



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

“Modulación de la respuesta inflamatoria intestinal a través de la inclusión de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces boulardii* en la dieta iniciadora de lechones”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta:

Samantha Elizabeth Bautista Marín

Dirigido por:

Dra. Tércia Cesária Reis de Souza

Co-Director:

Dr. Gerardo Mariscal Landín

Dra. Tércia Cesária Reis de Souza
Presidente

Dr. Gerardo Mariscal Landín
Secretario

Dra. Araceli Aguilera Barreyro
Vocal

Dr. Christian Molina Aguilar
Suplente

Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro
Mayo, 2020
México

DEDICATORIA

A mis padres por su apoyo incondicional.

A mis hermanos y sus familias.

A Cami por ser y existir.

A Konisg por apoyarme cada instante en todo y con todo.

Dirección General de Bibliotecas UAQ

AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por su apoyo con el proyecto CB-2012-01000000000179898 y por brindar la beca durante los estudios del Doctorado.

A FOFI-UAQ 2013 por el apoyo financiero para la realización de este proyecto.

Al Doctorado en Ciencias Biológicas de la UAQ.

A los integrantes del cuerpo académico de “Morfofisiología y Nutrición Animal”.

A la Dra. Tércia Cesária Reis de Souza por asesorarme y ser mi madre académica.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, a la Facultad de Ciencias Naturales, en especial al Laboratorio de Nutrición Animal, por brindar todas las facilidades para la realización de este proyecto.

A Leticia Castillo por apoyar durante la técnica de Inmunofluorescencia y a Miriam Martínez por su apoyo en el trabajo de granja.

Al Dr. Mariscal e INIFAP por facilitar las instalaciones para poder llevar a cabo este experimento.

A la empresa Lallemand Animal Nutrition por donar el probiótico *Saccharomyces boulardii* empleado en el trabajo.

Al Dr. Christian Molina Aguilar por su gran apoyo durante la elaboración del trabajo y del artículo.

Al Dr. Mauricio Díaz y Dra. Olivia Martínez del laboratorio B-11 del Instituto de Neurobiología de la UNAM- Juriquilla por el apoyo para realizar la IHQ.

ÍNDICE GENERAL

CONTENIDO

Página

DEDICATORIA

I

AGRADECIMIENTOS

II

ÍNDICE GENERAL

III

ÍNDICE DE CUADROS

V

ÍNDICE DE FIGURAS

VI

RESUMEN

1

ABSTRACT

2

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

3

2. ANTECEDENTES

5

2.1. Desarrollo del tracto gastrointestinal (TGI)

5

2.2. Destete

7

2.3. Alternativas al uso de antibióticos en alimentos para el consumo animal.

9

2.3.1. Probióticos

9

2.3.2. Probióticos del género *Saccharomyces spp.*

12

2.4. Cascadas de señalización de la respuesta proinflamatoria intestinal

27

2.4.1. NF- κ B

27

2.4.2. IL-6

30

2.4.3. TNF- α

37

2.4.4. IL-12p40

40

2.5. Mecanismos de los probióticos del género

43

Saccharomyces spp. en la respuesta inmunitaria

3. HIPÓTESIS

63

4. OBJETIVOS

63

4.1. Objetivo general

63

4.2. Objetivos particulares

63

5. MATERIAL Y MÉTODOS	63
5.1. Experimentos	64
5.2. Eutanasia y muestreo	66
5.3. Análisis estadístico	68
6. RESULTADOS	68
6.1. Morfología intestinal	72
6.2. Concentración de los marcadores de inflamación	74
7. DISCUSIÓN	82
8. CONCLUSIONES	88
9. BIBLIOGRAFÍA	89

Dirección General de Bibliotecas UAQ

ÍNDICE DE CUADROS

CONTENIDO	Página
Cuadro 1. Características diferenciales entre <i>S. boulardii</i> y <i>S. cerevisiae</i>	13
Cuadro 2. Receptores de lectina tipo-C de <i>Saccharomyces spp.</i>	25
Cuadro 3. Ingredientes y composición química de la dieta basal, porcentaje en base alimenticia.	65
Cuadro 4. Efecto de las diferentes dietas experimentales sobre el comportamiento productivo.	69
Cuadro 5. Efecto de las dietas experimentales sobre la incidencia y severidad de la diarrea.	70
Cuadro 6. Efecto de la edad posdestete sobre la incidencia y severidad de la diarrea.	70
Cuadro 7. Efecto de las diferentes dietas experimentales sobre el comportamiento productivo.	71

ÍNDICE DE FIGURAS

CONTENIDO	Página
Figura 1. Efecto de la alimentación parenteral y enteral sobre el desarrollo del intestino delgado en lechones a término y pretérmino de 6 días de edad.	6
Figura 2. Desarrollo de los órganos digestivos de acuerdo con la edad.	7
Figura 3. Altura de las vellosidades intestinales de lechones no destetados, lechones destetados con dieta con alto nivel de leche materna, lechones con dieta comercial de destete y lechones destetados con dieta con bajo nivel de leche materna; al destete, 4 y 7 días posdestete.	8
Figura 4. Recuperación (%) de <i>S. boulardii</i> en los contenidos gastrointestinales a lo largo del tiempo.	14
Figura 5. Porcentaje de recuperación de <i>S. boulardii</i> pacientes tratados con ampicilina (AMP) o no.	15
Figura 6. Cambios en la actividad enzimática específica de las enzimas de borde de cepillo en función de la presencia o no de <i>S. boulardii</i> .	17
Figura 7. Concentraciones de poliaminas en preparaciones liofilizadas de <i>S. boulardii</i> .	18
Figura 8. Cascada de señalización de NF- κ B, vía canónica y alternativa.	29
Figura 9. Vía de señalización de la IL-6.	31
Figura 10. Vía de señalización IL-6 utilizando MAP quinasas.	33
Figura 11. Vía de señalización del TNF- α .	40
Figura 12. Vía de señalización de IL-12p40.	42
Figura 13. Concentración del componente secretorio (CS) en células de las vellosidades (vellosidades) y en células de las criptas (criptas) en ratas tratadas con <i>S. boulardii</i> .	44

Figura 14. Modelo esquemático de una inmunoglobulina A en su forma monomérica y dimerizada con su cadena J y el componente secretor.	45
Figura 15. Niveles de slgA total (a) y anti- <i>Saccharomyces</i> (b) en el contenido del intestino delgado de ratones libres de gérmenes (GF) y libres de gérmenes solamente inoculados con <i>Saccharomyces</i> (GF-mono-asociado).	46
Figura 16. Análisis del desaparecimiento de procaspasa 9 (a) y procaspasa 8 (b) durante el curso de una infección por EHEC sola o con la pre-incubación con <i>S. boulardii</i> .	47
Figura 17. Cinética de la transcripción de TNF α .	48
Figura 18. Inhibición de la secreción de IL-8 por el sobrenadante de <i>S. boulardii</i> en células HT-29 (a) y células AGS (b).	50
Figura 19. Inhibición de la degradación de I κ B α por parte del sobrenadante de <i>S. boulardii</i> .	51
Figura 20. Efecto de <i>S. cerevisiae</i> sobre la expresión de TNF- α en células IPI-21.	52
Figura 21. Efecto de la viabilidad de <i>S. cerevisiae</i> en la expresión de ARN mensajero de diferentes citocinas en células IPI-21 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> muerto: ScM; <i>E. coli</i> enterotóxica: ETEC).	53
Figura 22. Efecto benéfico del <i>Saccharomyces spp.</i> a nivel intestinal.	56
Figura 23. Efecto del sobrenadante de <i>S. boulardii</i> sobre la producción de IL-8 (pg/ml) debida a la estimulación de células NCM460 con IL1- β (a) o Toxina A de <i>C. difficile</i> (b).	57
Figura 24. Inhibición de la transcripción de Erk 1/2 en colonocitos NCM460 por parte de la combinación de la toxina A de <i>C. difficile</i> y el sobrenadante de <i>S. boulardii</i> .	58
Figura 25. <i>S. cerevisiae</i> disminuye la fosforilación de la MAP quinasa (ERK1/2) en células diferenciadas IPEC-1.	59
Figura 26. Peso al día 0, 7 y 14 posdestete (W0, W7, W14) y ganancia diaria de peso (GDP) a los 0-7 y 7-14 días posdestete en cerdos alimentados con diferentes dietas experimentales.	72

Figura 27. Altura de las vellosidades del íleon de lechones destetados alimentados con las diferentes dietas experimentales a los 7 y 14 días posdestete (DPD) mediante la tinción de hematoxilina y eosina.	74
Figura 28. Concentración de NF- κ B en íleon de cerdos destetados alimentados con diferentes dietas experimentales a los 7 y 14 días posdestete (DPD).	76
Figura 29. Concentración de IL-6 en íleon de cerdos destetados alimentados con diferentes dietas experimentales a los 7 y 14 días posdestete (DPD).	78
Figura 30. Concentración de TNF- α en íleon de cerdos destetados alimentados con diferentes dietas experimentales a los 7 y 14 días posdestete (DPD).	80
Figura 31. Concentración de IL-12p40 en íleon de cerdos destetados alimentados con diferentes dietas experimentales a los 7 y 14 días posdestete (DPD).	81

RESUMEN

Durante el destete, los lechones presentan disturbios gastrointestinales debido al cambio de alimento, siendo controlados con el uso de antibióticos. Actualmente está prohibido el uso de antibióticos debido a la resistencia bacteriana, por lo que se han buscado alternativas que mejoren la salud intestinal de los lechones durante esta etapa. Las levaduras probióticas han sido consideradas como una opción para estabilizar el ambiente intestinal mediante la modulación de la inflamación, favoreciendo y restaurando el balance intestinal. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de usar suplementos de *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces boulardii* sobre el desempeño productivo, las diarreas posdestete, la modulación de: Factor nuclear- κ B (NF- κ B), interleucina-6 (IL-6), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-12 subunidad p40 (IL-12p40) y la altura de las vellosidades en el íleon de lechones. Se realizaron 2 experimentos, uno con 80 lechones y otro con 40 lechones. Fueron asignados a cuatro grupos experimentales: dieta con antibiótico (C+); dieta con *S. cerevisiae* (Sc); dieta con *S. boulardii* (Sb) y dieta sin antibiótico y sin probióticos (C-) (n= 5 lechones/dieta/corral. Experimento 1 con 4 corrales/dieta y Experimento 2 con 2 corrales/dieta). A los 7 y 14 días posdestete se sacrificaron 5 lechones por grupo para evaluar los marcadores de inflamación y la altura de las vellosidades. No hubo diferencias estadísticas en el desempeño productivo. El grupo C+ presentó la menor severidad de diarreas. Asimismo, tuvo las concentraciones más bajas de los marcadores de inflamación, siendo similar el grupo Sb, mientras que la altura de las vellosidades en ambos grupos fueron las mayores. El grupo Sc presentó valores intermedios en ambas mediciones. El grupo C- registró los valores más elevados de los marcadores de inflamación y las vellosidades más atrofiadas. Se puede concluir que ambas levaduras pueden ser empleadas como alternativa al uso de antibióticos. Sin embargo, *S. boulardii* presentó mejores resultados que *S. cerevisiae* tanto en los marcadores de inflamación como en la morfología de las vellosidades, preservando la mucosa intestinal y pudiendo ser suplementada en dietas iniciadoras libres de antibiótico para lechones.

Palabras clave: lechones, destete, levaduras probióticas, interleucinas, inflamación intestinal

ABSTRACT

During weaning, piglets have gastrointestinal disturbances due to feed changes, which have been controlled with the use of antibiotics. This is currently prohibited due to bacterial resistance, so alternatives have been sought that help to improve the intestinal health of piglets during this stage. The use of probiotic yeasts has been considered as an option to stabilize the intestinal environment by modulating inflammation, favoring and restoring the intestinal balance. The aim of the present work was to evaluate the effect of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii* on performance, post-weaning diarrhea, the modulation of: Nuclear Factor- κ B (NF- κ B), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-12 subunit p40 (IL-12p40); and the villi height in the ileum of pigs. Two experiments were performed with 80 and 40 piglets, respectively. They were assigned to four experimental groups: antibiotic diet (C+); diet with *S. cerevisiae* (Sc); diet with *S. boulardii* (Sb) and diet without antibiotic and without probiotics (C-) (n = 5 piglets / diet / pen. Experiment 1 with 4 pens / diet and Experiment 2 with 2 pens / diet). At 7 and 14 post-weaning days, 5 piglets per group were slaughtered to assess the markers of inflammation and the villi height. There were no statistical differences in productive performance. The C+ group had the lowest severity of diarrhea. It also had the lowest concentrations of the inflammation markers, the Sb group being similar, but not as low, while the villi height in both groups was the highest. The Sc group presented intermediate values in both measurements. Group C- recorded the highest values of the inflammation markers and the most stunted villi. It can be concluded that both yeasts can be used as an alternative to the use of antibiotics. However, *S. boulardii* presented better results than *S. cerevisiae* both in the measured markers of inflammation and in the morphology of the villi, preserving the intestinal mucosa and being able to be supplemented in antibiotic-free starter diets for piglets.

Keywords: weaning, piglets, yeasts, interleukins, intestinal inflammation

1. Introducción

Durante el destete, los lechones sufren cambios importantes en su medio ambiente, estatus social y principalmente en su alimentación. Ésta última basada en la leche materna, la cual es un alimento líquido totalmente digestible compuesto por proteínas de origen animal, y pasan a un alimento sólido de origen vegetal menos digestible, provocando severos disturbios gastrointestinales que se ven reflejados en procesos inflamatorios y en un bajo desempeño productivo (Lallès *et al.*, 2007) haciendo de esta etapa, la más crítica durante su vida productiva.

El destete en los lechones está asociado con una respuesta temprana y transitoria en la expresión de genes de citocinas inflamatorias a nivel intestinal (Pié *et al.*, 2004). La síntesis y liberación de citocinas es estimulada ya sea por microorganismos patógenos como bacterias, virus, parásitos y hongos, o por numerosos estimulantes no infecciosos tales como la anorexia transitoria, alérgenos e incluso otras citocinas proinflamatorias, incluyendo a la interleucina-1 (IL-1), IL-6 y TNF- α , que inducen la producción de proteínas de respuesta de fase aguda (McCracken *et al.*, 1999; Naugler y Karin, 2008). Los antígenos bacterianos que se encuentran en la luz intestinal generan una respuesta inflamatoria aguda a través de la acción de citocinas proinflamatorias que activan las cascadas de señalización, liberando al NF- κ B, el cual se transloca al núcleo y funciona como el factor de transcripción para la síntesis de IL-6 y TNF- α (Lawrence, 2009; Fernández-Jiménez *et al.*, 2014). El TNF- α actúa como un mediador en la inflamación aguda, el cual incrementa la producción de IL-1 e IL-6 (Sánchez-Muñoz *et al.*, 2008). Por otro lado, la inflamación crónica es mediada por IL-12p40, la cual es activada a través del complejo JAK/STAT que es dimerizado y fosforilado, permitiendo su translocación al núcleo donde IL-12p40 se transcribe (Trinchieri *et al.*, 2003; Abdi *et al.*, 2014; Zundler y Neurath, 2015).

El control de la inflamación intestinal es un desafío en el manejo de los desordenes intestinales de los lechones al destete (Pié *et al.*, 2004). Tradicionalmente estas

alteraciones se han controlado con la administración de antibióticos, pero actualmente muchos países han prohibido su uso debido a que la resistencia bacteriana ha ido en aumento, por lo que los especialistas en nutrición animal han enfocado sus esfuerzos en buscar alternativas que hagan frente a dicha prohibición (Stein y Kil, 2006; Opapeju *et al.*, 2009).

Una alternativa es el uso de levaduras probióticas del género *Saccharomyces spp*, las cuales han sido consideradas como una opción para estabilizar el ambiente intestinal mediante la modulación de la inflamación, puesto que interrumpen las cascadas de señalización involucradas en la respuesta inflamatoria (Bontempo *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2018), favoreciendo y restaurando el balance intestinal, y mejorando la salud de los lechones. Diversos estudios han evaluado los efectos de dos levaduras probióticas mostrando resultados interesantes, tal es el caso de *Saccharomyces cerevisiae*, con la cual varios autores han investigado su efecto sobre la inflamación intestinal de los cerdos desafiados con patógenos (Martins *et al.*, 2011; Trevisi *et al.*, 2015). Por otro lado, el uso de *Saccharomyces boulardii* ha arrojado resultados prometedores, pero la mayoría de los estudios han sido realizados en humanos y roedores (Dalmasso *et al.*, 2006; Sougioultzis *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2010), por lo que es importante conocer más a fondo su mecanismo de acción sobre la inflamación intestinal en lechones.

El objetivo del presente trabajo fue determinar si las levaduras disponibles en la industria de alimentación animal pueden ser empleadas como alternativas al uso de antibióticos en dietas iniciadoras para lechones, evaluando su efecto en íleon sobre la modulación de los marcadores de la inflamación (NF- κ B, IL-6, TNF- α e IL-12p40), así como sobre la morfología de las vellosidades intestinales. También se determinó si *S. boulardii* produce efectos similares a *S. cerevisiae* sobre las variables medidas.

2. Antecedentes

2.1. Desarrollo del tracto gastrointestinal (TGI)

El desarrollo del tracto gastrointestinal es un proceso muy organizado desde el punto de vista temporal y espacial, dando como resultado células especializadas en absorción de nutrientes y secreción de sustancias con funciones endócrinas e inmunológicas. Este proceso se divide en 5 fases: 1) morfogénesis, 2) citodiferenciación y preparación del epitelio fetal para absorción de calostro y leche, 3) nacimiento y periodo posparto, 4) periodo de lactancia y, 5) destete y crecimiento; periodos en los cuales se dan modificaciones en las funciones digestivas y de transporte, para que al final el TGI obtenga características de un órgano adulto (Vásquez y Vega, 2012).

Los procesos de morfogénesis y diferenciación intestinal son similares en las diferentes especies de mamíferos, variando solamente en el ritmo y tiempo. El TGI de los cerdos se desarrolla muy poco durante la vida fetal, pero se acelera después del nacimiento aumentando su longitud, diámetro y peso en los primeros días de vida, siendo los órganos del TGI los que crecen más rápido que cualquier otro órgano del cuerpo, maximizándose el crecimiento una vez que se lleva a cabo el destete (Reis de Souza *et al.*, 2012).

El desarrollo gastrointestinal está determinado por el tipo de alimentación y el crecimiento es estimulado por la presencia de alimento en el intestino. En un estudio publicado por Sangild *et al.* (2002) administraron alimentación parenteral y enteral a lechones a término (115 días de gestación) y pretérmino (107 días de gestación), y observaron diferencias significativas en el peso relativo del intestino delgado (g/kg de peso vivo) en lechones de 6 días de edad (Figura 1).

Al momento del destete el cambio de alimentación hace que el TGI pase por un proceso de adaptación, lo cual genera cambios morfológicos y funcionales que generan un retroceso en el desarrollo de los órganos digestivos (Sangild *et al.*, 2002)

(Figura 2). Dicho retroceso, puede causar trastornos en el consumo de alimento y alteraciones en el proceso digestivo, viéndose reflejado con el desarrollo del síndrome diarreico posdestete. Posteriormente, el desarrollo del aparato digestivo está íntimamente ligado con el consumo de alimento sólido. Los animales que consumen una mayor cantidad de alimento, y por ende más energía, tienen un mayor crecimiento del estómago, páncreas, intestino delgado e hígado (Reis de Souza *et al.*, 2012).

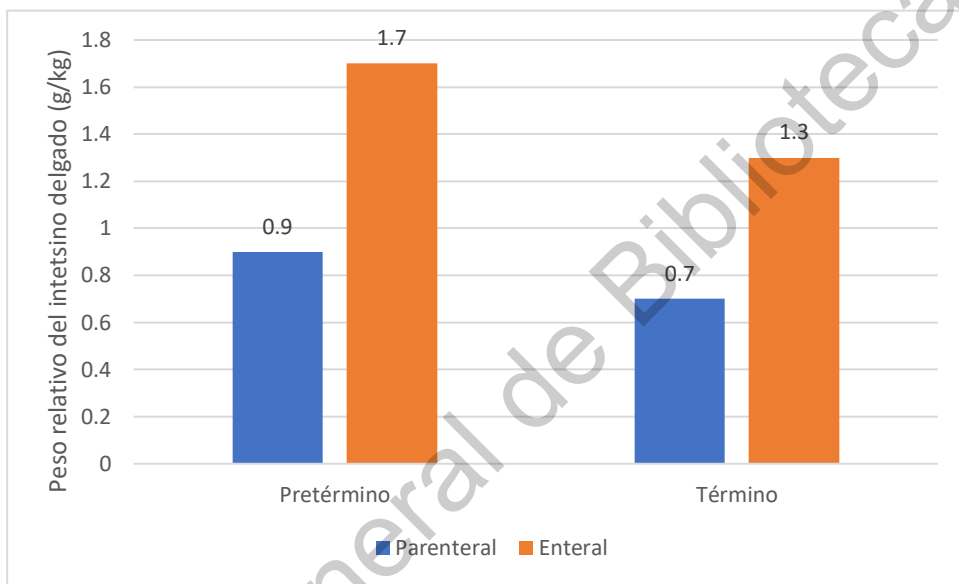


Figura 1. Efecto de la alimentación parenteral y enteral sobre el desarrollo del intestino delgado en lechones a término y pretérmino de 6 días de edad (adaptado Sangild *et al.*, 2002).

El efecto de los probióticos sobre el desarrollo del tracto gastrointestinal no está muy bien documentado. Sin embargo, Reis de Souza *et al.* (2012) mencionan que el efecto positivo del uso de estos parece estar relacionado con la modificación del medio ambiente gastrointestinal a través de cambios en la microbiota.

2.2. Destete

Durante el destete los lechones sufren la separación de la madre y de la camada, cambio del medio ambiente (instalaciones) y de alimentación (Reis de Souza *et al.*, 2010), lo cual genera un estrés que altera su desarrollo gastrointestinal y por ende su capacidad productiva. Todo esto sumado al poco desarrollo y cambios que presenta el tracto gastrointestinal a nivel fisiológico, microbiológico e inmunológico; hace que este periodo sea el más crítico en la vida del cerdo, en el que se presenta una fase de anorexia y subnutrición (Cranwell, 1995; Lallès *et al.*, 2007).

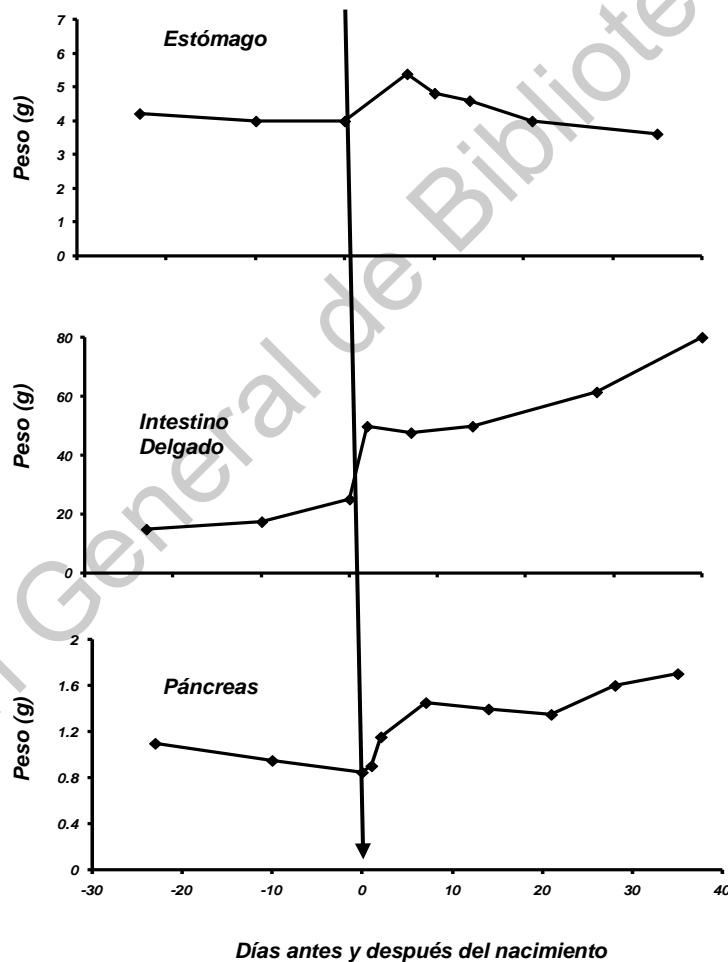


Figura 2. Desarrollo de los órganos digestivos de acuerdo con la edad (adaptado de Sangild *et al.*, 2002).

