveles de expresión de ARNm de *IL8*, *CXCL10* y *CCL20* en células Caco-2 polarizadas estimuladas con las distintas especies de bacterias a una concentración de 10^8 ufc/ml. Los resultados fueron analizados mediante el t test no paramétrico de Mann Whitney para analizar las diferencias entre los distintos estímulos. + Resultados estadísticamente significativos (+ $p \leq 0,05$; ++ $p \leq 0,01$; +++ $p \leq 0,001$).

ST: *S. typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

Las células Caco-2 polarizadas son menos sensibles a la estimulación por las bacterias. Para *IL8*, los probióticos *L. salivarius* y *B. lactis* Bb12 incrementaron sus niveles de expresión de ARNm por encima incluso del control patógeno *S. typhimurium*. En el caso de *CXCL10*, el control *S. typhimurium* desencadenó el mayor incremento (47,4 FC), seguido por *L. fermentum* (23,5 FC) y *L. salivarius* (20,8 FC). Para *CCL20*, los dos controles patógenos desencadenaron los mayores incrementos en los niveles de expresión de su ARNm (*S. typhimurium*: 36,2 FC; *C. perfringens*: 46,6 FC) aunque, las bacterias probióticas indujeron también un incremento de su

expresión. El lactobacillus *L. rhamnosus* fue la bacteria que desencadenó los niveles de expresión de ARNm más bajos de estas quimiocinas (*IL8*: 2,6 FC; *CCL20*: 4,1 FC; *CXCL10*: 2,9 FC).

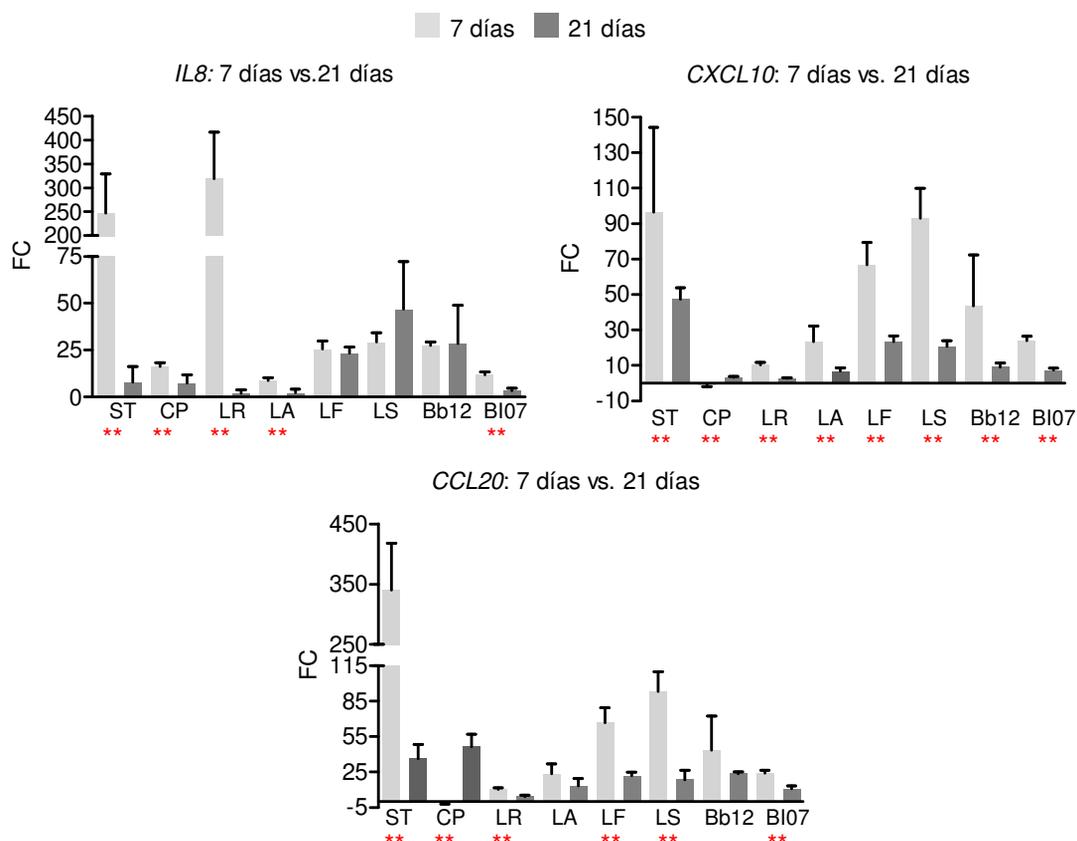


Figura 31. Las células Caco-2 polarizadas responden de una manera más débil frente a los mismos estímulos y en las mismas condiciones. Con algunos probióticos como *L. fermentum*, *L. salivarius* y *B. lactis* Bb12 no se encontraron diferencias entre 7 y 21 días en los niveles de ARNm de *IL8*. Tampoco se encontraron diferencias para *CCL20* para *L. acidophilus* y *B. lactis* Bb12. Los valores están representados como FC con respecto a la condición basal, y normalizados con el gen de referencia *GADPH*. Los resultados fueron analizados mediante el t test no paramétrico de Mann Whitney para analizar las diferencias entre los distintos estímulos. * Resultados estadísticamente significativos (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). ST: *S. typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

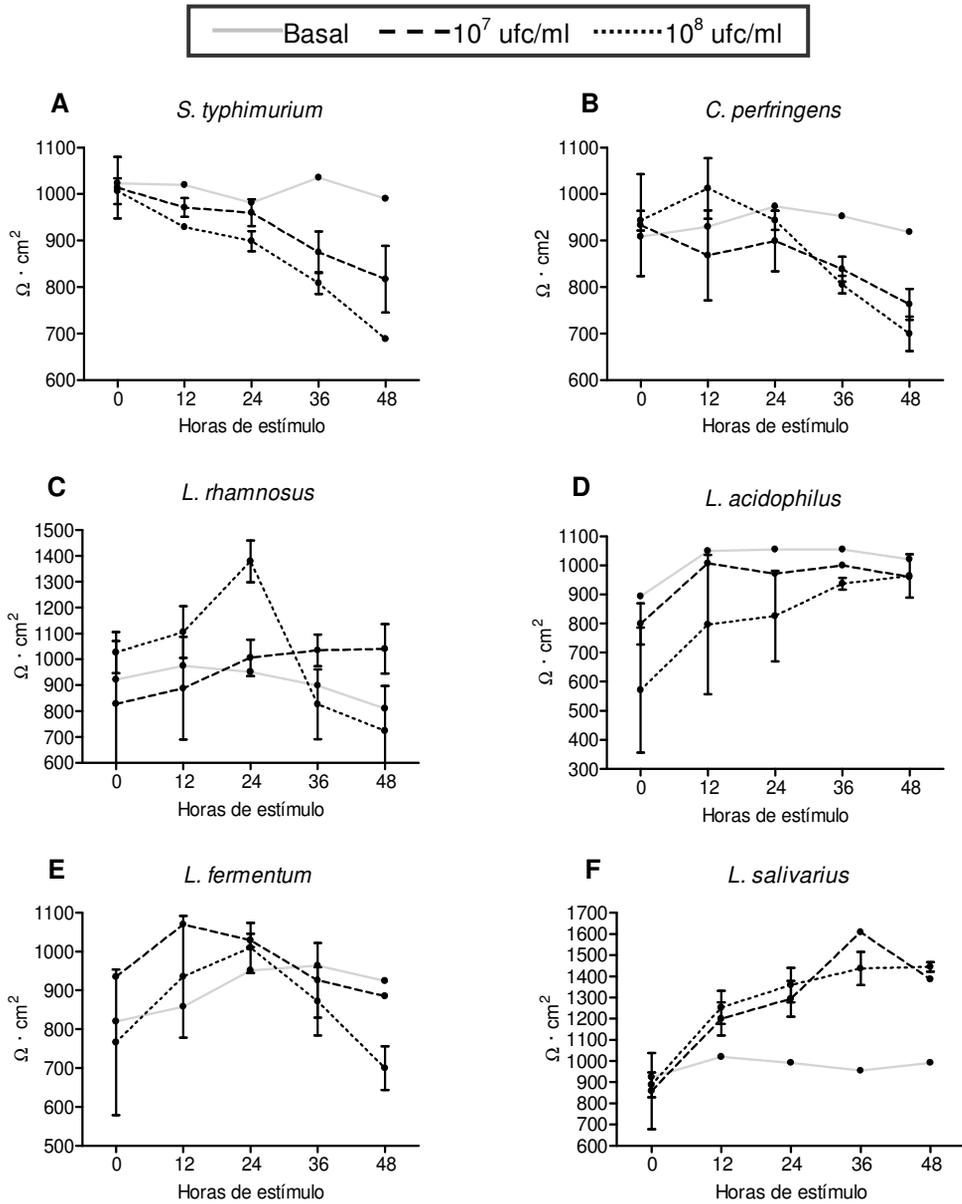
Cuando se compararon los resultados obtenidos en células Caco-2 no polarizadas (7 días) con células Caco-2 polarizadas (21 días), se observó que los niveles de ARNm de *IL8* eran los que menos variaban entre las dos condiciones de

cultivo. Solo en caso de *C. perfringens* se observó un incremento significativo en los niveles de expresión de ARNm de *CCL20* en las células Caco-2 polarizadas con respecto a las no polarizadas.

2.2. Efectos sobre la estabilidad de la monocapa epitelial.

Una de las características de las células Caco-2 es su capacidad de diferenciarse hasta alcanzar un estado con las mismas propiedades que un enterocito funcional. Entre estas características, se encuentra la formación de uniones estrechas entre las células que estabilizan la monocapa que forman estas células al crecer. En su estabilidad, participan proteínas como la ZO-1, que forma parte de las proteínas de unión. La medida de la RTE indica la permeabilidad de la monocapa epitelial. Para medir los efectos de las bacterias, tanto sobre la ZO-1 como sobre la RTE, se utilizaron células Caco-2 crecidas sobre los insertos durante 21 días. Las bacterias se añadieron a dos concentraciones de 10^7 ufc/ml y 10^8 ufc/ml. Con la ayuda de un voltímetro se midió la RTE a intervalos de 12 horas durante un total de 48 horas. Transcurrido el tiempo total, las monocapas celulares se tiñeron con el anticuerpo anti-ZO-1 y el marcador para núcleos DAPI. Los estímulos se realizaron para cada concentración en duplicado con las bacterias *S. typhimurium*, *C. perfringens*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *B. lactis* Bb12 y *B. lactis* BI07. Como condición basal se consideró los cultivos sin estimular.

2.2.1. Medición de la Resistencia Transepitelial Eléctrica durante 48 horas.



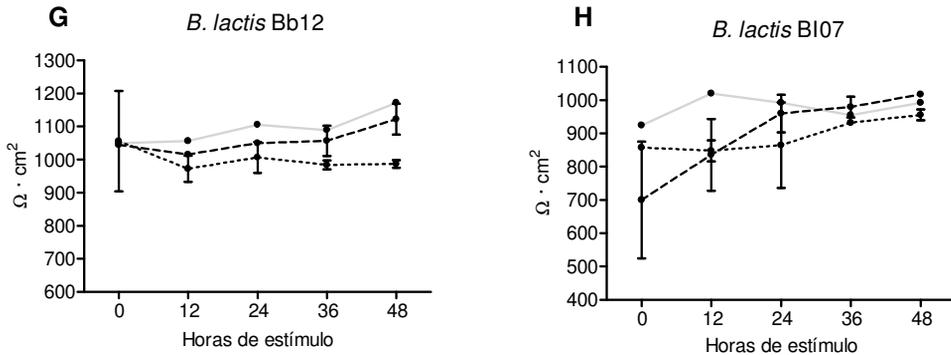
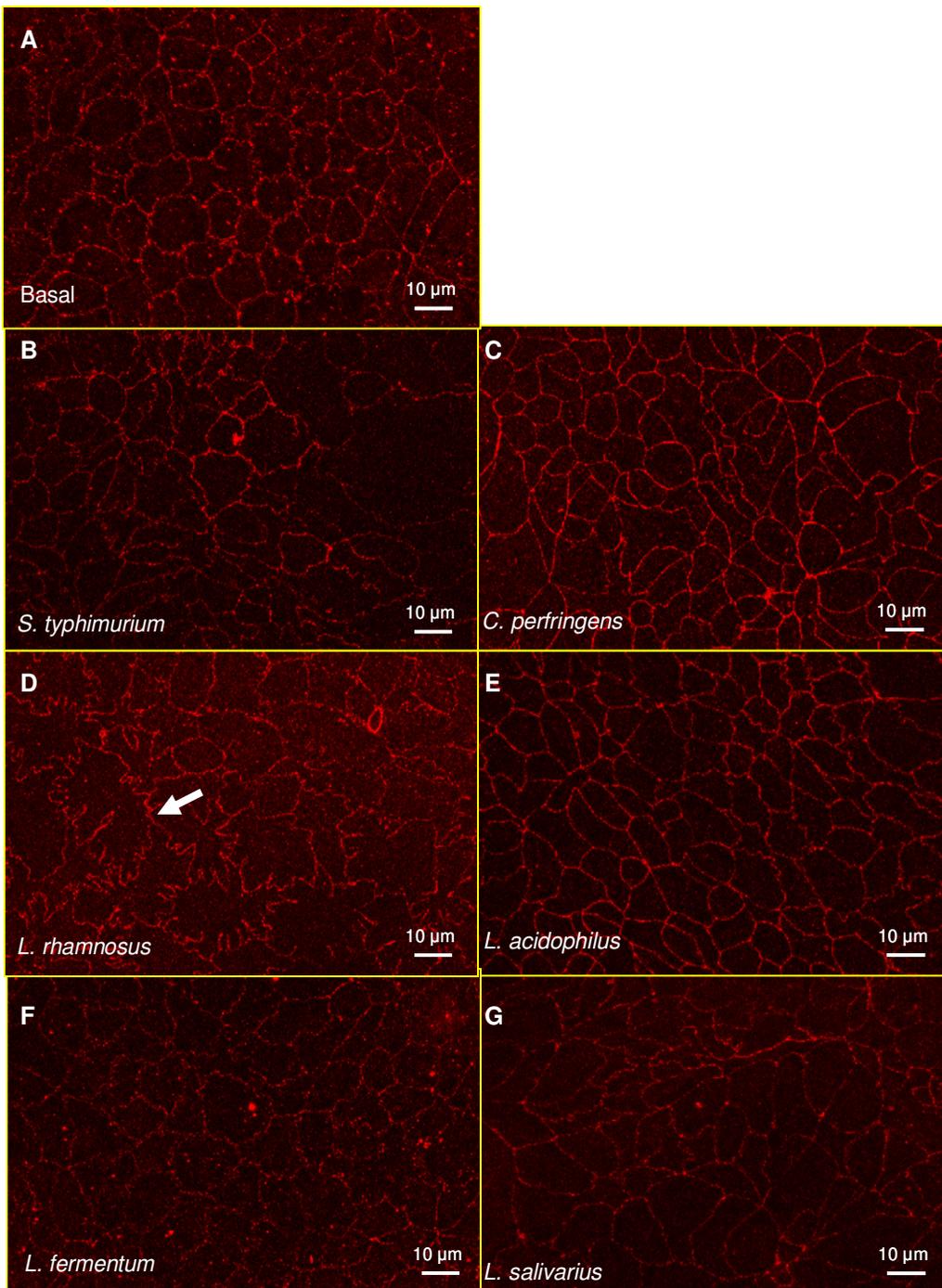


Figura 32. Medida de la RTE en células Caco-2 de 21 días estimuladas con diferentes especies bacterianas. Las células Caco-2 se crecieron sobre los insertos durante 21 días y se estimularon con las bacterias a dos concentraciones (10^7 ufc/ml y 10^8 ufc/ml). En las gráficas se representa la resistencia (ohm: Ω) \cdot superficie (cm^2), expresada como media \pm SD, en función del tiempo. Los experimentos se realizaron por duplicado con su propio control basal que presenta una RTE aproximadamente de $1000 \text{ Ohm}\cdot\text{cm}^2$.

Como se observa en la figura 32.A y 32.B, los dos controles patógenos, *S. typhimurium* y *C. perfringens* indujeron una disminución de la RTE, que indica un incremento en la permeabilidad de la monocapa epitelial, que permitiría la entrada de las bacterias al espacio basolateral. El efecto de *L. rhamnosus* y *L. fermentum* (Fig. 32.C y 32.E) sobre la RTE dependió de la concentración utilizada. De esta manera, la concentración más alta, 10^8 ufc/ml, desencadenó una caída brusca en la RTE de la monocapa. Aunque, en las primeras 24 horas se observó un incremento de la RTE en las células estimuladas con *L. rhamnosus* y *L. fermentum*, un crecimiento excesivo en las siguientes horas, que provocó un marcado viraje en el color del medio del cultivo, podría ser el responsable de la pérdida de la integridad de la monocapa. En cambio, *L. acidophilus* (Fig. 32.D) a la concentración de 10^8 ufc/ml fue incrementando la resistencia paulatinamente. El mayor incremento de la RTE se encontró en las células Caco-2 estimuladas con *L. salivarius* (Fig. 32.F), que presentaron un incremento continuado a lo largo de las 48 horas con las dos concentraciones utilizadas. Con respecto a las bifidobacterias, *B. lactis* Bb12 (Fig. 32.G) mantuvo los mismos niveles de resistencia en las células Caco-2 con respecto a su control. Las células Caco-2 tratadas con la concentración más alta de *B. lactis* BI07 (Fig. 32.H) presentaron un incremento secuencial de la RTE desde el momento 0 hasta el final del ensayo.

Al final del ensayo de la RTE, se retiraron las membranas de los insertos y se tiñeron con el anticuerpo anti-ZO1 para determinar qué efecto tendrían las distintas especies de probióticos y patógenos sobre la distribución de esta proteína de membrana.

2.2.2. Expresión de la Zonula Occludens-1.



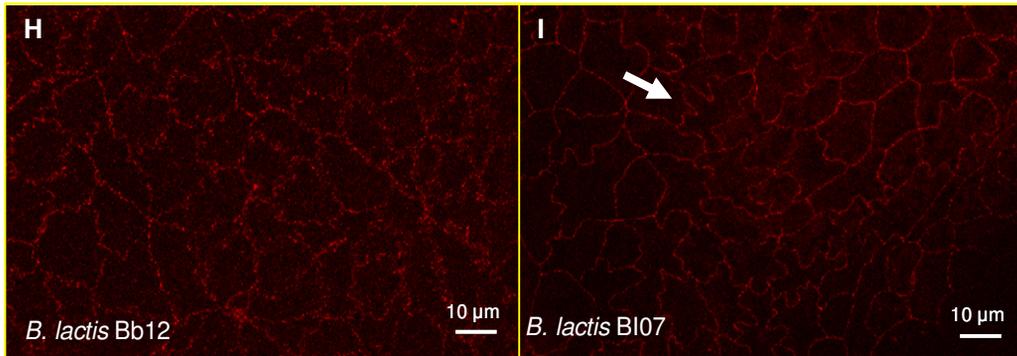


Figura 33. Marcaje de la proteína de membrana ZO-1 en células Caco-2 estimuladas con diferentes especies de bacterias (10^7 ufc/ml). Las células Caco-2 se cultivaron durante 21 días sobre los insertos y se estimularon con distintas especies de bacterias a una concentración de 10^7 ufc/ml durante 48 horas. Se analizó la expresión de ZO-1 a lo largo del eje Z utilizando un microscopio confocal Leica. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 40x y procesadas mediante el software Leica realizando la proyección máxima de todos los cortes obtenidos. Se realizaron al menos 2 secuencias de fotografías para cada duplicado. Las flechas muestran interdigitaciones observadas entre las células Caco-2 estimuladas con *L. rhamnosus* y *B. lactis* BI07.

Algunas especies bacterianas provocaron distintos efectos sobre la membrana celular. Las células Caco-2 estimuladas con *C. perfringens* (Fig. 33.C) presentaron una forma más redondeada y sus membranas un aspecto más liso con respecto a la condición basal. Sin embargo, con *L. acidophilus* y *B. lactis* BI07 se observó también un alisamiento de la membrana. No obstante, no se observaron cambios en la RTE de las monocapas estimuladas con estas bacterias. Además del aspecto de las membranas, se observó que las células Caco-2 estimuladas con *L. rhamnosus* y *B. lactis* BI07 presentaban interdigitaciones celulares, las cuales podrían contribuir al mantenimiento de estabilidad de la monocapa.

Las células Caco-2 estimuladas con una concentración bacteriana de 10^8 ufc/ml mostraron, en general, unas membranas más lisas (Fig. S2). Las células Caco-2 estimuladas con *L. rhamnosus* 10^8 ufc/ml presentaron un aspecto más redondeado (Fig. S2).

2.3. Adherencia de las bacterias sobre la superficie de las células Caco-2.

Una de las propiedades que deben poseer los probióticos es la capacidad de adhesión a la superficie del epitelio intestinal y colonizarlo. Se realizaron ensayos de adherencia para determinar si hubiera alguna relación entre las respuestas observadas en las células Caco-2 y la capacidad de adherencia al epitelio. Para estos experimentos se utilizaron células Caco-2 polarizadas (21 días) a las que se añadió una concentración de 10^8 ufc/ml de cada bacteria durante una hora. Se lisaron las células Caco-2 y el lisado se cultivó en placas de medio de cultivo agar para cuantificar el número de ucf.

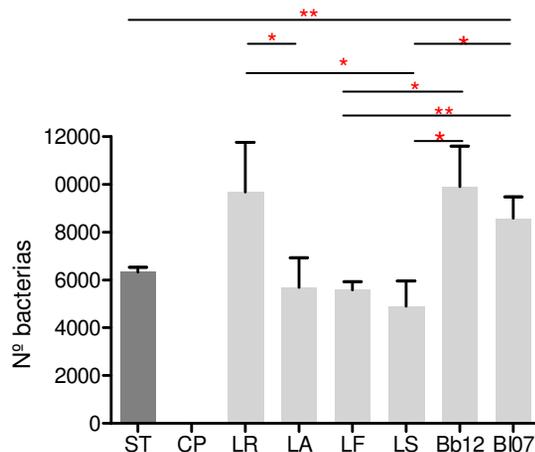


Figura 34. Concentración de bacterias adheridas a las células Caco-2. Se añadieron los probióticos a las células Caco-2 durante una hora y posteriormente se lisaron con una solución de Tritón X-100 y se sembraron a distintas concentraciones en placas de cultivo agar. Los valores están representados como media \pm SD de tres experimentos independientes llevados a cabo por duplicado. Los valores fueron analizados mediante el Anova test de Kruskal-Wallis, y posteriormente por el t test no paramétrico Mann Whitney. * Resultado estadísticamente significativo, * = $p \leq 0,05$; ** = $p \leq 0,01$.

ST: *S. Typhimurium*; CP: *C. perfringens*; LR: *L. rhamnosus*; LA: *L. acidophilus*; LF: *L. fermentum*; LS: *L. salivarius*; Bb12: *B. lactis* Bb12; BI07: *B. lactis* BI07.

Como se observa en la figura 34, las bifidobacterias y *L. rhamnosus* presentaron una mayor capacidad de adherencia al epitelio que el resto de bacterias, incluso que el control *S. typhimurium*. Curiosamente, no se observó ningún crecimiento de *C. perfringens* en ninguna de las placas de cultivo.

3. Efecto del sobrenadante de las células Caco-2 sobre la diferenciación y maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos.

Se ha descrito en la literatura que los factores solubles producidos por las células Caco-2 pueden afectar *in vitro* a la diferenciación de las CDmo adquiriendo un perfil CD103⁺ similar al de las CD intestinales (Iliev et al., 2009b). Para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron los sobrenadantes de células Caco-2 polarizadas cultivadas sobre los insertos.

En primer lugar, se analizaron los posibles cambios en las CDmo que se diferenciaban en los sobrenadantes de los cultivos de las células Caco-2. No se encontraron diferencias en cuanto al marcador CD103 característico de las CD intestinales tolerogénicas. Se observó un ligero incremento en la MIF de moléculas MHC-II, CD86 y CD83, aunque no en todos los donantes.

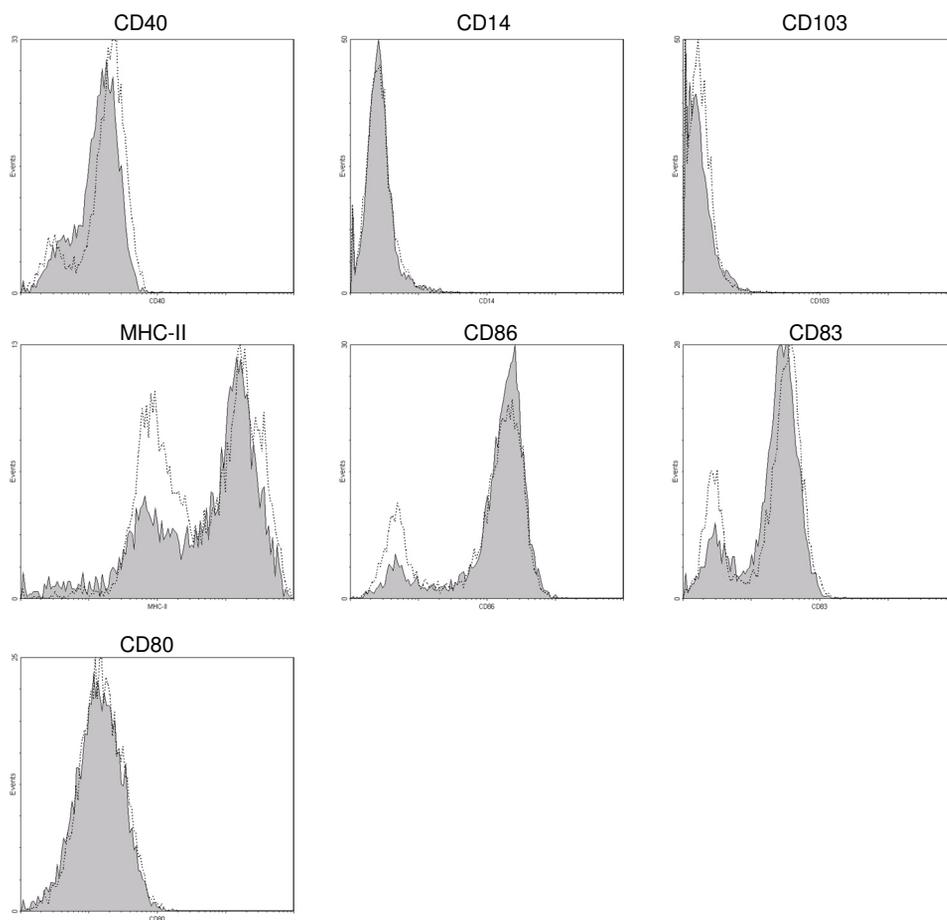
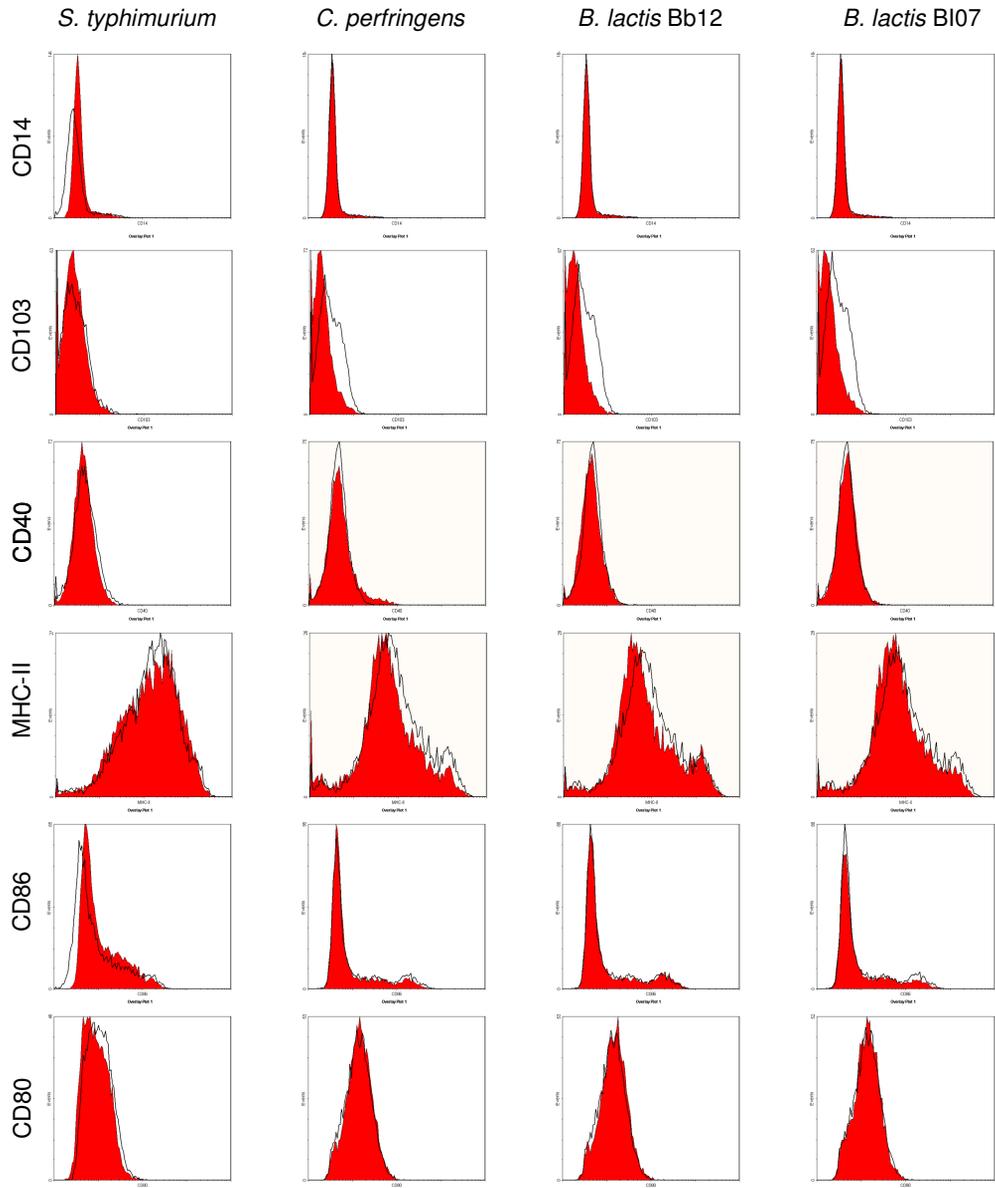


Figura 35. Expresión de CD40, CD14, CD103, MHC-II, CD86, CD83 y CD80 en CDmo diferenciadas en el sobrenadante de células Caco-2 o diferenciadas en medio RPMI completo. La línea negra representa las CDmo diferenciadas en medio RPMI completo y el histograma gris representa las CDmo diferenciadas en el sobrenadante de las células Caco-2. Se muestra un experimento representativo de 5 ensayos realizados.

En otros experimentos, se sembraron monocitos en la parte basolateral de los insertos donde hay cultivadas células Caco-2, y al término de la diferenciación de las CDmo se añadieron las bacterias en la parte apical del inserto. Las bacterias elegidas para el ensayo fueron *S. typhimurium*, *C. perfringens*, *B. lactis* Bb12 y *B. lactis* BI07. En las CDmo se evaluaron los cambios en marcadores de diferenciación (CD14 y CD103) y de maduración (MHC-II, CD40, CD86, CD80 y CD83). Además de estos marcadores se analizó la expresión de CCR7, un receptor de quimiocinas presente en las CD maduras con capacidad para migrar a los NLM.



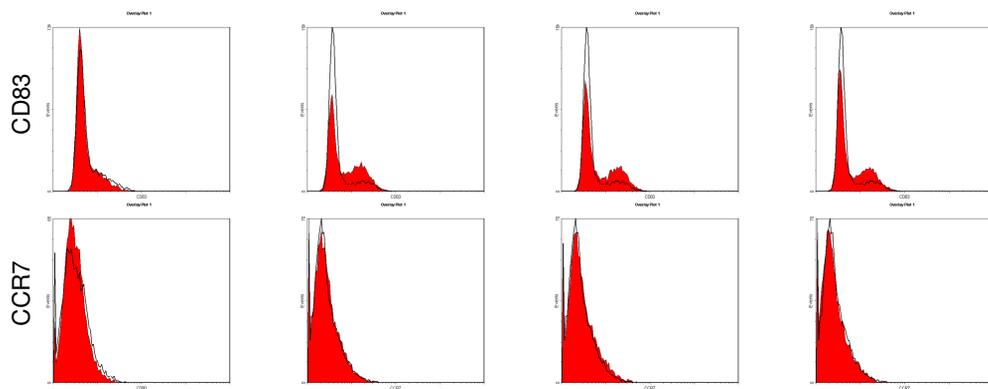


Figura 36. Expresión de CD14, CD103, CD40, MHC-II, CD86, CD80, CD83 y CCR7 en CDmo diferenciadas en el sobrenadante del cultivo de células Caco-2. La línea negra muestra las condiciones basales y el histograma rojo cuando diferentes especies de bacterias (*S. typhimurium*, *C. perfringens*, *B. lactis* Bb12 y *B. lactis* BI07) son añadidas en la parte apical del inserto. No se observaron cambios en ninguno de los marcadores, ni de diferenciación (CD14, CD103), ni de maduración (MHC-II, CD86, CD80, CD83), ni de migración (CCR7). Se muestra un experimento representativo de 3 experimentos independientes.

Cuando las CDmo fueron diferenciadas en presencia de células Caco-2, y posteriormente se añadieron las bacterias en la parte apical del inserto, no se observaron diferencias en los marcadores estudiados.

Debido a que los monocitos son reclutados a los lugares de inflamación, se analizaron los efectos de un sobrenadante epitelial inflamatorio sobre los monocitos al intentar diferenciarlos a CDmo. Para lo cual, los monocitos fueron cultivados en un sobrenadante de cultivo de células Caco-2 estimuladas con *S. typhimurium*.

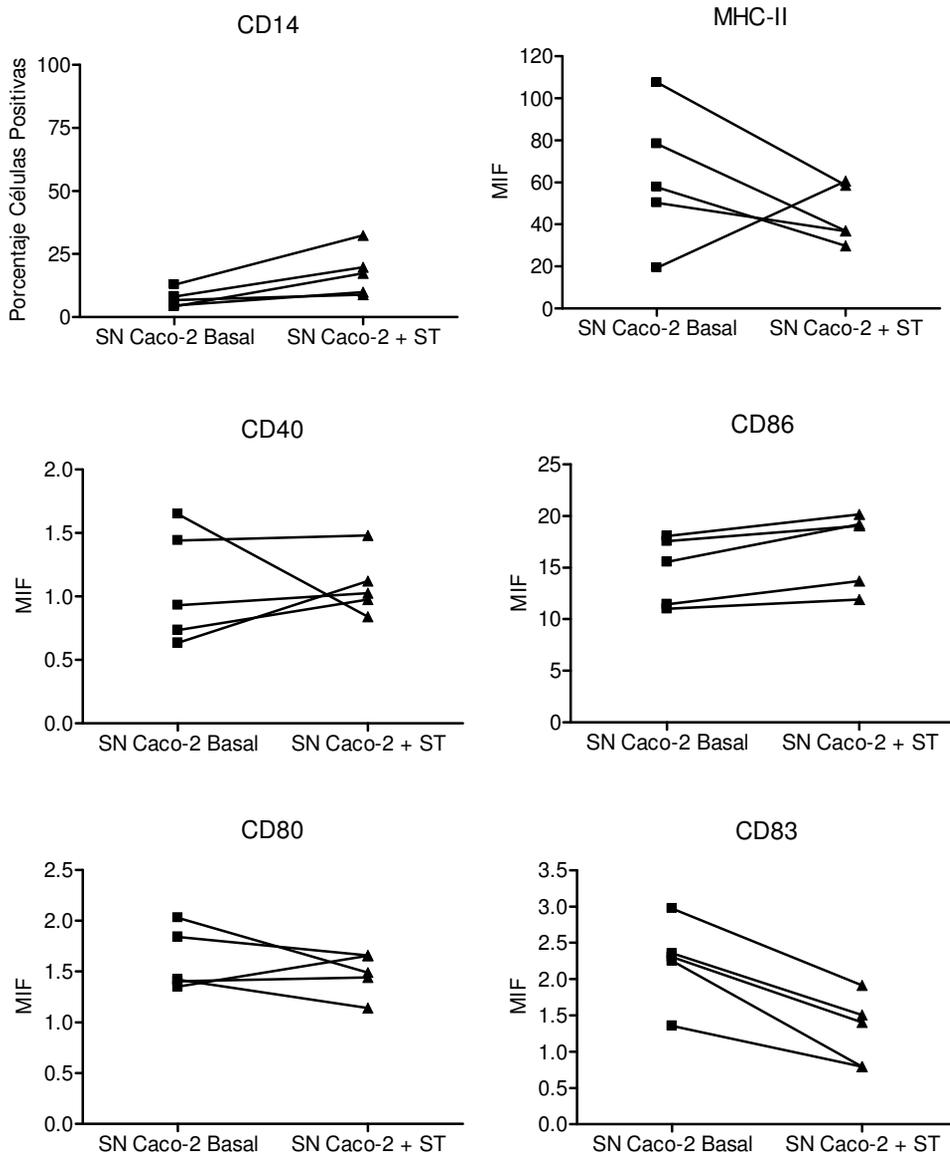


Figura 37. Expresión de CD14, MHC-II, CD40, CD86, CD80 y CD83 en CDmo diferenciadas en el sobrenadante del cultivo de células Caco-2 estimuladas con *S. typhimurium*.

Cuando las CDmo se diferenciaron en el sobrenadante del cultivo de las células Caco-2 estimuladas con ST, se observó un incremento en el porcentaje de células CD14⁺ con respecto a la condición basal. Además, también se observó que estas CDmo presentan niveles más bajos de MIF del MHC-II y de algunas moléculas coestimuladoras como CD80 y CD83. Sin embargo, los niveles de MFCI para CD86 se incrementaron.

SN: sobrenadante; ST: *S. typhimurium*.

Cuando se diferenciaron las CDmo en el medio de cultivo donde previamente se habían estimulado las células Caco-2 con *S. typhimurium*, sí que se observaron diferencias en cuanto a la diferenciación y estado de maduración con respecto a la condición basal. Se observó una tendencia de estas CDmo a presentar niveles menores de moléculas MHC-II, CD80 y CD83, y mayores de CD14.

VII. Discusión

1. Efecto de los probióticos sobre la maduración de las células dendríticas derivadas de monocitos.

Al analizar los resultados obtenidos a lo largo de la tesis, uno de los problemas encontrados fue la gran variedad de probióticos disponibles, cuyos efectos no son solo dependientes de especie, sino también de la cepa que se esté utilizando. Además, aunque en la definición de probiótico se incluye el término “vivo”, son pocos los estudios que usan bacterias vivas en lugar de bacterias muertas por calor o inactivadas por irradiación. El uso de bacterias no viables asegura que la concentración de bacterias que se esté utilizando no varíe, pero se elimina del cultivo los metabolitos sintetizados por el propio probiótico que pueden tener efectos beneficiosos. En cuanto al tipo de CD utilizado, las CDmo pueden presentar distintas características simplemente por el método utilizado para aislar los monocitos circulantes CD14⁺, y afectar *a posteriori* a la secreción de citocinas. De este modo, las CDmo que proceden de monocitos aislados mediante adherencia secretan mayores cantidades de citocinas inmunomoduladoras como la IL-10 y TNF α cuando son estimulados con LPS (Elkord et al., 2005). Los niveles de expresión de los marcadores de maduración en las CDmo estimuladas con las bacterias dependen de los niveles iniciales que presenten esas CDmo en condiciones basales. Los niveles basales de maduración que se observaron en las CDmo utilizadas fueron altos, debido posiblemente al hecho de que la sangre que nos suministraban había sido extraída al menos 12 horas antes.

Algunos de los probióticos que se han utilizado en este proyecto, como *L. fermentum* CECT 5716 y *L. salivarius* CECT 5713, proceden de la leche materna (Diaz-Ropero et al., 2007), mientras que el resto son cepas comerciales. En la revisión bibliográfica de estas cepas bacterianas, se observó que tenían un efecto beneficioso sobre el hospedador actuando de diversas maneras, resumidos en la Tabla 7.

Probiótico	Actividad sistema inmunológico	Protección frente a patógenos	Modelos de colitis
<i>L. rhamnosus</i> DR20	En individuos sanos, incrementa el número de células PMN con capacidad fagocítica y de células NK (Gill and Rutherford, 2001).	En ratones infectados con <i>E. coli</i> O157:H7, disminuye su mortalidad, incrementa la secreción de IgA en la mucosa intestinal y la presencia de leucocitos con actividad fagocítica (Shu and Gill, 2002). Un efecto similar se encontró en ratones infectados con <i>S. typhimurium</i> (Gill et al., 2001).	
<i>L. acidophilus</i> NCFM	En CMSP y CD induce la síntesis de IL-12 (Foligne et al., 2007). En ratones incrementa de manera notable los niveles de ARNm de <i>IFNB1</i> a través del TLR2 (Weiss et al., 2010)	.	Inhibe la colitis desencadenada en ratones por <i>Citrobacter rodentium</i> (Chen et al., 2005)
<i>L. fermentum</i> CECT 5716	Incrementa la activación de células NK en CMSP humanas (Perez-Cano et al., 2010). Aumenta la respuesta inmunológica cuando se administra la vacuna contra el virus de la gripe aumentando el número de células NK, la expresión de IL-12, TNF α y de inmunoglobulinas (IgA, IgG e IgM) (Olivares et al., 2007).		En un modelo murino, protege y revierte la colitis inducida por TNBS disminuyendo IL-6 y potenciando la vía TLR-MyD88 (Mane et al., 2009).
<i>L. salivarius</i> CECT 5713	Incrementa la activación de células NK en CMSP humanas (Perez-Cano et al., 2010). Incrementa el número de monocitos y células NK e incrementa los niveles en plasma de		Protege a los ratones frente al desarrollo de la colitis, aunque cuando la colitis ya se ha inducido solo el grupo tratado con <i>L. salivarius</i> vivo muestra una mejoría (Arribas et al., 2012).

	inmunoglobulinas (IgG, IgA e IgM) y de la IL-10 (Sierra et al., 2010).		Ejerce un efecto protector induciendo la síntesis de IL-10 y disminuyendo la producción de proteínas proinflamatorias como IL-1 β y CXCL2 (Macho Fernandez et al., 2011).
<i>B. lactis</i> Bb12	Incrementa la producción de IgAs en el intestino (Holscher et al., 2012). Incrementa la producción de anticuerpos cuando se ingiere durante un rango de tiempo en el que se administra la vacuna contra la gripe (Rizzardini et al., 2012).		Un factor secretado por <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> Bb12 inhibe la activación del NF- κ B inducida por la IL-8 (Wang et al., 2011b). En ratones IL10 ^{-/-} , que desarrollan de manera espontánea colitis en condiciones estándar, acentúa el proceso de inflamación (Moran et al., 2009).
<i>B. lactis</i> BI07	En personas ancianas incrementa la actividad fagocítica de monocitos y granulocitos (Maneerat et al., 2013).		

Tabla 7. Características de las bacterias probióticas utilizadas a lo largo de la tesis sobre el sistema inmunológico, frente a patógenos y en modelos animales de colitis.

- Efecto sobre la expresión de los marcadores de maduración.

En el proceso de maduración de las CD se produce un incremento de la expresión de moléculas que intervienen en la presentación antigénica (MHC-II), moléculas coestimuladoras (CD80, CD86 y CD40) y de CD83. Como era de esperar, el control patógeno Gram-negativo *S. typhimurium* desencadenó los mayores incrementos en la expresión de los marcadores de maduración, ya que en general, las bacterias patógenas Gram-negativas desencadenan unos niveles de maduración en las CD mayores que las Gram-positivas y además, existe una relación entre el incremento del marcador CD83 con la activación del TLR4 por parte de las bacterias Gram-negativas (Boele et al., 2009). Varios estudios han demostrado que los probióticos son capaces de incrementar los niveles de expresión de los marcadores de maduración en las CD (Foligne et al., 2007, Young et al., 2004, Baba et al., 2008, Lopez et al., 2010, Mohamadzadeh et al., 2005, Latvala et al., 2008). Las bacterias probióticas utilizadas en esta tesis afectaron de distinto modo a estos marcadores en las CDmo. Por un lado, *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* indujeron los niveles más altos, mientras que el resto de probióticos tuvieron un efecto menos notable. Se observó incluso, una disminución en los niveles de MIF de CD40, CD86 y CD83 en las CDmo estimuladas con *B. lactis* BI07. Este efecto, fue observado también por otros grupos pero con otras bifidobacterias, las pertenecientes a la mezcla probiótica VSL#3 (*B. longum*, *B. infantis* y *B. breve*), que disminuyeron los niveles de CD80 y CD40 en CD intestinales (Hart et al., 2004).

- Efecto sobre la expresión de receptores de reconocimiento de patrones.

Tras analizar la maduración de las CDmo, nos planteamos estudiar las moléculas involucradas en la ruta de los TLR, debido a que varios de estos receptores están presentes en las CD y en conjunto reconocen un amplio rango de moléculas bacterianas. Dentro de esta familia, TLR2 y TLR4 son los receptores más estudiados ya que reconocen componentes tan generales como el PGN o el LPS respectivamente. Sin embargo, las bacterias estudiadas apenas incrementaron los niveles de expresión de sus ARNm en las CDmo (Fig. 16). Curiosamente, observamos que el control patógeno Gram-positivo *C. perfringens* desencadenó una marcada

disminución en los niveles de expresión de ARNm de *TLR2* y *TLR4* (Fig. 16). Además, algunas bacterias incrementaron los niveles de expresión del ARNm de *TLR7* (*S. typhimurium* y *L. acidophilus*) y *TLR9* (Bifidobacterias) (Fig. 16). El TLR7 y TLR9 no fueron caracterizados en un principio en las CDmo, pero la utilización de nuevos cebadores y anticuerpos ha permitido su identificación (Makela et al., 2011, Hoene et al., 2006). Estudios en modelos murinos de colitis demostraron que los efectos beneficiosos ejercidos por los probióticos eran dependientes del TLR9 (Rachmilewitz et al., 2004), por lo que este TLR podría ser una vía utilizada por las bifidobacterias en las CDmo.

Aparte de los TLR, analizamos la expresión de otros PRR como NOD2, que reconoce una pequeña porción del PGN, el MDP, que forma parte de la pared bacteriana de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Grimes et al., 2012). NOD2 puede inducir junto con los TLR distintas respuestas inmunológicas. Por un lado, se ha demostrado que actúa sinérgicamente junto con el TLR3, TLR4 y TLR9 incrementando la síntesis de proteínas proinflamatorias como la IL-12, IL-8 o TNF α (Tada et al., 2005), y por otro, NOD2 es responsable, junto con el TLR2, de la producción de IL-10 y de la regulación de la activación del perfil Th1 desencadenado por el TLR2 (Moreira et al., 2008). RIPK2, es una quinasa que en un principio se pensó que era un intermediario de la ruta de los TLR (Kobayashi et al., 2002), pero pertenece a la ruta de NOD2 (Park et al., 2007). La activación de RIPK2, al igual que NOD2, desencadena la síntesis de IL-10. Las CDmo estimuladas con las distintas bacterias presentaron un perfil similar entre *MYD88* (figura 17) y *NOD2* (figura 16). El control Gram-positivo *C. perfringens*, el lactobacilo *L. salivarius* y las dos bifidobacterias disminuyeron los niveles de expresión de ARNm de ambos genes, lo que podría evitar una estimulación excesiva de estas vías. Sin embargo, NOD2 también está implicado en el efecto protector de algunos probióticos, como demostró Macho Fernández *et al* (2011) al observar que el probiótico *L. salivarius* Ls33 y su PGN ejercían un efecto protector en ratones que desarrollaban colitis gracias a la síntesis de IL-10, y este efecto era dependiente de NOD2 (Macho Fernandez et al., 2011). Por lo tanto, aunque en las primeras horas tras el estímulo un control en la síntesis *de novo* de NOD2 podría servir para controlar la respuesta proinflamatoria, una inhibición prolongada de su síntesis podría tener efectos negativos sobre el hospedador.