Debido a estos cambios, el periodo inmediato al destete se caracteriza por una atrofia de vellosidades e hipertrofia de criptas, como lo mencionan van Beers-Schreurs *et al.* (1998), quienes realizaron un experimento con cuatro grupos de animales administrando diferentes dietas, en donde los animales que consumieron un mayor nivel de energía derivada de la leche materna, presentaron las vellosidades más altas; mientras que aquellos lechones que consumieron una dieta comercial de destete y un menor nivel de energía proveniente de la leche, presentaron las vellosidades más bajas entre los días 0 y 7 posdestete (Figura 3).

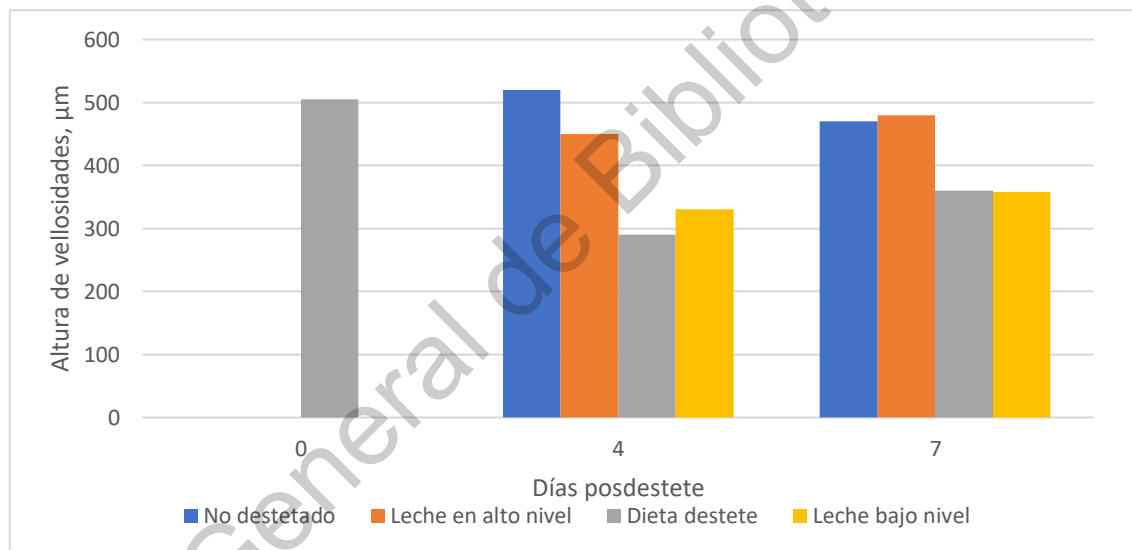


Figura 3. Altura de las vellosidades intestinales de lechones no destetados, lechones destetados con dieta con alto nivel de leche materna, lechones con dieta comercial de destete y lechones destetados con dieta con bajo nivel de leche materna; al destete, 4 y 7 días posdestete (adaptado de Van Beers-Schreurs *et al.*, 1998).

Como consecuencia se desarrolla una baja capacidad digestiva en los lechones recién destetados que se caracteriza por una disminución en la capacidad de digestión y absorción lo que hace que queden remanentes de alimento sin digerir o

parcialmente digerido en la luz intestinal. El alimento parcialmente digerido en intestino es colonizado por bacterias permitiendo su proliferación, lo cual incrementa la producción de toxinas bacterianas que desencadenarán lo que se denomina “Síndrome diarreico posdestete” (Dirkzwager *et al.*, 2005).

Un pobre rendimiento asociado al destete en lechones es el resultado de este estrés multifactorial (Heo *et al.*, 2012; Windey *et al.*, 2012).

Esta problemática se ha venido solucionando con la inclusión de antibióticos en la dieta para controlar las diarreas posdestete, a través del control sobre la composición de la microbiota intestinal, permitiendo una mayor “eficiencia” intestinal, optimizando el crecimiento de los animales y una protección contra microorganismos patógenos que provocan diarreas (Heo *et al.*, 2012).

Por lo anterior se han realizado varias investigaciones con la finalidad de encontrar alternativas al uso de antibióticos en alimentos para el consumo animal.

2.3. Alternativas al uso de antibióticos en alimentos para el consumo animal.

Para mantener una industria porcícola rentable, se han estudiado alternativas que reemplacen el uso de antibióticos que son efectivos en la reducción de la presencia y severidad de los problemas digestivos asociados con el periodo inmediato al destete, tales como la suplementación con ácidos orgánicos, prebióticos y probióticos, minerales traza, así como diversos niveles y fuentes de proteína (Heo *et al.*, 2012).

2.3.1. Probióticos

Los probióticos son “organismos vivos, los cuales, al ser administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del huésped” (FAO/OMS). Dentro de los microorganismos que han sido autorizados para su empleo en la alimentación animal hay diferentes grupos de bacterias probióticas (*Bacillus cereus*,

Bacillus subtilis, *Bacillus licheniformis*, *Lactobacillus facíminis*, *Enterococcus faecium*, *Pediococcus acidilactici*). En cuanto a las levaduras probióticas del género *Sacharomyces spp.*, las especies más comunes son *S. cerevisiae* y *S. boulardii* (Chaucheyras-Durand y Durand, 2008).

El tracto digestivo de los animales es estéril al nacimiento, el contacto con su madre y con el ambiente permite que se establezca una variada microflora. Los organismos benéficos producen enzimas que complementan la habilidad digestiva del hospedero y su presencia provee una barrera contra patógenos invasores. En esta situación, es preferible la alimentación con bacterias deseables que están presentes en los productos probióticos, ya que, al usar antibióticos, se destruyen tanto bacterias perjudiciales como bacterias benéficas (Walker, 2008; Stein y Kil, 2006).

Se ha sugerido que los probióticos ejercen sus efectos en los siguientes aspectos: adhesión a la pared del tracto digestivo para prevenir la colonización por microorganismos patógenos, neutralización de enterotoxinas producidas por bacterias patógenas, las cuales causan pérdida de fluidos, tienen actividad bactericida y mejoran la inmunidad (Quintero y Huerta, 1996; Choudhari *et al.*, 2008).

Un buen probiótico debe cumplir con las siguientes características según Figueroa *et al.* (2006) y Choudhari *et al.* (2008):

- El cultivo debe ejercer un efecto positivo en el hospedero, debe ser ácido resistente y resistente a la bilis.
- Debe poseer un alto rango de supervivencia y multiplicarse rápidamente en el tracto digestivo.
- Debe ser una cepa específica.
- No debe ser patógeno ni tóxico para el hospedero.
- La capacidad de adhesión de los microorganismos probióticos a las superficies epiteliales debe ser firme y rápida.

- Debe ser lo suficientemente resistente para soportar fabricación comercial, procesamiento y distribución de manera que se pueda entregar viva al intestino.
- Debe tener la capacidad de reducir el número de microorganismos patógenos en intestino.

Se ha observado que la administración vía oral de probióticos tienen un efecto sobre el sistema inmunológico del intestino, lo que aumenta las posibilidades para mayor competencia por receptores y por sitios de adhesión de la mucosa intestinal, mayor inhibición del crecimiento de algunas especies de enteropatógenos, aumento de la competencia por nutrientes con bacterias patógenas, mayor prevención de transposición bacteriana, y aumento de la secreción de mucina protectora del intestino (Figuroa *et al.*, 2006).

Los microorganismos intestinales tienen una función importante en el efecto de protección de la mucosa intestinal frente a infecciones. Los mecanismos de acción mencionados estimulan el efecto de protección que previene la invasión de patógenos. La respuesta inmune del huésped comprende dos componentes: uno de ellos es la defensa no específica innata o natural que se activa desde el primer encuentro con el patógeno, y el otro es la defensa específica o adaptativa que se activa únicamente contra el patógeno que estimula la respuesta y cuyo desarrollo requiere algunos días de maduración (Figuroa *et al.*, 2006).

Es importante enfatizar que los probióticos no podrán competir con los productos antimicrobianos como agentes terapéuticos, pero pueden reducir la presencia y la severidad de los trastornos intestinales, entre ellos, los que frecuentemente son causados por el uso inadecuado de antibióticos. La actividad probiótica se puede ver favorecida si estos compuestos son incorporados de manera rutinaria en la dieta normal de lechones, favoreciendo el desarrollo morfofisiológico y mejorando la salud intestinal (Quintero y Huerta, 1996).

2.3.2. Probióticos del género *Saccharomyces spp.*

La microbiota intestinal ha sido propuesta como el mayor regulador de la respuesta inmune. Se han hecho muchos intentos para poder mejorar la salud de los individuos, modulando la flora indígena intestinal usando microorganismos vivos adjuntos, como las levaduras del género *Saccharomyces spp* (Czerucka *et al.*, 2007).

Saccharomyces spp posee muchas propiedades que lo hacen un potencial agente probiótico, sin embargo, pertenece al grupo de células eucariotas lo cual difiere de los demás probióticos, ya que son bacterias, las cuales son procariotas. Entre sus características se encuentran: que tienen diferentes estructuras fisiológicas, las levaduras son más grandes, no adquiere resistencia a antibióticos ni son afectados por estos. Es importante mencionar que el desarrollo de resistencia a los antimicrobianos por parte de las bacterias patógenas, asociada a los tratamientos con antibióticos, ha llevado a un importante problema de salud pública. (Czerucka *et al.*, 2007; McFarland, 2010).

La estabilidad de *Saccharomyces* es importante, ya que puede afectar su eficiencia a través del tiempo, por lo tanto, las preparaciones liofilizadas son mejores, pues son más estables a temperatura ambiente y mantienen su alta viabilidad por periodos prolongados. Al contrario de las preparaciones secadas al calor que deben mantenerse en refrigeración y no son estables a temperatura ambiente. Las mezclas de probióticos no son sugeridas, pues pueden existir posibles antagonismos que pueden atenuar las respuestas terapéuticas de las diferentes cepas. Por último, la dosis empleada puede afectar el efecto del probiótico, las diferentes dosis empleadas pueden llegar a generar discrepancias en la eficacia reportada en diferentes estudios (Fietto *et al.*, 2004; McFarland, 2010; Kelesidis y Pothoulakis, 2012).

Las características que poseen las diferentes cepas de *Saccharomyces* y que son necesarias para su sobrevivencia dentro del intestino se aprecian en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Características diferenciales entre *S. boulardii* y *S. cerevisiae* (Adaptado de Lukaszewicz, 2012 y Hudson *et al.*, 2016)

Características	<i>S. boulardii</i>	<i>S. cerevisiae</i>
T° óptima de crecimiento	~37°C	~30°C
Pared celular (β -glucanos)	Gruesa	Delgada
Resistencia a cambios de pH	+	-
Viabilidad después de 15 min en pH ácido	75%	30%
Capacidad de crecimiento	Rápido	Lento
Capacidad de competencia con otros microorganismos intestinales	Alta	Media
Diferencias genéticas	Alelo microsatélite	-
Diferencias genéticas	Trisomía en el cromosoma IX	-

Un estudio realizado por Elmer *et al.* (1999), indica que *S. boulardii*, cuando es administrada oralmente, su paso por el estómago y el intestino delgado es de aproximadamente 3 horas, observando que en íleon y ciego hay pérdidas en la viabilidad de *Saccharomyces* en presencia de un ambiente enriquecido por microflora anaerobia (Figura 4).

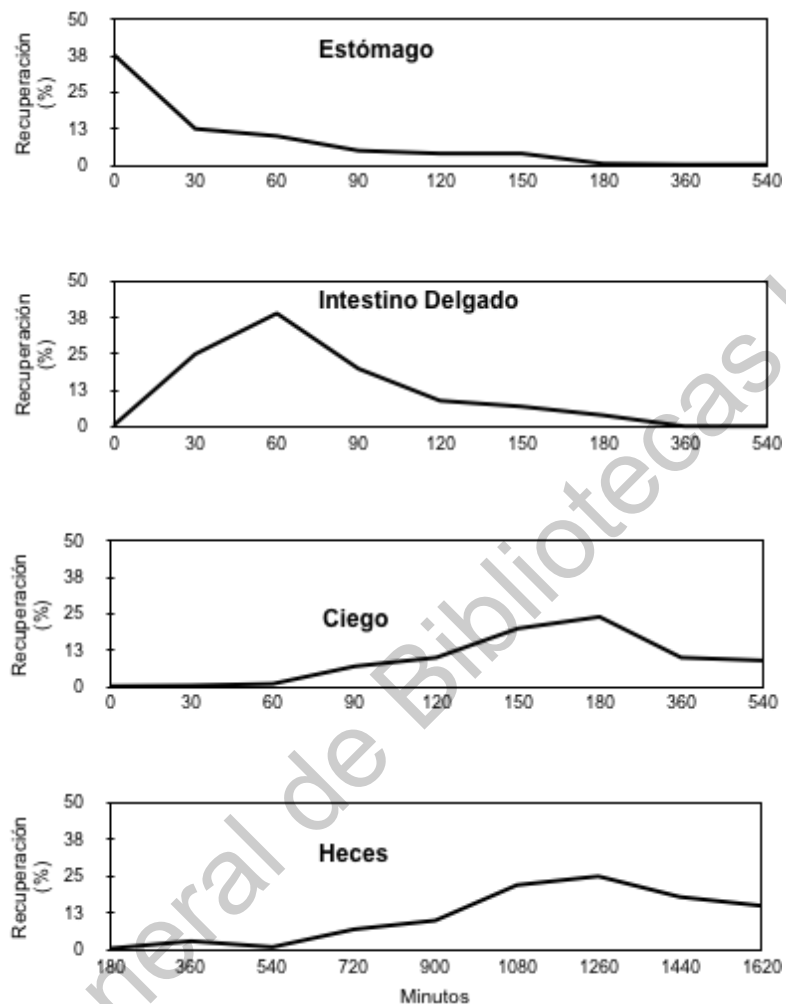


Figura 4. Recuperación (%) de *S. boulardii* en los contenidos gastrointestinales a lo largo del tiempo. Adaptada de Elmer *et al.*, 1999.

Klein *et al.* (1993) indican que cuando la levadura es administrada de manera oral, y sin presencia de antibióticos, <5% es recuperada en las heces de manera viable, mientras que cuando se incluyen antibióticos a la dieta, como la ampicilina (antibiótico de amplio espectro), y al ser administrada junto con la levadura, afectan la microflora bacteriana incrementado los niveles de la levadura pues ésta es resistente a los antibióticos, además de que se ha sugerido que el tracto gastrointestinal posee microorganismos que pueden metabolizar o destruir la

levadura. Por otro lado, *S. boulardii* no coloniza el tracto gastrointestinal y desocupa rápidamente el tracto intestinal cuando se deja de administrar (Figura 5).

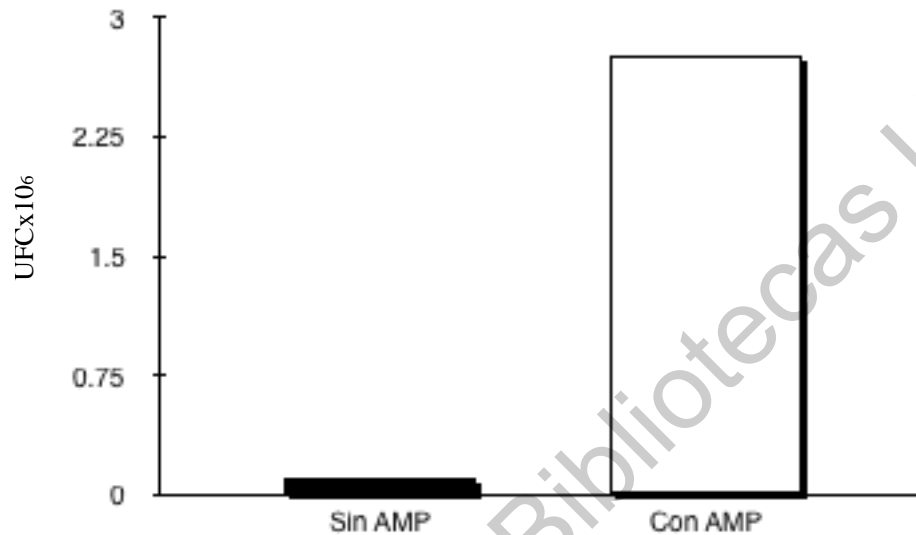


Figura 5. Porcentaje de recuperación de *S. boulardii* pacientes tratados con ampicilina (AMP) o no. Adaptado de Klein *et al.*, 1993.

En la actualidad se han llevado a cabo muchos estudios que involucran esta levadura con el fin de conocer a fondo sus mecanismos de acción, principalmente para conocer el beneficio de usarlo en humanos, como terapéutico contra las diarreas causadas por bacterias y otros trastornos gastrointestinales causados por la administración de agentes antimicrobianos. Sin embargo, su uso en animales no ha tenido los resultados esperados, por lo que hace falta más investigación al respecto (Zanello *et al.*, 2009, McFarland, 2010).

S. boulardii genera efectos tróficos sobre la mucosa, que restauran y mantienen la homeostasis intestinal. A menudo las enfermedades gastrointestinales tanto agudas como crónicas inducen diarrea; la microflora y mucosa intestinal están en desequilibrio, resultando en una digestión y una absorción deficiente por una baja actividad enzimática y una pobre expresión de transportadores de membrana en las

células intestinales, así como en un incremento de la inflamación y pérdida de agua (Czerucka *et al.* 2007; Zanello *et al.*, 2009; Mcfarland, 2010).

Dos estudios realizados por Buts *et al.* (1986 y 1999) en humanos y en ratas, mostraron un incremento significativo en la actividad total de la sucrasa-isomaltasa (+82%), lactasa (+77%) y maltasa-glucoamilasa (+75%) después del tratamiento oral con *S. boulardii* (Figura 6), al término del tratamiento, la levadura mejoró la actividad de las disacaridasas, mejorando la absorción de la D-glucosa acoplada a sodio por el simporte glucosa/sodio, a través de la expresión del co-transportador sodio-glucosa-1 (SLGT-1) en el borde de cepillo de los segmentos intestinales remanentes, el cual está implicado en la reabsorción de agua y electrolitos.

Buts *et al.* (1994) sugirieron que *S. boulardii* contiene una cantidad importante de poliaminas y éstas tienen un efecto fisiológico sobre la maduración celular, la expresión enzimática y los mecanismos de transporte de membrana, por lo tanto, estas poliaminas tienen un efecto trófico. En su experimento con ratas, cuando éstas fueron tratadas con *S. boulardii*, presentó un contenido de poliaminas de 6.79 nmol/mg de poliaminas, de las cuales el 55.4% fue espermidina y el 43.6% fue espermina, presentando una baja proporción de putrescina (1.4%), lo cual promovió el incremento en las actividades de la sucrasa y maltasa.

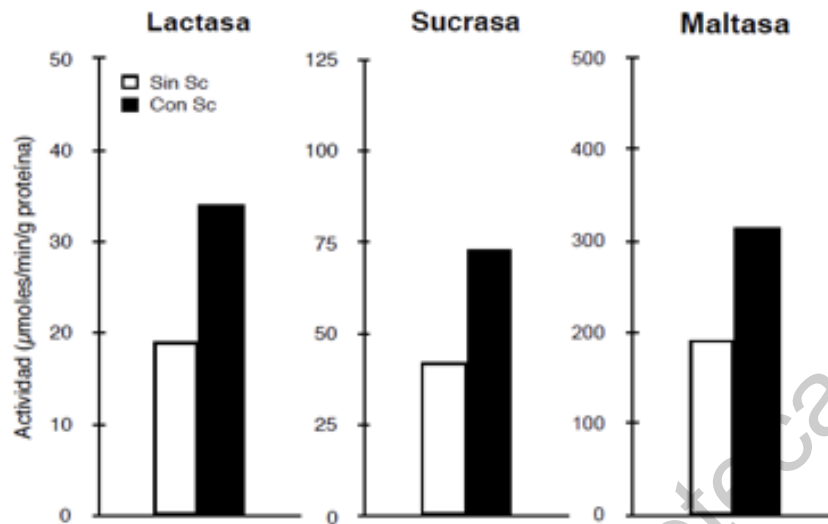


Figura 6. Cambios en la actividad enzimática específica de las enzimas de borde de cepillo en función de la presencia o no de *S. boulardii*. Adaptado de Buts *et al.*, 1986.

Estos investigadores llegaron a una conclusión provista de 2 observaciones: 1) menos del 3% de la dosis oral de levadura es recuperada en las heces en forma viable, indicando que el progresivo catabolismo endoluminal ocurre durante el tránsito intestinal y 2) las poliaminas derivadas de la microflora pueden modular el grosor de la mucosa, causando incluso una obstrucción intestinal por una hipertrofia excesiva del intestino. Es por esto que la dosis administrada de la levadura debe realizarse con precaución para que pueda ejercer los efectos tróficos esperados para una renovación celular epitelial y por ende, la salud intestinal (Figura 7).

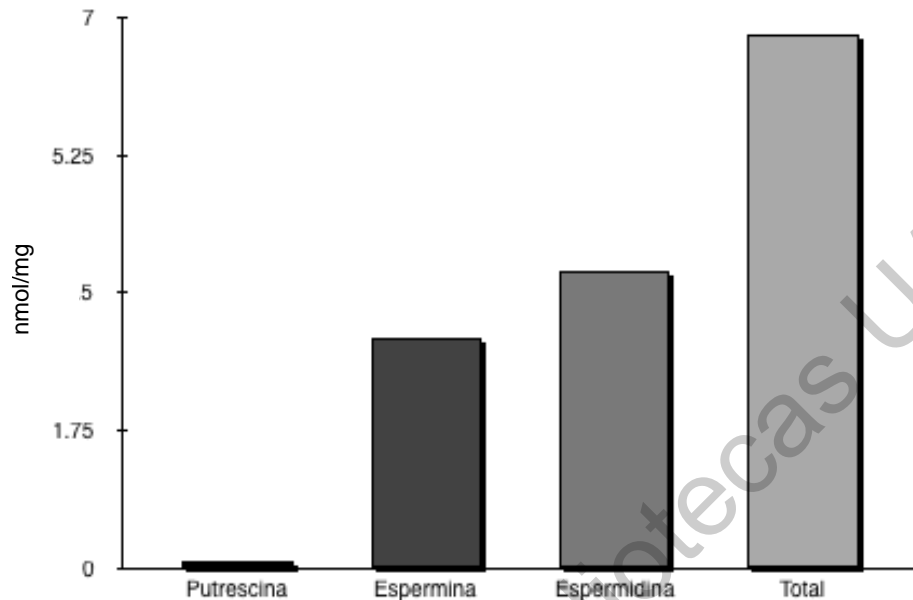


Figura 7. Concentraciones de poliaminas en preparaciones liofilizadas de *S. boulardii*. Adaptado de Buts *et al.*, 1994.