- Efecto sobre la expresión de intermediarios de la ruta del NF- κ B.

Las principales rutas que se activan a través de los TLR son la del NF- κ B, a través del complejo IKK, y la de AP-1, a través de las MAPK. Como se ha mencionado en la introducción, el NF- κ B está formado por dos proteínas que dan lugar a un homodímero o un heterodímero, y puede tener distintas funciones en función de las proteínas que lo formen. De este modo, los homodímeros formados por p50 o p52 tienen función represora, y los dímeros que contienen RelA o c-Rel son activadores transcripcionales (Bonizzi and Karin, 2004). La activación del NF- κ B se produce de manera rápida gracias a los complejos inactivos presentes en el citoplasma, y en los experimentos de inmunofluorescencia se puede observar, de una manera similar para todos los probióticos, como la subunidad p65 se transloca al núcleo de las CDmo tras 90 minutos de estimulación (Fig. 25). Sin embargo, para que la activación del NF- κ B se produzca de manera continuada, es necesario una estimulación prolongada en el tiempo y la síntesis *de novo* de proteínas. Por lo tanto, los incrementos observados en los niveles de ARNm a las 6 horas podrían ser un reflejo de esta síntesis *de novo* desencadenada por la presencia de determinadas citocinas como el TNF α . Tras 6 horas de estimulación se observaron cambios en los ARNm de *NFKB1* (que dará lugar a la subunidad p50) y *REL* (c-Rel). Entre los lactobacilos, *L. fermentum* fue el único que no modificó la expresión de estos dos genes, encontrándose las diferencias más notables en los niveles de expresión de ARNm de *REL* (Fig. 18.A). La ausencia de c-Rel en macrófagos murinos provoca que estas células, cuando son estimuladas con LPS, sinteticen mayores cantidades de G-CSF, IL-6 y GM-CSF, mientras que la producción de TNF α , en cambio, se encuentre inhibida (Grigoriadis et al., 1996). Por tanto, los efectos de *L. fermentum* observados sobre c-Rel (Fig. 18A) podrían promover el incremento en la síntesis de G-CSF, como muestran los niveles de ARNm para CSF3 en las CD estimuladas con este probiótico (Fig. 22). La subunidad c-Rel está también involucrada en la maduración de las CD y en la inducción de un perfil Th sobre los linfocitos (Boffa et al., 2003).

- Efecto sobre la expresión de intermediarios de la ruta de AP-1.

El término de proteína activadora AP-1 se aplica de manera genérica a factores de transcripción diméricos formados por proteínas pertenecientes las familias Jun, Fos o factor de transcripción activador (ATF). AP-1 se activa en situaciones de estrés y puede desencadenar la apoptosis celular (Karin et al., 1997). Al analizar los cambios desencadenados por las distintas bacterias sobre los niveles de expresión de ARNm de *FOS* (C-FOS) y *JUN* (C-JUN) se observó que, de entre los lactobacilos estudiados, *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* desencadenaron los niveles más altos (Fig. 18.C). Ante un estímulo se desencadena de manera inmediata la transcripción de estos dos genes, independientemente de la necesidad de proteína (Karin et al., 1997). Además de un incremento a nivel transcripcional, el aumento de la producción de AP-1 depende de la estabilización de las proteínas que forman el dímero mediante fosforilaciones llevadas a cabo por MAPK (Karin et al., 1997). Existen quinasas encargadas de activar a estas MAPK para incrementar la estabilidad de AP-1, entre las que se encuentran MAP2K3 (MEK3) y la MAP3K1 (MEKK1) (Efimova et al., 1998, Balasubramanian et al., 2002). Como observamos en la figura 18B, los niveles de expresión de ARNm de los genes que codifican para estas enzimas coincidieron con los niveles de *FOS* y *JUN* observados. Además, observamos un patrón muy similar entre *REL*, perteneciente al NF- κ B, y *FOS* y *JUN*, pertenecientes a AP-1 (Fig. 18). Por tanto, una segunda activación de NF- κ B en las CD estimuladas con *L. rhamnosus* y *L. acidophilus* podría desencadenar la síntesis *de novo* de AP-1, incrementando de este modo la respuesta.

- Efecto sobre la expresión de citocinas.

Los niveles de expresión de los ARNm de *IL2* e *IFNG* (Fig. 19) marcaron claramente una diferencia entre las bacterias probióticas y las patógenas. Se ha demostrado que bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, inducen en las CD la producción de IL-2 de manera temprana (4 - 8 horas) y tardía (14 - 16 horas) (Granucci et al., 2001). Esta síntesis de IL-2 es específica de las CD, ya que en otras células presentadoras, como los macrófagos, no ocurre. De este modo, la síntesis temprana de IL-2 favorece la presentación antigénica de las CD a los linfocitos CD4⁺ de manera rápida, aunque en las CD todavía haya poca presencia de moléculas MHC,

moléculas de superficie coestimuladoras o incluso, en el ambiente esté presente la IL-10, que inhibe la proliferación de los linfocitos T (Granucci et al., 2001). Como observamos en los ensayos de proliferación alogénicos, las CD estimuladas con *S. typhimurium* incrementaron la proliferación de los linfocitos T vírgenes, mientras que en el caso de *C. perfringens* observamos una proliferación similar a la encontrada con los probióticos (Fig. 27.A). Esta diferencia podría deberse a que al realizar el lavado tras la estimulación de las CD, eliminamos del medio de cultivo la IL-2 sintetizada de manera temprana, y en el caso de *C. perfringens*, que desencadena una respuesta inmunológica débil, la síntesis temprana de IL-2 podría ser de suma importancia para la proliferación linfocitaria.

Los lactobacilos utilizados en este proyecto desencadenaron una mayor respuesta proinflamatoria que las bifidobacterias, caracterizada por un incremento en los niveles de expresión de ARNm de *IL1A*, *IL1B* (Fig. 21) y *PTGS2* (Fig. 19). La enzima COX-2 (*PTGS2*) es una enzima inducible ante diversos estímulos proinflamatorios o factores de crecimiento. Ante estos estímulos, COX-2 es la principal enzima que sintetiza prostaglandina E2 (PGE2). Por su parte, la PGE2 posee varias funciones como: favorecer la expresión de CCR7 en CDmo estimuladas con citocinas proinflamatorias (Scandella et al., 2002), inhibir la acción presentadora de las CD a través de la IL10 (Harizi et al., 2002) o favorecer la maduración de las CD y la presentación antigénica a los linfocitos T induciendo un perfil Th1 y Th17 (Chizzolini and Brembilla, 2009).

Los lactobacilos *L. acidophilus*, *L. fermentum* y *L. salivarius* incrementaron los niveles del ARNm de *IL10* e *IL6* (Fig. 20 y Fig. 21) en distinto grado. Sin embargo, solo *L. fermentum* y *L. acidophilus* incrementaron, además de manera notable, los niveles de ARNm de *CSF3* (G-CSF) (Fig. 22). Estos 3 factores –IL-10, G-CSF e IL-6– activan al factor de transcripción STAT3, que regula de manera negativa a las CD (Melillo et al., 2010). La proteína de SOCS3 es capaz de unirse a los receptores de varias citocinas (IL-6R, G-CSFR) bloqueando esas rutas (Lang et al., 2003, Hortner et al., 2002) e impidiendo la activación de STAT3. Sin embargo, SOCS3 no es capaz de unirse al receptor de la IL-10 (IL-10R), que ejerce su acción antiinflamatoria gracias a la activación prolongada de STAT3 (Murray, 2006). Aunque el bloqueo del IL-6R por SOCS3, y por lo tanto la inhibición de STAT3, tiene un efecto proinflamatorio, en el

caso de la ruta del G-CSF no está tan claro que el resultado final sea el mismo que con la IL-6. Estudios con monocitos demostraron, que cuando eran estimulados con G-CSF se inhibía la producción de TNF α inducida por LPS a través de la fosforilación de STAT3 (Nishiki et al., 2004). Sin embargo, la concentración de G-CSF necesaria para inducir la fosforilación de STAT3 era mucho menor que la necesaria para inhibir la producción de TNF α , por lo que otros mecanismos, además de STAT3, tendrían que estar involucrados en las funciones antiinflamatorias del G-CSF (Nishiki et al., 2004). En macrófagos, se ha observado que el probiótico *L. rhamnosus* es capaz de inhibir la producción de TNF α desencadenada por LPS o *E. coli* mediante la producción de G-CSF que, a su vez, permite la activación de STAT3 y la inhibición de las quinasas C-Jun N terminal (JNK) (Kim et al., 2006). Al analizar los cambios en los niveles de expresión de ARNm de *TNFA*, observamos que *L. fermentum* fue el lactobacilo que desencadenó los incrementos más bajos (Fig. 21), mientras que *L. salivarius* fue responsable de los más altos (Fig. 21) y además incrementó también la expresión de *IL10* (Fig. 20) y de *IL6* (Fig. 21) pero no de *CSF3* (Fig. 22). Estos datos estarían en consonancia con lo observado por Kim et al (2006) con *L. rhamnosus*.

La producción de SOCS3 se puede inducir por ligandos de TLR o citocinas como IL-6, IL-10 (Hortner et al., 2002) y G-CSF (Murray, 2006). Sin embargo, cuando se analizó la expresión de *SOCS3*, los niveles que desencadenaron estas 3 bacterias, *L. acidophilus*, *L. fermentum* y *L. salivarius*, fueron los mismos.

Las dos bifidobacterias utilizadas desencadenaron una débil respuesta inmunológica en las CD a nivel transcripcional, sin embargo las CD estimuladas con *B. lactis* BI07 presentaron unos niveles de marcadores de maduración más bajos que la condición basal (Fig. 15). También es destacable el efecto de estos dos probióticos sobre los niveles de *CXCL10* (Fig. 19). Su síntesis puede ser desencadenada por citocinas proinflamatorias como el TNF α o el IFN γ y depende de los factores de transcripción NF- κ B y STAT1. *CXCL10* participa en procesos de apoptosis y proliferación celular y su producción se encuentra incrementada en varias situaciones patológicas como infecciones por diversos agentes, infecciones crónicas o enfermedades autoinmunes (Liu et al., 2011). Además, en ratones *CXCL10*^{-/-} se ha descrito una menor proliferación alogénica y una menor producción de IFN γ en respuesta a antígenos (Dufour et al., 2002).

Un posible candidato capaz de explicar los resultados obtenidos en los experimentos de maduración y expresión génica en las CD estimuladas con estas bifidobacterias podría ser el PPAR γ . La activación de PPAR γ en las CD tiene efectos negativos sobre su maduración, ya que estas CD presentan niveles más bajos de CD40, CD80, CD83 y de CCR7, y reprime la expresión de CXCL10 (Straus and Glass, 2007). Además, su activación inhibe la presencia de c-Rel en el núcleo (Appel et al., 2005) e incrementa la expresión de CD36, marcador de la actividad fagocítica, en las CD (Gosset et al., 2001). Todos estos factores repercuten en las funciones de las CD como CPA, disminuyendo su capacidad presentadora sobre los linfocitos que, a su vez, presentan una menor capacidad de proliferación y de síntesis de IFN γ (Nencioni et al., 2002). Como podemos observar en los resultados obtenidos con *B. lactis* BI07 respecto a los marcadores de maduración (Fig. 15), análisis de expresión génica de *CXCL10* (Fig. 19) y *REL* (Fig. 18.A), los experimentos de fagocitosis (Fig. 26) y en los ensayos alogénicos (Fig. 27A y B), *B. lactis* BI07 podría activar principalmente la ruta del PPAR γ . Se ha demostrado que uno de los ligandos de PPAR γ podría ser el ácido linoleico producido por los probióticos (Bassaganya-Riera et al., 2012). Por lo tanto, estudios de otros posibles marcadores como CCR7 y CD36, y el estudio de los sobrenadantes de cultivo de este probióticos serían necesarios para validar esta hipótesis.

El efecto inmunomodulador de algunos probióticos se refleja también en la expresión de moléculas típicamente antivirales como el *IFNB1* y *EIF2AK2*. El IFN β actúa en la respuesta inmunológica contra patógenos intracelulares que posean un metabolismo activo dentro de la célula (Decker et al., 2005) y además, actúa como adyuvante en la maduración de CDmo (Wiesemann et al., 2002). En las CDmo estimuladas con *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *B. lactis* Bb12 y *B. lactis* BI07 observamos unos niveles de ARNm de *IFNB* por debajo de la condición basal (Fig. 23). Sin embargo, en CD murinas se ha demostrado que *L. acidophilus* NCFM incrementa de manera notable los niveles de ARNm de *Ifnb1* a través del TLR2 (Weiss et al., 2011).

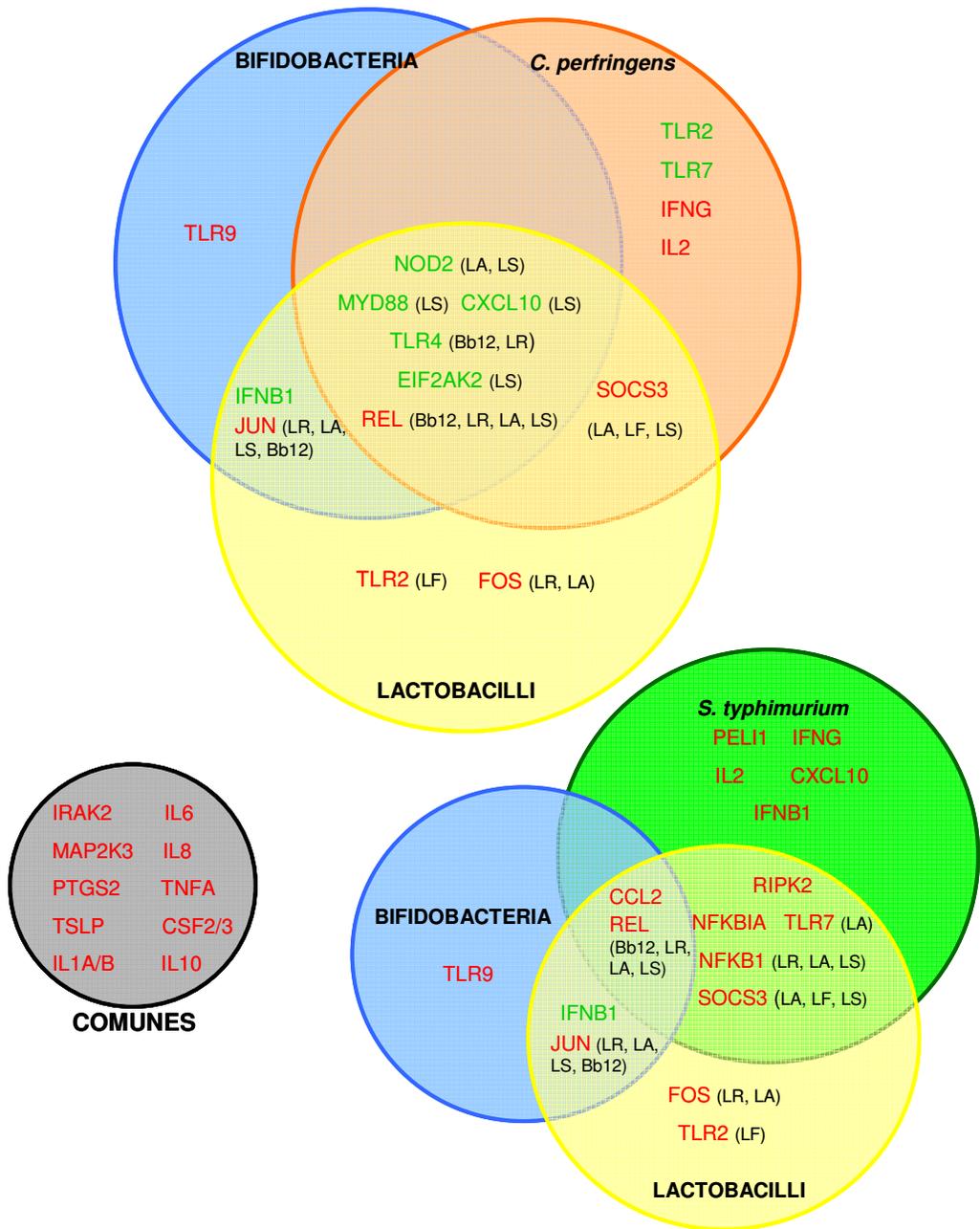


Figura 38. Diagrama de Venn en el que se muestra la modulación por parte de las diferentes bacterias de los niveles de expresión de ARNm en las CDmo. En rojo se muestra los genes que presentaron unos niveles por encima de la condición basal, y en verde los genes que mostraron unos niveles por debajo. En el diagrama gris se muestran los genes cuyos niveles de expresión de ARNm fueron incrementados de manera común por todas las bacterias. Se observó que un incremento en los niveles de expresión de ARNm de *IL2* e *IFNG* es común a los dos controles patógenos, mientras que, un nivel de expresión de ARNm de *IFNB* por debajo de la condición basal es común a todos los probióticos utilizados en el ensayo.

- Efectos sobre la translocación de la subunidad p65 del NF- κ B al núcleo.

Los probióticos utilizados durante esta tesis fueron capaces de inducir la translocación del NF- κ B al núcleo de manera temprana. Las bacterias presentaron una localización intracelular en todos los casos, excepto *C. perfringens*. El patógeno *C. perfringens* indujo un perfil molecular en las CDmo similar al desencadenado por las bifidobacterias, sin embargo las bifidobacterias fueron fagocitadas por las CDmo sin ningún problema. Entre las bacterias Gram-positivas hubo una activación del NF- κ B similar, pero esta similitud no se observó en los niveles de ARNm de moléculas cuya expresión está controlada por el NF- κ B, como el IFN γ , IL-1 α/β , IL-6, IL-8, TNF α , IL-10, CD40, CD86, CD83, NOD2, TLR9, PTGS2, GM-CSF, G-CSF, RIPK2, etc (<http://www.bu.edu/nf-kb/gene-resources/target-genes/>). Se ha descrito que la unión del LPS al TLR4 desencadena una activación del complejo IKK de manera bifásica. De este modo, se produce una primera activación desencadenada por el LPS, y una segunda más tardía inducida por el TNF α sintetizado de *nov*o, que crea un circuito de retroalimentación positivo (Werner et al., 2005). Al igual que el TNF α , otras citocinas, como IL-2, IL-12 e IL-1, son capaces de inducir la activación del NF- κ B (<http://www.bu.edu/nf-kb/physiological-mediators/inducers/>). El intermediario IRAK2 (perteneciente a la familia IRAK cuyos componentes IRAK1 e IRAK4 participan en las primeras fases de la ruta de los TLR) es necesario para una activación prolongada en el tiempo (horas) del NF- κ B. En los análisis mediante qPCR, no observamos grandes diferencias en los niveles de expresión del ARNm de *IRAK2* entre los probióticos utilizados, aunque las CDmo estimuladas con *B. lactis* BI07 y *C. perfringens* presentaron los niveles más bajos (Fig. 17), indicando que serían las bacterias menos eficaces en la activación posterior del NF- κ B por esta vía.

Además, desde hace tiempo se conoce que la activación del NF- κ B es necesaria para el proceso de maduración de las CD, ya que al bloquear la translocación del NF- κ B al núcleo se inhibe el aumento de la expresión en superficie de moléculas MHC-II y de las moléculas coestimuladoras (Rescigno et al., 1998).

Discusión.

• Efectos sobre la reacción alogénica de células dendríticas estimuladas con bacterias y linfocitos T vírgenes.

Para corroborar los datos obtenidos con un ensayo funcional, se realizó un ensayo alogénico con CD estimuladas con las distintas bacterias y linfocitos T vírgenes. Varios estudios han demostrado que los probióticos pueden tener efectos diversos sobre la proliferación de los linfocitos. Lactobacilos como *L. johnsonii*, *L. reuteri* y *L. gasseri*, inducen una maduración eficiente sobre las CD, las cuales inducen un perfil Th1 de linfocitos (Mohamadzadeh et al., 2005), en cambio, CD estimuladas con *L. casei* y *B. animalis* inducen células T CD4⁺ hiporespondedoras (Baba et al., 2008). Además, ciertos probióticos pueden modular la respuesta inmunológica ya establecida. De este modo, las bifidobacterias que pertenecen a la mezcla probiótica VSL#3 (*B. infantis* Y1 y *B. longum* Y10), son capaces de inhibir la producción de IFN γ que se produce de manera basal en un ensayo alogénico (Hart et al., 2004).

Como se observa en los resultados de esta tesis, las CD estimuladas con *L. acidophilus* NCFM inhibieron la proliferación de los linfocitos T alogénicos. Sin embargo, estos resultados no cuadran con la expresión de los marcadores de maduración, ni se asemejaron a los datos obtenidos con los otros probióticos. Por lo tanto, otros mecanismos tendrían que ser los responsables de este hecho. Marcadores como CTLA4 o B7-H1 también participan en el proceso de tolerancia/anergia (Fife and Bluestone, 2008), por lo que sería interesante conocer su expresión en las CD estimuladas con *L. acidophilus*, así como estudiar los efectos en un ensayo autólogo. El resto de probióticos no disminuyeron la proliferación de los linfocitos T vírgenes, pero sí se observó que *L. rhamnosus* y *L. fermentum* condicionaron a las CDmo de una manera distinta (Fig. 27C). Las CDmo estimuladas con *L. fermentum* tuvieron un efecto más inmunomodulador sobre la producción de IFN γ por parte de los linfocitos T, y junto con *B. lactis* BI07, fueron las únicas bacterias que disminuyeron la producción de IFN γ en algún caso. En este contexto, sería también interesante evaluar el potencial modulador de estos dos probióticos bajo condiciones de inflamación.

2. Efecto de los probióticos sobre las células Caco-2.

El epitelio intestinal constituye una barrera celular selectiva que permite el paso de nutrientes pero impide que los microorganismos del lumen alcancen la lámina propia, donde desencadenarían una fuerte respuesta inflamatoria. La línea celular Caco-2 se empezó a utilizar como modelo epitelial del intestino delgado a partir de 1983 (Pinto and Zweibaum, 1983) y desde entonces, ha sido ampliamente utilizada en estudios de interacción epitelio-bacterias. Los enterocitos también participan activamente en la respuesta inmunológica frente a los agentes invasores. Estas células son sensibles a la estimulación mediante citocinas inflamatorias, como el TNF α o la IL-1 β , y a la invasión de bacterias enteropatógenas, produciendo distintos tipos de quimiocinas para atraer a células del sistema inmunológico. Entre estas quimiocinas se encuentran CCL20, IL-8 (o CXCL8) y CXCL10.

• Efectos sobre la expresión de quimiocinas.

La quimiocina IL-8 atrae a neutrófilos al lugar de la inflamación y su síntesis está desencadenada por el NF- κ B (Gewirtz et al., 2000). CCL20, que también se induce por el NF- κ B, atrae a CDi y a linfocitos T CD45RO⁺ (linfocitos T de memoria) que presentan su receptor, CCR6 (Schutyser et al., 2003). Mientras que CXCL10 atrae linfocitos T activados y monocitos que presentan su receptor CXCR3, y su expresión puede ser inducida en el epitelio por el IFN γ (Dwinell et al., 2001). La expresión de estas 3 moléculas se encuentra incrementada en situaciones de inflamación, como en la EII, y puede ser modificada por bacterias y por citocinas, como TNF α e IL-1 (Ugucioni et al., 1999, Kaser et al., 2004). Además de las funciones atrayentes, CXCL10, posee también actividad antimicrobiana (Cole et al., 2001).