La acción de *S. boulardii* está basada en múltiples mecanismos, incluyendo efectos inmunológicos, adhesión a patógenos y efectos antitoxinas, así como efectos sobre enzimas digestivas. Muchos estudios han demostrado que, durante la disbiosis, la cual es definida como el desequilibrio en las funciones fisiológicas gastrointestinales que altera el medio ambiente intestinal, ambas levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de restablecer rápidamente un microbioma saludable. El efecto más relevante sobre la composición fecal incluye un incremento en la cantidad de ácidos grasos volátiles de cadena corta producidos por el metabolismo bacteriano, dándose a través de una estabilización de la microbiota benéfica en el intestino, evitando la proliferación de microorganismos patógenos (Moré y Swidsinski, 2015).

Moré y Swidsinski (2015) enfatizan sobre los efectos específicos de *S. boulardii* sobre la mucosa y microbiota intestinales; indicando que la microbiota fecal saludable puede ser dividida en 2 grupos bacterianos: habitual y esencial, las cuales

generalmente están presentes en pacientes sanos, mientras que hay otras bacterias ocasionales que se presentan en menores proporciones. Dependiendo de cada individuo la cantidad de estas bacterias variará. Durante la disbiosis todo esto cambia y como consecuencia el espesor y la consistencia del moco. Algunas bacterias patógenas se alimentan de los oligosacáridos presentes en la mucina, siendo capaces de reducir la integridad de la mucosa, aumentando la porosidad y maceración, de esta manera entran numerosas bacterias, alcanzando las células epiteliales, generando así una infección multimicrobiana, provocando una ruptura de la barrera mucosa, dejando una inflamación que se presenta en enfermedades como colitis ulcerativa. Es así, que la presencia de levaduras genera una notoria recuperación, pues se disminuye el grosor de la mucosa.

Diversos estudios realizados con modelos animales han indicado que *Saccharomyces spp.* puede ejercer un efecto benéfico contra varios patógenos entéricos tal como: *C. difficile*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli* (Czerucka *et al.*, 2007; Zanello *et al.*, 2009).

El *C. difficile* es una bacteria Gram+, anaerobia estricta que frecuentemente causa diarrea asociada a antibióticos y está implicada en el 95% de los casos diagnosticados de colitis pseudomembranosa. Las cepas patogénicas de *C. difficile*, producen 2 toxinas muy bien caracterizadas A y B que causan daño a la mucosa e inflamación del colon. Las toxinas A y B ejercen un efecto citotóxico en las células intestinales y causan inflamación profunda, secreción de fluidos e incrementan la permeabilidad de la mucosa, así como también liberan a los mediadores de la inflamación. Varios autores (Pothoulakis *et al.*, 1993; Castagliuolo *et al.*, 1996; Castagliuolo *et al.*, 1999; Martins *et al.*, 2005) indican que existe una proteasa que inhibe las toxinas A y B del *C. difficile* y observaron que *Saccharomyces spp.* ejercía un efecto protector durante las colitis asociadas a *C. difficile*, sin embargo, este efecto no era directo de la levadura, si no que al evaluar las heces de los animales infectados y tratados con *Saccharomyces*, las citotoxinas secretadas en heces eran

mucho más bajas que aquellos animales sin tratamiento. Por otro lado, también observaron que aquellos ratones axénicos infectados con la bacteria presentaban lesiones en la mucosa tanto en intestino delgado como grueso y que estaban moderadas o ausentes en aquellos ratones tratados con la levadura. No se observó una disminución de la bacteria en el intestino, pero sí existió una disminución en la concentración de ambas toxinas. La incubación de las células epiteliales con *Saccharomyces* antes de ser infectadas con las toxinas de *C. difficile*, prevenía parcial o totalmente el daño causado a las células.

Pothoulakis *et al.* (1993) fueron los primeros en detectar el efecto anti-secretorio de *S. boulardii* que inhibió a la toxina A, esto, en heces de rata. En otro estudio adicionaron la toxina A mezclada con el sobrenadante de la levadura, el cual disminuyó la secreción de toxina A, indicando que el efecto anti-secretorio es mediado por los factores secretados por la levadura. Este efecto protector fue específico de *S. boulardii*. La identificación de la fracción activa que disminuye a la toxina A, es una proteasa que media la inflamación y disminuye el daño a las vellosidades intestinales; funciona a través de la proteólisis de la toxina A e inhibiendo el receptor de la toxina A que se encuentra en la membrana de borde de cepillo. Se identificó como una serina-proteasa de 54 kDa, la cual también ejerce un efecto proteolítico contra la toxina B de *C. difficile*. Esta proteasa de *S. boulardii* disminuye la capacidad de ambas toxinas, A y B, de ligarse a la membrana de borde de cepillo e inhibe el efecto patogénico de las toxinas en las células epiteliales del colon (inhibe la síntesis de las proteínas mediadas por las toxinas A y B). Cuando se agregó un anticuerpo contra la proteasa de *Saccharomyces*, se observó un efecto completamente reversible, permitiendo que la toxina ejerciera el daño, por lo que este experimento comprobó la hipótesis que la proteasa-serina de *S. boulardii* media parcialmente el efecto protector de la levadura contra *C. difficile*.

Czerucka y Rampal (2002) realizaron estudios en animales infectados con *Vibrio cholerae* y ratones pretratados con *S. boulardii* observando que en estos últimos se

disminuyeron los daños morfológicos causados por la bacteria. La toxina del cólera (TC) está compuesta por 5 subunidades B idénticas que constituyen la región de unión de la toxina y la subunidad catalítica A que activa la adenilato ciclasa (AC), la cual produce AMP cíclico (AMP-c), que es un segundo mensajero que señala una gran cantidad de rutas metabólicas, y esta toxina causa un aumento en los niveles de AMP-c que activan la secreción de cloro y bicarbonato en las criptas e inhibe la absorción de cloro en las vellosidades. Durante el experimento, en vellosidades infectadas con TC y una vez que se activó la AC, se administró *S. boulardii*, indicando que la levadura tiene un efecto curativo, ya que disminuyó la secreción de sodio inducido por la TC, hipotetizando que la acción de *Saccharomyces* es inhibiendo directamente el transporte del ion.

Krammer y Karbach (1993) estudiaron el efecto directo de la levadura sobre el transporte de cloro a través del yeyuno y el colon descendente, *Saccharomyces* estimuló el transporte de cloro de la mucosa a la serosa e incrementó la absorción de cloro. La acción inhibitoria de *Saccharomyces* sobre la TC fue confirmada en un estudio donde las células fueron pre-incubadas con la levadura, después fueron expuestas a la TC por 90 minutos, observando que la cantidad de AMP-c estimulada por TC disminuyó en un 50% en células tratadas con la levadura. La incubación concomitante de células con TC y el sobrenadante de la levadura (llamado medio condicionado *S. boulardii* - CM), fue suficiente para disminuir la concentración de AMP-c inducido por TC; este tratamiento fue eliminado cuando la levadura fue secada al calor, sin embargo, el sobrenadante de la levadura posee un factor que media el efecto protector, siendo una proteína conocida como proteína 120 kDa. *S. boulardii* - CM no modifica la TC o la unión de ésta a los receptores; la interacción de *Saccharomyces* con las células receptoras del huésped es importante para la reducción de los efectos patológicos de la infección por la toxina del cólera. La levadura también posee un efecto directo sobre AMP-c y la secreción de cloro regulada por calcio. Aunado a esto, la toxina de cólera puede unirse a la pared

celular de la levadura y es eliminada por el intestino a través de movimientos peristálticos.

Por otro lado, Buts *et al.* (2006) identificaron una proteína fosfatasa de 63 kDa en *S. boulardii*, es una enzima que tiene una gran habilidad de desfosforilar el lipopolisacárido (LPS) de *E.coli*, así, la levadura es capaz de inhibir la toxicidad de las endotoxinas de superficie de *E. coli* liberando una proteína fosfatasa. Esta proteína es capaz de ejercer su acción de desfosforilación a pH entre 2 y 10. Esta fosfatasa al ser administrada experimentalmente en ratas con LPS, mostraron una disminución en la producción de TNF- α (40 ng/ml), mientras que aquellos individuos que recibían solo LPS, la cantidad de TNF- α se incrementó considerablemente (100 ng/ml). Las fosfatasas alcalinas son metaloenzimas que se encuentran casi toda la vida en los microorganismos, con excepción de algunas plantas. Las fosfatasas alcalinas intestinales (FAI) son glicoproteínas unidas a la membrana intestinal apical, es un dímero de 2 proteínas, que son diferentes en masa molecular, tal vez debido a diferencias en la glicosilación; la partícula termoestable exhibe su máxima actividad arriba de los 80°C, mientras que la forma soluble es termolábil (45°C). esta proteína fosfatasa desfosforila endotoxinas como LPS y con esto, inactiva parcialmente los efectos citotóxicos de *E. coli*. Así, esta proteína fosfatasa de *Saccharomyces* puede ejercer un efecto protector en individuos jóvenes en donde las endotoxinas de *E. coli* pueden translocarse al torrente sanguíneo generando sepsis, choque tóxico y una enfermedad fatal.

Rajkowska *et al.* (2012) mencionan que diferentes cepas de *S. boulardii* disminuyeron significativamente el número de células de *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* a través del acortamiento de la fase lag de la bacteria, fase en la que el microorganismo se adapta a las nuevas condiciones y pone en marcha su maquinaria metabólica para crecer activamente. De igual manera, investigaron sobre la habilidad de *Saccharomyces* de unirse a la superficie celular de bacterias patógenas (*E. coli*, *Salmonella typhimurium*,

Staphylococcus aureus, *Campylobacter jejuni* y *Enterococcus faecalis*, sin mostrar adhesión a *L. monocytogenes* y *P. aeruginosa*). El beneficio de administrar *Saccharomyces* como probiótico es a través de la prevención de la adherencia bacteriana y su posterior traslocación a las células epiteliales intestinales para que no sean capaces de ejercer su efecto dañino. En el caso de *L. monocytogenes* y *P. aeruginosa* la presencia del probiótico disminuyó el rango de crecimiento bacteriano, mientras que para *S. aureus* disminuyó el número de células presentes cuando está tratado con *S. boulardii* aunque no hay una inhibición total del crecimiento bacteriano. La prevención de la adherencia bacteriana y la subsecuente traslocación al epitelio intestinal, resulta de la habilidad de la pared celular de *S. boulardii* para ligar patógenos, demostrando que esta levadura tiene la capacidad de adherirse a *E. coli*, *C. jejuni* y *E. faecalis* y es debido a que tienen un pili tipo 1 que es común en estas bacterias, este pili está constituido por hebras de largas proteínas filamentosas que pueden adherirse a las microvellosidades de la superficie de las células intestinales, y éstas pueden ser inhibidas por la D-manosa ó α - manosidasa. La levadura posee en su pared celular manano-proteínas que pueden servir como receptores por interacciones proteína-proteína entre la levadura y la bacteria. Es así como, para el inicio de la patogénesis bacteriana, se requiere de la adherencia bacteriana a las células intestinales del huésped, la presencia de *S. boulardii*, puede inhibir esta adhesión y puede eliminar a los patógenos del tracto intestinal.

Las levaduras al igual que las bacterias poseen una pared celular y existen diferencias sustanciales, las cuales tienen un impacto sobre sus respuestas antigénicas. Todas las paredes de las bacterias contienen un carbohidrato de alto peso molecular asociado a una proteína que forma una estructura rígida llamada peptidoglicano. Las paredes celulares de las bacterias Gram-positivas y Gram-negativas difieren en la concentración de lípidos, las Gram-negativas contienen más del 20% de lípidos compuestos de lipopolisacáridos (LPS), mientras que las Gram-positivas tienen una menor cantidad de lípidos en sus paredes celulares, pero

contienen ácido lipoteicoico (LTA), que funciona como un antígeno que se une a receptores de membrana e induce la activación de los mecanismos de inflamación. La pared celular de la levadura consiste en al menos 2 capas. La capa externa contiene una combinación de manosa asociada con otra proteína (fosfopeptidomanano- PPM llamado comúnmente manano) o con un lípido (fosfolipomanano- PLM); la capa interna está conformada por quitina a 1,3- β glucano y 1,6- β glucano. En los seres vivos, la primera línea de defensa contra la agresión de los agentes microbianos es la inmunidad innata, la cual se basa en el reconocimiento de antígenos por medio de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) mediante proteínas específicas referidas como receptores de patrones de reconocimiento (PRRs). Los peptidoglicanos, LPS y LTA de paredes celulares bacterianas, y los PLM, PPM y glicanos, de paredes celulares de las levaduras son PAMP's y son reconocidas por diferentes PRRs y así pueden generar diferentes respuestas al hospedero, ya sea de manera dañina o benéfica (Czerucka *et al.*, 2007).

Hudson *et al.* (2016) indican que el reconocimiento inmunológico de *Saccharomyces spp.* muy probablemente sea mediado por su pared celular, una estructura compleja que media las respuestas al estrés externo, incluyendo las condiciones anaeróbicas, así como el pH y los cambios osmóticos. La pared celular contiene muchos componentes inmunomoduladores. Las manano-proteínas, forman el compuesto de la capa externa de la pared celular de la levadura y ésta se une a la galectina 3, DC-SIGN y TLR4. Los β -glucanos, que constituyen la capa media de la pared celular, se unen a la Dectina-1, TLR 2 y TLR6 y pueden estimular a células dendríticas Langerin positivas en las placas de Peyer del intestino delgado. En el Cuadro 2 se describen los receptores de lectina tipo-C. La quitina, un componente menor de la capa interior de la pared celular, se une a los receptores de manosa. Cuando se administran fragmentos de pared celular como β -glucanos, se ha encontrado que estimula la respuesta inmune de la mucosa y puede ejercer algunos efectos como el probiótico entero. Es así como se ha observado que los

componentes de la pared celular de *Saccharomyces spp*, incrementan la resistencia al estrés del pH y a las condiciones presentes en el tracto gastrointestinal.

Cuadro 2. Receptores de lectina tipo-C de *Saccharomyces spp*. Adaptado de Drummond *et al.* 2011.

Receptor	Definición
Galectina-3	Lectina miembro de la familia de proteínas que se unen a β -galactosidos y desempeña un papel importante en la adhesión célula-célula, activación de macrófagos, angiogénesis y apoptosis.
DC-SIGN	Célula dendrítica – molécula de adhesión específica intercelular-3- no unida a integrinas, es un tipo de receptor de lectina, presente tanto en macrófagos como en células dendríticas. En macrófagos reconoce y se une a carbohidratos tipo manosa, una clase de PAMP's comúnmente encontrado en virus, bacterias y hongos, esta unión activa la fagocitosis.
Dectina-1	Receptor de lectina tipo C expresado en macrófagos, células dendríticas y macrófagos. La unión de los β -glucanos con la Dectina-1 desencadena una variedad de respuestas celulares a través de la vía de señalización Syk/CARD9, incluyendo la fagocitosis y la secreción de citocinas. La Dectina-1 es descrita como un receptor de glucanos específico de uniones $\beta(1-3)$, sin embargo, también se ha averiguado que otros tipos de β -glucanos lineares con enlaces $\beta(1-6)$ también consiguen unirse a dicho receptor.
CD Langerin	CD207, es un receptor de lectina tipo-C sobre las células de Langerhans; la proteína codificada por este gen se expresa en las células Langerhans, las cuales son células dendríticas inmaduras de la mucosa y epidermis.

De acuerdo con lo investigado por Drummond *et al.* (2011), los receptores de lectina tipo-C (CLRs) son receptores de patrones de reconocimiento (PRRs) que son críticos para la respuesta inmune; muchos de estos receptores están acoplados a la Syk quinasa, la cual permite a estos receptores señalar la vía CARD9, activando al NF- κ B, el cual contribuye a la inducción de la inmunidad tanto innata como adaptativa.

La Dectina-1, Dectina-2 y Mincle son CLRs que comparten la misma vía de señalización y desempeñan roles importantes. Entonces, algunos miembros de la familia CLR reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), mientras que otros miembros reconocen ligandos endógenos. Similar a otros PRRs, tal como los receptores tipo Toll (TLRs), los CLRs están involucrados en la defensa del huésped contra las infecciones patógenas, sin embargo, a diferencia de los TLRs, los cuales reconocen varios PAMPs tales como los LPS, proteoglicanos y ácidos nucleicos, la mayoría de los CLRs reconocen carbohidratos en los patógenos.

Las paredes celulares de las levaduras contienen múltiples tipos de carbohidratos, tales como los mananos, β -glucanos y quitinas; una vez se da el reconocimiento de estos carbohidratos por los PRRs, la respuesta inmune innata se activa y se inician con los mecanismos de respuesta. Recientemente se reportó que los prototipos de los CLRs, Dectina-1 y Dectina-2, son receptores específicos para los β -glucanos y mananos, respectivamente; mientras que Mincle aún no está bien caracterizado, sin embargo, desempeña un papel importante en la vía de señalización de las paredes celulares. Estos receptores inducen a las citocinas que manejan la inflamación y la inmunidad adaptativa en el huésped. Estas acciones son dependientes de la activación de una cascada de señalización común y que involucra a Syk quinasa, CARD9 y NF- κ B, tanto en células dendríticas como macrófagos.

2.4. Cascadas de señalización de la respuesta proinflamatoria intestinal

2.4.1. NF- κ B

NF- κ B es un factor de transcripción pleiotrópico con funciones clave en muchos órganos y tejidos, incluyendo el sistema inmune del intestino. Los miembros de la familia NF- κ B consisten en varias proteínas que incluyen NF- κ B1 (p105; precursor de la proteína p50), NF- κ B2 (p100; precursor de la proteína p52), p65 (RelA), cRel (Rel) y RelB los cuales comparten el dominio homólogo denominado Rel. Todos ellos controlan la actividad transcripcional de varios promotores de citocinas proinflamatorias, receptores de superficie celular, factores de transcripción y moléculas de adhesión que están involucradas en la inflamación intestinal (Neurath *et al.*, 1998). El NF- κ B juega roles complejos en la inflamación y se ha sugerido que desempeña una función tanto anti como proinflamatoria (Lawrence, 2009), por lo que es difícil interpretar su efecto en la inflamación, ya que los mediadores producidos generan diferentes resultados que, probablemente nos indiquen el progreso de una enfermedad (Lawrence y Bebien, 2007).

La respuesta inflamatoria se caracteriza por coordinar la activación de varias vías de señalización que regulan la expresión de mediadores tanto pro como antiinflamatorios en las células del tejido intestinal. La señalización durante la inflamación se ha conocido por estudios hechos sobre miembros de la familia de la IL-1 y receptores de la familia TNF, así como de los receptores de patrones de reconocimiento microbiano (TLRs) (Lawrence, 2009). IL-1 y TNF- α representan a las citocinas proinflamatorias que son rápidamente liberadas en el tejido dañado o durante la infección. A pesar de que son estructuralmente diferentes, sus receptores utilizan mecanismos de transducción de señales similares que incluyen la activación de la κ B quinasa (IKK) y NF- κ B (Gosh y Karin, 2002).

Existen dos vías de señalización del NF- κ B: la canónica y la alternativa. La vía canónica de activación del NF- κ B, es activada por productos microbianos y por

citocinas proinflamatorias como TNF α e IL-1, activando así a los complejos RelA o cRel. El complejo IKK consiste en dos subunidades de quinasas: IKK α (IKK1) e IKK β (IKK2) y una unidad subregulatoria IKK γ (NEMO). IKK β regula la activación de esta vía a través de la fosforilación de I κ B y requiere de la subunidad IKK γ (Zandi *et al.*, 1997).

Lawrence *et al.* (2001) mencionan que NF- κ B desempeña el papel esperado en la inducción de genes proinflamatorios durante el inicio de la inflamación, pero también muestra un papel importante en la expresión de genes antiinflamatorios y la inducción de la apoptosis de leucocitos durante la resolución de la inflamación. El papel pro-apoptótico del NF- κ B puede ser un mecanismo antiinflamatorio durante la inflamación aguda.

La vía de señalización alternativa es activada por las citocinas de la familia TNF- β linfotóxica (LT), ligando CD40 (CD40L) y factor de activación de células B (BAFF), y se diferencia de la vía canónica porque ésta requiere de IKK α para su activación, la cual se da a través de NIK (quinasa inductora de NF- κ B). IKK α fosforila y activa p100 y esta a su vez activa los heterodímeros RelB/p52 (NF- κ B2) (Lawrence *et al.*, 2009). Se han realizado numerosos estudios que muestran el papel desempeñado sobre la función de linfocitos B, pero el rol de esta vía de señalización en la inflamación es aún incierto (Lawrence y Bebien, 2007; Sun, 2011).

Varios estudios sugieren que existe la posibilidad de que IKK α pueda desempeñar un papel en la inflamación y en la inmunidad adaptativa, por tanto, tal vez puede promover la resolución de la inflamación apagando la vía canónica del NF- κ B. La resolución de la inflamación es necesaria para evitar daño tisular mientras se desarrolla la inmunidad de memoria. Juntando ambas vías, del NF- κ B, puede ser que regule la transición de la inflamación aguda a una respuesta inmune antígeno-específica (Lawrence, 2009).

Con todo lo anterior, se puede concluir que la función inflamatoria de las células inmunes, no dependen de las concentraciones intracelulares de NF- κ B, sino del estímulo que se reciba desde el medio extracelular, el cual va a activar la vía de señalización del NF- κ B, permitiendo su entrada al núcleo, produciendo el efecto anteriormente mencionado (Figura 8).

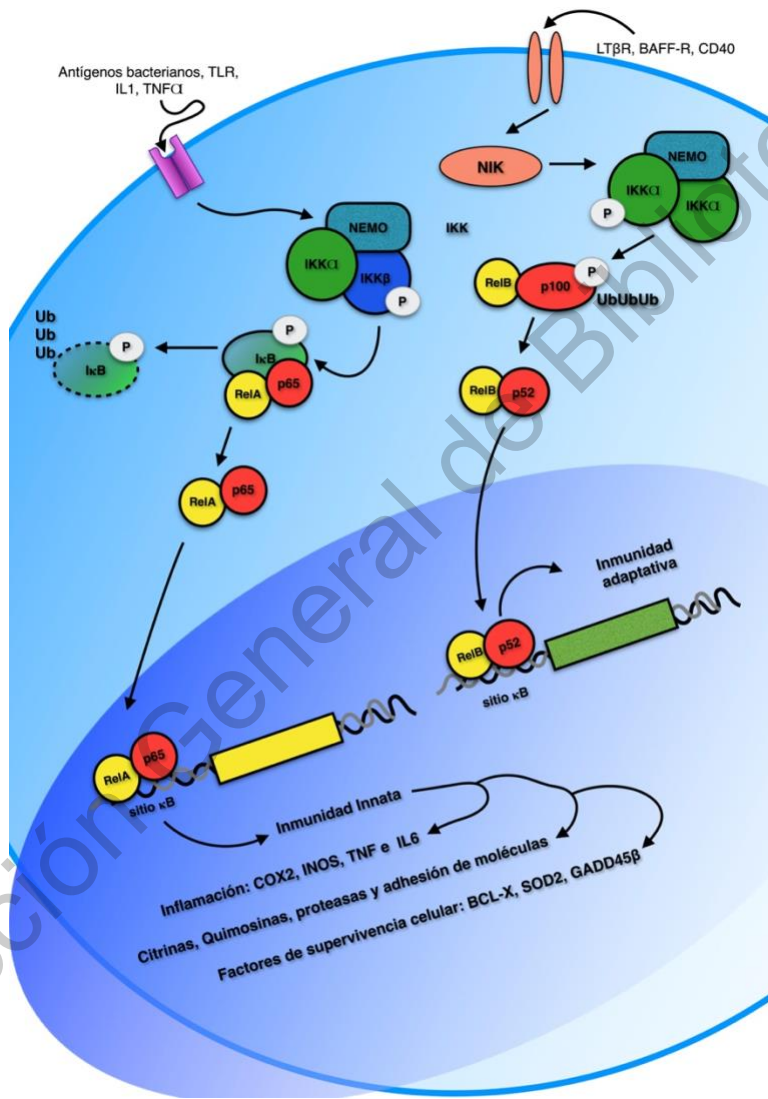


Figura 8. Cascada de señalización de NF- κ B, vía canónica y alternativa. Adaptado de Lawrence, 2009.