Varios estudios han demostrado que los probióticos pueden actuar de diversas maneras sobre el epitelio. Hay probióticos que son capaces de disminuir los efectos proinflamatorios desencadenados por un estímulo previo, como bacterias enteropatógenas (Roselli et al., 2006) o quimiocinas proinflamatorias como la IL-8 (Wang et al., 2011b). Sin embargo, también hay bacterias probióticas cuyo efecto beneficioso radica en la estimulación inmunológica del epitelio. En ratones SAMP (con

una ileítis crónica similar a la encontrada en la Enfermedad de Crohn), la mezcla probiótica VSL#3 impide el incremento de la permeabilidad epitelial en los primeros estadios de la enfermedad a través de la producción del TNF α , mediada por la activación del NF- κ B. En este estudio, se demostró que la presencia del TNF α es necesaria para que se establezca la inflamación, pero antes de que esta ocurra, el TNF α puede tener una función protectora (Pagnini et al., 2010).

Los cultivos de células Caco-2 no polarizadas, similares a las encontradas en las criptas de las vellosidades, sirvieron como modelo de un epitelio inflamado, donde los procesos de proliferación y renovación se encuentran alterados y por lo tanto se incrementa la permeabilidad de la barrera (Vereecke et al., 2011, van der Flier and Clevers, 2009). Como observamos en la figura 31, las células Caco-2 no polarizadas fueron mucho más sensibles a las bacterias que las células Caco-2 polarizadas. En general *L. rhamnosus*, *L. acidophilus* y *B. lactis* B107 indujeron una débil respuesta en comparación con los otros probióticos, aunque *L. rhamnosus*, a la concentración de 10^8 ufc/ml, desencadenó un marcado incremento en los niveles de ARNm de *IL8* y *CCL20* (Fig. 29). Por lo tanto, una elevada concentración de determinados probióticos puede resultar perjudicial. Como se ha comentado en el apartado de las células dendríticas, las dos bifidobacterias utilizadas desencadenaron unos niveles de ARNm de *CXCL10* por debajo de la condición basal (Fig. 19), sin embargo, este efecto no se observó en las células Caco-2 (Fig. 31).

· Efectos sobre la distribución de Zonula Occludens-1, permeabilidad y adherencia.

La proteína ZO-1, que participa en las uniones estrechas entre los enterocitos, posee una localización citosólica y une los filamentos de F-actina con la ocludina, una proteína localizada en la membrana celular (Ward et al., 2000). El probiótico *L. salivarius* fue la única bacteria capaz de incrementar los niveles de RTE por encima de los niveles basales. Sin embargo, aunque se ha demostrado que existe una relación entre la activación del TLR2 (receptor para el PGN, componente mayoritario de la pared celular de las bacterias Gram-positivas) y ZO-1 (Cario et al., 2004), en los experimentos realizados en esta tesis no se pudo correlacionar el aumento de la RTE producido por *L. salivarius* con una redistribución apical de ZO-1. Como observamos

en los análisis de expresión para las células Caco-2 polarizadas (Fig. 30), *L. salivarius* activó la expresión de las quimiocinas estudiadas sin afectar a la integridad de la monocapa. Sin embargo, *L. rhamnosus*, que disminuyó la resistencia de la monocapa epitelial, no afectó a los niveles de expresión de ARNm de las mismas quimiocinas. Por lo tanto los efectos en la permeabilidad intestinal no estarían tan ligados, en un primer momento, a la producción de citocinas sino a efectos más directos de las bacterias sobre las células como la formación de poros, desestabilización de las uniones estrechas, etc. En condiciones basales, la membrana plasmática de las células Caco-2 presentó un aspecto rugoso, mientras que con algunas bacterias se observó un alisamiento de las membranas plasmáticas. Aparte de este alisamiento, los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactis* BI07 indujeron la formación de interdigitaciones entre las células Caco-2 (Fig. 33D/I); y *B. lactis* Bb12 (Fig. H) dio a las membranas plasmáticas un aspecto más rugoso, como si ZO-1 tuviera una localización más interna en la célula. Aunque estas modificaciones no se correlacionaron con un incremento de la RTE, podrían tener un papel importante en la estabilidad de la monocapa ante una agresión. Ambas especies patógenas utilizadas como controles, *S. typhimurium* y *C. perfringens*, provocaron una disminución de la RTE similar, sin embargo, la distribución de ZO-1 fue diferente. Las células Caco-2 estimuladas con *C. perfringens* presentaron un aspecto más redondeado y liso que las estimuladas con *S. typhimurium*.

Como observamos en los ensayos de adherencia, *C. perfringens* no fue capaz de adherirse a las células Caco-2, sin embargo, el potencial patógeno de esta bacteria reside en las toxinas que produce. Estas toxinas pueden modificar la distribución de las uniones estrechas o formar poros en las membranas dando a las células un aspecto redondeado (Berkes et al., 2003). Esta morfología redondeada también se observó en las células Caco-2 estimuladas con *L. rhamnosus* a una concentración de 10^8 ufc/m (Fig. S2), que presentaron también un descenso brusco en la RTE (Fig.32.C).

Al analizar la capacidad de adherencia de *L. rhamnosus*, observamos que era capaz de adherirse a las células Caco-2 de una manera muy eficiente. Esta característica, junto con un sobrecrecimiento de las bacterias adheridas a las células Caco-2, pudo afectar a la estabilidad de la monocapa. El resto de probióticos

utilizados fueron también capaces de adherirse a las células Caco-2. En el caso de *L. acidophilus* NCFM, se han descrito numerosos genes que codifican para proteínas de unión a mucus y fibronectina, lo que le confiere una gran capacidad de adhesión al epitelio intestinal humano (Altermann et al., 2005). En el caso de las células Caco-2 cultivadas con las bifidobacterias, se recuperó un número similar de colonias que con *L. rhamnosus* (Fig. 34), pero no observamos cambios en la permeabilidad de la monocapa (Fig. 32), indicando que podría ser una bacteria más segura a altas concentraciones.

- Efecto de los factores solubles del epitelio sobre las células dendríticas derivadas de monocitos.

Los factores solubles producidos por las CEI determinan las características que presentan las CD intestinales. Los principales factores que favorecen el desarrollo de CD con un fenotipo tolerogénico son TGF- β , AR y TSLP. Además de las CEI, las CD poseen la capacidad necesaria para sintetizar estos factores.

Las CEI producen TSLP de manera constitutiva, y en las células Caco-2 su síntesis puede ser desencadenada por bacterias a través de la activación del NF- κ B (Cultrone et al., 2013, Lee and Ziegler, 2007). Sin embargo, solo cuando las células se encuentran en un estado no polarizado son capaces de sintetizar TSLP ante estímulos bacterianos (Rimoldi et al., 2005). En la enfermedad de Crohn, las CEI producen menos TSLP que los individuos sanos, por lo que el TSLP colabora de algún modo en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Iliev et al., 2009b). En otros tejidos como el pulmón, un exceso de TSLP está asociado con procesos asmáticos por una respuesta exacerbada de tipo Th2 y una disminución de la función supresora de los linfocitos Treg (Nguyen et al., 2010). Estudios de condicionamiento en CDmo con TSLP, demostraron que la inhibición de la respuesta tipo Th1, solo se producía en un pequeño rango de concentración de TSLP, y concentraciones fuera de ese rango permitían a las CDmo desencadenar una respuesta proinflamatoria (Rimoldi et al., 2005). Se ha demostrado en ratón, que las CD CD103⁺ intestinales producen unos niveles de TSLP similares al epitelio (Spadoni et al., 2012), y que las CD derivadas de la médula ósea producen TSLP cuando son estimuladas por los ligandos de los TLR (Spadoni et al., 2012). Cuando compararamos los datos obtenidos en las CDmo (Fig.

20) y en las Caco-2 (Fig. S3) con respecto a la expresión de *TSLP*, observamos que las CDmo presentaron una expresión basal más alta que las células Caco-2, y ante los mismos estímulos desencadenaron un mayor incremento en los niveles de ARNm de *TSLP*. Debido a que la activación del NF- κ B por *S. typhimurium* en las células Caco-2 (Fig. S4) se desencadena al igual que en las CDmo, las células Caco-2 necesitarían una estimulación más prolongada en el tiempo para incrementar la producción de *TSLP*, y por lo tanto, ante un estímulo proinflamatorio como *S. typhimurium*, las CD circulantes que migran a la lámina propia serían las encargadas de producir grandes cantidades de *TSLP* para atraer a otras CD (Fernandez et al., 2011) o basófilos al lugar de infección (Perrigou et al., 2009).

El AR es otro factor que también participa de manera activa en la creación de un ambiente tolerogénico. Estudios en ratones demostraron que las CD CD103⁺ de los NLM son capaces de convertir el retinol en AR mediante las enzimas aldehído deshidrogenasa (aldh), miembro A1 y A2 de la familia 1 (*adh1a1*, *aldh1a2*) (Coombes et al., 2007). Sin embargo, dependiendo del ambiente en el que se sintetice el AR, puede desencadenar la expansión de células Th1 y Th17 (Agace and Persson, 2012). Además, el AR tiene un efecto más directo en la inmunidad innata ya que, como se ha demostrado en ratones, los ligandos del TLR2 son capaces de incrementar la expresión de *Aldh1a2* (Wang et al., 2011a), e inducir un perfil regulador mediado por la expresión de *Socs3* (Manicassamy et al., 2009). Sin embargo, cuando se estimularon las CDmo con las bacterias, se observó que las bacterias Gram-positivas, excepto curiosamente *L. fermentum* y *B. lactis* BI07, incrementaron los niveles de ARNm de *ALDH1A2* (Fig. S5).

Varios estudios demostraron que las CD CD103⁺ proceden de los PCD o de las células pre-CD, y como se comentó en el apartado de origen de las CD (página 19) estos precursores ya no pueden dar lugar a monocitos (Bogunovic et al., 2009). Debido a que estos experimentos se realizaron principalmente en ratón, y al hecho de que en el trabajo de Iliev *et al* (2009) obtuvieran CDmo CD103⁺ utilizando el sobrenadante de cultivo de las células Caco-2, se propuso analizar los efectos de un epitelio estimulado con bacterias sobre la diferenciación y la maduración de las CDmo.

En los experimentos de maduración, no observamos ni expresión de CD103, ni cambios en la expresión de moléculas coestimuladoras, ni de CCR7 (Fig. 36), lo que indicó que las CDmo diferenciadas en medio de cultivo de Caco-2 fueron insensibles a factores proinflamatorios secretados por el epitelio. Recientemente, se ha demostrado en ratones que las CD 103⁺, al igual que las CX3CR1, eran capaces de atravesar el epitelio intestinal y fagocitar las bacterias (Farache et al., 2013). Por tanto, o bien los monocitos no son los precursores más idóneos para realizar este tipo de experimentos, o el ambiente proinflamatorio desencadenado por el epitelio no es suficiente para inducir la maduración y migración de estas CD. Debido a que los monocitos son atraídos a los lugares de inflamación, se analizaron las características de los monocitos circulantes que acudirían a la mucosa intestinal ante señales proinflamatorias desencadenadas por el epitelio y su capacidad para diferenciarse a CDmo. Las CDmo obtenidas en estos ensayos presentaron niveles menores de CD80, CD83 y del MHC-II (Fig. 37) y unos niveles mayores de CD14, con respecto a CDmo diferenciadas bajo condiciones basales. Desde hace años se conoce que la diferenciación de monocitos a CDmo es inhibida en presencia de LPS. Los monocitos son precursores de CD y de macrófagos, y en presencia de LPS, incluso junto a GM-CSF e IL-4, tienden a diferenciarse a macrófagos (Rotta et al., 2003, Palucka et al., 1999). Por lo que una situación inflamatoria desencadenada por el epitelio intestinal atraería a los monocitos circulantes que intentarían destruir el agente causante de la infección de manera directa actuando como macrófagos. En un modelo de ratón, se ha observado que las CD CX3CR1⁺ presentes en la lámina propia expresan los marcadores CD14⁺ y CD11b⁺, y proceden de monocitos LyC6⁺ (que corresponden a los monocitos CD14⁺ en humanos) (Varol et al., 2009, Strauss-Ayali et al., 2007), por lo que en humanos, los monocitos podrían ser una fuente importante de células CX3CR1⁺.

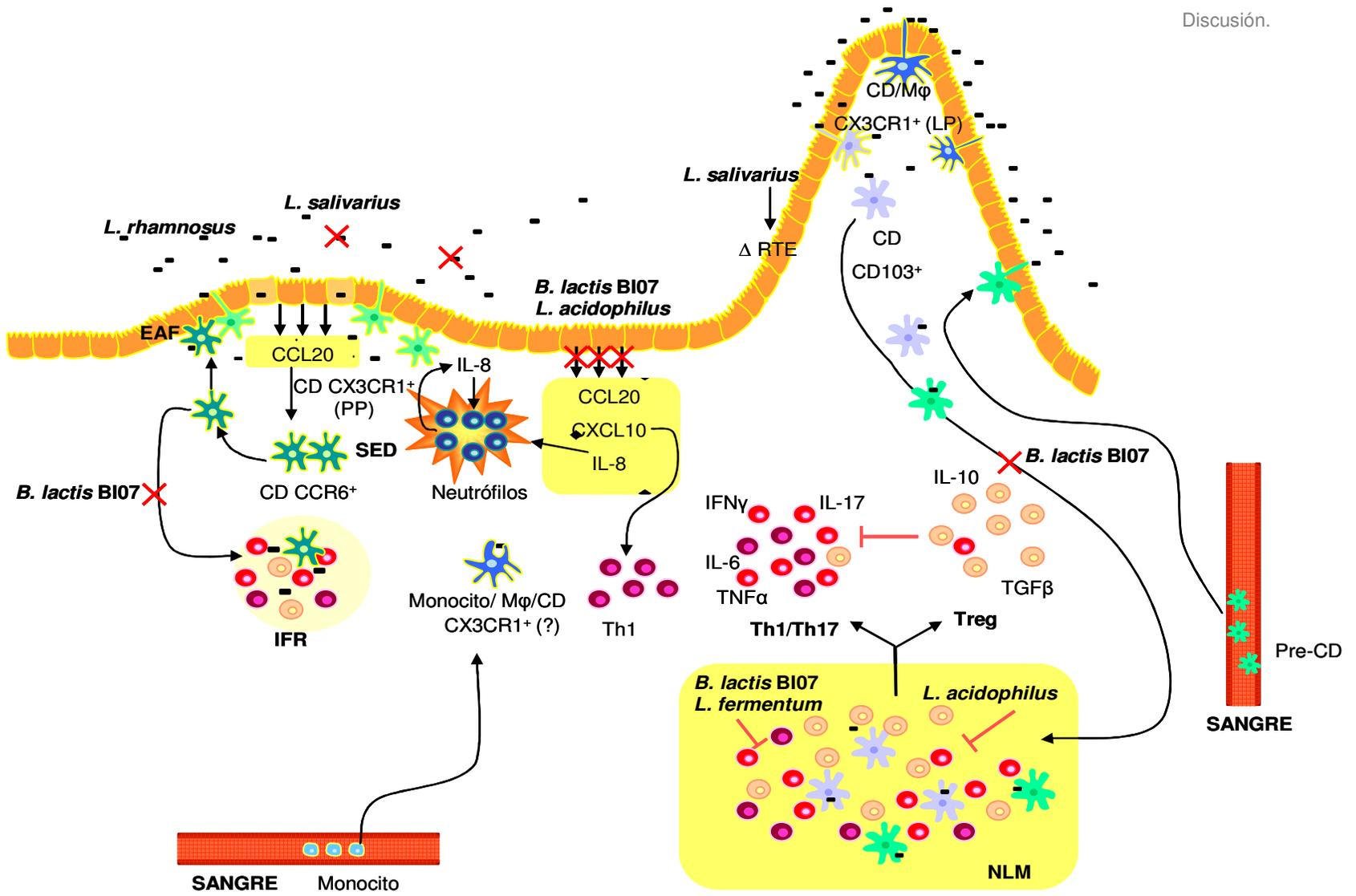


Figura 39. Esquema del hipotético uso de los probióticos estudiados en un intestino dañado, de acuerdo con los resultados obtenidos y a datos de modelos murinos.

Ante estímulos proinflamatorios el epitelio secreta quimiocinas como la IL-8, CXCL10 o CCL20. La IL-8 atrae neutrófilos al lugar de la inflamación, que pueden dañar el tejido. CXCL10 atrae a células que presentan su receptor CXCR3 como linfocitos T efectores como Th1 y CD. En cambio, CCL20 en las PP atrae a CDi, que expresan su receptor CCR6, desde la zona subepitelial del domo (SED) hasta el epitelio asociado al folículo (EAF). Estas CD CCR6+ migraran posteriormente a la zona interfolicular (IFR) de la PP para realizar la presentación antigénica. En los resultados obtenidos, *B. lactis* BI07 y *L. acidophilus* no desencadenaron la expresión de estas quimiocinas en células Caco-2 no polarizadas, por tanto, no potenciarían las señales proinflamatorias en un intestino dañado. En condiciones basales, las CD CD103+ y CX3CR1+ están patrullando por el epitelio intestinal, pero solo las CD CD103+ son capaces de migrar a los NLM. Además de estas poblaciones de CD, bajo condiciones de inflamación son reclutados monocitos y pre-CD desde el torrente sanguíneo a la lámina propia. *B. lactis* BI07 y *L. fermentum* podrían modular la maduración de las CD presentes en la LP o PP y paliar las respuestas proinflamatorias de los linfocitos T efectores, mientras que, *L. acidophilus* podría limitar el exceso de proliferación de los linfocitos T. *L. salivarius* incrementa la RTE en las células Caco-2, aunque su uso podría estar más indicado de un modo profilático que terapéutico, ya que induce la expresión de varias quimiocinas.

PP: placa de Peyer; LP: lamina propia; EAF: epitelio asociado al folículo; IFR: zona interfolicular; SED: zona subepitelial del domo; Δ RTE: incremento resistencia transepitelial eléctrica; CD: célula dendrítica; CDi: célula dendrítica inmadura; Mφ: macrófago.

● linfocito Th17; ● linfocito Th1; ● linfocito Treg; ● neutrófilo; ● monocito; ● CD CX3CR1+ (PP); ● : CD CCR6+ (PP); ● CD/Mφ CX3CR1+ (LP); ● : CD 103+ (LP); ● : pre-CD.

Ante estímulos o situaciones proinflamatorias, los enterocitos secretan IL-8, CXCL10 y CCL20 para atraer a células del sistema inmunitario y acabar con el agente causante de la infección. La IL-8 atrae a neutrófilos que secretan más IL-8 mediante la activación de los TLR, y factores dañinos para el tejido como enzimas metabolitos del oxígeno citotóxicos. A su vez, CXCL10 atrae a células que presentan su receptor CXCR3, como linfocitos Th1 y CD de origen mieloide. Mientras que CCL20 es el ligando para el CCR6, presente en las CD inmaduras de la zona SED de las placas de Peyer. Estas CD CCR6+ migran a la zona interfolicular y realizan la presentación antigénica. En la LP, las CD CD103+ son las encargadas de mantener la homeostasis intestinal ya que en condiciones basales inducen la diferenciación de linfocitos Treg en los NLM, sin embargo, bajo condiciones de inflamación pierden esa capacidad tolerógena y son capaces de inducir un perfil Th1/Th17. Células que actúan como precursores de las CD, como monocitos y pre-CD son reclutados desde la corriente

sanguínea para favorecer la respuesta inmunológica. En la EII, se ha identificado que las CD de la mucosa intestinal presentan unos niveles de moléculas coestimuladoras CD86, CD40 y CD83 elevados (Kelsall and Leon, 2005). Los probióticos estudiados durante esta tesis podrían actuar en diferentes ambientes intestinales en un hipotético tratamiento. *B. lactis* BI07 podría limitar la presentación antigénica y la migración al inhibir la maduración de las CD, mientras que *L. acidophilus* podría paliar el exceso de proliferación linfocitaria en los NLM. El probiótico *L. salivarius* fue el único de los probióticos ensayados que incrementó la resistencia en un modelo de monocapa epitelial de células Caco-2. Aunque, al desencadenar un incremento en la expresión de ARNm de *CXCL10*, *CCL10* e *IL8* en un modelo de epitelio dañado quizá no sea el probiótico más adecuado para revertir la inflamación. Sin embargo, podría ser de gran utilidad para prevenir recaídas en la EII. El efecto protector de *L. salivarius* CECT 5713 ya se observó en ratones, donde se demostró que prevenía el desarrollo de la colitis (Arribas et al., 2012). Otros probióticos como *L. acidophilus* y *L. fermentum* resultaron más seguros en este modelo. En otros estudios, se ha demostrado que algunos de los probióticos utilizados en esta tesis, *L. rhamnosus* y *L. salivarius* son capaces de sintetizar sustancias bactericidas (Jimenez et al., 2010, Olivares et al., 2006, Gopal et al., 2001), lo que podría ser de utilidad en la eliminación de bacterias patógenas.

Se necesitan nuevos estudios para determinar si PPAR γ y STAT3 están implicados en las rutas de señalización de *B. lactis* BI07 y *L. fermentum*, y si los sobrenadantes de *B. lactis* BI07 ejercen alguna función. Sería también interesante determinar como se comportarían las CDmo estimuladas con *L. acidophilus* en un ensayo autólogo y bajo condiciones de inflamación. *L. salivarius* es capaz de inducir una respuesta inmunológica en un modelo de epitelio y a su vez incrementar la resistencia, por lo tanto, analizar la resistencia de un epitelio pretratado con *L. salivarius* ante posibles patógenos aportaría datos de interés sobre este probiótico.

VIII. Conclusiones/Conclusions

Los datos obtenidos durante esta Tesis doctoral permitieron concluir:

I. Los distintos lactobacilos estudiados desencadenaron la maduración de las CDmo de forma diferente. En cambio, las bifidobacterias apenas indujeron cambios en la expresión de marcadores de maduración.

II. Las bacterias patógenas, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, incrementaron los niveles de ARNm de *IL2* e *IFNG*. En general, los lactobacilos desencadenaron una respuesta proinflamatoria mayor sobre las CD que las bifidobacterias. Entre los lactobacilos, *L. fermentum* tuvo un efecto más específico sobre los genes relacionados con la ruta del NF- κ B, AP-1 y STAT3. Mientras que las bifidobacterias disminuyeron la expresión de PRR y de genes relacionados con IFN.

III. Las CDmo fueron capaces de fagocitar todas las especies bacterianas, a excepción de *C. perfringens*, y de activar la translocación del NF- κ B al núcleo.

IV. Las CDmo estimuladas con *L. acidophilus* indujeron una menor proliferación sobre los linfocitos T vírgenes. Aunque la producción de IFN γ por estas células fue muy variable, algunos probióticos, como *L. fermentum* y *B. lactis* BI07, indujeron una menor producción de IFN γ , lo que podría sugerir una posible función reguladora.

V. Las células Caco-2 polarizadas fueron menos sensibles a los estímulos bacterianos. Los probióticos utilizados desencadenaron perfiles de expresión diferentes de quimiocinas involucradas en la respuesta inmunológica intestinal.

VI. Los probióticos, en general, no modificaron la permeabilidad de la monocapa epitelial, a excepción de *L. salivarius* que indujo un incremento en la resistencia de manera gradual. Este incremento de la resistencia no se correlacionó con un cambio en la distribución de ZO-1.

VII. Los distintos probióticos utilizados fueron capaces de adherirse a una línea celular de epitelio intestinal en distinto grado.

VIII. Las CDmo diferenciadas en un cocultivo con células Caco-2 no fueron capaces de madurar cuando las células Caco-2 cultivadas en el inserto se estimularon con distintas bacterias. Sin embargo, cuando los monocitos se intentaron diferenciar a CDmo en presencia de factores proinflamatorios procedentes del epitelio intestinal, estas células mostraron un perfil diferente de las CDmo diferenciadas en condiciones basales.

The results obtained in this Thesis let me to conclude the following conclusions:

I. *Lactobacillus* spp. triggered maturation on monocyte-derived dendritic cells (moDCs) in a different degree, whereas, *Bifidobacterium* spp. Induced slight changes in the expression of maturation markers.