2.4.2. IL-6

La IL-6 es producida por diversos tipos celulares, siendo los más importantes los monocitos y macrófagos en los sitios de inflamación durante la inflamación aguda (Naugler y Karin, 2008). Los principales estímulos para su síntesis y liberación son las infecciones por ciertos microorganismos, particularmente virus y bacterias (lipopolisacárido bacteriano) y la acción de otras citocinas como TNF- α e IL-1. Es una citocina pluripotencial ya que tiene acciones tanto proinflamatorias como antiinflamatorias. En la actualidad se le reconoce como el principal mediador de la respuesta de fase aguda; su efecto antiinflamatorio se presenta al ejercer un control parcial sobre la producción de TNF- α e IL-1. A diferencia de estas 2 últimas, los efectos de la IL-6 en la inmunidad, dependen del contexto y de su concentración local (Saavedra *et al.*, 2011). En una condición de homeostasis, los niveles de IL-6 son bajos, mientras que, bajo condiciones de estrés, la cantidad de IL-6 aumenta rápidamente en suero (Naugler y Karin, 2008).

IL-6 ejerce diferentes funciones, siendo la principal estimuladora de la producción de la mayoría de las proteínas de fase aguda como la proteína C reactiva, amiloide sérico A, haptoglobina, hemopexina, ferritina, etc. (Gabay y Kushner, 1999).

En el sistema inmune, la IL-6 promueve la diferenciación y maduración de linfocitos T y B, estimula la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B, inhibe la secreción de citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1. La IL-6 tiene efectos anti-inflamatorios ya que induce la liberación del antagonista del receptor de la IL-1 y del receptor soluble del TNF- α (Choy, 2004).

La IL-6 pertenece a la superfamilia de la gp130, las citocinas que conforman esta familia comparten una homología estructural y usan una vía común de transducción de señales (gp130) para estimular la activación celular. De igual manera, las citocinas de esta superfamilia se unen a receptores de la superficie celular y a receptores solubles (Scheller *et al.*, 2006).

La producción de IL-6 depende de varios factores de transcripción, principalmente de NF- κ B, C/EPB β (CAAT/ enhancer-binding protein beta antes conocido como NF-IL6) y AP-1 (proteína activadora 1). El estímulo que dispara esta activación incluye al TNF- α e IL-1 y cualquier efecto que cause inflamación activará la producción de IL-6 (Naugler y Karin, 2008) (Figura 9).

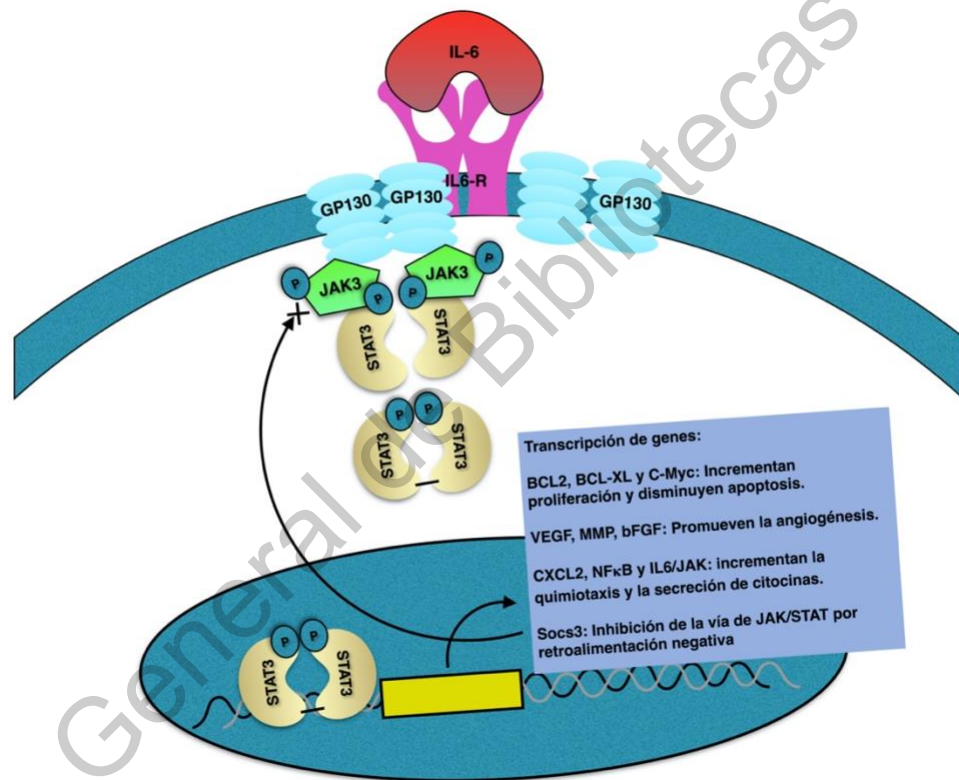


Figura 9. Vía de señalización de la IL-6. Adaptado de Naugler y Karin, 2008.

El receptor de IL-6 (IL-6R) no posee un dominio intracelular de transducción de señales, por lo tanto, la unión de IL-6 con su receptor no promueve la activación celular. El IL-6R también puede encontrarse en su forma soluble (sIL-6R), el cual es capaz de fijar la IL-6 circulante y contribuye junto con el IL-6R a la activación celular.

Mientras que, en la mayoría de los casos, los receptores solubles compiten con las proteínas unidas a la membrana por la unión con el ligando, el IL-6R funciona como un agonista (Scheller et al., 2006). Para que se dé la activación celular, la IL-6 debe unirse al IL-6R en la superficie celular y luego este complejo se asocia a otra glicoproteína de la superficie celular, la gp130, que se encarga de la transducción de señales; y para que se pueda dar esta transducción, el complejo IL-6/IL-6R/gp130 debe unirse a otro complejo igual (Choy, 2004; Naugler y Karin, 2008).

Posteriormente, se activan varios miembros de la familia de las proteínas tirosina-quinazas (Jak- Janus asociado a quinazas); primero Jak3 es reclutada a la porción intracelular de gp130 y a su vez activa al factor de transcripción STAT3 (transductor de señal y activador de la transcripción) y en menor cantidad a STAT1, mediante fosforilación. Una vez fosforilados, STAT3 y STAT1 se dimerizan y translocan hacia el núcleo celular, donde se unen a los elementos de respuesta tipo-2 de la IL-6 e inducen la expresión de los diferentes genes “diana” por medio de C/EPB β . La función primaria de esta vía es promover el crecimiento y diferenciación celular y prevenir la apoptosis (Naugler y Karin, 2008; Saavedra *et al.*, 2011).

Una vez que tiene lugar la estimulación celular, se produce de manera muy rápida una familia de inhibidores inducidos por citocinas, llamados supresores de señalización de citocinas (SOCS) cuya función es frenar o bloquear la generación de señal de las STAT; por lo tanto, la cascada Jak/STAT controla su propia señalización mediante una retroalimentación negativa (Murray, 2007). En este caso la SOCS3 es la que bloquea a STAT3.

Por otro lado, la IL-6 también activa la vía de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) específicamente la quinasa del receptor extracelular (ERK), a través de SHP2 (proteína -tirosín fosfatasa) activada por Jak, la cual eventualmente activa el proto-oncogen Ras, que es una GTPasa que se encuentra mutada en muchos tipos de cáncer. La importancia de esta vía no está del todo estudiada,

específicamente porque muchos efectos de la IL-6 pueden verse abolidos por una disrupción de la vía de STAT3 (Naugler y Karin, 2008) (Figura 10).

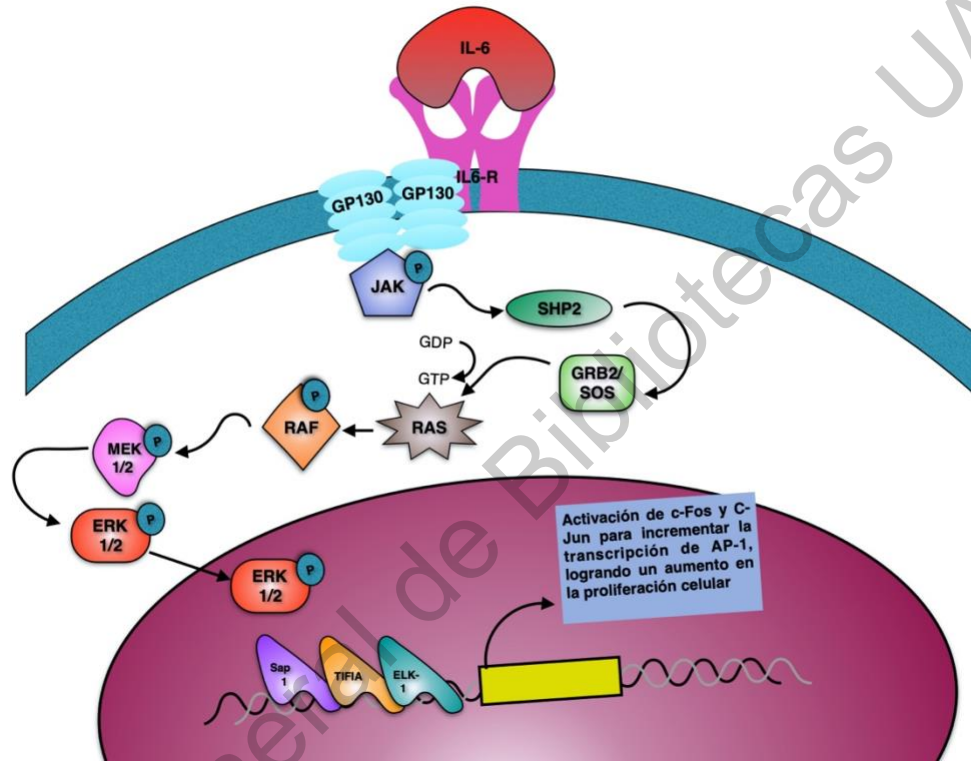


Figura 10. Vía de señalización IL-6 utilizando MAP quinasas. Adaptado de Naugler y Karin, 2008.

Una vía de señalización alterna se da a partir del receptor soluble de IL-6 (sIL-6R) y se puede explicar a partir del hecho de que gp 130 se expresa en la mayoría de los tipos celulares, por tanto, la IL-6 tiene la capacidad de inducir efectos activadores en otras células que no tienen un IL-6-R de membrana celular, sino por medio de la unión de un complejo IL-6/sIL-6R/gp130 y a esto se le conoce como "trans-señalización" (Choy, 2004). Esto le confiere la capacidad a la IL-6 de desencadenar

respuestas en una amplia variedad de células, tal como actividades de migración, activación y apoptosis de leucocitos (Jones, 2005).

La IL-6 junto con STAT3 ayudan a la supervivencia tumoral, por tanto, se han realizado estudios que indican que la carencia de algunos de estos dos genes, pueden favorecer a una inflamación sin llegar a la proliferación tumoral (Grivennikov *et al.*, 2009, Klampfer, 2011).

Estudios indican que altas concentraciones de IL-6 están asociados a enfermedades severas, tanto en circulación como en el intestino. Otro estudio, muestra que durante una enfermedad activa se observó un incremento de IL-6 en suero. Pacientes que presentaban la enfermedad inflamatoria del intestino, se les tomó una muestra de intestino y reveló que la mucosa del colon con enfermedad activa contiene grandes cantidades de IL-6, a diferencia de aquellos pacientes que presentaban una enfermedad inactiva o pacientes control (Mitsuyama *et al.*, 2006).

El análisis de la producción de citocinas por parte de las células mononucleares presentes en la lámina propia, realizados en muestras de pacientes que padecen la enfermedad inflamatoria del intestino, revelaron un incremento espontáneo en la producción de IL-6, así como en las concentraciones de TNF- α e IL-1. La IL-6 puede afectar tanto en eventos sistémicos, tales como la síntesis de proteínas de fase aguda, inducción de plaquetas y anticuerpos, así como también se ve incrementada su concentración en eventos localizados, tales como la inflamación intestinal, lo cual sugiere su participación en las enfermedades intestinales (Mitsuyama *et al.*, 2006).

STAT3 induce los factores antiapoptóticos Bcl-2 y Bcl-XL, con esto, las células T generan una resistencia contra la apoptosis. Esta acumulación de células T, mediadas por la resistencia a la apoptosis, llevan finalmente, a la inflamación crónica, la cual puede bloquearse con anticuerpos que poseen un receptor anti IL-6 (Sánchez *et al.*, 2008).

En los estados inflamatorios crónicos IL-6 requiere de su trans-señalización, ya que ésta es la responsable de la mayoría de los efectos asociados a la enfermedad. Por otro lado, un bloqueo en esta vía elimina los síntomas o la progresión de los procesos inflamatorios crónicos (Naugler y Karin, 2008, Grivennikov *et al.*, 2009).

Avances recientes han documentado que las actividades de IL-6 son críticas para resolver la inmunidad innata y promover la inmunidad adquirida. La transición entre estas dos es un evento central para resolver cualquier condición que incluya la inflamación y la disrupción de este cambio entre los dos tipos de inmunidad, puede distorsionar la respuesta inmune iniciando con la inflamación crónica (Mitsuyama *et al.*, 2006; Naugler y Karin, 2008; Grivennikov *et al.*, 2009).

En la inflamación aguda, el reclutamiento de leucocitos se caracteriza por una infiltración inicial de neutrófilos, los cuales son posteriormente reemplazados por un flujo más sustancioso de células mononucleares. Estudios demuestran que la vía de trans-señalización de IL-6 controla este patrón de infiltración, así como también regula eventos para la expresión de quimiocinas y moléculas de adhesión, por lo tanto, controla un evento intermediario clave en la resolución de la inflamación (Mitsuyama *et al.*, 2006; Naugler y Karin, 2008).

Tal escenario, puede explicar la aparente actividad antiinflamatoria de la IL-6 observada en la inflamación aguda, ya que la influencia de IL-6 sobre la respuesta inmune, está direccionada hacia el reclutamiento, activación y despeje de subpoblaciones de leucocitos mediante la apoptosis (Mitsuyama *et al.*, 2006).

Así como STAT 3 induce la expresión de genes importantes para la proliferación celular (ciclina D) y la supresión de la apoptosis (Bcl-XL, Bcl-2), se ha observado que en la señalización que se da en las células epiteliales intestinales (IECs),

también controla la expresión de una forma inducible de chaperona citoprotectora Hsp70, la cual protege la mucosa intestinal del daño (Rakoff-Nahoum *et al.*, 2004).

Otro factor citoprotectivo regulado por IL-6 en IECs son los factores intestinales trébol (ITF/Tff3), los cuales son importantes para la protección intestinal durante la colitis inducida; sin embargo, la expresión de Tff3 es dependiente de la vía de señalización de STAT3 (Grivennikov *et al.*, 2009). Todo esto sugiere la posible participación de otras citocinas para desempeñar papeles en la citoprotección y proliferación celular, tal es el caso de la IL-11.

El efecto antiinflamatorio de IL-6 fue observado en estudios hechos por Xing *et al.* (1998), donde ratones que carecían de IL-6 sufrían un incremento en el rango de mortalidad cuando eran desafiados con una dosis letal de endotoxina; en contraste con una respuesta hiperactiva de citocinas proinflamatorias en ratones carentes de IL-6, la respuesta de proteínas de fase aguda fue sólo moderada o marginalmente afectada durante la endotoxemia. Esto sugiere que el papel de la IL-6 en la inducción de proteínas de fase aguda en tal escenario, puede ser parcialmente compensado por otras citocinas (Xing *et al.*, 1998).

Por otro lado, en un paciente normal, una función de la IL-6 durante las respuestas agudas, es suprimir los niveles de citocinas proinflamatorias sin comprometer el nivel de citocinas antiinflamatorias. La naturaleza antiinflamatoria de IL-6 ha sido sugerida por estudios donde el uso farmacológico de una IL-6 recombinante indujo la liberación de moléculas antiinflamatorias como el receptor antagonista de IL-1 y receptor soluble de TNF- α , así como la inhibición de la liberación de TNF- α (Xing *et al.*, 1998; Grivennikov *et al.*, 2009).

Así, la IL-6 sirve no solo para promover las proteínas de fase aguda, sino que también desempeña un papel importante en la obtención de respuestas celulares inmunes contra células afectadas y respuestas humorales de la mucosa contra la

reinfección. Estas actividades pueden ser vistas como un intento de regresar al individuo a la homeostasis (Xing *et al.*, 1998).

2.4.3. TNF- α

El factor de necrosis tumoral (TNF- α) o caquexina, es una citocina proinflamatoria que está expresada en la membrana celular y participa en la regulación de la proliferación celular y la apoptosis. Es secretada principalmente por células del sistema inmune, tales como los monocitos, macrófagos, neutrófilos, células NK y linfocitos T. El TNF- α actúa como mediador letal en la respuesta inmune aguda o crónica de enfermedades y procesos inflamatorios (Anaya, 2003).

La síntesis de TNF- α puede ser inducida por virus, parásitos, bacterias, células tumorales, trauma e irradiación, así como por citocinas tales como la IL-1, IL-2, IL-12, IFN- γ y el mismo TNF- α . El efecto pleiotrópico de TNF- α tiene como resultado la síntesis de otras citocinas como IL-1, IL-2, IL-6 y TGF- β (factor de crecimiento y transformación-beta), entre otros. Muchos de los mediadores inducidos por TNF- α actúan a su vez como inhibidores de su expresión, tales como IL-6, IL-10 y el cortisol (Anaya, 2003).

TNF- α ejerce su efecto proinflamatorio incrementando la producción de IL-1 e IL-6, la expresión de moléculas de adhesión, proliferación de fibroblastos y factores procoagulantes, así como el inicio de la citotoxicidad, apoptosis y respuestas de fase aguda (Sánchez *et al.*, 2008).

La vía de señalización de TNF- α comienza con la unión a sus receptores I y II TNF (TNF-RI, p55 ó p60 y TNF-RII, p80 ó p75); estos receptores presentan una alta promiscuidad molecular con respecto a sus ligandos y están presentes en todos los tipos de células, excepto los eritrocitos. Se han identificado formas solubles de ambos receptores (sTNF-R) en fluidos biológicos que parecen afectar de alguna manera la actividad biológica y la biodisponibilidad del TNF- α a nivel sistémico

(Chen y Goeddel, 2002). Múltiples experimentos mencionan que el TNF-RI inicia la mayoría de las actividades biológicas de TNF- α ; su unión, dispara una serie de eventos intracelulares que culminan en la activación de dos importantes factores de transcripción: el NF- κ B y c-Jun. Estos factores de transcripción son los responsables de inducir la expresión de genes importantes para diversos procesos biológicos, entre ellos, la inflamación (Chen y Goeddel, 2002).

Una vez unido el TNF- α al dominio extracelular de TNF-RI, se libera la proteína inhibitoria silenciadora de los dominios de la muerte (SODD) del dominio intracelular de TNF-RI (ICD). Así el TNF-RI ICD es reconocido por las proteínas de dominio mortal asociadas al receptor TNF-RI (TRADD), el cual recluta proteínas adaptadoras adicionales como las proteínas de interacción con receptores (RIP), TNF-R- asociado al factor 2 (TRAF2) y Fas asociado al dominio de la muerte (FADD). Estas 3 últimas, reclutan enzimas a TNF-RI que son las responsables de iniciar los eventos de señalización (Chen y Goeddel, 2002; van Horssen *et al.*, 2006).

Cuando TNF-RI señala la apoptosis, la caspasa-8 es reclutada por FADD al complejo TNF-RI, donde es activada y se inicia la cascada de una proteasa que da como resultado la apoptosis, donde se involucra la mitocondria, y la caspasa es el regulador clave. El evento final en esta activación apoptótica, es la activación de endonucleasas, tal como EndoG, resultando en la fragmentación de DNA (Chen y Goeddel, 2002; van Horssen *et al.*, 2006).

De manera alternativa, cuando TNF-RI señala la supervivencia, TRAF-2 es reclutado al complejo, el cual inhibe la apoptosis vía citoplasmática por la proteína inhibitoria de la apoptosis (cIAP). La unión de TRAF-2 inicia con una vía de fosforilación que resulta en la activación de un factor de transcripción cFos/cJun, a través de la activación de la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK) y la cJun N- quinasa terminal (JNK) (Chen y Goeddel, 2002; van Horssen *et al.*, 2006).

Finalmente, la proteína quinasa RIP es crítica para el funcionamiento de una tercera opción en la red de señalización de TNF- α , la activación del factor de transcripción NF- κ B. Sin embargo, la actividad enzimática de RIP no es necesaria para inducir la activación de NF- κ B. La activación de NF- κ B inducida por TNF- α se basa en la ubiquitinación dependiente de fosforilación y en la posterior degradación de las proteínas inhibitoras κ B (I κ B), las cuales, de manera normal, retienen al NF- κ B dentro del citoplasma de células no estimuladas (Chen y Goeddel, 2002; van Horssen *et al.*, 2006) (Figura 11). El resto de la vía de señalización fue explicada ampliamente en la sección anterior. Es importante mencionar que tanto NF- κ B como cJun, inducen la transcripción de genes anti-apoptóticos, proliferativos, inmunomodulatorios e inflamatorios.

TNF- α e IL-1 comparten varias propiedades proinflamatorias y ambas pueden inducir fiebre. TNF- α comparte propiedades inflamatorias con IL-6, por ejemplo, la inducción de proteínas de fase aguda por parte del hígado. TNF- α e IL-1 promueven un efecto inflamatorio secundario estimulando la síntesis de IL-6 en varios tipos de células; IL-6 luego media sus propios efectos y aquellos inducidos por TNF- α e IL-1 (Feghali y Wright, 1997).

TNF- α , IL-1 e IL-6 ejercen su acción a nivel sistémico ya que son producidas en cantidades extremadamente grandes durante procesos agudos, tal como una sepsis bacteriana, donde los individuos presentan fiebre e hipotensión. Cuando se presentan en menor cantidad, entonces se habla de una infección crónica y la producción de TNF durante estas situaciones es la responsable de las alteraciones metabólicas, que tiene como resultado caquexia que está asociado posiblemente a algunos tipos de cáncer (Feghali y Wright, 1997; Sánchez *et al.*, 2008).

Estudios hechos por Biesiada *et al.* (2012) indican que durante la diarrea infecciosa hay una elevada expresión de citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 e IL-6, debido

a una reacción de inflamación a corto plazo, encontrando que, si el individuo se recupera de la diarrea, las concentraciones de estas citocinas disminuyen conforme hay resolución de la enfermedad.

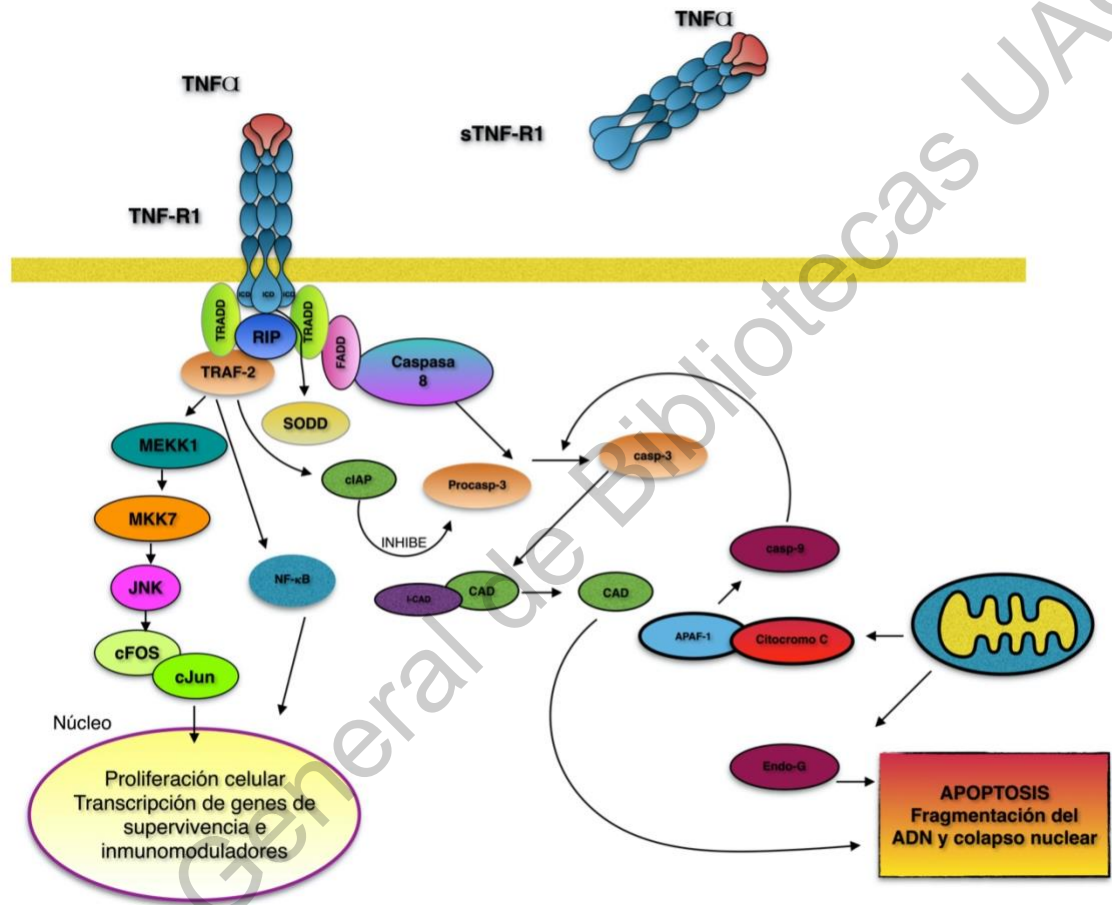


Figura 11. Vía de señalización del TNF- α . Adaptado de van Horsen *et al.*, 2006.

2.4.4. IL-12p40

La citocina heterodimérica IL-12 es parte de una familia de 5 citocinas, con las cuales comparte funciones importantes en la regulación tanto de la inmunidad innata como adquirida, junto con 2 de ellas la IL-23 e IL-27.

La IL-12 tiene una estructura molecular única que está unida covalentemente a un heterodímero compuesto de dos cadenas: p40 y p35. La secuencia de la cadena p40 es homóloga a la porción extracelular de los miembros de la familia de receptores de hematopoyetina, particularmente a la cadena α del receptor de IL-6 (IL-6R α), la cual puede ser secretada como moléculas solubles capaces de formar complejos con las citocinas. Estos complejos se unen a otras cadenas transmembranales de un complejo receptor (que generalmente contiene al receptor gp 130 cadena β), induciendo la señal de transducción. Esto indica que, la IL-12 está involucrada fuertemente con la familia de la IL-6, unida covalentemente a la porción extracelular con su receptor principal en la cadena α (Trinchieri, 2003).

El complejo receptor de membrana de IL-12 está formada por 2 cadenas: IL-12R β 1 e IL-12R β 2, ambas son homólogas a gp130 (receptor de membrana de IL-6). IL-12R β 1 se une a IL-12p40, mientras que IL-12R β 2 se une a IL-12p35.

La cascada de señalización a través del complejo receptor de IL-12 induce la fosforilación, dimerización y translocación al núcleo de varios factores de transcripción STAT (1,3,4,5), pero la respuesta predominante y las respuestas biológicas de IL-12 son mediadas por STAT4 (Trinchieri, 2003). IL-12 es producida principalmente por células hematopoyéticas fagocíticas (monocitos, macrófagos, neutrófilos) y por células dendríticas. La IL-12p40 es secretada en excesivas cantidades, mientras que IL-12p35 solo es secretada cuando las células producen la p40. IL-12 es una potente citocina inductora de interferón- γ (IFN- γ).

La IL-12p40 puede presentarse en forma monomérica u homodimérica. Su función es ampliamente apreciada para proveer una retroalimentación negativa uniéndose de manera muy competitiva a los receptores de IL-12. Sin embargo, funciona como un quimioatrayente para macrófagos y promueve la migración de células dendríticas estimuladas por bacterias (Cooper y Khader, 2006).

La IL-12p40 con su receptor IL-12R β 1 puede fosforilar Tyk2 y STAT3 cuando está como monómero. Al presentarse el homodímero IL-12p40/p80 induce la señalización en macrófagos resultando la activación de Tyk2 y posteriormente la activación de las vías de señalización NF- κ B y MAPk p38 (Cooper y Khader, 2006; Zundler y Neurath, 2015) (Figura 12).

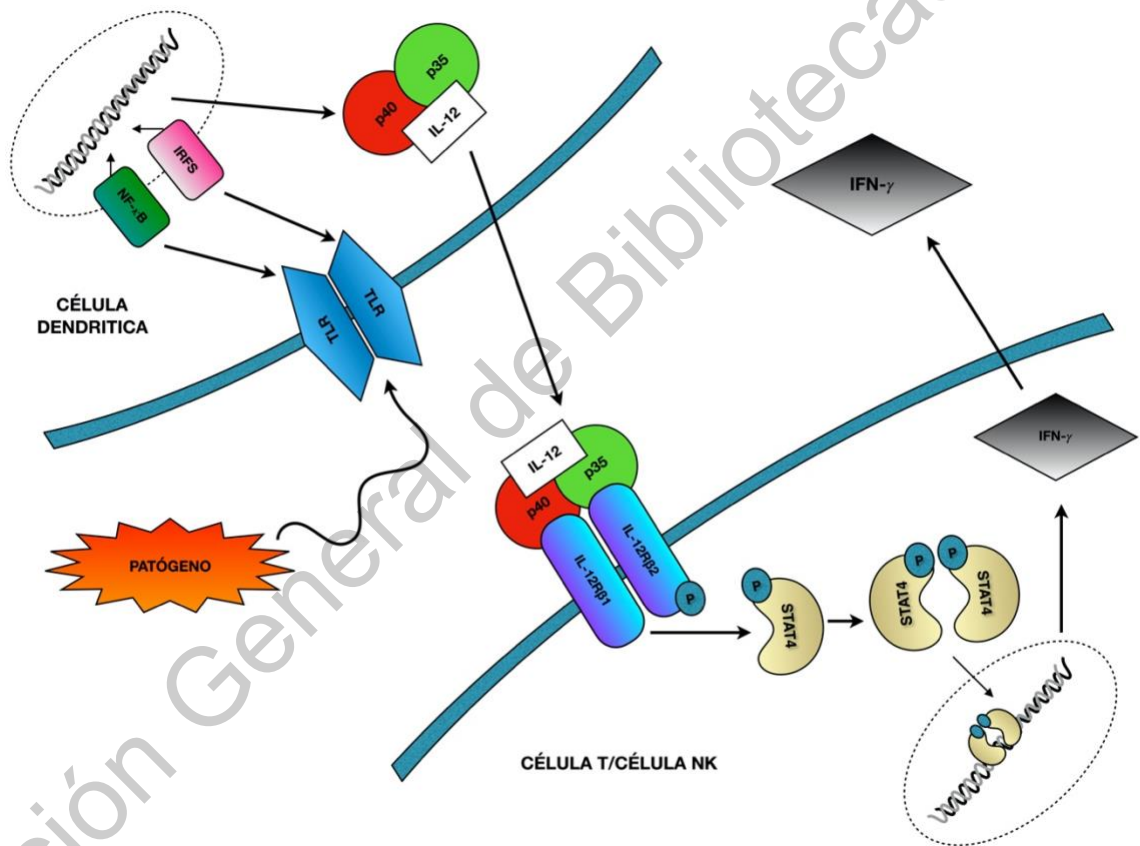


Figura 12. Vía de señalización de IL-12p40. Adaptado de Zundler y Neurath, 2015.

En diferentes estudios se ha encontrado que la IL-12p40 está asociada con varias enfermedades patógenas inflamatorias como rechazo de trasplantes, asma, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, psoriasis y síndrome del colon irritable, en las cuales se han empleado anticuerpos anti IL-12p40 para poder aminorar los

efectos inflamatorios de dichas enfermedades (Cooper y Khader, 2006; Zundler y Neurath, 2015).

2.5. Mecanismos de los probióticos del género *Saccharomyces spp.* en la respuesta inmunitaria

Saccharomyces spp. tiene diferentes mecanismos de acción los cuales pueden ser clasificados dentro de tres áreas principales: acción luminal, acción trófica y efectos antiinflamatorios, todos estos modulan vías de señalización en el hospedero que regulan las funciones intestinales. *Saccharomyces spp.* regula la respuesta inmune actuando como un inmunoestimulante o reduciendo las respuestas proinflamatorias (Czerucka *et al.*, 2007; McFarland, 2010).

S. boulardii puede incrementar los niveles de IgA secretoria (sIgA) en el intestino. La sIgA representa una barrera inmune contra la adhesión de patógenos a la mucosa intestinal, ya sea uniéndose a la superficie de la bacteria y atrapándola en la capa mucosa del epitelio intestinal o por moléculas en la superficie de las bacterias que median la adhesión a las células epiteliales, previniendo así, la traslocación bacteriana al interior del órgano. (Buts *et al.*, 1990; Rodrigues *et al.*, 2000; Czerucka *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2007; Generoso *et al.*, 2010). En una publicación clásica de Buts *et al.* (1990) comprobaron que la adición de la levadura en el alimento de los animales estimula y aumenta considerablemente la concentración del componente secretorio de inmunoglobulinas, aumentado un 69% en las vellosidades intestinales y 80% en las criptas intestinales; teniendo un aumento promedio del 57% de sIgA en el lumen intestinal (Figura 13).

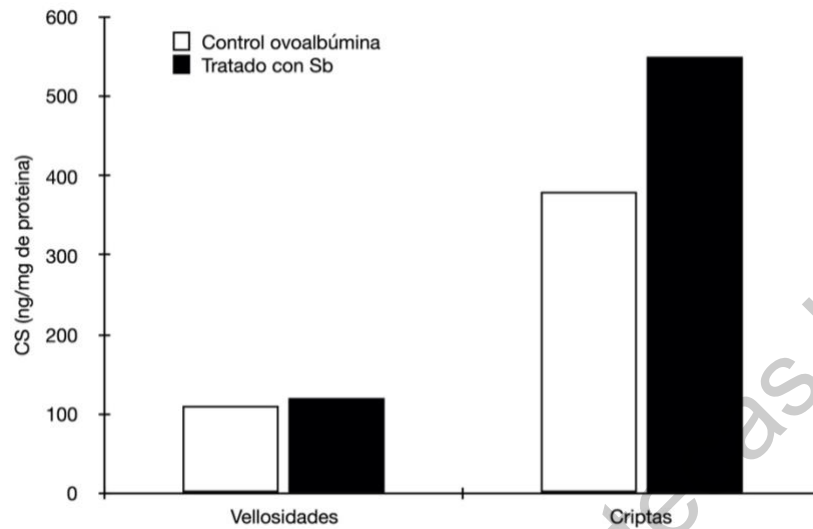


Figura 13. Concentración del componente secretorio (CS) en células de las vellosidades (vellosidades) y en células de las criptas (criptas) en ratas tratadas con *S. bouardii*. Adaptado de Buts *et al.*, 1990.

Las células plasmáticas presentes en la mucosa (plasmocitos) producen dímeros de IgA unidos entre sí por medio de un puente disulfuro que se ubica en el carbono terminal de la cadena sencilla α de cada molécula de IgA, esta unión se denomina la cadena J. Estos dímeros de IgA se unen a través de la cadena J a receptores poliméricos de inmunoglobulinas (p-IgR) que se encuentran en la membrana basolateral de las células epiteliales (enterocitos) permitiendo la internalización del dímero de IgA a la célula epitelial. Una vez dentro, a este dímero se le une una glucoproteína denominada componente secretorio el cual estabiliza la IgA y previene su rápida ruptura en ambientes hostiles como los del intestino. Una vez completa la estructura, la IgA es secretada y pasa a denominarse sIgA (Figura 14) (Bekema y van Egmond, 2011).

La sIgA aparece como la primera línea de defensa contra patógenos externos, el aumento significativo de esta inmunoglobulina en el fluido duodenal de los animales tratados con *S. bouardii*, estuvo asociado a un incremento paralelo en el contenido

celular de su componente secretorio. En el fluido intestinal, los anticuerpos de la sIgA se unen a los antígenos virales y bacterianos, reduciendo el número de antígenos que buscan atravesar el epitelio. Así, *S. boulardii*, ejerce un efecto sobre la membrana de borde de cepillo, pues con el incremento de sIgA se impide la proliferación de microorganismos patógenos.

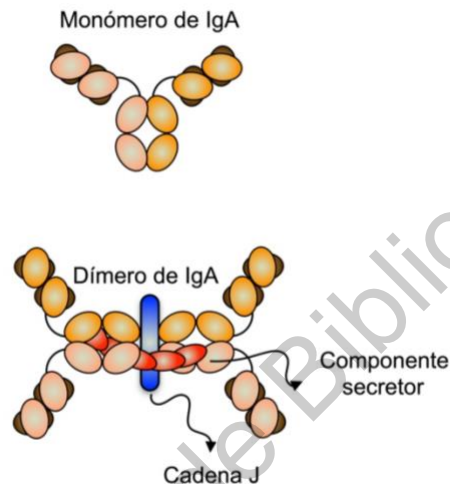


Figura 14. Modelo esquemático de una inmunoglobulina A en su forma monomérica y dimerizada con su cadena J y el componente secretorio. Adaptado de Bekema y van Egmond, 2011.

Por otro lado, Rodrigues *et al.* (2000) indican en su trabajo, que a pesar de que no existan alteraciones histológicas en la mucosa del intestino, la presencia de *S. boulardii* incrementa los niveles de sIgA por gramo de contenido intestinal. De igual manera, la presencia de la levadura estimula la secreción de altos niveles de IgA dentro del lumen intestinal, provocando un efecto local, ya que se dispara la producción de IgA ligado a *S. boulardii* y así se incrementa la IgA secretoria (sIgA) al lumen intestinal (Figura 15). Además, concluyeron que posiblemente *S. boulardii* induce un incremento en la actividad de plasmocitos preexistentes en la lámina propia, provocando un aumento en la síntesis de sIgA.

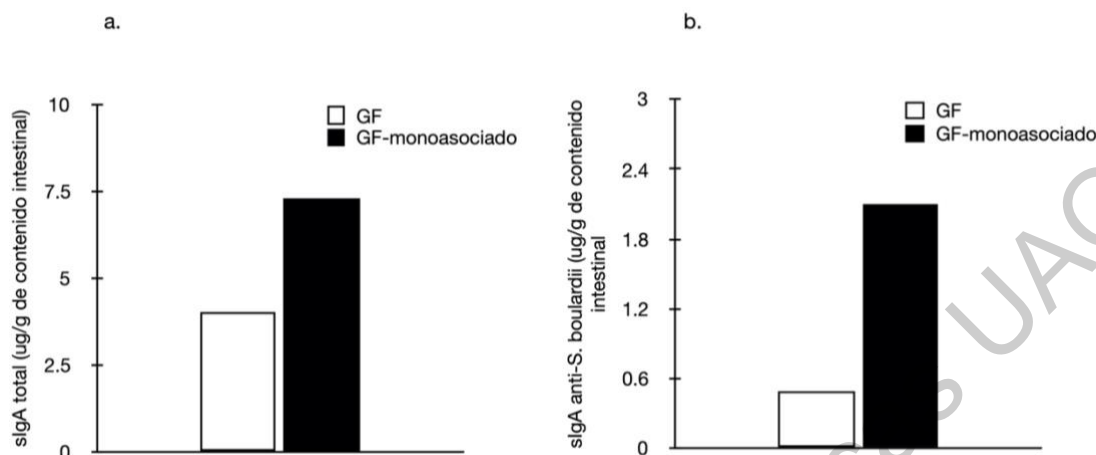


Figura 15. Niveles de sIgA total (a) y anti-*S. boulardii* (b) en el contenido del intestino delgado de ratones libres de gérmenes (GF) y libres de gérmenes solamente inoculados con *S. boulardii* (GF-mono-asociado). Adaptado de Rodrigues *et al.*, 2000.

Desde otro punto de vista *S. cerevisiae* y *S. boulardii* interfieren con las vías de transducción de señales mediadas por NF- κ B, la cual estimula la producción de citocinas proinflamatorias como IFN- γ , TNF- α e IL-1 (Dalmasso *et al.*, 2006; Sougioultzis *et al.*, 2006; Martins *et al.*, 2010).

Dalmasso *et al.* (2006) indican que las infecciones generadas por *Escherichia coli* enterohemorrágica estimula la síntesis de TNF- α , el cual está implicado en la apoptosis de células derivadas de carcinoma de colon (T84) y *S. boulardii* inducen una disminución de la producción de TNF- α inhibiendo la vía de señalización de NF- κ B, de igual manera se disminuye la apoptosis de células infectadas con *E. coli*. La apoptosis es mediada por muchas enzimas y vías de señalización que se activan por las caspasas, éstas son una familia de proteasas-cisteína que son parte de una cascada proteolítica que es activada por diversos estímulos apoptóticos, ya sea por dentro o por fuera de la célula.

Existen 2 vías de señalización, la primera es a través de la unión de los ligandos de los receptores de muerte que utilizan proteínas tal como la Fas asociada al dominio de la muerte (FADD) que induce el reclutamiento de las procaspasas 8 y 10. Los receptores de muerte mejor caracterizados son Fas (CD95) y TNFR1 (p55). La segunda vía de señalización requiere la liberación del citocromo c de la mitocondria al citosol; en este caso, la caspasa 9 se une a la proteasa activadora del factor-1 (Apaf-1) en el citocromo c y de manera dependiente de ATP iniciando el proceso auto-catalítico. Ambas vías activan la caspasa 3, lo que finalmente culmina en cambios de la membrana que incluye: asimetría de la membrana, cambios mitocondriales y fragmentación de DNA.

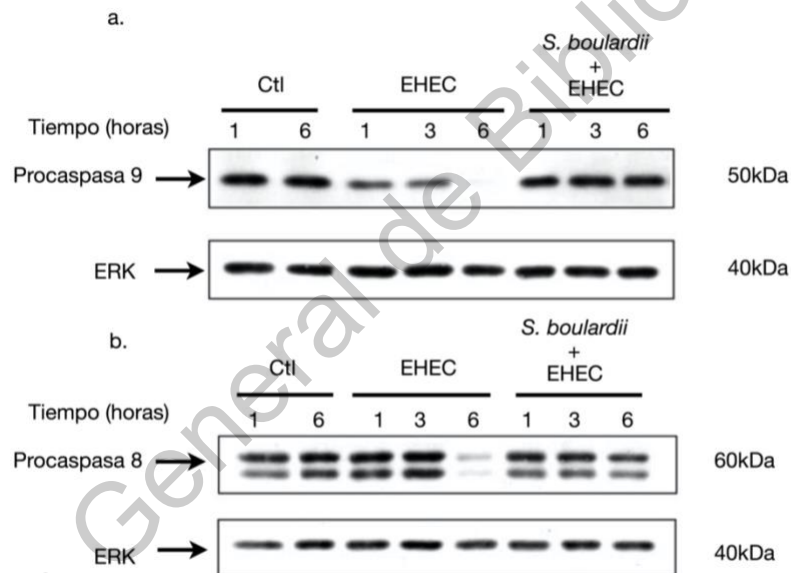


Figura 16. Análisis del desaparecimiento de procaspasa 9 (a) y procaspasa 8 (b) durante el curso de una infección por EHEC sola o con la pre-incubación con *S. bouardii*. Adaptado de Dalmaso *et al.*, 2006.

Dalmaso *et al.* (2006) observaron que aquellas células infectadas con *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y tratadas con *S. bouardii*, la cantidad de procaspasa 3

(proenzima inactiva de la caspasa 3, que es cortada en la célula apoptótica), no varió durante 6 horas, es decir que no hubo el proceso de apoptosis celular, ya que no se observó degradación del DNA, mientras que las células que fueron expuestas a *E.coli* presentaron degradación constante del DNA (Figura 16). De igual manera, la presencia de la levadura en células infectadas detiene la iniciación de la apoptosis en 2 niveles: tanto la ruta mitocondrial como la ruta extracelular mediada por receptores (no hay activación de procaspasa 8). Por otro lado, encontraron que TNF- α es funcional en las células T84 que contribuye a la inducción de la apoptosis en este tipo de células y cuando hay una infección por *E.coli*, la expresión de esta citocina se incrementa considerablemente después de 6 horas. Aquellas células que fueron pretratadas con *S. boulardii* mostraron una disminución significativa en la producción de TNF- α , lo cual sugiere que la levadura puede interferir con la vía de señalización que regula la expresión de TNF- α (Figura 17).

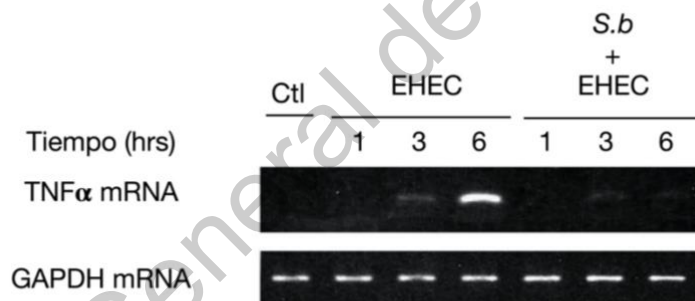


Figura 17. Cinética de la transcripción de TNF α . Adaptado de Dalmaso *et al.*, 2006

Otro estudio realizado por Sougioultzis *et al.* (2006) muestran que la levadura produce un factor soluble de bajo peso molecular (<1kDa) bloqueando la activación de NF- κ B, modulando así la expresión del gen IL-8 en las células epiteliales intestinales. Estos investigadores estimularon células con las citocinas proinflamatorias IL-1 β y TNF- α , y observaron que en presencia de *S. boulardii* se redujo significativamente la producción de IL-8. Posteriormente, basados en

estudios que evidencian que *S. bouardii* secreta proteínas de alto peso molecular (>50 kDa) y que poseen actividad biológica, estos investigadores filtraron la proteína que tenía alta actividad anti-inflamatoria, pues probaron que inhibía la expresión de IL-8 durante todo el periodo experimental, sin embargo, también observaron que aquellas células que eran pre-tratadas con *S. bouardii* y posteriormente utilizaban el sobrenadante que contenía la proteína, después de 8 horas, el efecto inhibitorio era reversible y la producción de IL-8 regresaba a los niveles del control (Figura 18).