II. Pathogen bacteria, both Gram-negative and Gram-positive, increased mRNA levels of *IL2* and *IFNG* on moDCs. In general, *Lactobacillus* spp. induced a greater pro-inflammatory response than *Bifidobacterium* spp. Among *Lactobacillus* spp., *L. fermentum* showed a more specific effect on genes related with NF- κ B, AP-1 and STAT3 pathways; whereas *Bifidobacterium* spp. decreased PRRs and IFN related genes.

III. Monocyte-derived dendritic cells were able to carry out phagocytosis of all bacterial species, with exception of *C. perfringens*, and to promote translocation of NF- κ B to the nucleus.

IV. *L. acidophilus* -stimulated moDCs induced lower proliferation of naïve T cells than other bacteria. However the production of IFN γ by T cells was heterogeneous, and *L. fermentum* and *B. lactis* BI07 might have a regulatory function.

V. Non-polarized Caco-2 cells, more usual in inflamed epithelium, were more sensitive to the stimuli than polarized cells. Probiotics triggered different profiles of chemokine expression.

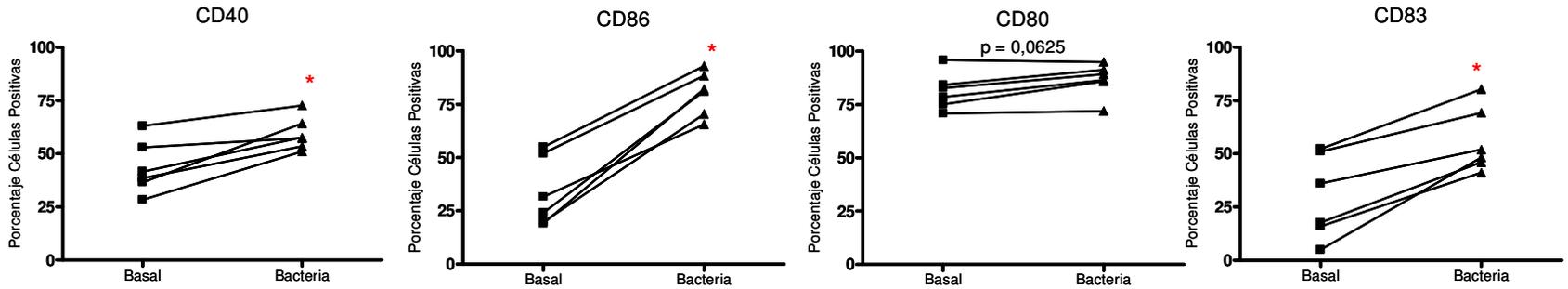
VI. In general, probiotics did not modify the permeability of Caco-2 cells monolayer, with the exception of *L. salivarius*, which gradually increased the resistance of monolayer. Nevertheless, this increase did not correlate with changes in the Zonula-Occludens (ZO)-1 distribution.

VII. All probiotics had the ability to adhere to Caco-2 cells surface with different degree.

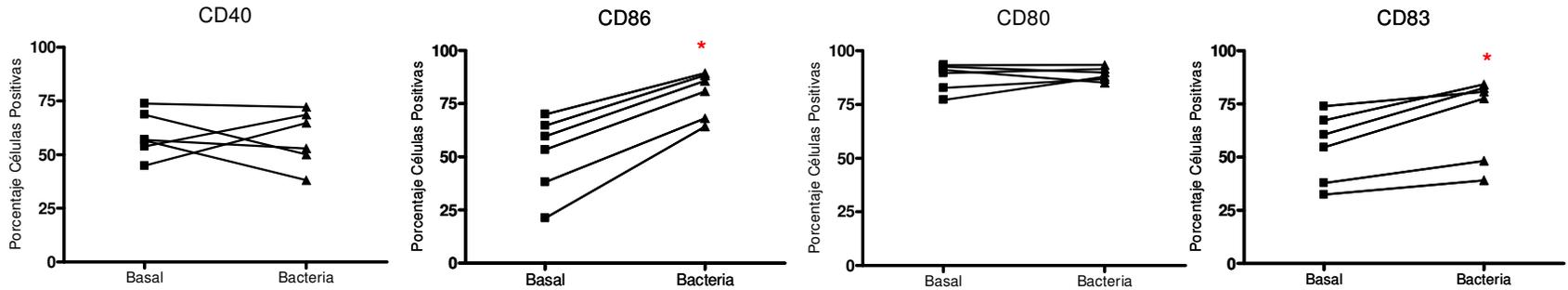
VIII. Monocyte-derived dendritic cells differentiated in co-culture with Caco-2 cells, were not able to mature in the presence of pro-inflammatory stimuli from bacteria-stimulated Caco-2 cells. Nevertheless, when monocytes are induced to differentiate to moDCs in presence of intestinal epithelial pro-inflammatory factors, these cells showed different profiles from moDCs differentiated in basal culture medium.

Anexo I

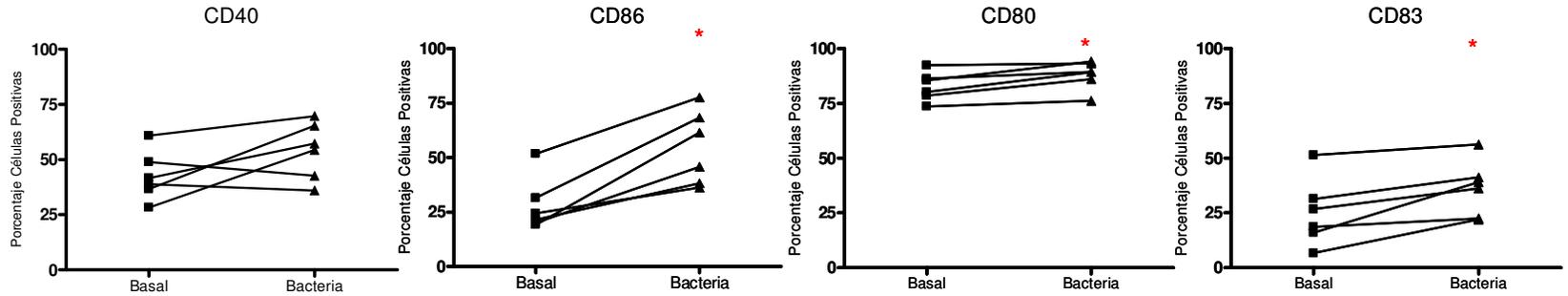
A) *S. typhimurium*



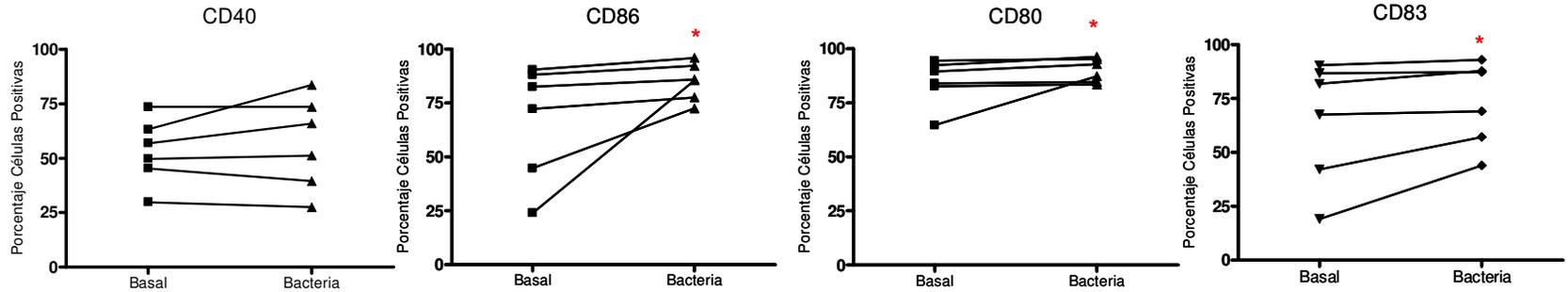
B) *C. perfringens*



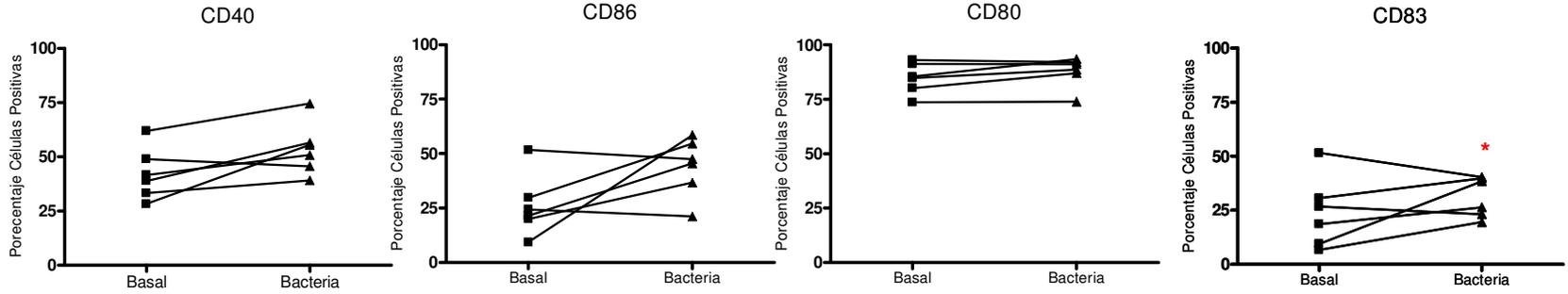
C) *L. rhamnosus*



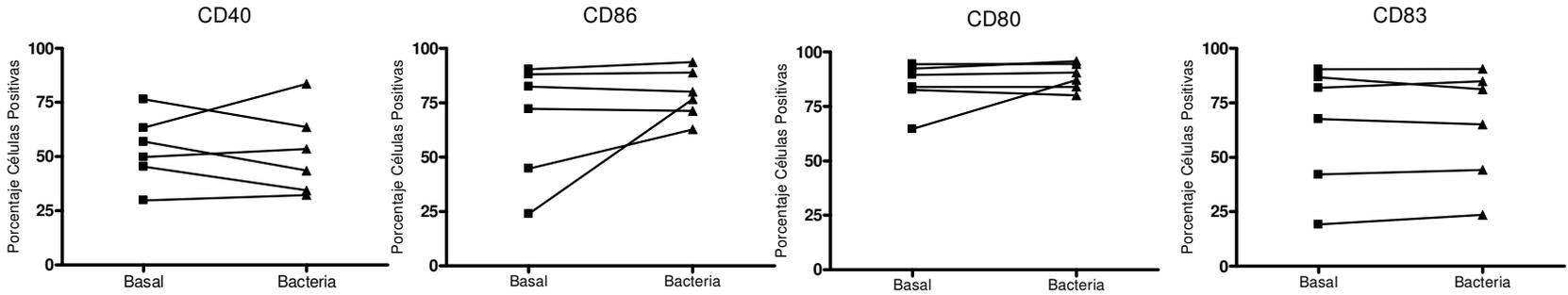
D) *L. acidophilus*



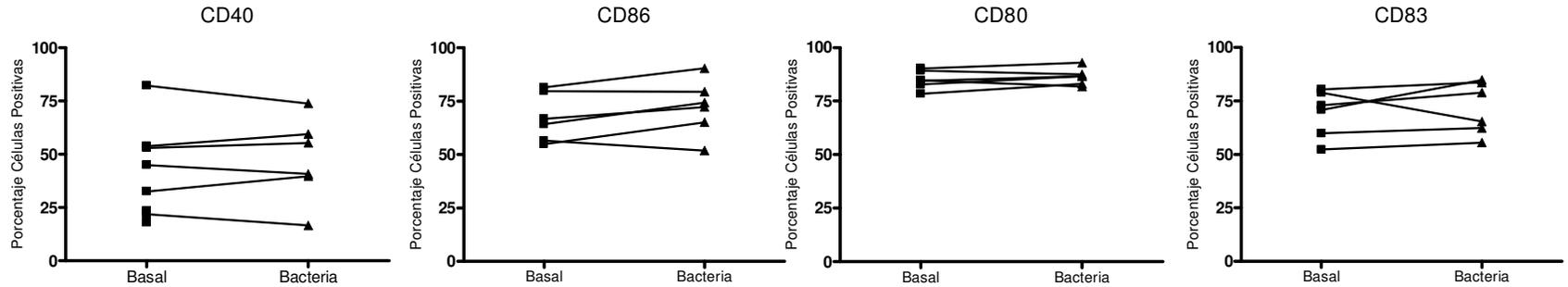
E) *L. fermentum*



F) *L. salivarius*



G) *B. lactis* Bb12



H) *B. lactis* BI07

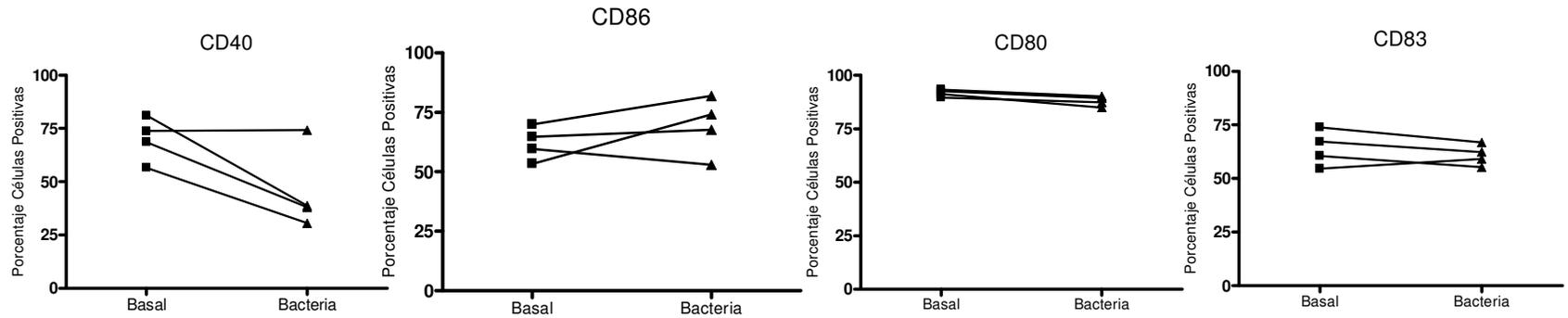


Figura S1. Expresión de los marcadores de maduración, expresados como porcentaje, en CDmo estimuladas con las distintas bacterias. Los resultados fueron analizados mediante el test pareado no paramétrico de Wilcoxon. * Resultado estadísticamente significativo. * = $p \leq 0,05$.

Siglas del gen	Secuencia referencia	Nombre oficial del gen	Categoría funcional
BTK	NM_000061	Tirosina kinasa de Bruton	Proteína de unión a TLR
CASP8	NM_001228	Caspasa 8	Proteína efectora
CCL2	NM_002982	Ligando quimiocina 2	Ruta del NF- κ B
CD14	NM_000591	Molécula CD14	Proteína de unión a TLR
CD80	NM_005191	Molécula CD80	Regulación de inmunidad adaptativa
CD86	NM_006889	Molécula CD86	Regulación de inmunidad adaptativa
CHUK	NM_001278	Quinasa ubicua de hélice-bucle-hélice conservado	Ruta del NF- κ B
CLEC4E	NM_014358	Dominio tipo C-lectina, familia 4, miembro E	Ruta del factor nuclear IL-6
CSF2	NM_000758	Factor estimulador de colonias granulocito-macrófago	Ruta del NF- κ B
CSF3	NM_000759	Factor estimulador de colonias granulocito	Ruta del NF- κ B
CXCL10	NM_001565	Ligando quimiocina 10	Proteína efectora
EIF2AK2	NM_002759	Quinasa 2 del factor 2 alpha de inicio de la traducción en eucariotas	Proteína efectora
ELK1	NM_005229	Miembro de la familia de oncogenes ETS	Ruta del JNK/p38
FADD	NM_003824	Dominio de muerte asociado a Fas	Proteína efectora
FOS	NM_005252	Oncogen homólogo al del virus del osteosarcoma murino FBJ	Ruta del JNK/p38
HMGB1	NM_002128	Proteína 1 del grupo de alta movilidad	Proteína de unión a TLR
HRAS	NM_005343	Oncogén homólogo al del virus del sarcoma de las ratas Harvey	Proteína de unión a TLR
HSPA1A	NM_005345	Proteína de choque térmico 70kDa	Proteína de unión a TLR
HSPD1	NM_002156	Proteína de choque térmico 70kDa (chaperonina)	Proteína de unión a TLR
IFNA1	NM_024013	Interferón alpha 1	Ruta del IRF
IFNB1	NM_002176	Interferón beta 1	Ruta del IRF
IFNG	NM_000619	Interferón gamma	Ruta del IRF
IKKBK	NM_001556	Quinasa beta del inhibidor del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	Ruta del NF- κ B

IL10	NM_000572	Interleucina 10	Ruta del NF-κB
IL12A	NM_000882	Interleucina 12A	Ruta del NF-κB
IL1A	NM_000575	Interleucina 1 alpha	Ruta del NF-κB
IL1B	NM_000576	Interleucina 1 beta	Ruta del NF-κB
IL2	NM_000586	Interleucina 2	Ruta del NF-κB
IL6	NM_000600	Interleucina 6	Ruta del NF-κB
IL8	NM_000584	Interleucina 8	Ruta del NF-κB
IRAK1	NM_001569	Quinasa 1 asociada al receptor de IL-1	Proteína efectora
IRAK2	NM_001570	Quinasa 2 asociada al receptor de IL-1	Proteína efectora
IRF1	NM_002198	Factor 1 regulador del interferón	Ruta del IRF
IRF3	NM_001571	Factor 3 regulador del interferón	Ruta del IRF
JUN	NM_002228	Protooncogén Jun	Ruta del JNK/p38
LTA	NM_000595	Linfotoxina alpha	Ruta del NF-κB
CD180	NM_005582	Molécula CD180	Homólogo TLR
LY86	NM_004271	Antígeno 86 de linfocito	Proteína de unión a TLR
LY96	NM_015364	Antígeno 96 de linfocito	Proteína de unión a TLR
MAP2K3	NM_002756	Proteína quinasa quinasa 3 activada por mitógenos	Ruta del JNK/p38
MAP2K4	NM_003010	Proteína quinasa quinasa 4 activada por mitógenos	Ruta del JNK/p38
MAP3K1	NM_005921	Proteína quinasa quinasa quinasa 1 activada por mitógenos	Ruta del JNK/p38
TAK1	NM_003188	Quinasa activada por el TGFβ	Proteína efectora
TAB1	NM_006116	Proteína de unión a la quinasa activada por el TGFβ	Proteína efectora
MAP4K4	NM_004834	Proteína quinasa quinasa quinasa quinasa 4 activada por mitógenos	Ruta del NF-κB
MAPK8	NM_002750	Proteína quinasa 8 activada por mitógenos	Ruta del JNK/p38
MYD88	NM_002468	Proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide 88	Adaptador de TLR
NFKB1	NM_003998	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las	Ruta del NF-κB

		células B activadas 1	
NFKB2	NM_002502	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas 2 (p49/p100)	Ruta del NF-κB
NFKBIA	NM_020529	Inhibidor alfa del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	Ruta del NF-κB
NFKBIL1	NM_005007	Inhibidor tipo 1 del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas	Ruta del NF-κB
NFRKB	NM_006165	Factor nuclear relacionado con la proteína de unión a kappaB	Ruta del NF-κB
NR2C2	NM_003298	Miembro 2, del grupo C, de la subfamilia de receptores nucleares	Proteína efectora
PELI1	NM_020651	Homólogo de Pellino 1	Proteína de unión a TLR
PPARA	NM_005036	Receptor alfa activado por los proliferadores de los peroxisomas	Proteína efectora
PRKRA	NM_003690	Proteína quinasa activada por ARN de doble cadena inducida por el IFN	Proteína efectora
PTGS2	NM_000963	Prostaglandina endoperóxido sintasa 2	Ruta del factor nuclear IL-6
REL	NM_002908	Oncogen homólogo al gen v-rel de la reticuloendoteliosis viral	Ruta del NF-κB
RELA	NM_021975	Oncogen homólogo A al gen v-rel de la reticuloendoteliosis viral	Ruta del NF-κB
RIPK2	NM_003821	Serina treonina quinasa 2 que interactúa con el receptor	Proteína de unión a TLR Regulación de la inmunidad innata
SARM1	NM_015077	Sterile alfa y proteínas que contienen el motivo TIR	Proteína de unión a TLR
SIGIRR	NM_021805	Dominio de inmunoglobulina simple y de TIR	Inhibidor de TLR
ECSIT	NM_016581	Homólogo al gen ECSIT	Proteína efectora
TBK1	NM_013254	Quinasa 1 de unión a TANK	Ruta del IRF
TICAM2	NM_021649	Molécula adaptadora 2 de TLR (TRAM)	Proteína adaptadora
TIRAP	NM_001039 661	Proteína adaptadora que contiene el dominio TIR	Proteína adaptadora
TLR1	NM_003263	Receptor tipo Toll 1	Receptor tipo Toll
TLR10	NM_030956	Receptor tipo Toll 10	Receptor tipo Toll
TLR2	NM_003264	Receptor tipo Toll 2	Receptor tipo Toll

TLR3	NM_003265	Receptor tipo Toll 3	Receptor tipo Toll
TLR4	NM_138554	Receptor tipo Toll 4	Receptor tipo Toll
TLR5	NM_003268	Receptor tipo Toll 5	Receptor tipo Toll
TLR6	NM_006068	Receptor tipo Toll 6	Receptor tipo Toll
TLR7	NM_016562	Receptor tipo Toll 7	Receptor tipo Toll
TLR8	NM_138636	Receptor tipo Toll 8	Receptor tipo Toll
TLR9	NM_017442	Receptor tipo Toll 9	Receptor tipo Toll
TNF	NM_000594	Factor de necrosis tumoral	Ruta del NF-κB
TNFRSF1A	NM_001065	Miembro 1A de la superfamilia de receptores del tumor de necrosis tumoral	Ruta del NF-κB
TOLLIP	NM_019009	Proteína que interactúa con Toll	Proteína de unión al TLR
TRAF6	NM_004620	Factor 6 asociado al receptor del TNF	Regulación de la inmunidad adaptativa
TICAM1	NM_182919	Molécula adaptadora 1 de TLR (TRIF)	Proteína adaptadora
UBE2N	NM_003348	Enzima E2N conjugada con la ubiquitina	Proteína efectora
UBE2V1	NM_021988	Variante 1 de la enzima E2 conjugada con la ubiquitina	Proteína efectora
B2M	NM_004048	Beta 2 microglobulina	Gen de referencia
HPRT1	NM_000194	Hipoxantina fosforibosil transferasa	Gen de referencia
RPL13A	NM_012423	Proteína ribosomal L13A	Gen de referencia
GAPDH	NM_002046	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	Gen de referencia
ACTB	NM_001101	Beta actina	Gen de referencia
HGDC	SA_00105	-	Control de contaminación de ADN genómico
RTC	SA_00104	-	Control de la transcripción reversa
PPC	PPC	-	Control positivo de la PCR

Tabla S1. Genes incluidos en el estudio de la ruta de señalización de los TLR humanos (Número de catálogo: PAHS-018).