Dirección General de Bibliotecas UNQ

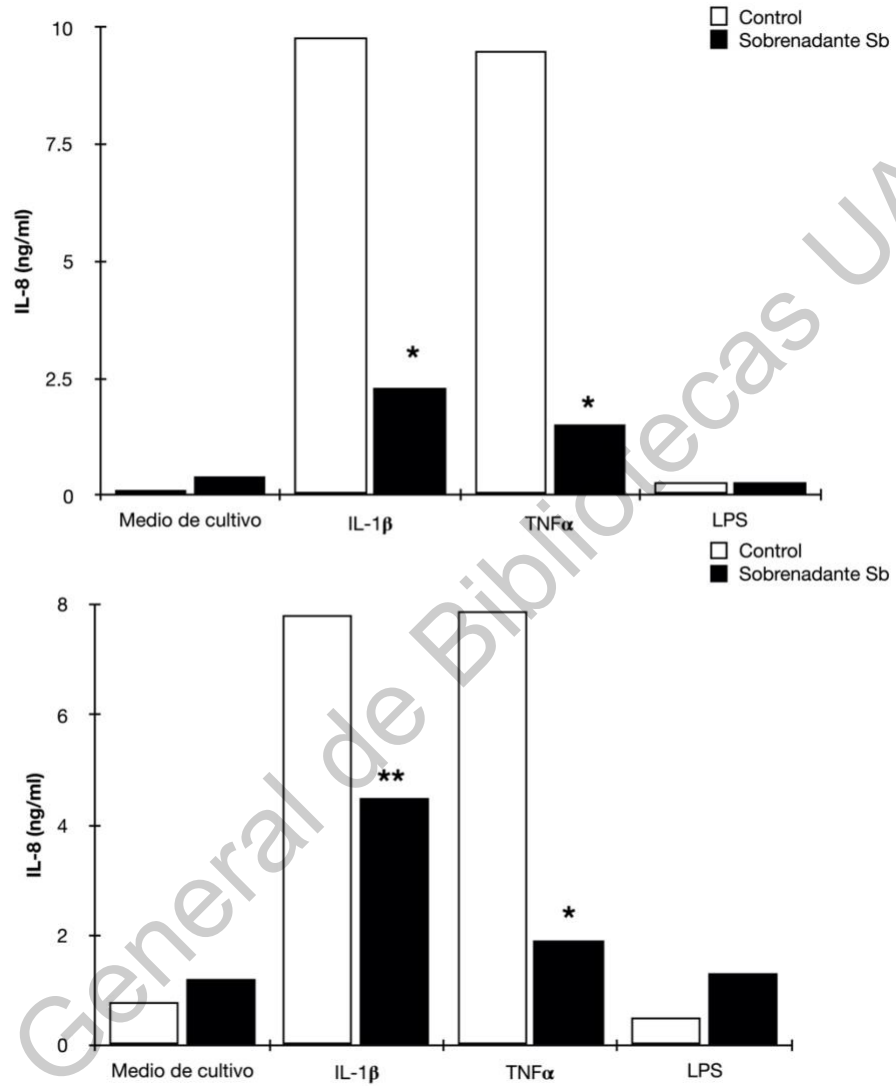


Figura 18. Inhibición de la secreción de IL-8 por el sobrenadante de *S. boulardii* en células HT-29 (a) y células AGS (b). Adaptado de Sougioultzis *et al.*, 2006

Con todo lo anterior, el primer regulador de la expresión de IL-8, es el factor de transcripción NF- κ B tanto en células epiteliales intestinales como en monocitos, así, estos investigadores, probaron que *S. boulardii* previene la degradación de I κ B α , por tanto, la levadura inhibe la producción de IL-8 reteniendo a NF- κ B en el citoplasma sin permitir su traslocación al núcleo para poder ejercer su acción (el sobrenadante de *S. boulardii* retiene la fracción p65 de NF- κ B en el citoplasma). Finalmente encontraron que la sustancia activa del factor antiinflamatorio de *Saccharomyces* (SAIF), con un peso <1kDa, es estable al calor y soluble en agua (Figura 19).

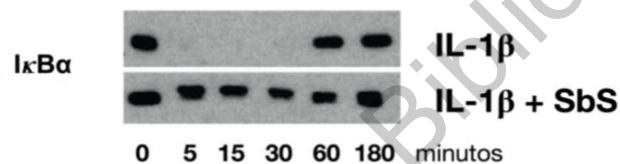


Figura 19. Inhibición de la degradación de I κ B α por parte del sobrenadante de *S. boulardii*. Adaptado de Sougioultzis *et al.*, 2006.

Zanello *et al.* (2011b) indican que las levaduras como probióticos proveen protección contra la inflamación intestinal inducida por enteropatógenos, entre ellos la *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), la función de *S. cerevisiae* es inhibir la expresión de los genes de TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-8, CXCL2 y CCL20, a partir de factores solubles de la levadura. La *E. coli* enterotoxigénica interactúa con las células epiteliales intestinales, colonizando el intestino delgado y secretando enterotoxinas lábiles al calor (LT), enterotoxinas estables al calor (STa y/o STb) y enterotoxina 1 enteroagregativa *E. coli* estable al calor (EAST1).

En cerdos, esta bacteria y sus enterotoxinas inducen inflamación intestinal y diarrea, resultando en un pobre crecimiento, aumento en la mortalidad y pérdidas económicas. La ETEC cepa F4+ induce una respuesta proinflamatoria en las células

epiteliales del intestino. Estos investigadores observaron que la administración de *S. cerevisiae* inhibe la expresión de TNF- α (Figura 20).

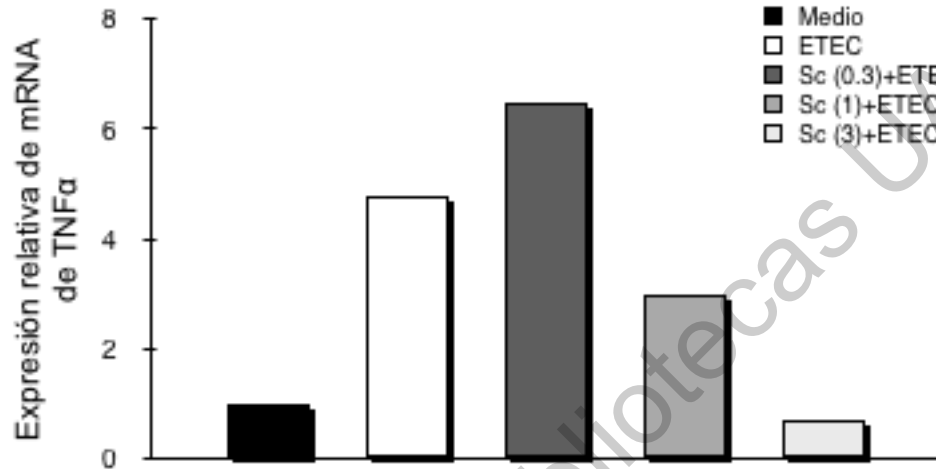


Figura 20. Efecto de *S. cerevisiae* sobre la expresión de TNF- α en células IPI-21. Adaptado de Zanello *et al.*, 2011b. Medio (medio de cultivo), ETEC: células IPI-21 cultivadas a las que se le agregó un co-cultivo de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (1×10^7 UFC/pozo), Sc (0.3)+ETEC: células IPI-21 a las que se les agregó un co-cultivo de ETEC y de *S. cerevisiae* 0.3×10^6 levaduras/pozo, Sc (1)+ETEC: células IPI-21 a las que se les agregó un co-cultivo de ETEC y de *S. cerevisiae* 1×10^6 levaduras/pozo, Sc (3)+ETEC: células IPI-21 a las que se les agregó un co-cultivo de ETEC y de *S. cerevisiae* 3×10^6 levaduras/pozo.

También observaron que, sí se administraba la levadura muerta, solo se mostraba inhibición en la expresión de IL-6 e IL-8, sugiriendo que el efecto fue probablemente debido a los β -glucanos que contiene la pared celular de *S. cerevisiae* (Figura 21).

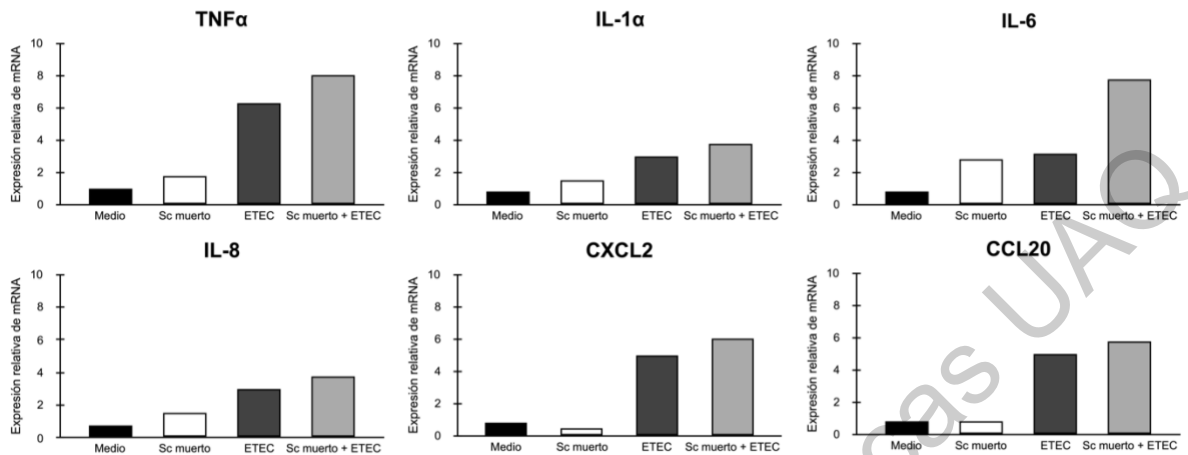


Figura 21. Efecto de la viabilidad de *S. cerevisiae* en la expresión de ARN mensajero de diferentes citocinas en células IPI-21 (*Saccharomyces cerevisiae* muerto: ScM; *E. coli* enterotóxica: ETEC). Adaptado de Zanello *et al.*, 2011.

Por otro lado, Zanello *et al.* (2011b), probaron el efecto inhibitorio del sobrenadante de la levadura, concluyendo que en efecto *S. cerevisiae* posee factores solubles <10 kDa que inhiben los niveles de expresión de IL-8, CCL20, IL-6, TNF- α , CXCL2 e IL-1 α . Esta regulación de citocinas proinflamatorias por parte de los factores solubles de *S. cerevisiae*, se da inhibiendo la vía de señalización MAPKs (ERK1/2) y/o la vía de NF- κ B.

Martins *et al.* (2010), reportaron que la incubación con *S. boulardii* antes de la infección con *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (ST), eliminó totalmente la invasión, esto a través de la inhibición de la síntesis de IL-8, restringiendo la activación de MAPKs ERK1/2, así como la activación de NF- κ B. La infección por *Salmonella* inicia con la adhesión y su propia internalización al epitelio intestinal a través de mecanismos especializados que envuelven a los factores de virulencia dentro de las células del huésped y un sistema de secreción de proteínas tipo III (TTSS). Ambos activan las cascadas de señalización del huésped que involucran los re-arreglos de actina del citoesqueleto, llevando a la internalización de la bacteria. Además, las vías de señalización inducidas por *Salmonella*, deja una

reorganización del citoesqueleto y de los plegamientos de la membrana, conduciendo a la internalización de la bacteria.

Salmonella dispara una respuesta para liberar mediadores inflamatorios, tal como la IL-8 que es la responsable del reclutamiento y migración transepitelial de leucocitos polimorfonucleares (una característica específica de la salmonelosis). Las grandes cantidades de IL-8 son generadas por la combinación de 3 mecanismos diferentes: activación de las vías de señalización del NF- κ B y JNK y la estabilización de la proteína quinasa mitógeno activador (p38), la cual es responsable del estímulo al estrés y está involucrada en la diferenciación celular, apoptosis y autofagia y se activa mediante la vía de señalización de las MAPKs. Al evaluar si la levadura protege contra la infección provocada por *Salmonella*, estos investigadores encontraron que *S. boulardii* disminuye el número de ST en las células, esto debido a que ST es una bacteria adherente y expresa fimbria tipo I, la cual tiene afinidad a *S. boulardii*; esta afinidad es mediada por los mananooligosacáridos presentes en la pared celular de la levadura, una vez la levadura atrae a la bacteria a su superficie, la poca presencia de ST, provocará una disminución o inhibición de las vías de señalización (Martins *et al.*, 2010; Stier y Bischoff, 2016).

De igual manera, las observaciones hechas a nivel intestinal en células T84, mostraron que la levadura protege activamente al epitelio y por tanto la función de la barrera intestinal durante la infección con ST. *S. boulardii* no afecta el crecimiento de *Salmonella*, a menos que la levadura sea aplicada como pre- tratamiento, donde se demuestra que la levadura puede interferir con la invasión de ST. Por otro lado, *Salmonella* induce una rápida activación de Rac1 GTPasa (importante para la remodelación del citoesqueleto durante las infecciones bacterianas) y observaron que un pretratamiento con *S. boulardii* interfería con la activación de Rac1 inducida por ST, provocando una interferencia en la internalización de *Salmonella* a la célula; mientras que, si se daba la levadura como protocolo curativo, no se veía el mismo efecto (Martins *et al.*, 2010; Stier y Bischoff, 2016).

La infección por ST incrementa la producción de IL-8, diversos tratamientos con *S. boulardii* han demostrado que, si la levadura se adiciona junto con ST, la producción de IL-8 disminuye considerablemente, pero, si se da un pretratamiento con *S. boulardii*, la producción de IL-8 es casi totalmente eliminada. Con esto como antecedente, los investigadores notaron que las células pretratadas con esta levadura y posteriormente infectadas con ST, disminuyeron la activación de ERK1/2 y JNK quinasa, observando una activación mucho menos pronunciada de p38 y desapareciendo pocas horas después. Para que lo anteriormente mencionado pueda darse, es necesario que la levadura dada en el pretratamiento esté viva, pues aquellas levaduras tratadas con calor o lavadas con PBS no muestran efecto alguno sobre la activación de las MAPKs. Finalmente, las células pretratadas con *S. boulardii* mostraron una disminución en la fosforilación de I κ B α , previniendo así la activación de NF- κ B y por ende la producción de IL-8 (Martins *et al.*, 2010; Stier y Bischoff, 2016) (Figura 22).

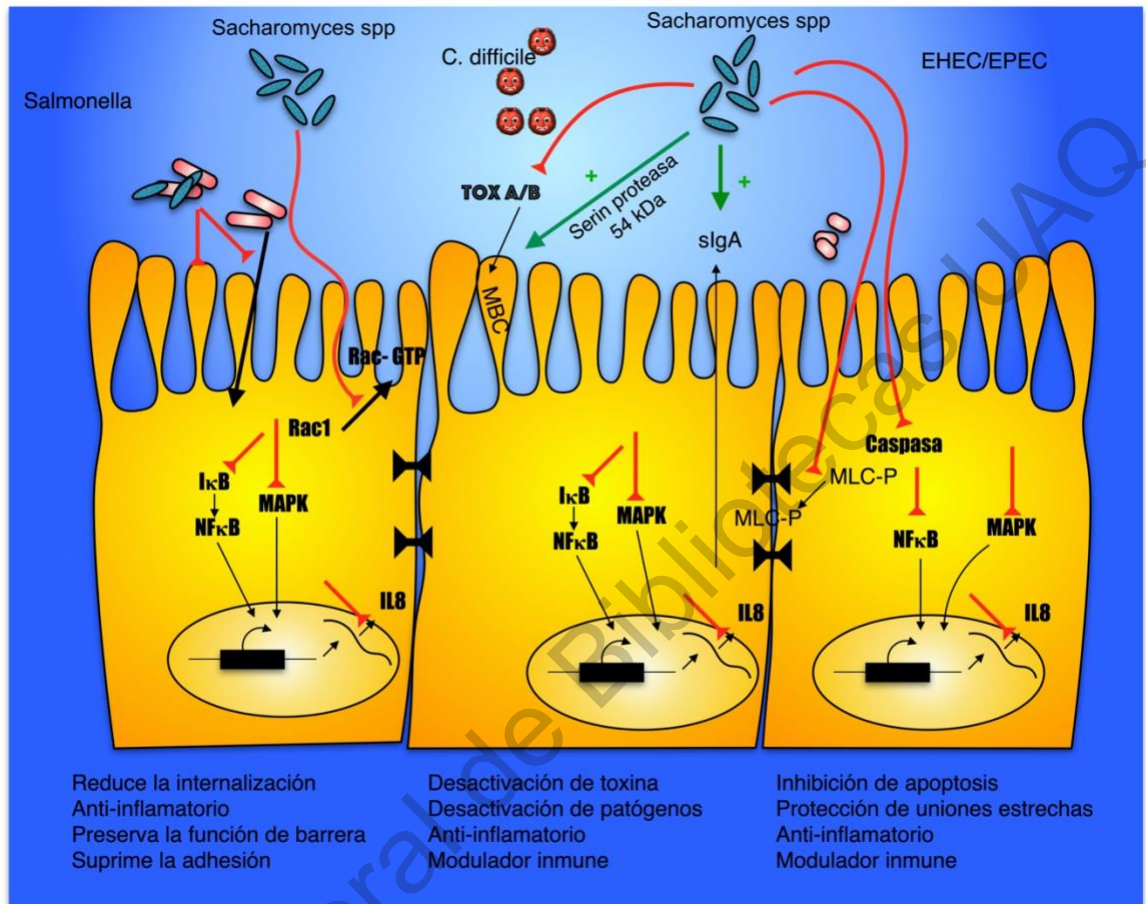


Figura 22. Efecto benéfico del *Saccharomyces* spp. a nivel intestinal. Adaptado de Stier y Bischoff, 2016.

Chen *et al.* (2006) encontraron que un factor soluble de *S. boulardii* bloquea la activación de la vía ERK1/2 y MAP quinasa, la cual típicamente estimula producción de IL-8, así como la necrosis celular en modelos de vellosidades de íleon en ratones infectados con *C. difficile*. Tanto la diarrea asociada al antibiótico como la colitis en humanos y animales, es causada por *C. difficile*; su mayor factor de virulencia es la toxina A, una proteína de 308 kDa; esta toxina activa las vías de señalización MAPKs ERK1/2 y p38, las cuales son requeridas para inducir la expresión de la IL-

8 así como la necrosis celular. Estos investigadores observaron que la presencia de *Saccharomyces* redujo significativamente la producción de IL-8 cuando las células epiteliales del colon fueron estimuladas con IL-1 o con la toxina A de *Clostridium* (Figura 23).

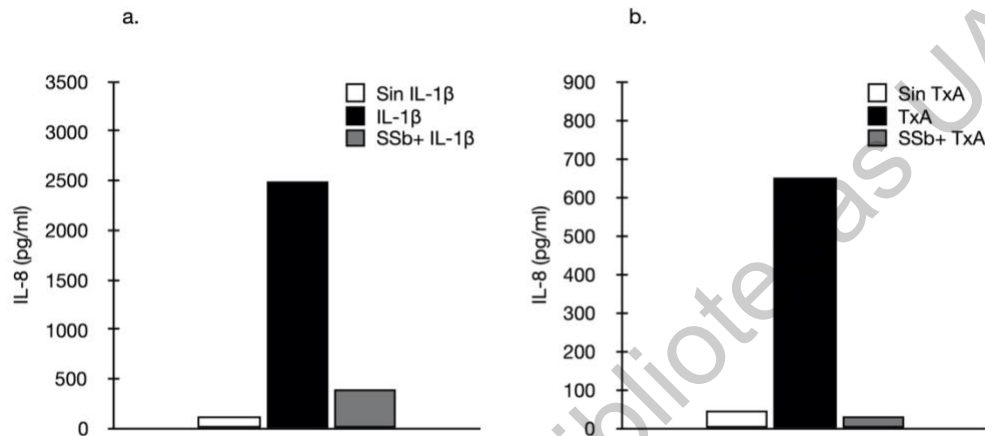


Figura 23. Efecto del sobrenadante de *S. boulardii* sobre la producción de IL-8 (pg/ml) debida a la estimulación de células NCM460 con IL1-β (a) o Toxina A de *C. difficile* (b). Adaptado de Chen *et al.*, 2006.

Por otro lado, la vía de señalización de las MAP quinasas regula la producción de citocinas en respuesta al estrés y por tanto es importante en la regulación de la producción de IL-8, Chen *et al.* (2006) observaron que en presencia del sobrenadante de *S. boulardii* hubo inhibición de la activación de ERK1/2, pero no mostró efectos evidentes sobre p38; así, la producción de la toxina A de *C. difficile* resultó inhibida pues el factor soluble de la levadura inhibió la fosforilación de MAPk (Figura 24).

También se ha descrito que la toxina A de *C. difficile* genera daños a nivel histológico en las células del íleon, provocando necrosis epitelial, congestión de la mucosa y edema e infiltración de neutrófilos, sin embargo, el pretratamiento de las células con *S. boulardii*, mostró una protección contra estos daños. Es así como estos

investigadores, concluyen que esta levadura funciona como probiótico, pues atenúa los eventos de señalización que regulan la inflamación intestinal del huésped.

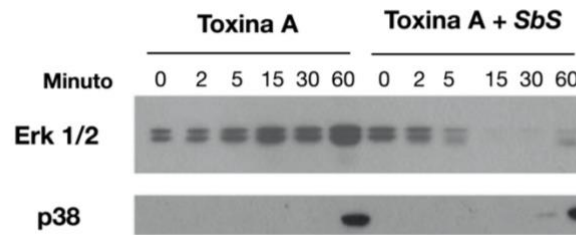


Figura 24. Inhibición de la transcripción de Erk 1/2 en colonocitos NCM460 por parte de la combinación de la toxina A de *C. difficile* y el sobrenadante de *S. boulardii*. Adaptado de Chen *et al.*, 2006.

Por otro lado, Zanello *et al.* (2011a), encontraron que *S. cerevisiae* desempeña múltiples efectos inmunomodulatorios en células epiteliales intestinales, así como también impide las infecciones de enteropatógenos intestinales, como *E. coli* enteropatógena (ETEC) inhibiendo la vía de señalización ERK1/2 sin permitir la expresión de IL-6 e IL-8 (Figura 25).

La característica de la patogenia de ETEC es la adhesión a las células epiteliales del intestino a través de adhesinas, las cuales interactúan con sus receptores específicos en la membrana del borde de cepillo. Una vez dentro del epitelio intestinal ETEC secreta sus toxinas, causando perturbación en las secreciones hidroelectrolíticas del intestino delgado, generando diarrea. La ETEC expresa la fimbria F4, la cual está involucrada en las diarreas neonatal y posdestete. Las infecciones por ETEC F4+ principalmente ocurren durante la primera semana posdestete en cerdos, expresando el receptor F4 en el borde de cepillo intestinal. Por otro lado, las células epiteliales (IEC) protegen al intestino a través de diferentes mecanismos tales como: la barrera intestinal, secreción de moco, síntesis de

péptidos antibacterianos y secreción de citocinas y quimiocinas. Las IEC detectan a los patógenos a través de los PAMP's (patrones moleculares asociados a patógenos) a través de sus receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) para luego secretar citocinas y quimiocinas que activan las cascadas de señalización proinflamatorias. Sin embargo, las respuestas inflamatorias inducidas por patógenos entéricos, pueden alterar la señalización de las IEC, ruptura en la integridad de la barrera intestinal y favorece traslocación de los patógenos. Por tanto, estas IEC son importantes para evaluar si *S. cerevisiae* tiene efectos positivos en estas células que son básicas para mantener la homeostasis intestinal (Zanello *et al.*, 2011a).

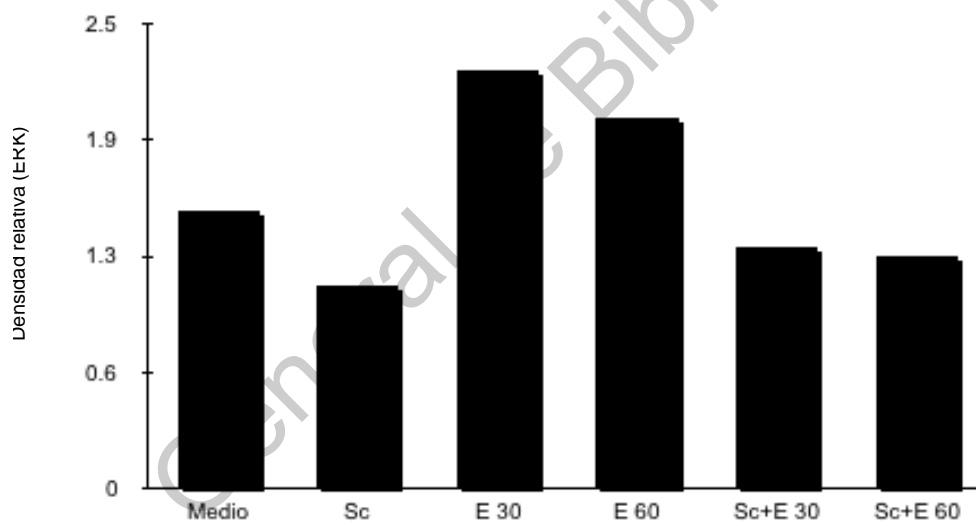


Figura 25. *S. cerevisiae* disminuye la fosforilación de la MAP quinasa (ERK1/2) en células diferenciadas IPEC-1. Adaptado de Zanello *et al.*, 2011a. Medio: medio de cultivo; Sc: *S. cerevisiae*; E30: cultivo de células IPEC-1 con ETEC durante 30 minutos; E60: cultivo de células IPEC-1 con ETEC durante 60 minutos; Sc+E30: cultivo de células IPEC-1 con ETEC y Sc durante 30 min; Sc+E60: cultivo de células IPEC-1 con ETEC y Sc durante 60 min.

Estos investigadores evaluaron la expresión de los genes y observaron que ETEC aumenta la expresión de citocinas proinflamatorias tales como: TNF- α , IL-1 α , IL-6, así como de las quimiocinas CCL20, CXCL2, IL-8, CXCL10 y CXCL12, al contrario de *S. cerevisiae* que incrementó la expresión de la quimiocina CCL25, del receptor nuclear antiinflamatorio PPAR- γ , y la mucina MUC1; de tal suerte, que ETEC y *S. cerevisiae* muestran diferentes efectos moduladores que involucran tanto respuestas inflamatorias como inmunes. Cuando las células fueron pretratadas con *S. cerevisiae*, observaron que la levadura inhibió significativamente la expresión de CCL20, CXCL10, CXCL2, IL-8 e IL-6, sin embargo, la levadura no tuvo efecto sobre TNF- α , IL-1 α y CXCL12. Más aun, indican que la levadura debe permanecer viva para ejercer un efecto positivo a través de sus factores solubles Zanello *et al.*, 2011a).

Zanello *et al.* (2011a) indican que *S. cerevisiae* disminuye la fosforilación de ERK1/2 y p38, por lo tanto, la levadura ejerce un efecto inhibitorio sobre la expresión de citocinas y quimiocinas. De acuerdo con lo observado en el experimento, *S. cerevisiae*, regula la expresión de CCL25, la cual está involucrada en el reclutamiento de células T y B en el intestino delgado y también incrementa la secreción de IgA en el intestino y, por ende, la levadura estimula la respuesta inmune de la mucosa intestinal. En cuanto al PPAR- γ (receptor de peroxisoma-proliferador-activado gamma) es un receptor nuclear expresado por las IEC y células dendríticas y es un regulador de la inflamación, en este estudio, los investigadores indican que *S. cerevisiae* puede mediar el efecto antiinflamatorio incrementando la expresión de PPAR- γ y éste disminuye los niveles de las citocinas proinflamatorias en IEC. Finalmente, Zanello *et al.* (2011a) observaron que la levadura posee características de adherencia y por lo tanto puede aglutinar a ETEC, disminuyendo así su población dentro del intestino.

También se ha indicado que esta levadura puede reducir la inflamación al aumentar la expresión de PPAR- γ , éste es un receptor nuclear expresado en varios tipos

celulares, entre ellos las células epiteliales del intestino y células dendríticas, entre otros. Actúa como un regulador de la inflamación y dado que *S. cerevisiae* puede regular su expresión, los ligandos de PPAR- γ inhiben la activación de NF- κ B atenuando su señalización y, por ende, la disminución en la expresión de citocinas proinflamatorias (Dubuquoy *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2009, Zanello *et al.*, 2009).

Lee *et al.* (2009) demuestran que *S. boulardii* es capaz de regular la expresión de PPAR- γ y de disminuir la expresión de IL-8 mediante el bloqueo del TNF- α a nivel de inactivación de la fosforilación de I κ B en la vía de señalización de NF- κ B. De igual manera, indican que *S. boulardii* reduce la inflamación del colon y regula la expresión de genes inflamatorios. La enfermedad inflamatoria del intestino es multifactorial con desordenes inflamatorios crónicos, donde la microbiota comensal del intestino desempeña un papel importante en el mantenimiento e inflamación. Se ha estudiado con anterioridad que la levadura *S. boulardii* ejerce un efecto antiinflamatorio, que, junto con otros receptores, tal como el PPAR- γ pueden ayudar a mejorar considerablemente la salud del hospedero. El PPAR- γ es un receptor nuclear que traduce varios estímulos en cambios de la expresión génica, PPAR- γ regula un amplio rango de funciones biológicas tales como: inflamación, inmunidad y diferenciación de las células epiteliales.

Los trabajos realizados con *S. boulardii* han demostrado que la levadura incrementa la expresión de PPAR- γ en células intestinales, sugiriendo que el efecto antiinflamatorio de la levadura puede estar asociado con la regulación en la expresión de PPAR- γ . En este trabajo se muestra que *S. boulardii* regula positivamente la expresión de PPAR- γ e inhibe la secreción de IL-8, aunado a una disminución de la inflamación intestinal, debido a una reducción en la expresión de citocinas proinflamatorias en ratas con colitis. Por un lado, estos investigadores observaron que, en efecto *S. boulardii* incrementa la expresión de PPAR- γ , sin embargo, este incremento está asociado a la dosis de levadura administrada (Lee *et al.*, 2009).

Seguendo con el estudio, la expresión de PPAR- γ se ve disminuida en presencia de TNF- α e IL-1 β , sin embargo, si las células son pretratadas con *S. boulardii*, hay una pobre regulación de PPAR- γ efectuada por las citocinas proinflamatorias. La expresión de IL-8 se ve aumentada por TNF- α e IL-1 β , al preincubar las células con la levadura, esta expresión se ve disminuida. Es así como se corrobora que PPAR- γ desempeña un papel importante en la regulación transcripcional de las citocinas proinflamatorias, una vez se administra la levadura a las células, se observa que *S. boulardii* sobre regula la expresión de PPAR- γ e inhibe la expresión de IL-8. Como se indicó anteriormente, TNF- α inhibe PPAR- γ , pero estimula la expresión de IL-8, sugiriendo que la cascada de señalización de NF- κ B juega un rol importante, pues dispara la activación de varias citocinas. La presencia de *S. boulardii* suprime fuertemente la traslocación de NF- κ B al núcleo y, por tanto, se inactiva la expresión de TNF- α , dejando así una sobre expresión de PPAR- γ y la inhibición de la expresión de IL-8. Los análisis histológicos muestran serias lesiones inflamatorias y úlceras en el colon; estos cambios inflamatorios están asociados a un incremento significativo en la longitud/peso del colon; todo esto debido a un aumento en la expresión de citocinas proinflamatorias (IL-6, IL-1 β , TNF- α e IL-12) que mantienen activa la inflamación. Es así, como los investigadores nos demuestran que aquellas células tratadas con *S. boulardii* suprime la expresión de los genes proinflamatorios, sugiriendo que la levadura posee una función claramente antiinflamatoria (Lee *et al.*, 2009).

Con base en los antecedentes descritos, sabemos que el medio ambiente gastrointestinal se ve altamente influenciado por estímulos externos, dentro de los cuales la dieta juega un papel fundamental. Todos los componentes de la morfofisiología intestinal interactúan entre sí con la finalidad de establecer un equilibrio en el medio ambiente que vaya a favor de la salud intestinal del hospedero, por lo que los factores dietéticos tienen la capacidad de modificar dicho entorno, favoreciendo o desfavoreciendo la salud intestinal.

3. Hipótesis

Los lechones recién destetados alimentados con dietas sin antibióticos sufren una inflamación intestinal aguda y presentan cambios en la morfología intestinal y diarreas, como consecuencia una disminución en el consumo de alimento y en la ganancia diaria de peso. Al suplementar las dietas con levaduras probióticas del género *Saccharomyces spp.* se reduce la inflamación intestinal, de tal manera que no se afectan las vellosidades intestinales, disminuyendo la diarrea y los lechones mejoran su consumo, logrando resultados similares a los observados al adicionar antibióticos a la dieta.

4. Objetivos

4.1. Objetivo General

Conocer los ajustes morfológicos e inmunológicos que sufren los lechones sometidos a las condiciones de estrés inherentes al destete, en respuesta a modificaciones en los componentes dietéticos aportados, con énfasis en la inclusión de probióticos del género *Saccharomyces spp.*

4.2. Objetivos particulares

En la ausencia y/o presencia de antibióticos y probióticos en dietas para lechones recién destetados, se evaluó su efecto sobre:

1. El comportamiento productivo.
2. La presencia y severidad de diarreas posdestete.
3. La morfología microscópica de la mucosa del íleon, en cuanto a la altura de las vellosidades y la profundidad de las criptas.
4. La concentración de citocinas proinflamatorias (NF- κ B, IL-6, TNF- α e IL12p40) en íleon.

5. Material y métodos

Se llevaron a cabo 2 experimentos en la granja experimental del CENID- Fisiología INIFAP Ajuchitlán, Colón, Querétaro. El protocolo experimental fue revisado y

aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (43FCN2016). Los animales utilizados durante el trabajo experimental fueron tratados bajo la NOM 062-ZOO-199 para la producción, cuidado y uso de los animales para experimentación (DOF, 2001) y bajo las indicaciones de la International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (CIOMS-ICLAS, 2012).

5.1. Experimentos

Experimento 1: Prueba de comportamiento

Se utilizaron 80 animales (Fertilis × Genetiporc®) destetados a los 19.8 ± 1.6 días, con un peso de 6.2 ± 0.8 kg, los cuales se dividieron en cuatro grupos, considerando la camada de origen y el peso corporal. Se les asignó 1 de 4 dietas: Dieta basal (control negativo, C-) (Cuadro 3); dieta basal con 0.05% de antibiótico (LincoSpectin: 2.2 g lincomicina, 2.2 g espectinomina. Zoetis®) (control positivo, C+); dieta basal con 0.8% de *Saccharomyces cerevisiae* (Yea-Sacc cepa 1026. Alltech®, dosis recomendada por el fabricante) (Sc); dieta basal con 0.1% de *Saccharomyces boulardii* (Levucell SB, CNCM I-1079. Lallemand Animal Nutrition, dosis recomendada por el fabricante) (Sb). Se balancearon los componentes de las dietas C+, Sc y Sb a expensas del maíz.

Los lechones fueron alojados en 4 corrales por grupo, habiendo 5 animales por corral, para al final tener 20 lechones por dieta experimental en una sala de destete con ambiente controlado (30 y 28°C, durante la primera y segunda semana posdestete, respectivamente) equipada con corrales de destete con bebederos de chupón y comederos con cinco bocas. Los animales tuvieron libre acceso al agua y fueron alimentados a las 8:00, 12:00 y 16:00 h. Al final de la semana se midió el rechazo y se calculó el consumo diario de alimento (CDA). Los animales se pesaron al final de cada semana (7 y 14 días posdestete), con la finalidad de calcular la ganancia diaria de peso (GDP) y la eficiencia alimenticia (EA). Diariamente se revisaron los corrales por la mañana para evaluar las diarreas.

La severidad de diarrea se midió con base a una evaluación visual de la consistencia fecal (Ball y Aherne, 1987), con una escala de 0 a 3, en donde: 3 describe una diarrea severa, muy líquida; 2 diarrea moderada, semi-líquida; 1 diarrea ligera, pastosa; y 0 indica la no existencia de diarrea. La calificación diaria por corral fue sumada en cada semana y en el total del periodo experimental, para calcular la severidad. La presencia se midió en función del número de días en que la diarrea fue observada en cada corral.

Cuadro 3. Ingredientes y composición química de la dieta basal, porcentaje en base alimenticia

Ingredientes	%	Composición química	
Maíz	47.05	Materia seca (%) ϵ	89.50
Pasta de soya	15.00	Proteína cruda(%) ϵ	21.80
H. de pescado Menhaden	9.23	FDN (%) ϵ	12.30
Suero de leche	24.69	EM (kcal·kg ⁻¹) \dagger	3,300
Aceite de maíz	1.49		
Lisina	0.25		
Aminogut*	0.80		
Treonina	0.10		
Triptófano	0.05		
Fosfato dicálcico	0.90		
Vitaminas	0.08		
Minerales	0.12		
Biocolina	0.04		
Gustor**	0.20		

*Aminogut: L-glutamina y L-ácido glutámico (1:1), (Ajinomoto®, Japón)

**Gustor: butirato de sodio (Norel®, España)

ϵ : Valor analizado

\dagger EM: Energía Metabolizable, calculada

Experimento 2: Prueba inmunológica

Se utilizaron 40 animales (Fertilis × Genetiporc®) destetados a los 20 ± 1.6 días, con un peso de 6.5 ± 0.8 kg, fueron divididos en cuatro grupos. Los lechones fueron alojados en una sala de destete con ambiente controlado (30 y 28°C, durante la primera y segunda semana posdestete, respectivamente) equipada con corrales de destete con bebederos de chupón y comederos con cinco bocas. Los animales tuvieron libre acceso al agua y fueron alimentados a las 8:00, 12:00 y 16:00 h diariamente y fueron asignados a las mismas dietas del experimento 1. Los lechones fueron alojados en 2 corrales por dieta (5 cerdos por corral), teniendo 10 lechones por dieta experimental. Los animales fueron pesados al destete (P0), a los 7 y 14 días posdestete (P7 y P14, respectivamente). La ganancia diaria de peso (GDP) fue calculada durante 7 días en ambos grupos de animales, por tratamiento (0-7 días y 7-14 días posdestete) (Figura 26).

5.2. Eutanasia y muestreo

Para el experimento 2, se sacrificaron 5 lechones por grupo a los 7 y 14 días posdestete. Los animales fueron tranquilizados con azaperona (Sural®, Chinoín, México) administrado a 20 mg/kg de peso y después eutanasiados con una sobredosis de pentobarbital sódico (Pisabental®, PiSA Agropecuaria, México). La sección del tejido del íleon (10 cm) fue colectado 5 cm antes de la válvula ileocecal, lavada gentilmente con agua destilada y luego fijada en una solución de formol neutralizado al 10%. Posteriormente, las secciones del íleon fueron embebidas en parafina y cortadas en laminillas con un grosor de 5 μm . La mitad de estas laminillas fueron teñidas con hematoxilina y eosina. Diez vellosidades fueron utilizadas para determinar el promedio de la altura de las vellosidades (del ápice a la base de la vellosidad) y la profundidad de las criptas (de la base de la vellosidad hasta el fondo de la cripta) (Nabuurs *et al.*, 1993; Makkink *et al.*, 1994) y fueron medidas con un microscopio óptico usando el objetivo 10× (Primo Star, Carl Zeiss, Alemania) y analizadas con el software ZEN (Carl Zeiss, Alemania).

Las demás laminillas fueron utilizadas para cuantificar NF- κ B, IL-6, TNF- α e IL12p40 mediante la técnica de inmunofluorescencia. Las laminillas con el tejido ileal fueron desparafinadas por 2 h a 60°C en una estufa con calor seco y luego rehidratadas en el siguiente orden: xilol al 100% (10 min), etanol al 100% (5 min), etanol al 96% (5 min), etanol al 80% (5 min) y agua desionizada (10 min). Las laminillas fueron humedecidas en solución salina buffer citrato de sodio concentrado 1 \times (Sigma-Aldrich, USA) en un baño de agua a 80°C por 25 min. Posteriormente, las laminillas fueron bloqueadas con leche descremada al 1% durante 1 h, lavada 3 veces durante 5 min con solución salina Tween- TRIS (TBST) e incubada 2 h a 4°C con los siguientes anticuerpos: a) rabbit anti NKIRAS2 (MBS 631230) (Mybiosource, San Diego, CA, USA) a una dilución 1:50; b) rabbit anti TNF- α (ab 6671) (Abcam, Cambridge, MA, USA) a una dilución 1:200; c) rabbit anti IL-12p40 (ab 106270) (Abcam, Cambridge, MA, USA) a una dilución 1:100; y d) rabbit anti IL-6 (ab 6672) (Abcam, Cambridge, MA, USA) a una dilución 1:400, las cuales fueron incubadas durante 16 h. Las laminillas fueron lavadas 3 veces durante 5 min con el buffer TBST al 0.05% e incubadas durante 2 h con el anticuerpo secundario Alexa Fluor 488 chicken anti-rabbit IgG (H+L) (A-21441) (Invitrogen Molecular Probes Inc., Eugene, OR, USA) a una dilución 1:500.

Las intensidades de la fluorescencia (unidades arbitrarias de fluorescencia, UAF) fueron evaluadas con los controles positivos (aquellas laminillas que contienen anticuerpos primarios y secundarios) y los controles negativos (sólo con anticuerpo secundario), considerando las mismas áreas en el tejido endotelial en ambas situaciones (Rivera-Zavala *et al.*, 2017). Para el análisis, se tomaron fotos con el objetivo 40 \times de 10 vellosidades intestinales por lechón (Olympus CX31, Tokyo, Japón). Finalmente, 10 secciones de cada vellosidad intestinal, fueron seleccionadas por foto, para obtener 100 mediciones por cerdo. La fluorescencia fue visualizada y medida con un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E600,

Minato, Japan) con el software ImagePro Plus versión 6.1 (Media Cybernetics, USA).

5.3. Análisis estadístico

Para el experimento 1, el comportamiento fue analizado con un diseño completamente al azar, mientras que para las diarreas se utilizó un diseño de medidas repetidas en el tiempo. En ambos casos, el corral fue la unidad experimental.

Para el experimento 2, el peso corporal a los 0 y 7 días posdestete ($n=10$ /dieta) y a los 14 días posdestete ($n=5$ /dieta), la ganancia diaria de peso (GDP) en la primera semana ($n=10$) y durante la segunda semana ($n=5$) fueron analizadas usando un diseño completamente al azar y el corral fue la unidad experimental. Para la altura de las vellosidades, profundidad de criptas y concentración de marcadores de inflamación ($n=5$ / por dieta para los 7 y 14 días posdestete) se analizaron con un diseño completamente al azar y la unidad experimental fue el lechón.

Las diferencias entre las dietas se analizaron mediante ANOVA. Las medias fueron comparadas utilizando la prueba SNK y las diferencias fueron consideradas estadísticamente diferentes con una $P<0.05$, utilizando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS; 1994).

6. Resultados

Experimento 1:

En el Cuadro 4 se muestran los resultados del comportamiento productivo, donde no se observaron diferencias significativas debidas a las dietas ($P<0.05$).

Cuadro 4. Efecto de las diferentes dietas experimentales sobre el comportamiento productivo.

	Dietas				P	EEM
	C+	Sc	Sb	C-		
CDA1	129.5	112.3	97.9	117.8	NS	6.98
CDA2	307.7	203.0	212.9	247.6	NS	16.69
CDAT	218.6	157.6	155.5	182.7	NS	11.34
GDP1	21.4	-12.9	-38.6	-7.9	NS	11.41
GDP2	224.7	137.5	141.7	158.9	NS	15.72
GDPT	123.1	62.3	51.6	75.5	NS	12.22
EA1	0.16	-0.11	-0.39	-0.06	NS	0.09
EA2	0.73	0.67	0.66	0.64	NS	0.03
EAT	0.56	0.39	0.33	0.41	NS	0.04

C+: dieta con antibiótico; Sc: dieta con *Saccharomyces cerevisiae*; Sb: dieta con *Saccharomyces boulardii*; C-: dieta sin antibiótico y sin probiótico; CDA: consumo diario de alimento; GDP: ganancia diaria de peso; EA: eficiencia alimenticia; 1: semana 1; 2: semana 2; T: total de ambas semanas; P: significancia estadística; NS: no significativo; EEM: error estándar de la media.

En el Cuadro 5 se observa la influencia de las dietas sobre la incidencia y severidad de la diarrea. La presencia del antibiótico ejerció un control sobre la incidencia de la diarrea ($P < 0.05$). Mientras que los animales que consumieron las dietas con *S. cerevisiae* y sin probióticos ni antibióticos (Sc y C-) presentaron resultados intermedios en la incidencia de la diarrea que no permitieron diferenciarlos estadísticamente. Los animales alimentados con la dieta adicionada con *S. boulardii* presentaron la incidencia más alta ($P < 0.05$). La suplementación con antibióticos permitió una menor severidad de las diarreas, mientras que en los animales alimentados con las otras dietas se observó una mayor severidad ($P < 0.01$).

Cuadro 5. Efecto de las dietas experimentales sobre la incidencia y severidad de la diarrea.

	Dietas				P	EEM
	C+	Sc	Sb	C-		
Incidencia	5.3 _b	5.8 _{ab}	6 _a	5.6 _{ab}	0.036	0.078
Severidad	1.2 _b	1.9 _a	2 _a	1.9 _a	<0.01	0.070

C+: dieta con antibiótico; Sc: dieta con *Saccharomyces cerevisiae*; Sb: dieta con *Saccharomyces boulardii*; C-: dieta sin antibiótico y sin probiótico; P: significancia estadística; ab: diferentes literales en la misma fila indican diferencias significativas; EEM: error estándar de la media.

La incidencia y severidad de la diarrea a los 7 y 14 días posdestete se presentan en el Cuadro 6. Se observó un efecto sobre éstas debido a la edad. Al día 7 posdestete se observa que tanto la incidencia como la severidad son menores que al día 14 posdestete ($P < 0.01$).

Cuadro 6. Efecto de la edad posdestete sobre la incidencia y severidad de la diarrea.

	Edad		P	EEM
	Día 7	Día 14		
Incidencia	4.4 _b	6.9 _a	<0.001	0.078
Severidad	1.6 _b	2.0 _a	0.016	0.070

P: significancia estadística; ab: diferentes literales en la misma fila indican diferencias significativas; EEM: error estándar de la media.

Experimento 2:

En el Cuadro 7 se muestran los resultados del comportamiento productivo, donde no se observaron diferencias significativas debidas a las dietas ($P < 0.05$).

Cuadro 7. Efecto de las diferentes dietas experimentales sobre el comportamiento productivo.

	Dietas				P	EEM
	C+	Sc	Sb	C-		
CDA1	133.4 _a	114.4 _{ab}	95.6 _b	121.6 _a	0.02	2.47
CDA2	334.2 _a	231.0 _c	206.0 _d	237.8 _b	<0.001	0.01
CDAT	233.8 _a	172.7 _b	150.8 _c	179.7 _b	<0.001	1.23
GDP1	68.1	24.9	-7.9	22.9	NS	21.76
GDP2	300.9 _a	200.0 _c	211.4 _b	157.1 _d	<0.001	0.001
GDPT	184.5	112.5	101.8	90.0	NS	10.88
EA1	0.51	0.21	-0.08	0.18	NS	0.17
EA2	0.90 _b	0.86 _b	1.02 _a	0.66 _c	<0.001	0.01
EAT	0.78	0.88	0.67	0.50	NS	0.05

C+: dieta con antibiótico; Sc: dieta con *Saccharomyces cerevisiae*; Sb: dieta con *Saccharomyces boulardii*; C-: dieta sin antibiótico y sin probiótico; CDA: consumo diario de alimento; GDP: ganancia diaria de peso; EA: eficiencia alimenticia; 1: semana 1; 2: semana 2; T: total de ambas semanas; P: significancia estadística; NS: no significativo; EEM: error estándar de la media.