Gen	ST	CP	LR	LA	LF	LS	BL	DN
BTK	-0,081	-3,517	1,261	1,811	0,002	-1,168	-1,237	-1,511
CASP8	-2,555	-4,718	-7,749	-1,892	-1,522	-1,489	-1,605	-2,137
CCL2	9,156	1,530	9,217	13,667	13,282	6,259	5,043	4,790
CD14	-1,336	-3,201	-1,220	1,361	1,649	-1,492	-1,616	-1,445
CD80	2,529	-0,277	2,237	3,409	1,563	2,470	1,431	-1,127
CD86	1,719	1,675	1,533	4,214	1,545	2,838	2,462	1,538
CHUK	1,268	1,036	2,210	2,313	2,046	1,928	1,448	1,458
CLEC4E	4,143	-3,382	2,118	5,224	3,953	-1,354	-1,417	-1,125
CSF2	906,615	211,019	155,588	261,937	142,564	194,580	59,503	46,709
CSF3	1088,077	13,304	14,641	178,037	322,615	20,892	5,210	6,265
CXCL10	6,310	-12,859	-2,296	-0,140	2,273	-3,954	-79,521	-34,868
EIF2AK2	-1,554	-7,600	-1,046	-0,201	0,032	-4,639	-6,175	-7,497
ELK1	1,795	1,727	2,305	2,951	1,433	2,726	2,150	2,022
FADD	-1,734	-1,336	0,322	1,912	-1,136	-1,119	1,326	1,100
FOS	1,444	2,249	4,244	3,695	0,019	1,574	1,912	1,307
HMGB1	-1,071	1,219	1,465	1,881	0,068	1,664	1,970	1,712
HRAS	-0,038	1,261	1,959	2,597	1,397	1,930	1,667	1,503
HSPA1A	-1,480	2,431	1,196	0,162	-1,433	1,173	2,621	1,698
HSPD1	-1,414	-1,218	1,391	1,807	1,101	1,163	1,698	-1,154
IFNA1	3,036	1,594	-2,726	-0,107	1,559	2,996	-0,058	1,714
IFNB1	5,255	-1,783	-9,776	-5,458	-5,088	-3,706	-10,918	-15,930
IFNG	49,459	92,051	3,179	4,857	1,477	3,062	2,592	1,361
IKBKB	-0,004	1,096	2,108	1,651	0,022	1,472	1,226	1,169
IL10	26,923	4,979	9,680	21,085	29,069	18,641	3,205	4,016
IL12A	2,452	2,470	1,793	1,693	1,995	1,423	-1,827	-0,178
IL1A	168,416	10,033	64,924	48,881	56,076	60,055	14,258	12,938
IL1B	508,712	44,124	130,217	174,302	158,706	144,381	25,586	37,267
IL2	25,485	14,876	-1,241	1,843	0,157	1,275	-1,975	1,611
IL6	337,636	7,630	13,787	51,075	108,258	43,456	4,908	6,005
IL8	35,143	7,015	19,872	21,372	18,923	12,511	8,172	6,178
IRAK1	0,035	-1,278	0,186	2,084	-1,105	-1,587	1,897	-1,185
IRAK2	10,122	2,211	8,033	10,637	5,681	5,284	4,147	3,350
IRF1	2,005	0,013	0,041	0,038	1,069	-1,254	-0,048	-1,371
IRF3	-1,550	1,772	2,355	2,289	-1,242	1,985	2,403	2,142
JUN	1,173	1,879	5,344	5,639	1,172	3,197	3,157	1,642
LTA	7,368	5,869	5,154	5,496	1,389	6,821	3,377	2,318
CD180	-1,627	-2,745	-1,664	-1,292	-1,540	-1,926	-1,261	-2,112
LY86	-0,010	-1,889	1,349	1,773	1,241	1,545	-1,110	1,063

LY96	1,604	-1,232	1,833	2,196	0,321	1,564	1,232	1,333
MAP2K3	9,274	5,467	12,953	20,153	4,896	9,503	8,150	5,304
MAP2K4	1,250	-1,056	1,677	1,858	1,182	1,437	1,335	1,240
MAP3K1	-1,120	2,460	3,516	4,466	1,026	3,112	3,541	2,352
MAP3K7	-1,563	-1,510	-0,424	0,104	-1,477	-1,150	1,081	-1,096
TAB1	-3,031	-2,094	-1,242	-1,261	-2,013	-1,800	0,764	0,024
MAP4K4	2,995	2,287	2,585	2,773	1,763	2,102	1,844	1,693
MAPK8	1,173	1,253	1,631	1,544	1,145	1,277	1,605	1,738
MAPK8IP3	-2,311	-0,062	1,254	-0,056	-1,533	-1,608	1,312	1,262
MYD88	1,302	-4,071	-1,086	1,206	0,820	-3,231	-2,654	-2,424
NFKB1	4,371	3,031	3,328	3,915	2,324	4,915	2,166	2,933
NFKB2	1,674	0,406	1,221	1,763	1,276	1,237	-1,051	1,605
NFKBIA	4,821	2,893	4,191	4,705	3,599	4,293	2,196	2,286
NFKBIL1	-0,022	1,120	1,163	1,753	1,305	1,128	1,562	1,463
NFRKB	-1,845	-1,817	0,985	1,271	-1,499	0,935	-0,040	1,041
NR2C2	-1,745	-1,733	-1,337	-0,084	-1,629	-1,248	-0,016	0,925
PELI1	4,452	-1,205	1,639	1,739	1,648	1,231	0,210	0,419
PPARA	-1,171	-0,019	1,646	1,780	-0,197	1,284	1,463	1,226
PRKRA	0,034	-1,218	1,413	1,698	0,049	1,312	1,206	1,142
PTGS2	509,428	57,795	71,089	121,389	113,904	68,707	23,813	26,697
REL	3,549	3,945	8,286	7,632	1,588	4,718	4,216	2,367
RELA	1,334	-0,044	1,516	1,920	1,215	1,175	1,555	1,189
RIPK2	9,389	2,052	5,108	6,109	6,012	4,065	2,483	1,727
SARM1	-3,005	-1,203	1,761	1,768	-3,303	0,066	1,866	1,414
SIGIRR	1,012	1,490	1,006	2,124	1,179	-1,095	1,978	1,953
ECSIT	-0,035	-1,191	1,314	1,826	-1,344	0,019	1,261	1,429
TBK1	1,238	-1,264	1,566	1,835	1,070	1,382	0,141	1,166
TICAM2	-0,100	-0,084	0,241	0,275	-1,646	-1,067	1,518	1,044
TIRAP	-3,605	-2,958	-0,305	-1,498	-1,523	-2,609	-0,320	-1,477
TLR1	-1,422	-17,987	-4,037	-1,466	1,077	-2,740	-4,787	-4,619
TLR10	1,803	-1,215	2,980	2,373	1,754	-0,125	1,539	1,573
TLR2	2,080	-5,151	1,780	2,698	3,096	1,599	-1,394	-1,391
TLR3	-0,167	-2,449	-0,012	-2,498	-2,076	-1,735	-1,926	-1,683
TLR4	-2,320	-11,760	-3,106	-2,775	0,000	-2,686	-4,171	-2,874
TLR5	1,276	-2,636	1,100	-0,068	1,169	1,388	-1,263	0,081
TLR6	-2,281	-8,890	-1,939	-1,839	-1,483	-2,610	-2,302	-1,480
TLR7	4,508	-2,830	0,549	3,540	0,659	0,156	1,505	0,023
TLR8	1,176	0,017	2,565	2,955	1,599	1,277	1,377	1,467
TLR9	1,488	2,119	1,941	2,084	1,678	2,644	3,470	3,502

Anexo I.

TNF	37,953	49,033	23,814	20,090	12,921	48,981	20,635	17,017
TNFRSF1A	-3,589	-6,424	-6,930	-2,490	-2,410	-4,453	-2,006	-2,182
TOLLIP	-1,029	-1,137	1,674	1,854	1,346	1,611	1,556	1,214
TRAF6	-1,167	-1,114	2,261	2,441	0,971	1,764	1,617	1,252
TICAM1	1,783	-1,203	1,995	2,449	1,328	1,793	1,453	1,738
UBE2N	1,087	1,230	1,968	2,274	1,623	1,885	1,912	1,637
UBE2V1	-0,307	0,049	2,578	2,017	-0,186	0,175	0,214	0,775

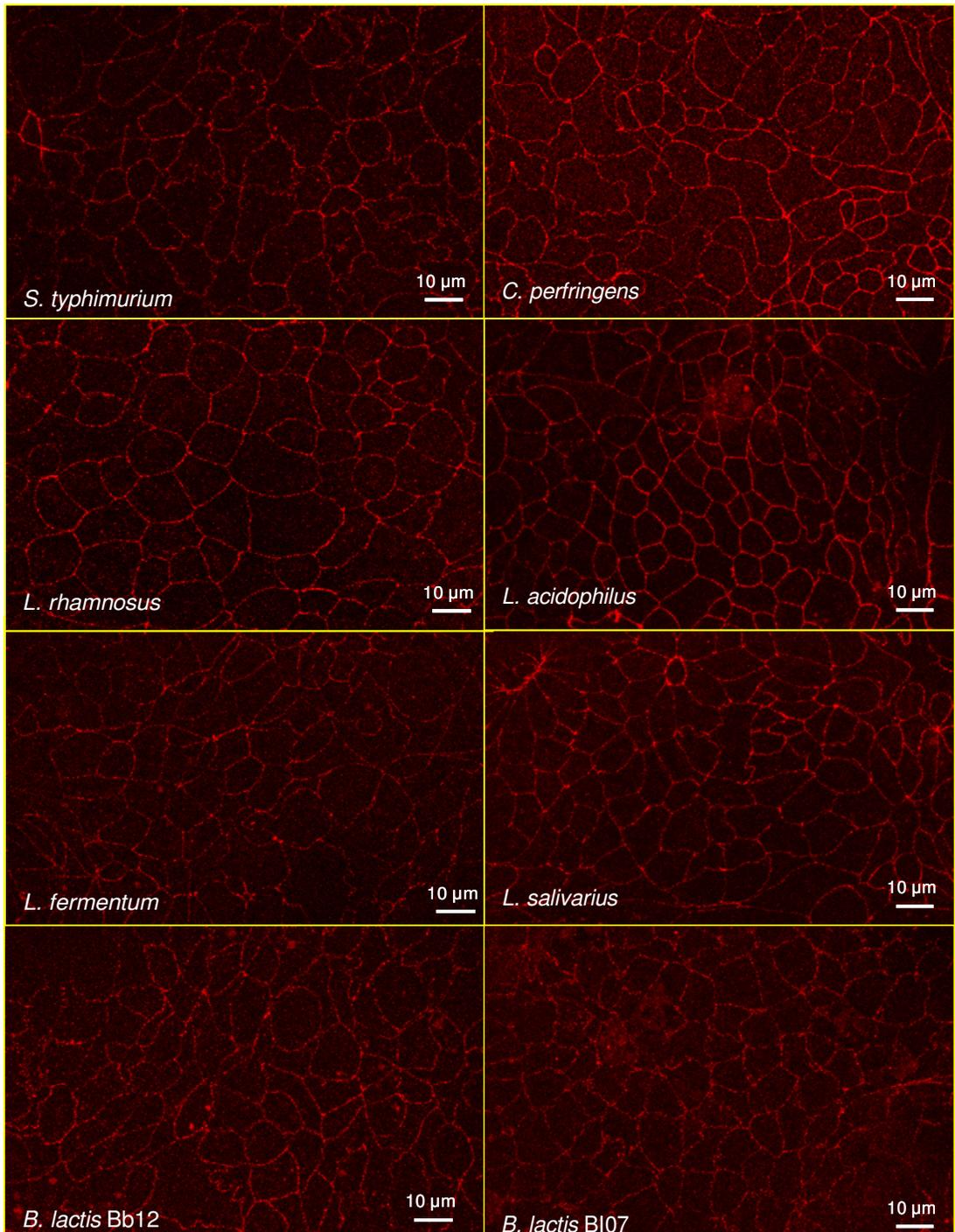


Figura S2. Marcaje de la proteína de membrana ZO-1 en células Caco-2 estimuladas con diferentes especies de bacterias a una concentración de 10^8 ufc/ml. Se analizó la expresión de ZO-1 a lo largo del eje Z utilizando un microscopio confocal Leica. Las imágenes fueron tomadas con el objetivo 40x y procesadas mediante el software Leica realizando la proyección máxima de todos los cortes obtenidos. Los experimentos se realizaron en duplicado y se realizaron al menos 2 secuencias de fotografías para cada duplicado.

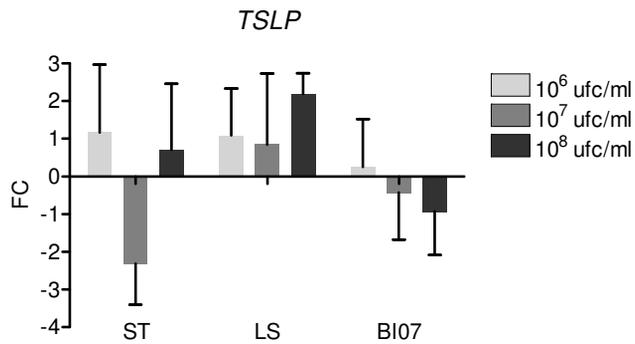


Figura S3. Efecto de distintas especies bacterianas sobre los niveles de ARNm de *TSLP* en células Caco-2 no polarizadas. Los valores están representados como FC con respecto a la condición basal, y normalizados con el gen de referencia *GADPH*.
ST: *S. typhimurium*; LS: *L. salivarius*; BI07: *B. lactis* BI07.

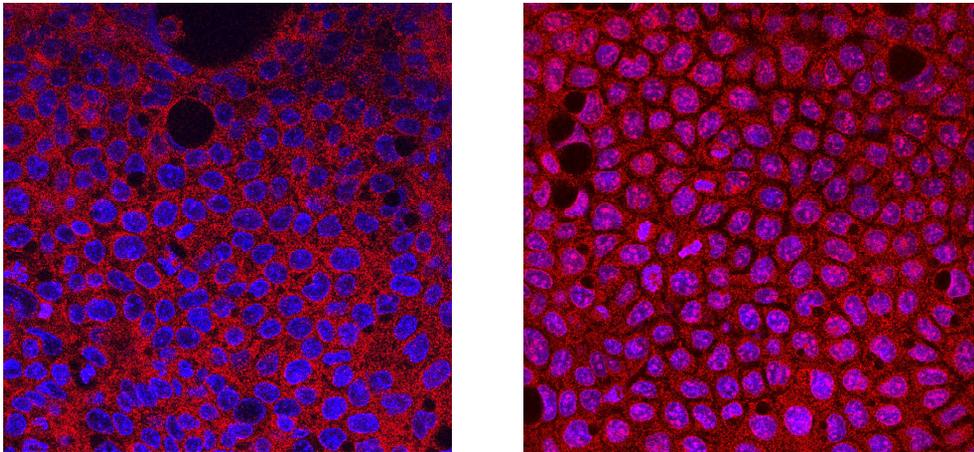


Fig. S4. Marcaje del NF-κB en células Caco-2 no polarizadas en condiciones basales (izquierda) y células Caco-2 estimuladas con *S. typhimurium* (derecha) durante 90 minutos.

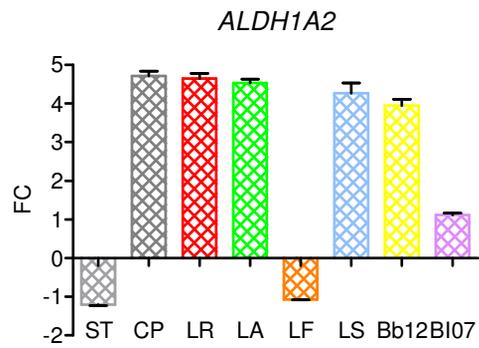


Figura S5. Cambios en la expresión del ARNm de *ALDH1A2* en CDmo estimuladas con bacterias. Los valores están representados como FC con respecto a la condición basal. El gen de referencia utilizado para la normalización fue el gen ribosomal *GADPH*.

Bibliografía

- AERTS-TOEGAERT, C., HEIRMAN, C., TUYAERTS, S., CORTHALS, J., AERTS, J. L., BONEHILL, A., THIELEMANS, K. & BRECKPOT, K. 2007. CD83 expression on dendritic cells and T cells: correlation with effective immune responses. *Eur J Immunol*, 37, 686-95.
- AGACE, W. W. & PERSSON, E. K. 2012. How vitamin A metabolizing dendritic cells are generated in the gut mucosa. *Trends Immunol*, 33, 42-8.
- AGRAWAL, S. & GUPTA, S. 2011. TLR1/2, TLR7, and TLR9 signals directly activate human peripheral blood naive and memory B cell subsets to produce cytokines, chemokines, and hematopoietic growth factors. *J Clin Immunol*, 31, 89-98.
- ALTERMANN, E., RUSSELL, W. M., AZCARATE-PERIL, M. A., BARRANGOU, R., BUCK, B. L., MCAULIFFE, O., SOUTHER, N., DOBSON, A., DUONG, T., CALLANAN, M., LICK, S., HAMRICK, A., CANO, R. & KLAENHAMMER, T. R. 2005. Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 3906-12.
- ANDERSON, K. V. 2000. Toll signaling pathways in the innate immune response. *Curr Opin Immunol*, 12, 13-9.
- ANDERSSON, L. I., CIRKIC, E., HELLMAN, P. & ERIKSSON, H. 2012. Myeloid blood dendritic cells and monocyte-derived dendritic cells differ in their endocytosing capability. *Hum Immunol*, 73, 1073-81.
- APPEL, S., MIRAKAJ, V., BRINGMANN, A., WECK, M. M., GRUNEBACH, F. & BROSSART, P. 2005. PPAR-gamma agonists inhibit toll-like receptor-mediated activation of dendritic cells via the MAP kinase and NF-kappaB pathways. *Blood*, 106, 3888-94.
- ARRIBAS, B., GARRIDO-MESA, N., PERAN, L., CAMUESCO, D., COMALADA, M., BAILON, E., OLIVARES, M., XAUS, J., KRUIDENIER, L., SANDERSON, I. R., ZARZUELO, A., RODRIGUEZ-CABEZAS, M. E. & GALVEZ, J. 2012. The immunomodulatory properties of viable *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius* CECT5713 are not restricted to the large intestine. *Eur J Nutr*, 51, 365-74.
- BABA, N., SAMSON, S., BOURDET-SICARD, R., RUBIO, M. & SARFATI, M. 2008. Commensal bacteria trigger a full dendritic cell maturation program that promotes the expansion of non-Tr1 suppressor T cells. *J Leukoc Biol*, 84, 468-76.
- BALASUBRAMANIAN, S., EFIMOVA, T. & ECKERT, R. L. 2002. Green tea polyphenol stimulates a Ras, MEKK1, MEK3, and p38 cascade to increase activator protein 1 factor-dependent involucrin gene expression in normal human keratinocytes. *J Biol Chem*, 277, 1828-36.
- BANCHEREAU, J., BRIERE, F., CAUX, C., DAVOUST, J., LEBECQUE, S., LIU, Y. J., PULENDRAN, B. & PALUCKA, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*, 18, 767-811.
- BANCHEREAU, J. & STEINMAN, R. M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, 245-52.
- BARNICH, N., AGUIRRE, J. E., REINECKER, H. C., XAVIER, R. & PODOLSKY, D. K. 2005. Membrane recruitment of NOD2 in intestinal epithelial cells is essential for nuclear factor- κ B activation in muramyl dipeptide recognition. *J Cell Biol*, 170, 21-6.
- BARTON, G. M., KAGAN, J. C. & MEDZHITOV, R. 2006. Intracellular localization of Toll-like receptor 9 prevents recognition of self DNA but facilitates access to viral DNA. *Nat Immunol*, 7, 49-56.

- BASSAGANYA-RIERA, J., VILADOMIU, M., PEDRAGOSA, M., DE SIMONE, C., CARBO, A., SHAYKHUTDINOV, R., JOBIN, C., ARTHUR, J. C., CORL, B. A., VOGEL, H., STORR, M. & HONTECILLAS, R. 2012. Probiotic bacteria produce conjugated linoleic acid locally in the gut that targets macrophage PPAR gamma to suppress colitis. *PLoS One*, 7, e31238.
- BERER, K., MUES, M., KOUTROLOS, M., RASBI, Z. A., BOZIKI, M., JOHNER, C., WEKERLE, H. & KRISHNAMOORTHY, G. 2011. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*, 479, 538-41.
- BERKES, J., VISWANATHAN, V. K., SAVKOVIC, S. D. & HECHT, G. 2003. Intestinal epithelial responses to enteric pathogens: effects on the tight junction barrier, ion transport, and inflammation. *Gut*, 52, 439-51.
- BEVINS, C. L. & SALZMAN, N. H. 2011. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol*, 9, 356-68.
- BOELE, L. C., BAJRAMOVIC, J. J., DE VRIES, A. M., VOSKAMP-VISSER, I. A., KAMAN, W. E. & VAN DER KLEIJ, D. 2009. Activation of Toll-like receptors and dendritic cells by a broad range of bacterial molecules. *Cell Immunol*, 255, 17-25.
- BOFFA, D. J., FENG, B., SHARMA, V., DEMATTEO, R., MILLER, G., SUTHANTHIRAN, M., NUNEZ, R. & LIOU, H. C. 2003. Selective loss of c-Rel compromises dendritic cell activation of T lymphocytes. *Cell Immunol*, 222, 105-15.
- BOGUNOVIC, M., GINHOUX, F., HELFT, J., SHANG, L., HASHIMOTO, D., GRETER, M., LIU, K., JAKUBZICK, C., INGERSOLL, M. A., LEBOEUF, M., STANLEY, E. R., NUSSENZWEIG, M., LIRA, S. A., RANDOLPH, G. J. & MERAD, M. 2009. Origin of the lamina propria dendritic cell network. *Immunity*, 31, 513-25.
- BONIZZI, G. & KARIN, M. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol*, 25, 280-8.
- CABALLERO-FRANCO, C., KELLER, K., DE SIMONE, C. & CHADEE, K. 2007. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292, G315-22.
- CAMPBELL, N., YIO, X. Y., SO, L. P., LI, Y. & MAYER, L. 1999. The intestinal epithelial cell: processing and presentation of antigen to the mucosal immune system. *Immunol Rev*, 172, 315-24.
- CAMPBELL, P. A., CANONO, B. P. & DREVETS, D. A. 2001. Measurement of bacterial ingestion and killing by macrophages. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 14, Unit 14 6.
- CAO, W., LEE, S. H. & LU, J. 2005. CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem J*, 385, 85-93.
- CAPALDO, C. T. & NUSRAT, A. 2009. Cytokine regulation of tight junctions. *Biochim Biophys Acta*, 1788, 864-71.
- CARIO, E., GERKEN, G. & PODOLSKY, D. K. 2004. Toll-like receptor 2 enhances ZO-1-associated intestinal epithelial barrier integrity via protein kinase C. *Gastroenterology*, 127, 224-38.
- CEBRA, J. J. 1999. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr*, 69, 1046S-1051S.
- CELLA, M., ENGERING, A., PINET, V., PIETERS, J. & LANZAVECCHIA, A. 1997a. Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells. *Nature*, 388, 782-7.

- CELLA, M., SALLUSTO, F. & LANZAVECCHIA, A. 1997b. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol*, 9, 10-6.
- COBURN, B., GRASSL, G. A. & FINLAY, B. B. 2007. Salmonella, the host and disease: a brief review. *Immunol Cell Biol*, 85, 112-8.
- COLE, A. M., GANZ, T., LIESE, A. M., BURDICK, M. D., LIU, L. & STRIETER, R. M. 2001. Cutting edge: IFN-inducible ELR- CXC chemokines display defensin-like antimicrobial activity. *J Immunol*, 167, 623-7.
- COOMBES, J. L., SIDDIQUI, K. R., ARANCIBIA-CARCAMO, C. V., HALL, J., SUN, C. M., BELKAID, Y. & POWRIE, F. 2007. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med*, 204, 1757-64.
- CORTHAY, A. 2006. A three-cell model for activation of naive T helper cells. *Scand J Immunol*, 64, 93-6.
- CULTRONE, A., DE WOUTERS, T., LAKHDARI, O., KELLY, D., MULDER, I., LOGAN, E., LAPAQUE, N., DORE, J. & BLOTTIERE, H. M. 2013. The NF-kappaB binding site located in the proximal region of the TSLP promoter is critical for TSLP modulation in human intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol*, 43, 1053-62.
- CHANG, M., JIN, W. & SUN, S. C. 2009. Peli1 facilitates TRIF-dependent Toll-like receptor signaling and proinflammatory cytokine production. *Nat Immunol*, 10, 1089-95.
- CHAO, W. 2009. Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 296, H1-12.
- CHEN, C. C., LOUIE, S., SHI, H. N. & WALKER, W. A. 2005. Preinoculation with the probiotic *Lactobacillus acidophilus* early in life effectively inhibits murine *Citrobacter rodentium* colitis. *Pediatr Res*, 58, 1185-91.
- CHIZZOLINI, C. & BREMBILLA, N. C. 2009. Prostaglandin E2: igniting the fire. *Immunol Cell Biol*, 87, 510-1.
- DECKER, T., MULLER, M. & STOCKINGER, S. 2005. The yin and yang of type I interferon activity in bacterial infection. *Nat Rev Immunol*, 5, 675-87.
- DENNING, T. L., WANG, Y. C., PATEL, S. R., WILLIAMS, I. R. & PULENDRAN, B. 2007. Lamina propria macrophages and dendritic cells differentially induce regulatory and interleukin 17-producing T cell responses. *Nat Immunol*, 8, 1086-94.
- DIAZ-ROPERO, M. P., MARTIN, R., SIERRA, S., LARA-VILLOSLADA, F., RODRIGUEZ, J. M., XAUS, J. & OLIVARES, M. 2007. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol*, 102, 337-43.
- DUFOUR, J. H., DZIEJMAN, M., LIU, M. T., LEUNG, J. H., LANE, T. E. & LUSTER, A. D. 2002. IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10; CXCL10)-deficient mice reveal a role for IP-10 in effector T cell generation and trafficking. *J Immunol*, 168, 3195-204.
- DWINELL, M. B., LÜGERING, N., ECKMANN, L. & KAGNOFF, M. F. 2001. Regulated production of interferon-inducible T-cell chemoattractants by human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology*, 120, 49-59.
- EFIMOVA, T., LACELLE, P., WELTER, J. F. & ECKERT, R. L. 1998. Regulation of human involucrin promoter activity by a protein kinase C, Ras, MEKK1, MEK3, p38/RK, AP1 signal transduction pathway. *J Biol Chem*, 273, 24387-95.

- ELKORD, E., WILLIAMS, P. E., KYNASTON, H. & ROWBOTTOM, A. W. 2005. Human monocyte isolation methods influence cytokine production from in vitro generated dendritic cells. *Immunology*, 114, 204-12.
- FAO/WHO. 2002. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Ontario, Canada.
- FARACHE, J., KOREN, I., MILO, I., GUREVICH, I., KIM, K. W., ZIGMOND, E., FURTADO, G. C., LIRA, S. A. & SHAKHAR, G. 2013. Luminal bacteria recruit CD103+ dendritic cells into the intestinal epithelium to sample bacterial antigens for presentation. *Immunity*, 38, 581-95.
- FAURE, E., EQUILS, O., SIELING, P. A., THOMAS, L., ZHANG, F. X., KIRSCHNING, C. J., POLENTARUTTI, N., MUZIO, M. & ARDITI, M. 2000. Bacterial lipopolysaccharide activates NF-kappaB through toll-like receptor 4 (TLR-4) in cultured human dermal endothelial cells. Differential expression of TLR-4 and TLR-2 in endothelial cells. *J Biol Chem*, 275, 11058-63.
- FAURE, E., THOMAS, L., XU, H., MEDVEDEV, A., EQUILS, O. & ARDITI, M. 2001. Bacterial lipopolysaccharide and IFN-gamma induce Toll-like receptor 2 and Toll-like receptor 4 expression in human endothelial cells: role of NF-kappa B activation. *J Immunol*, 166, 2018-24.
- FENG, T., WANG, L., SCHOEB, T. R., ELSON, C. O. & CONG, Y. 2010. Microbiota innate stimulation is a prerequisite for T cell spontaneous proliferation and induction of experimental colitis. *J Exp Med*, 207, 1321-32.
- FERNANDEZ, M. I., HEUZE, M. L., MARTINEZ-CINGOLANI, C., VOLPE, E., DONNADIEU, M. H., PIEL, M., HOMEY, B., LENNON-DUMENIL, A. M. & SOUMELIS, V. 2011. The human cytokine TSLP triggers a cell-autonomous dendritic cell migration in confined environments. *Blood*, 118, 3862-9.
- FIFE, B. T. & BLUESTONE, J. A. 2008. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol Rev*, 224, 166-82.
- FLACHER, V., BOUSCHBACHER, M., VERRONESE, E., MASSACRIER, C., SISIRAK, V., BERTHIER-VERGNES, O., DE SAINT-VIS, B., CAUX, C., DEZUTTER-DAMBUYANT, C., LEBECQUE, S. & VALLADEAU, J. 2006. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J Immunol*, 177, 7959-67.
- FLEISCHER, J., SOETH, E., REILING, N., GRAGE-GRIEBENOW, E., FLAD, H. D. & ERNST, M. 1996. Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology*, 89, 592-8.
- FLORES-DIAZ, M. & ALAPE-GIRON, A. 2003. Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene. *Toxicon*, 42, 979-86.
- FOLIGNE, B., ZOUMPOPOULOU, G., DEWULF, J., BEN YOUNES, A., CHAREYRE, F., SIRARD, J. C., POT, B. & GRANGETTE, C. 2007. A key role of dendritic cells in probiotic functionality. *PLoS One*, 2, e313.
- FRANCHI, L., WARNER, N., VIANI, K. & NUNEZ, G. 2009. Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. *Immunol Rev*, 227, 106-28.
- FRITZ, J. H., GIRARDIN, S. E., FITTING, C., WERTS, C., MENGIN-LECREULX, D., CAROFF, M., CAVAILLON, J. M., PHILPOTT, D. J. & ADIB-CONQUY, M. 2005. Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists. *Eur J Immunol*, 35, 2459-70.
- FUJIMOTO, K., KARUPPUCHAMY, T., TAKEMURA, N., SHIMOHIGOSHI, M., MACHIDA, T., HASEDA, Y., AOSHI, T., ISHII, K. J., AKIRA, S. & UEMATSU,

- S. 2011. A new subset of CD103+CD8alpha+ dendritic cells in the small intestine expresses TLR3, TLR7, and TLR9 and induces Th1 response and CTL activity. *J Immunol*, 186, 6287-95.
- FULLER, R. 1992. *History and development of probiotics*, Chapman & Hall.
- FURRIE, E., MACFARLANE, S., THOMSON, G. & MACFARLANE, G. T. 2005. Toll-like receptors-2, -3 and -4 expression patterns on human colon and their regulation by mucosal-associated bacteria. *Immunology*, 115, 565-74.
- GAUTIER, G., HUMBERT, M., DEAUVIEAU, F., SCUILLER, M., HISCOTT, J., BATES, E. E., TRINCHIERI, G., CAUX, C. & GARRONE, P. 2005. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med*, 201, 1435-46.
- GEISSMANN, F., MANZ, M. G., JUNG, S., SIEWEKE, M. H., MERAD, M. & LEY, K. 2010. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*, 327, 656-61.
- GEWIRTZ, A. T., RAO, A. S., SIMON, P. O., JR., MERLIN, D., CARNES, D., MADARA, J. L. & NEISH, A. S. 2000. Salmonella typhimurium induces epithelial IL-8 expression via Ca(2+)-mediated activation of the NF-kappaB pathway. *J Clin Invest*, 105, 79-92.
- GILL, H. S. & RUTHERFURD, K. J. 2001. Probiotic supplementation to enhance natural immunity in the elderly: effects of a newly characterized immunostimulatory strain Lactobacillus rhamnosus HN001 (DR20™) on leucocyte phagocytosis. *Nutrition Research*, 21, 183-9.
- GILL, H. S., SHU, Q., LIN, H., RUTHERFURD, K. J. & CROSS, M. L. 2001. Protection against translocating Salmonella typhimurium infection in mice by feeding the immuno-enhancing probiotic Lactobacillus rhamnosus strain HN001. *Med Microbiol Immunol*, 190, 97-104.
- GOPAL, P. K., PRASAD, J., SMART, J. & GILL, H. S. 2001. In vitro adherence properties of Lactobacillus rhamnosus DR20 and Bifidobacterium lactis DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic Escherichia coli. *Int J Food Microbiol*, 67, 207-16.
- GOSSET, P., CHARBONNIER, A. S., DELERIVE, P., FONTAINE, J., STAELS, B., PESTEL, J., TONNEL, A. B. & TROTTEIN, F. 2001. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators affect the maturation of human monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol*, 31, 2857-65.
- GRANUCCI, F., VIZZARDELLI, C., PAVELKA, N., FEAU, S., PERSICO, M., VIRZI, E., RESCIGNO, M., MORO, G. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. 2001. Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis. *Nat Immunol*, 2, 882-8.
- GRIBAR, S. C., ANAND, R. J., SODHI, C. P. & HACKAM, D. J. 2008. The role of epithelial Toll-like receptor signaling in the pathogenesis of intestinal inflammation. *J Leukoc Biol*, 83, 493-8.
- GRIGORIADIS, G., ZHAN, Y., GRUMONT, R. J., METCALF, D., HANDMAN, E., CHEERS, C. & GERONDAKIS, S. 1996. The Rel subunit of NF-kappaB-like transcription factors is a positive and negative regulator of macrophage gene expression: distinct roles for Rel in different macrophage populations. *EMBO J*, 15, 7099-107.
- GRIMES, C. L., ARIYANANDA LDE, Z., MELNYK, J. E. & O'SHEA, E. K. 2012. The innate immune protein Nod2 binds directly to MDP, a bacterial cell wall fragment. *J Am Chem Soc*, 134, 13535-7.

- GROSCHWITZ, K. R. & HOGAN, S. P. 2009. Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis. *J Allergy Clin Immunol*, 124, 3-20; quiz 21-2.
- GUARNER, F. & SCHAAFSMA, G. J. 1998. Probiotics. *Int J Food Microbiol*, 39, 237-8.
- HANABUCHI, S., ITO, T., PARK, W. R., WATANABE, N., SHAW, J. L., ROMAN, E., ARIMA, K., WANG, Y. H., VOO, K. S., CAO, W. & LIU, Y. J. 2010. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FOXP3+ regulatory T cells in human thymus. *J Immunol*, 184, 2999-3007.
- HARIZI, H., JUZAN, M., PITARD, V., MOREAU, J. F. & GUALDE, N. 2002. Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions. *J Immunol*, 168, 2255-63.
- HART, A. L., LAMMERS, K., BRIGIDI, P., VITALI, B., RIZZELLO, F., GIONCHETTI, P., CAMPIERI, M., KAMM, M. A., KNIGHT, S. C. & STAGG, A. J. 2004. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*, 53, 1602-9.
- HASHIMOTO, C., HUDSON, K. L. & ANDERSON, K. V. 1988. The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein. *Cell*, 52, 269-79.
- HAWIGER, J. 2001. Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm. *Immunol Res*, 23, 99-109.
- HERSBERG, R. M. & MAYER, L. F. 2000. Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today*, 21, 123-8.
- HOENE, V., PEISER, M. & WANNER, R. 2006. Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19. *J Leukoc Biol*, 80, 1328-36.
- HOFFMANN, W. 2005. Trefoil factors TFF (trefoil factor family) peptide-triggered signals promoting mucosal restitution. *Cell Mol Life Sci*, 62, 2932-8.
- HOLSCHER, H. D., CZERKIES, L. A., CEKOLA, P., LITOV, R., BENBOW, M., SANTEMA, S., ALEXANDER, D. D., PEREZ, V., SUN, S., SAAVEDRA, J. M. & TAPPENDEN, K. A. 2012. Bifidobacterium lactis Bb12 enhances intestinal antibody response in formula-fed infants: a randomized, double-blind, controlled trial. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*, 36, 106S-17S.
- HONDA, K., TAKAOKA, A. & TANIGUCHI, T. 2006. Type I interferon [corrected] gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity*, 25, 349-60.
- HOOPER, L. V., LITTMAN, D. R. & MACPHERSON, A. J. 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336, 1268-73.
- HOOPER, L. V., MIDTVEDT, T. & GORDON, J. I. 2002. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*, 22, 283-307.
- HORTNER, M., NIELSCH, U., MAYR, L. M., JOHNSTON, J. A., HEINRICH, P. C. & HAAN, S. 2002. Suppressor of cytokine signaling-3 is recruited to the activated granulocyte-colony stimulating factor receptor and modulates its signal transduction. *J Immunol*, 169, 1219-27.
- HUBATSCH, I., RAGNARSSON, E. G. & ARTURSSON, P. 2007. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc*, 2, 2111-9.

- HUBO, M., TRINSCHEK, B., KRYCZANOWSKY, F., TUETTENBERG, A., STEINBRINK, K. & JONULEIT, H. 2013. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol*, 4, 82.
- IBNOU-ZEKRI, N., BLUM, S., SCHIFFRIN, E. J. & VON DER WEID, T. 2003. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal Lactobacillus strains that display similar properties in vitro. *Infect Immun*, 71, 428-36.
- ILIEV, I. D., MILETI, E., MATTEOLI, G., CHIEPPA, M. & RESCIGNO, M. 2009a. Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning. *Mucosal Immunol*, 2, 340-50.
- ILIEV, I. D., SPADONI, I., MILETI, E., MATTEOLI, G., SONZOGNI, A., SAMPIETRO, G. M., FOSCHI, D., CAPRIOLI, F., VIALE, G. & RESCIGNO, M. 2009b. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut*, 58, 1481-9.
- ITO, T., WANG, Y. H. & LIU, Y. J. 2005. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol*, 26, 221-9.
- IVANOV, II, ATARASHI, K., MANEL, N., BRODIE, E. L., SHIMA, T., KARAOZ, U., WEI, D., GOLDFARB, K. C., SANTEE, C. A., LYNCH, S. V., TANOUE, T., IMAOKA, A., ITOH, K., TAKEDA, K., UMESAKI, Y., HONDA, K. & LITTMAN, D. R. 2009. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell*, 139, 485-98.
- IVANOV, II & LITTMAN, D. R. 2010. Segmented filamentous bacteria take the stage. *Mucosal Immunol*, 3, 209-12.
- IWASAKI, A. & KELSALL, B. L. 1999. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med*, 190, 229-39.
- IWASAKI, A. & KELSALL, B. L. 2000. Localization of distinct Peyer's patch dendritic cell subsets and their recruitment by chemokines macrophage inflammatory protein (MIP)-3alpha, MIP-3beta, and secondary lymphoid organ chemokine. *J Exp Med*, 191, 1381-94.
- IWASAKI, A. & KELSALL, B. L. 2001. Unique functions of CD11b+, CD8 alpha+, and double-negative Peyer's patch dendritic cells. *J Immunol*, 166, 4884-90.
- JIMENEZ, E., MARTIN, R., MALDONADO, A., MARTIN, V., GOMEZ DE SEGURA, A., FERNANDEZ, L. & RODRIGUEZ, J. M. 2010. Complete genome sequence of Lactobacillus salivarius CECT 5713, a probiotic strain isolated from human milk and infant feces. *J Bacteriol*, 192, 5266-7.
- JOHANSSON-LINDBOM, B., SVENSSON, M., PABST, O., PALMQVIST, C., MARQUEZ, G., FORSTER, R. & AGACE, W. W. 2005. Functional specialization of gut CD103+ dendritic cells in the regulation of tissue-selective T cell homing. *J Exp Med*, 202, 1063-73.
- JOHANSSON, M. E., LARSSON, J. M. & HANSSON, G. C. 2011. The two mucus layers of colon are organized by the MUC2 mucin, whereas the outer layer is a legislator of host-microbial interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1, 4659-65.
- JONULEIT, H. & SCHMITT, E. 2003. The regulatory T cell family: distinct subsets and their interrelations. *J Immunol*, 171, 6323-7.
- KALINSKI, P., HILKENS, C. M., WIERENGA, E. A. & KAPSENBERG, M. L. 1999. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today*, 20, 561-7.

- KAPSENBERG, M. L. 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat Rev Immunol*, 3, 984-93.
- KARIN, M., LIU, Z. & ZANDI, E. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*, 9, 240-6.
- KASER, A., LUDWICZEK, O., HOLZMANN, S., MOSCHEN, A. R., WEISS, G., ENRICH, B., GRAZIADEI, I., DUNZENDORFER, S., WIEDERMANN, C. J., MURZL, E., GRASL, E., JASAREVIC, Z., ROMANI, N., OFFNER, F. A. & TILG, H. 2004. Increased expression of CCL20 in human inflammatory bowel disease. *J Clin Immunol*, 24, 74-85.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2006. TLR signaling. *Cell Death Differ*, 13, 816-25.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2007a. Signaling to NF-kappaB by Toll-like receptors. *Trends Mol Med*, 13, 460-9.
- KAWAI, T. & AKIRA, S. 2007b. TLR signaling. *Semin Immunol*, 19, 24-32.
- KELSALL, B. L. & LEON, F. 2005. Involvement of intestinal dendritic cells in oral tolerance, immunity to pathogens, and inflammatory bowel disease. *Immunol Rev*, 206, 132-48.
- KIAMA, S. G., DREHER, D., COCHAND, L., KOK, M., OBREGON, C., NICOD, L. & GEHR, P. 2006. Host cell responses of Salmonella typhimurium infected human dendritic cells. *Immunol Cell Biol*, 84, 475-81.
- KIM, S. O., SHEIKH, H. I., HA, S. D., MARTINS, A. & REID, G. 2006. G-CSF-mediated inhibition of JNK is a key mechanism for Lactobacillus rhamnosus-induced suppression of TNF production in macrophages. *Cell Microbiol*, 8, 1958-71.
- KIM, Y., KIM, S. H., WHANG, K. Y., KIM, Y. J. & OH, S. 2008a. Inhibition of Escherichia coli O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells. *J Microbiol Biotechnol*, 18, 1278-85.
- KIM, Y. G., PARK, J. H., SHAW, M. H., FRANCHI, L., INOHARA, N. & NUNEZ, G. 2008b. The cytosolic sensors Nod1 and Nod2 are critical for bacterial recognition and host defense after exposure to Toll-like receptor ligands. *Immunity*, 28, 246-57.
- KNOECHEL, B., LOHR, J., ZHU, S., WONG, L., HU, D., AUSUBEL, L. & ABBAS, A. K. 2006. Functional and molecular comparison of anergic and regulatory T lymphocytes. *J Immunol*, 176, 6473-83.
- KOBAYASHI, K., INOHARA, N., HERNANDEZ, L. D., GALAN, J. E., NUNEZ, G., JANEWAY, C. A., MEDZHITOV, R. & FLAVELL, R. A. 2002. RICK/Rip2/CARDIAK mediates signalling for receptors of the innate and adaptive immune systems. *Nature*, 416, 194-9.
- KOENIG, J. E., SPOR, A., SCALFONE, N., FRICKER, A. D., STOMBAUGH, J., KNIGHT, R., ANGENENT, L. T. & LEY, R. E. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 Suppl 1, 4578-85.
- KUFER, T. A., KREMMER, E., ADAM, A. C., PHILPOTT, D. J. & SANSONETTI, P. J. 2008. The pattern-recognition molecule Nod1 is localized at the plasma membrane at sites of bacterial interaction. *Cell Microbiol*, 10, 477-86.
- KUMAR, A., TAKADA, Y., BORIEK, A. M. & AGGARWAL, B. B. 2004a. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med (Berl)*, 82, 434-48.
- KUMAR, H., KAWAI, T. & AKIRA, S. 2009. Pathogen recognition in the innate immune response. *Biochem J*, 420, 1-16.
- KUMAR, M. V., NAGINENI, C. N., CHIN, M. S., HOOKS, J. J. & DETRICK, B. 2004b. Innate immunity in the retina: Toll-like receptor (TLR) signaling in human retinal pigment epithelial cells. *J Neuroimmunol*, 153, 7-15.

- LANG, R., PAULEAU, A. L., PARGANAS, E., TAKAHASHI, Y., MAGES, J., IHLE, J. N., RUTSCHMAN, R. & MURRAY, P. J. 2003. SOCS3 regulates the plasticity of gp130 signaling. *Nat Immunol*, 4, 546-50.
- LANIER, L. L., O'FALLON, S., SOMOZA, C., PHILLIPS, J. H., LINSLEY, P. S., OKUMURA, K., ITO, D. & AZUMA, M. 1995. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol*, 154, 97-105.
- LARSEN, N., VOGENSEN, F. K., VAN DEN BERG, F. W., NIELSEN, D. S., ANDREASEN, A. S., PEDERSEN, B. K., AL-SOUD, W. A., SORENSEN, S. J., HANSEN, L. H. & JAKOBSEN, M. 2010. Gut microbiota in human adults with type 2 diabetes differs from non-diabetic adults. *PLoS One*, 5, e9085.
- LATVALA, S., PIETILA, T. E., VECKMAN, V., KEKKONEN, R. A., TYNKKYNNEN, S., KORPELA, R. & JULKUNEN, I. 2008. Potentially probiotic bacteria induce efficient maturation but differential cytokine production in human monocyte-derived dendritic cells. *World J Gastroenterol*, 14, 5570-83; discussion 5581-2.
- LEBER, J. H., CRIMMINS, G. T., RAGHAVAN, S., MEYER-MORSE, N. P., COX, J. S. & PORTNOY, D. A. 2008. Distinct TLR- and NLR-mediated transcriptional responses to an intracellular pathogen. *PLoS Pathog*, 4, e6.
- LECHMANN, M., BERCHTOLD, S., HAUBER, J. & STEINKASSERER, A. 2002. CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends Immunol*, 23, 273-5.
- LEE, H. C. & ZIEGLER, S. F. 2007. Inducible expression of the proallergic cytokine thymic stromal lymphopoietin in airway epithelial cells is controlled by NFkappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 914-9.
- LEE, J., GONZALES-NAVAJAS, J. M. & RAZ, E. 2008. The "polarizing-tolerizing" mechanism of intestinal epithelium: its relevance to colonic homeostasis. *Semin Immunopathol*, 30, 3-9.
- LEMAITRE, B., NICOLAS, E., MICHAUT, L., REICHHART, J. M. & HOFFMANN, J. A. 1996. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell*, 86, 973-83.
- LIU, K. & NUSSENZWEIG, M. C. 2010. Origin and development of dendritic cells. *Immunol Rev*, 234, 45-54.
- LIU, M., GUO, S., HIBBERT, J. M., JAIN, V., SINGH, N., WILSON, N. O. & STILES, J. K. 2011. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22, 121-30.
- LIVAK, K. J. & SCHMITTGEN, T. D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, 25, 402-8.
- LOPEZ, P., GUEIMONDE, M., MARGOLLES, A. & SUAREZ, A. 2010. Distinct Bifidobacterium strains drive different immune responses in vitro. *Int J Food Microbiol*, 138, 157-65.
- LOZUPONE, C. A., STOMBAUGH, J., GONZALEZ, A., ACKERMANN, G., WENDEL, D., VAZQUEZ-BAEZA, Y., JANSSON, J. K., GORDON, J. I. & KNIGHT, R. 2013. Meta-analyses of studies of the human microbiota. *Genome Res*, 23, 1704-14.
- LUTZ, M. B. & SCHULER, G. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol*, 23, 445-9.
- LYONS, A. B. 2000. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *J Immunol Methods*, 243, 147-54.

- MACHO FERNANDEZ, E., VALENTI, V., ROCKEL, C., HERMANN, C., POT, B., BONECA, I. G. & GRANGETTE, C. 2011. Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut*, 60, 1050-9.
- MAKELA, S. M., OSTERLUND, P. & JULKUNEN, I. 2011. TLR ligands induce synergistic interferon-beta and interferon-lambda1 gene expression in human monocyte-derived dendritic cells. *Mol Immunol*, 48, 505-15.
- MANE, J., LOREN, V., PEDROSA, E., OJANGUREN, I., XAUS, J., CABRE, E., DOMENECH, E. & GASSULL, M. A. 2009. Lactobacillus fermentum CECT 5716 prevents and reverts intestinal damage on TNBS-induced colitis in mice. *Inflamm Bowel Dis*, 15, 1155-63.
- MANEERAT, S., LEHTINEN, M. J., CHILDS, E. J., FORSSTEN, S. D., ALHONIEMI, E., TIPHAINE, M., YAQOUB, P., OUWEHAND, A. C. & RASTALL, R. A. 2013. Consumption of Bifidobacterium lactis Bi-07 by healthy elderly adults enhances phagocytic activity of monocytes and granulocytes. *Journal of Nutritional Science*, 2, 1-10.
- MANICASSAMY, S., RAVINDRAN, R., DENG, J., OLUOCH, H., DENNING, T. L., KASTURI, S. P., ROSENTHAL, K. M., EVAVOLD, B. D. & PULENDRAN, B. 2009. Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. *Nat Med*, 15, 401-9.
- MCDOLE, J. R., WHEELER, L. W., MCDONALD, K. G., WANG, B., KONJUFCA, V., KNOOP, K. A., NEWBERRY, R. D. & MILLER, M. J. 2012. Goblet cells deliver luminal antigen to CD103+ dendritic cells in the small intestine. *Nature*, 483, 345-9.
- MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P. & JANEWAY, C. A., JR. 1997. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 388, 394-7.
- MELILLO, J. A., SONG, L., BHAGAT, G., BLAZQUEZ, A. B., PLUMLEE, C. R., LEE, C., BERIN, C., REIZIS, B. & SCHINDLER, C. 2010. Dendritic cell (DC)-specific targeting reveals Stat3 as a negative regulator of DC function. *J Immunol*, 184, 2638-45.
- MENNIGEN, R., NOLTE, K., RIJCKEN, E., UTECH, M., LOEFFLER, B., SENNINGER, N. & BRUEWER, M. 2009. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 296, G1140-9.
- MERAD, M., SATHE, P., HELFT, J., MILLER, J. & MORTHA, A. 2013. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol*, 31, 563-604.
- MEYER ZUM BUSCHENFELDE, D., TAUBER, R. & HUBER, O. 2006. TFF3-peptide increases transepithelial resistance in epithelial cells by modulating claudin-1 and -2 expression. *Peptides*, 27, 3383-90.
- MOHAMADZADEH, M., OLSON, S., KALINA, W. V., RUTHEL, G., DEMMIN, G. L., WARFIELD, K. L., BAVARI, S. & KLAENHAMMER, T. R. 2005. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 2880-5.
- MORAN, J. P., WALTER, J., TANNOCK, G. W., TONKONOGY, S. L. & SARTOR, R. B. 2009. Bifidobacterium animalis causes extensive duodenitis and mild

- colonic inflammation in monoassociated interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis*, 15, 1022-31.
- MOREIRA, L. O., EL KASMI, K. C., SMITH, A. M., FINKELSTEIN, D., FILLON, S., KIM, Y. G., NUNEZ, G., TUOMANEN, E. & MURRAY, P. J. 2008. The TLR2-MyD88-NOD2-RIPK2 signalling axis regulates a balanced pro-inflammatory and IL-10-mediated anti-inflammatory cytokine response to Gram-positive cell walls. *Cell Microbiol*, 10, 2067-77.
- MUKHERJEE, S., VAISHNAVA, S. & HOOPER, L. V. 2008. Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense. *Cell Mol Life Sci*, 65, 3019-27.
- MURRAY, P. J. 2006. Understanding and exploiting the endogenous interleukin-10/STAT3-mediated anti-inflammatory response. *Curr Opin Pharmacol*, 6, 379-86.
- MUZIO, M., BOSISIO, D., POLENTARUTTI, N., D'AMICO, G., STOPPACCIARO, A., MANCINELLI, R., VAN'T VEER, C., PENTON-ROL, G., RUCO, L. P., ALLAVENA, P. & MANTOVANI, A. 2000. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol*, 164, 5998-6004.
- NENCI, A., BECKER, C., WULLAERT, A., GAREUS, R., VAN LOO, G., DANESE, S., HUTH, M., NIKOLAEV, A., NEUFERT, C., MADISON, B., GUMUCIO, D., NEURATH, M. F. & PASPARAKIS, M. 2007. Epithelial NEMO links innate immunity to chronic intestinal inflammation. *Nature*, 446, 557-61.
- NENCIONI, A., GRUNEBACH, F., ZOBYWLASKI, A., DENZLINGER, C., BRUGGER, W. & BROSSART, P. 2002. Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol*, 169, 1228-35.
- NETEA, M. G., FERWERDA, G., DE JONG, D. J., JANSEN, T., JACOBS, L., KRAMER, M., NABER, T. H., DRENTH, J. P., GIRARDIN, S. E., KULLBERG, B. J., ADEMA, G. J. & VAN DER MEER, J. W. 2005. Nucleotide-binding oligomerization domain-2 modulates specific TLR pathways for the induction of cytokine release. *J Immunol*, 174, 6518-23.
- NGUYEN, K. D., VANICHSARN, C. & NADEAU, K. C. 2010. TSLP directly impairs pulmonary Treg function: association with aberrant tolerogenic immunity in asthmatic airway. *Allergy Asthma Clin Immunol*, 6, 4.
- NISHIKI, S., HATO, F., KAMATA, N., SAKAMOTO, E., HASEGAWA, T., KIMURA-ETO, A., HINO, M. & KITAGAWA, S. 2004. Selective activation of STAT3 in human monocytes stimulated by G-CSF: implication in inhibition of LPS-induced TNF-alpha production. *Am J Physiol Cell Physiol*, 286, C1302-11.
- NOGUCHI, E., HOMMA, Y., KANG, X., NETEA, M. G. & MA, X. 2009. A Crohn's disease-associated NOD2 mutation suppresses transcription of human IL10 by inhibiting activity of the nuclear ribonucleoprotein hnRNP-A1. *Nat Immunol*, 10, 471-9.
- O'NEILL, D. W. & BHARDWAJ, N. 2005. Differentiation of peripheral blood monocytes into dendritic cells. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 22, Unit 22F 4.
- OLIVARES, M., DIAZ-ROPERO, M. P., MARTIN, R., RODRIGUEZ, J. M. & XAUS, J. 2006. Antimicrobial potential of four Lactobacillus strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol*, 101, 72-9.
- OLIVARES, M., DIAZ-ROPERO, M. P., SIERRA, S., LARA-VILLOSLADA, F., FONOLLA, J., NAVAS, M., RODRIGUEZ, J. M. & XAUS, J. 2007. Oral intake of Lactobacillus fermentum CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition*, 23, 254-60.

- OTTE, J.-M., CARIO, E. & PODOLSKY, D. K. 2004. Mechanisms of cross hyporesponsiveness to toll-like receptor bacterial ligands in intestinal epithelial cells☆. *Gastroenterology*, 126, 1054-1070.
- PAGNINI, C., SAEED, R., BAMIAS, G., ARSENEAU, K. O., PIZARRO, T. T. & COMINELLI, F. 2010. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 454-9.
- PALUCKA, K. A., TAQUET, N., SANCHEZ-CHAPUIS, F. & GLUCKMAN, J. C. 1999. Lipopolysaccharide can block the potential of monocytes to differentiate into dendritic cells. *J Leukoc Biol*, 65, 232-40.
- PARK, J. H., KIM, Y. G., MCDONALD, C., KANNEGANTI, T. D., HASEGAWA, M., BODY-MALAPEL, M., INOHARA, N. & NUNEZ, G. 2007. RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs. *J Immunol*, 178, 2380-6.
- PASPARAKIS, M. 2009. Regulation of tissue homeostasis by NF-kappaB signalling: implications for inflammatory diseases. *Nat Rev Immunol*, 9, 778-88.
- PEREZ-CANO, F. J., DONG, H. & YAQOUB, P. 2010. In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology*, 215, 996-1004.
- PERRIGOU, J. G., SAENZ, S. A., SIRACUSA, M. C., ALLENSPACH, E. J., TAYLOR, B. C., GIACOMIN, P. R., NAIR, M. G., DU, Y., ZAPH, C., VAN ROOIJEN, N., COMEAU, M. R., PEARCE, E. J., LAUFER, T. M. & ARTIS, D. 2009. MHC class II-dependent basophil-CD4+ T cell interactions promote T(H)2 cytokine-dependent immunity. *Nat Immunol*, 10, 697-705.
- PINTO, M., RABINE-LEON, S., APPAY, MD., KEDINGER, M., TRIADOU, N., DUSSAULX, E., LACROIX, B., SIMON-ASSMANN, P., HAFFEN, K., FOGH, J., AND & ZWEIBAUM, A. 1983. Enterocyte-like Differentiation and Polarization of the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco-2 in Culture. *Biology of the Cell*, 47, 323-330.
- POLLARD, M. & SHARON, N. 1970. Responses of the Peyer's Patches in Germ-Free Mice to Antigenic Stimulation. *Infect Immun*, 2, 96-100.
- PULENDRAN, B., TANG, H. & MANICASSAMY, S. 2010. Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol*, 11, 647-55.
- QIN, H., ZHANG, Z., HANG, X. & JIANG, Y. 2009. *L. plantarum* prevents enteroinvasive *Escherichia coli*-induced tight junction proteins changes in intestinal epithelial cells. *BMC Microbiol*, 9, 63.
- RACHMILEWITZ, D., KATAKURA, K., KARMELI, F., HAYASHI, T., REINUS, C., RUDENSKY, B., AKIRA, S., TAKEDA, K., LEE, J., TAKABAYASHI, K. & RAZ, E. 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology*, 126, 520-8.
- RAJILIC-STOJANOVIC, M., SMIDT, H. & DE VOS, W. M. 2007. Diversity of the human gastrointestinal tract microbiota revisited. *Environ Microbiol*, 9, 2125-36.
- RAKOFF-NAHOUM, S., PAGLINO, J., ESLAMI-VARZANEH, F., EDBERG, S. & MEDZHITOV, R. 2004. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell*, 118, 229-41.
- REIZIS, B., BUNIN, A., GHOSH, H. S., LEWIS, K. L. & SISIRAK, V. 2011. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. *Annu Rev Immunol*, 29, 163-83.

- RESCIGNO, M., MARTINO, M., SUTHERLAND, C. L., GOLD, M. R. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. 1998. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med*, 188, 2175-80.
- RESCIGNO, M., URBANO, M., VALZASINA, B., FRANCOLINI, M., ROTTA, G., BONASIO, R., GRANUCCI, F., KRAEHENBUHL, J. P. & RICCIARDI-CASTAGNOLI, P. 2001. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*, 2, 361-7.
- RIDAURA, V. K., FAITH, J. J., REY, F. E., CHENG, J., DUNCAN, A. E., KAU, A. L., GRIFFIN, N. W., LOMBARD, V., HENRISSAT, B., BAIN, J. R., MUEHLBAUER, M. J., ILKAYEVA, O., SEMENKOVICH, C. F., FUNAI, K., HAYASHI, D. K., LYLE, B. J., MARTINI, M. C., URSELL, L. K., CLEMENTE, J. C., VAN TREUREN, W., WALTERS, W. A., KNIGHT, R., NEWGARD, C. B., HEATH, A. C. & GORDON, J. I. 2013. Gut microbiota from twins discordant for obesity modulate metabolism in mice. *Science*, 341, 1241214.
- RIMOLDI, M., CHIEPPA, M., SALUCCI, V., AVOGADRI, F., SONZOGNI, A., SAMPIETRO, G. M., NESPOLI, A., VIALE, G., ALLAVENA, P. & RESCIGNO, M. 2005. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol*, 6, 507-14.
- RIZZARDINI, G., ESKESEN, D., CALDER, P. C., CAPETTI, A., JESPERSEN, L. & CLERICI, M. 2012. Evaluation of the immune benefits of two probiotic strains *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, BB-12(R) and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, L. casei 431(R) in an influenza vaccination model: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr*, 107, 876-84.
- ROSELLI, M., FINAMORE, A., BRITTI, M. S. & MENGHERI, E. 2006. Probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* MB5 and *Lactobacillus rhamnosus* GG protect intestinal Caco-2 cells from the inflammation-associated response induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *Br J Nutr*, 95, 1177-84.
- ROTTA, G., EDWARDS, E. W., SANGALETTI, S., BENNETT, C., RONZONI, S., COLOMBO, M. P., STEINMAN, R. M., RANDOLPH, G. J. & RESCIGNO, M. 2003. Lipopolysaccharide or whole bacteria block the conversion of inflammatory monocytes into dendritic cells in vivo. *J Exp Med*, 198, 1253-63.
- SALAZAR-GONZALEZ, R. M., NIESS, J. H., ZAMMIT, D. J., RAVINDRAN, R., SRINIVASAN, A., MAXWELL, J. R., STOKLASEK, T., YADAV, R., WILLIAMS, I. R., GU, X., MCCORMICK, B. A., PAZOS, M. A., VELLA, A. T., LEFRANCOIS, L., REINECKER, H. C. & MCSORLEY, S. J. 2006. CCR6-mediated dendritic cell activation of pathogen-specific T cells in Peyer's patches. *Immunity*, 24, 623-32.
- SAMBUY, Y., DE ANGELIS, I., RANALDI, G., SCARINO, M. L., STAMMATI, A. & ZUCCO, F. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol*, 21, 1-26.
- SCANDELLA, E., MEN, Y., GILLESSEN, S., FORSTER, R. & GROETTRUP, M. 2002. Prostaglandin E2 is a key factor for CCR7 surface expression and migration of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 100, 1354-61.
- SCOTT, C. L., AUMEUNIER, A. M. & MOWAT, A. M. 2011. Intestinal CD103+ dendritic cells: master regulators of tolerance? *Trends Immunol*, 32, 412-9.
- SCHAEFER, T. M., DESOUZA, K., FAHEY, J. V., BEAGLEY, K. W. & WIRA, C. R. 2004. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. *Immunology*, 112, 428-36.

- SCHLEE, M., HARDER, J., KOTEN, B., STANGE, E. F., WEHKAMP, J. & FELLERMANN, K. 2008. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clin Exp Immunol*, 151, 528-35.
- SCHULZ, O., JAENSSON, E., PERSSON, E. K., LIU, X., WORBS, T., AGACE, W. W. & PABST, O. 2009. Intestinal CD103+, but not CX3CR1+, antigen sampling cells migrate in lymph and serve classical dendritic cell functions. *J Exp Med*, 206, 3101-14.
- SCHULZKE, J. D., PLOEGER, S., AMASHEH, M., FROMM, A., ZEISSIG, S., TROEGER, H., RICHTER, J., BOJARSKI, C., SCHUMANN, M. & FROMM, M. 2009. Epithelial tight junctions in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci*, 1165, 294-300.
- SCHUTYSER, E., STRUYF, S. & VAN DAMME, J. 2003. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 14, 409-426.
- SHERMAN, P. M., OSSA, J. C. & JOHNSON-HENRY, K. 2009. Unraveling mechanisms of action of probiotics. *Nutr Clin Pract*, 24, 10-4.
- SHU, Q. & GILL, H. S. 2002. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 34, 59-64.
- SIERRA, S., LARA-VILLOSLADA, F., SEMPERE, L., OLIVARES, M., BOZA, J. & XAUS, J. 2010. Intestinal and immunological effects of daily oral administration of *Lactobacillus salivarius* CECT5713 to healthy adults. *Anaerobe*, 16, 195-200.
- SINKOROVA, Z., CAPKOVA, J., NIEDERLOVA, J., STEPANKOVA, R. & SINKORA, J. 2008. Commensal intestinal bacterial strains trigger ankylosing enthesopathy of the ankle in inbred B10.BR (H-2(k)) male mice. *Hum Immunol*, 69, 845-50.
- SJOGREN, Y. M., JENMALM, M. C., BOTTCHER, M. F., BJORKSTEN, B. & SVERREMARK-EKSTROM, E. 2009. Altered early infant gut microbiota in children developing allergy up to 5 years of age. *Clin Exp Allergy*, 39, 518-26.
- SNOECK, V., GODDEERIS, B. & COX, E. 2005. The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect*, 7, 997-1004.
- SOBEL, J., MIXTER, C. G., KOLHE, P., GUPTA, A., GUARNER, J., ZAKI, S., HOFFMAN, N. A., SONGER, J. G., FREMONT-SMITH, M., FISCHER, M., KILLGORE, G., BRITZ, P. H. & MACDONALD, C. 2005. Necrotizing enterocolitis associated with *clostridium perfringens* type A in previously healthy north american adults. *J Am Coll Surg*, 201, 48-56.
- SOUMELIS, V., RECHE, P. A., KANZLER, H., YUAN, W., EDWARD, G., HOMEY, B., GILLIET, M., HO, S., ANTONENKO, S., LAUERMA, A., SMITH, K., GORMAN, D., ZURAWSKI, S., ABRAMS, J., MENON, S., MCCLANAHAN, T., DE WAAL-MALEFYT RD, R., BAZAN, F., KASTELEIN, R. A. & LIU, Y. J. 2002. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat Immunol*, 3, 673-80.
- SPADONI, I., ILIEV, I. D., ROSSI, G. & RESCIGNO, M. 2012. Dendritic cells produce TSLP that limits the differentiation of Th17 cells, fosters Treg development, and protects against colitis. *Mucosal Immunol*, 5, 184-93.
- STEINMAN, R. M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol*, 9, 271-96.
- STEINMAN, R. M. & COHN, Z. A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med*, 137, 1142-62.

- STRAUCH, U. G., GRUNWALD, N., OBERMEIER, F., GURSTER, S. & RATH, H. C. 2010. Loss of CD103+ intestinal dendritic cells during colonic inflammation. *World J Gastroenterol*, 16, 21-9.
- STRAUS, D. S. & GLASS, C. K. 2007. Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms. *Trends Immunol*, 28, 551-8.
- STRAUSS-AYALI, D., CONRAD, S. M. & MOSSER, D. M. 2007. Monocyte subpopulations and their differentiation patterns during infection. *J Leukoc Biol*, 82, 244-52.
- SUN, C. M., HALL, J. A., BLANK, R. B., BOULADOUX, N., OUKKA, M., MORA, J. R. & BELKAID, Y. 2007. Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid. *J Exp Med*, 204, 1775-85.
- SZATMARI, I., PAP, A., RUHL, R., MA, J. X., ILLARIONOV, P. A., BESRA, G. S., RAJNAVOLGYI, E., DEZSO, B. & NAGY, L. 2006. PPARgamma controls CD1d expression by turning on retinoic acid synthesis in developing human dendritic cells. *J Exp Med*, 203, 2351-62.
- TADA, H., AIBA, S., SHIBATA, K., OHTEKI, T. & TAKADA, H. 2005. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun*, 73, 7967-76.
- TAKEDA, K. & AKIRA, S. 2004. TLR signaling pathways. *Semin Immunol*, 16, 3-9.
- TEJERO-SARINENA, S., BARLOW, J., COSTABILE, A., GIBSON, G. R. & ROWLAND, I. 2012. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens: evidence for the effects of organic acids. *Anaerobe*, 18, 530-8.
- THOMPSON, C. & POWRIE, F. 2004. Regulatory T cells. *Curr Opin Pharmacol*, 4, 408-14.
- TRIPATHI, P. & AGGARWAL, A. 2006. NF-kB transcription factor: a key player in the generation of immune response. *Current science*, 90, 519-31.
- TUETTENBERG, A., FONDEL, S., STEINBRINK, K., ENK, A. H. & JONULEIT, H. 2010. CD40 signalling induces IL-10-producing, tolerogenic dendritic cells. *Exp Dermatol*, 19, 44-53.
- UEMATSU, S., FUJIMOTO, K., JANG, M. H., YANG, B. G., JUNG, Y. J., NISHIYAMA, M., SATO, S., TSUJIMURA, T., YAMAMOTO, M., YOKOTA, Y., KIYONO, H., MIYASAKA, M., ISHII, K. J. & AKIRA, S. 2008. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol*, 9, 769-76.
- UGUCCIONI, M., GIONCHETTI, P., ROBBIANI, D. F., RIZZELLO, F., PERUZZO, S., CAMPIERI, M. & BAGGIOLINI, M. 1999. Increased expression of IP-10, IL-8, MCP-1, and MCP-3 in ulcerative colitis. *Am J Pathol*, 155, 331-6.
- VAMADEVAN, A. S., FUKATA, M., ARNOLD, E. T., THOMAS, L. S., HSU, D. & ABREU, M. T. 2010. Regulation of Toll-like receptor 4-associated MD-2 in intestinal epithelial cells: a comprehensive analysis. *Innate Immun*, 16, 93-103.
- VAN DER FLIER, L. G. & CLEVERS, H. 2009. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol*, 71, 241-60.
- VAROL, C., VALLON-EBERHARD, A., ELINAV, E., AYCHEK, T., SHAPIRA, Y., LUCHE, H., FEHLING, H. J., HARDT, W. D., SHAKHAR, G. & JUNG, S. 2009. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity*, 31, 502-12.

- VEREECKE, L., BEYAERT, R. & VAN LOO, G. 2011. Enterocyte death and intestinal barrier maintenance in homeostasis and disease. *Trends Mol Med*, 17, 584-93.
- VITSEVA, O. I., TANRIVERDI, K., TCHKONIA, T. T., KIRKLAND, J. L., MCDONNELL, M. E., APOVIAN, C. M., FREEDMAN, J. & GOKCE, N. 2008. Inducible Toll-like receptor and NF-kappaB regulatory pathway expression in human adipose tissue. *Obesity (Silver Spring)*, 16, 932-7.
- WALSH, K. P. & MILLS, K. H. 2013. Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation. *Trends Immunol*, 34, 521-30.
- WANG, S., VILLABLANCA, E. J., DE CALISTO, J., GOMES, D. C., NGUYEN, D. D., MIZOGUCHI, E., KAGAN, J. C., REINECKER, H. C., HACOEN, N., NAGLER, C., XAVIER, R. J., ROSSI-BERGMANN, B., CHEN, Y. B., BLOMHOFF, R., SNAPPER, S. B. & MORA, J. R. 2011a. MyD88-dependent TLR1/2 signals educate dendritic cells with gut-specific imprinting properties. *J Immunol*, 187, 141-50.
- WANG, Z., WANG, J., CHENG, Y., LIU, X. & HUANG, Y. 2011b. Secreted factors from *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* inhibit NF-kappaB-mediated interleukin-8 gene expression in Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol*, 77, 8171-4.
- WARD, P. D., TIPPIN, T. K. & THAKKER, D. R. 2000. Enhancing paracellular permeability by modulating epithelial tight junctions. *Pharm Sci Technol Today*, 3, 346-358.
- WEISS, G., CHRISTENSEN, H. R., ZEUTHEN, L. H., VOGENSEN, F. K., JAKOBSEN, M. & FROKIAER, H. 2011. Lactobacilli and bifidobacteria induce differential interferon-beta profiles in dendritic cells. *Cytokine*, 56, 520-30.
- WEISS, G., RASMUSSEN, S., ZEUTHEN, L. H., NIELSEN, B. N., JARMER, H., JESPERSEN, L. & FROKIAER, H. 2010. Lactobacillus acidophilus induces virus immune defence genes in murine dendritic cells by a Toll-like receptor-2-dependent mechanism. *Immunology*, 131, 268-81.
- WERNER, S. L., BARKEN, D. & HOFFMANN, A. 2005. Stimulus specificity of gene expression programs determined by temporal control of IKK activity. *Science*, 309, 1857-61.
- WIESEMANN, E., SONMEZ, D., HEIDENREICH, F. & WINDHAGEN, A. 2002. Interferon-beta increases the stimulatory capacity of monocyte-derived dendritic cells to induce IL-13, IL-5 and IL-10 in autologous T-cells. *J Neuroimmunol*, 123, 160-9.
- WILLIAMS, N. T. 2010. Probiotics. *Am J Health Syst Pharm*, 67, 449-58.
- YOSHIDA, M., CLAYPOOL, S. M., WAGNER, J. S., MIZOGUCHI, E., MIZOGUCHI, A., ROOPENIAN, D. C., LENCER, W. I. & BLUMBERG, R. S. 2004. Human neonatal Fc receptor mediates transport of IgG into luminal secretions for delivery of antigens to mucosal dendritic cells. *Immunity*, 20, 769-83.
- YOUNG, S. L., SIMON, M. A., BAIRD, M. A., TANNOCK, G. W., BIBILONI, R., SPENCELY, K., LANE, J. M., FITZHARRIS, P., CRANE, J., TOWN, I., ADDO-YOBO, E., MURRAY, C. S. & WOODCOCK, A. 2004. Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin Diagn Lab Immunol*, 11, 686-90.

Notas