El peso de los lechones a los 0, 7 y 14 días posdestete y la ganancia diaria de peso durante la primera y segunda semana posdestete se muestran en la Figura 26. No se observaron diferencias al día 7 posdestete en el peso de los lechones, ni durante la primera semana posdestete en la GDP ($P>0.05$). Sin embargo, a los 14 días posdestete, los animales que consumieron la dieta C+ fueron los más pesados y la mejor GDP se observó durante la segunda semana posdestete ($P>0.001$).

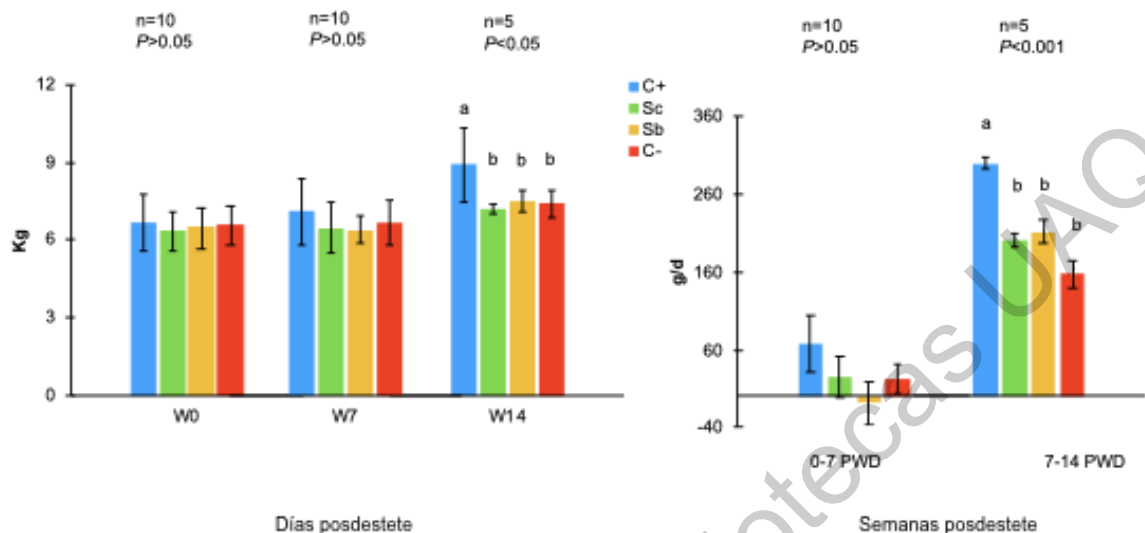


Figura 26. Peso al día 0, 7 y 14 posdestete (W0, W7, W14) y ganancia diaria de peso (GDP) a los 0-7 y 7-14 días posdestete en cerdos alimentados con diferentes dietas experimentales. a,b Barras con diferentes literales fueron significativamente diferentes ($P<0.05$).

6.1. Morfología intestinal

Al comparar la altura de las vellosidades de los animales que consumieron las distintas dietas se observaron diferencias significativas ($P<0.001$), los lechones que consumieron la dieta Sc presentaron una disminución del 13% con respecto al grupo C+. Los animales del grupo Sb presentaron un aumento del 7% comparado con el grupo C+, a pesar de que entre estos 2 grupos de animales no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, los individuos del grupo C- disminuyeron considerablemente un 46% el tamaño de las vellosidades con respecto al grupo C+ (Figura 27).

El grupo de animales que consumió la dieta Sc presentó una disminución en la altura de las vellosidades del 23% con respecto al grupo Sb (378 vs 465 μ). Cabe resaltar que los animales que consumieron la dieta sin probióticos presentaron las vellosidades más cortas, observando que los animales de los grupos Sc y Sb

tuvieron un 60 y 97% de incremento, respectivamente, en la altura de las vellosidades con respecto a los lechones que consumieron la dieta C- (Figura 27).

Al día 14 posdestete se observó una disminución de las vellosidades de las dietas Sc y C- (22 y 47%, respectivamente) con respecto a los animales que consumieron la dieta C+ ($P < 0.001$). En cuanto a los lechones del grupo Sb no se observaron diferencias significativas en la altura de las vellosidades comparadas con el grupo C+ (481 y 478 μ , respectivamente) (Figura 27).

En cuanto a los animales del grupo Sc, presentaron un comportamiento similar al día 7 con respecto a los lechones del grupo Sb, ya que los animales del primer grupo presentaron una disminución del 28% en la altura de las vellosidades con respecto a los lechones del grupo Sb. La altura de las vellosidades de los animales que consumieron la dieta C- presentaron las vellosidades más cortas comparadas con los grupos de lechones que consumieron las dietas Sc y Sb (253 vs 373 y 478 μ , respectivamente) (Figura 27).

Con respecto a la profundidad de las criptas a los 7 y 14 días posdestete, no se observaron diferencias significativas entre las dietas ($P > 0.05$).

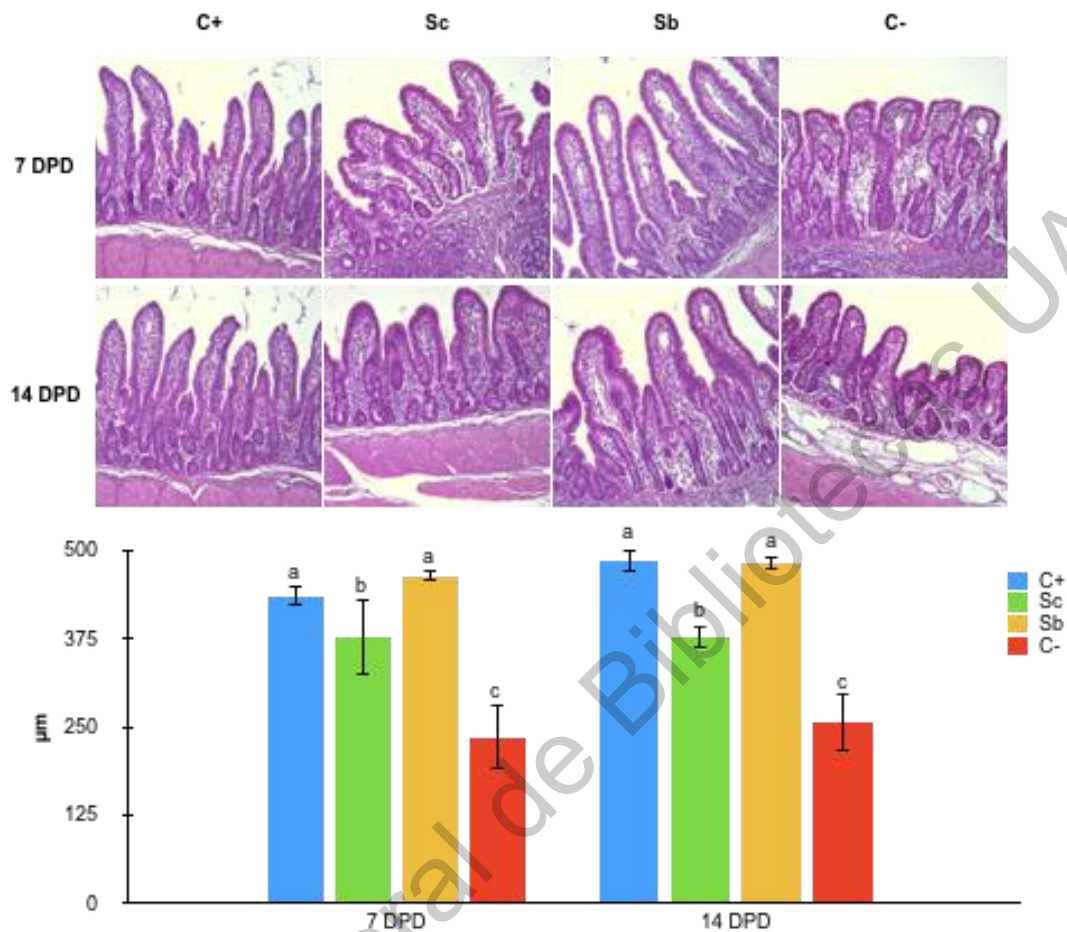


Figura 27. Altura de las vellosidades del íleon de lechones destetados alimentados con las diferentes dietas experimentales a los 7 y 14 días posdestete (DPD) mediante la tinción de hematoxilina y eosina. a,b,c Barras con diferentes literales son significativamente diferentes ($P < 0.05$).

6.2. Concentración de los marcadores de inflamación

Las concentraciones de NF- κ B, IL-6, TNF- α e IL-12p40 en las vellosidades del íleon de los lechones recién destetados, fueron afectadas por la dieta ($P < 0.001$), tanto a los 7 como a los 14 días posdestete (Figuras 28-31).

Los animales alimentados con la dieta C- (sin antibiótico y sin probióticos) tuvieron las más altas concentraciones en todos los marcadores de inflamación medidos. Los animales del grupo Sc mostraron valores intermedios, mientras que los grupos

suplementados con antibiótico (C+) o *S. boulardii* (Sc) tuvieron las menores concentraciones ($P < 0.001$).

NF- κ B

Al día 7 posdetete se observaron diferencias significativas debido a los tratamientos ($P < 0.001$), los animales que consumieron la dieta Sc presentaron un aumento del 216% con respecto a los lechones del grupo C+. Los animales del grupo Sb presentaron un aumento discreto del 28% comparado con los animales que consumieron la dieta C+. Los lechones que consumieron la dieta C- presentaron el mayor incremento en la concentración de NF- κ B, con un 554%.

Se observaron diferencias significativas entre los animales que consumieron las dietas Sc y Sb siendo la segunda la que presentó una disminución del 59% (2.34 vs 0.95 unidades arbitrarias de fluorescencia, UAF). De igual manera la presencia de probióticos en la dieta disminuyó considerablemente la concentración de NF- κ B en íleon, ya que al comparar las mediciones hechas en los animales que consumieron dietas sin probiótico ni antibiótico (C-) contra los que consumieron Sc se observó una disminución del 52% (4.84 vs 2.34 UAF), la presencia de *S. boulardii* disminuyó

un 80% la presencia de NF- κ B en íleon con respecto a los animales que consumieron la dieta C- (4.84 vs 0.95 UAF) (Figura 28).

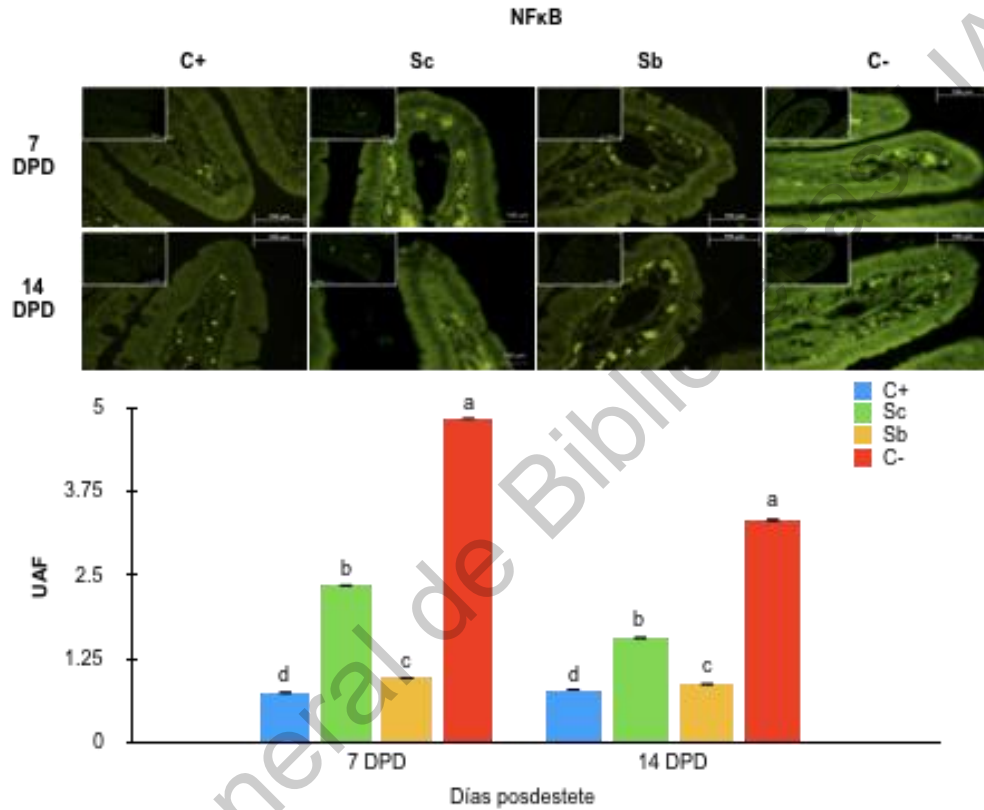


Figura 28. Concentración de NF- κ B en íleon de cerdos destetados alimentados con diferentes dietas experimentales a los 7 y 14 días posdestete (DPD). a,b,c,d Barras con diferentes literales son significativamente diferentes ($P < 0.001$).

El día 14 posdestete tuvo un comportamiento similar al observado al día 7 posdestete, obteniendo un incremento del 99,10 y 319% en la concentración de NF- κ B de los animales que consumieron las dietas Sc, Sb y C- con respecto a los lechones que se presentaban en el grupo C+. Sin embargo, la proporción en la cual se dio dicho incremento fue menor.

Al comparar la concentración de NF- κ B entre los animales que consumieron las dietas Sc y Sb se observó que la primera presentó un incremento del 90% (1.71 vs 0.95 UAF). De igual manera los animales que consumieron C- presentaron concentraciones mayores a las observadas en los animales que consumieron las dietas con Sc y Sb (3.60 vs 1.71 y 0.95 respectivamente) (Figura 28).

IL-6

Durante el día 7 posdestete, la concentración de IL-6 en el íleon, mostró un comportamiento significativamente diferente ($P < 0.001$), observando incremento en los animales que consumieron las dietas Sc, Sb y C- con respecto a los animales del grupo C+ (incrementos del 262, 62, 665% respectivamente) (Figura 29).

Al comparar la concentración de IL-6 entre los animales que consumieron las dietas Sc y Sb se observó una disminución del 55% de los lechones del grupo Sb (1.23 vs 0.55 UAF). La presencia de probióticos en la dieta también influyó sobre la concentración de IL-6 comparada con la que se observó en los animales que consumieron la dieta C-, con una disminución del 53% en el caso de Sc y de un 79% en el caso de Sb (2.6 vs 1.23 y 0.55 UAF respectivamente) (Figura 29).

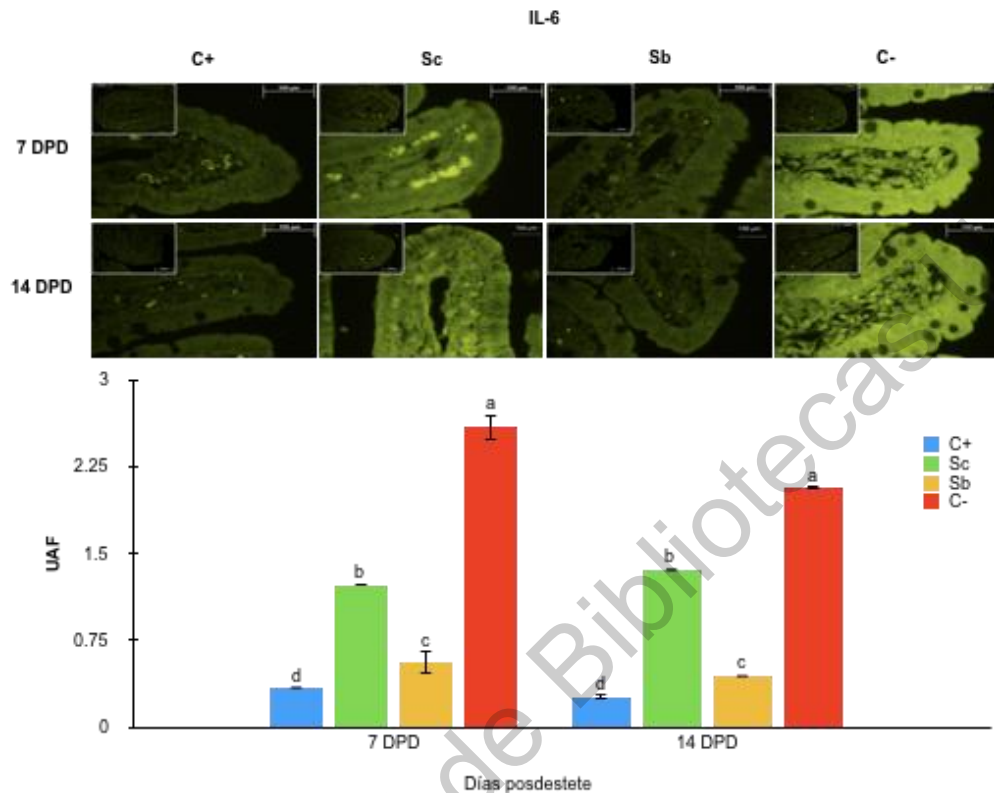


Figura 29. Concentración de IL-6 en íleon de cerdos destetados alimentados con diferentes dietas experimentales a los 7 y 14 días posdestete (DPD). a,b,c,d Barras con diferentes literales son significativamente diferentes ($P < 0.001$).

Al día 14 posdestete se vio un comportamiento similar observándose un incremento significativo en la concentración de IL-6 al comparar los animales que consumieron C+ (0.26 UAF) con los animales que consumieron las otras dietas (Sc, Sb, C- con un 423, 69, 708% respectivamente).

Al verificar entre los animales que consumieron Sc y Sb, los lechones del grupo Sb tuvieron una disminución del 68% en la concentración de IL-6 (1.36 vs 0.44 UAF). Finalmente, al comparar las concentraciones de IL-6 entre los animales que

consumieron C- y los que consumieron Sc y Sb también se observó una disminución del 35 y 79% (2.1 vs 1.36 y 0.44 respectivamente) (Figura 29).

TNF- α

Al día 7 posdestete se observó un comportamiento diferencial ($P < 0.001$) debido a los tratamientos. Al comparar la concentración de TNF- α de los animales del grupo C+ con el resto de los grupos, los animales que consumieron Sc y C- tuvieron un incremento del 50 y 224% respectivamente (1.93 vs 2.90 y 6.26 UAF). Sin embargo, la concentración de TNF- α en los lechones que consumieron la dieta Sb disminuyó un 6% con respecto a los que consumieron la dieta C+ (1.81 vs 1.93 UAF respectivamente) (Figura 30). Al comparar las concentraciones de TNF- α entre los animales que consumieron dietas con probióticos (Sc y Sb) se observó que los lechones alimentados con Sb presentaron una disminución del 38% (2.9 vs 1.81 UAF). Comparando las concentraciones de TNF- α entre los lechones alimentados con C- y aquellos que consumieron Sc y Sb se observó una disminución del 54% y 72% (6.26 vs 2.90 y 1.81 respectivamente) (Figura 30).

Al verificar las concentraciones de TNF- α entre los lechones del grupo C+ (1.75 UAF) y el resto de los animales al día 14 posdestete, se observó un incremento del 35% en los lechones que consumieron Sc (2.36 UAF), del 147% en los que consumieron C- (4.33 UAF), mientras que los lechones alimentados con Sb no presentaron diferencias significativas (1.76 UAF) ($P > 0.05$) (Figura 30).

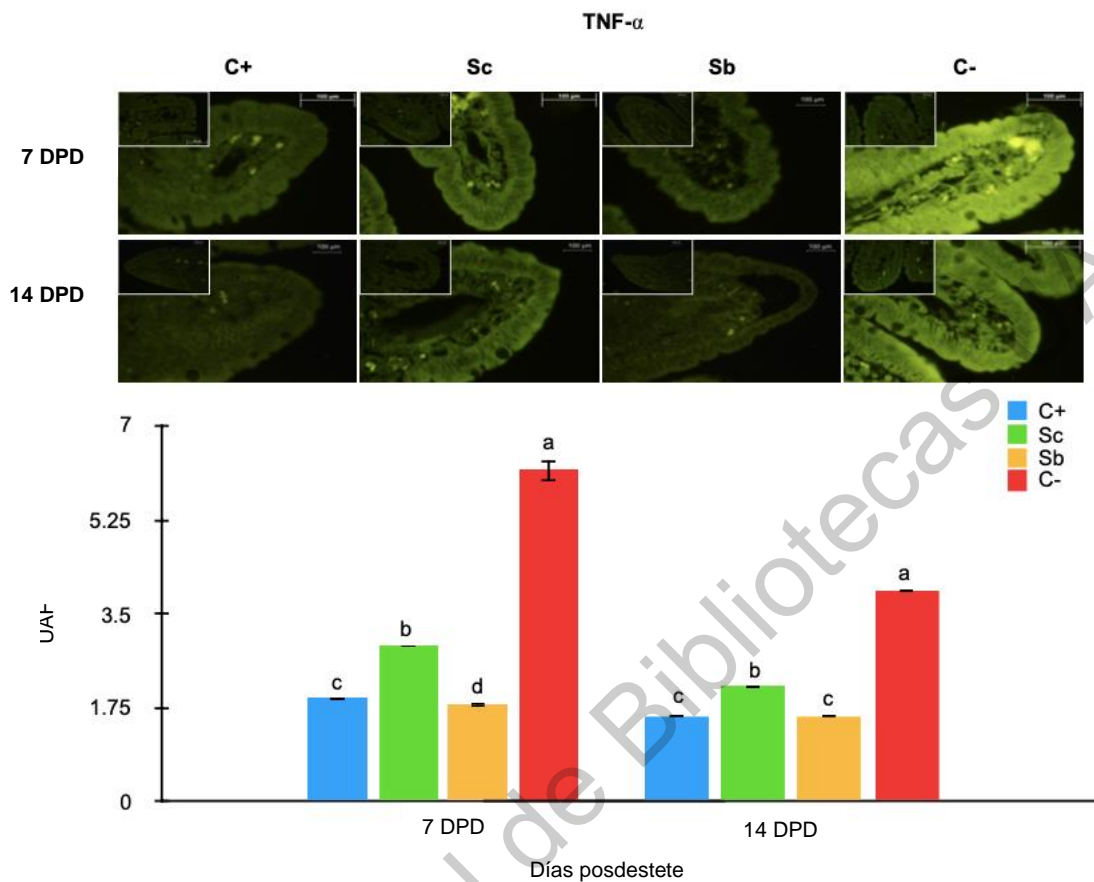


Figura 30. Concentración de $TNF-\alpha$ en íleon de cerdos destetados alimentados con diferentes dietas experimentales a los 7 y 14 días posdestete (DPD). a,b,c,d Barras con diferentes literales son significativamente diferentes ($P < 0.001$).

Comparando los datos de los animales alimentados con Sc y Sb se observó una disminución del 25% en las concentraciones de $TNF-\alpha$ en íleon del grupo Sb (2.36 vs 1.76 UAF). Comparando los lechones alimentados con C- con los que recibieron Sc y Sb en la dieta se observó una disminución del 46% y del 60% (4.33 vs 2.36 y 1.76 UAF respectivamente) (Figura 30).

IL-12p40

Al comparar las concentraciones de IL-12p40 en íleon de los lechones alimentados con la dieta C+ con el resto de los animales al día 7 posdestete, se observó un

incremento del 38% en los que consumieron Sc y del 132% en los alimentados con C- (12.8 vs 17.7 y 29.7 UAF respectivamente). Por otra parte, los lechones alimentados con Sb mostraron una disminución de 5% (12.8 vs 12.1 UAF).

Los animales del grupo Sb comparados con los animales alimentados con Sc, mostraron una disminución del 32% (17.7 vs 12.1 UAF). Finalmente, al comparar las concentraciones en íleon de IL-12p40 entre los animales que consumieron C- y los que tenían probióticos en la dieta (Sc y Sb) se observó una disminución del 40 y 59% (29.7 vs 17.7 y 12.1 UAF respectivamente) (Figura 31).

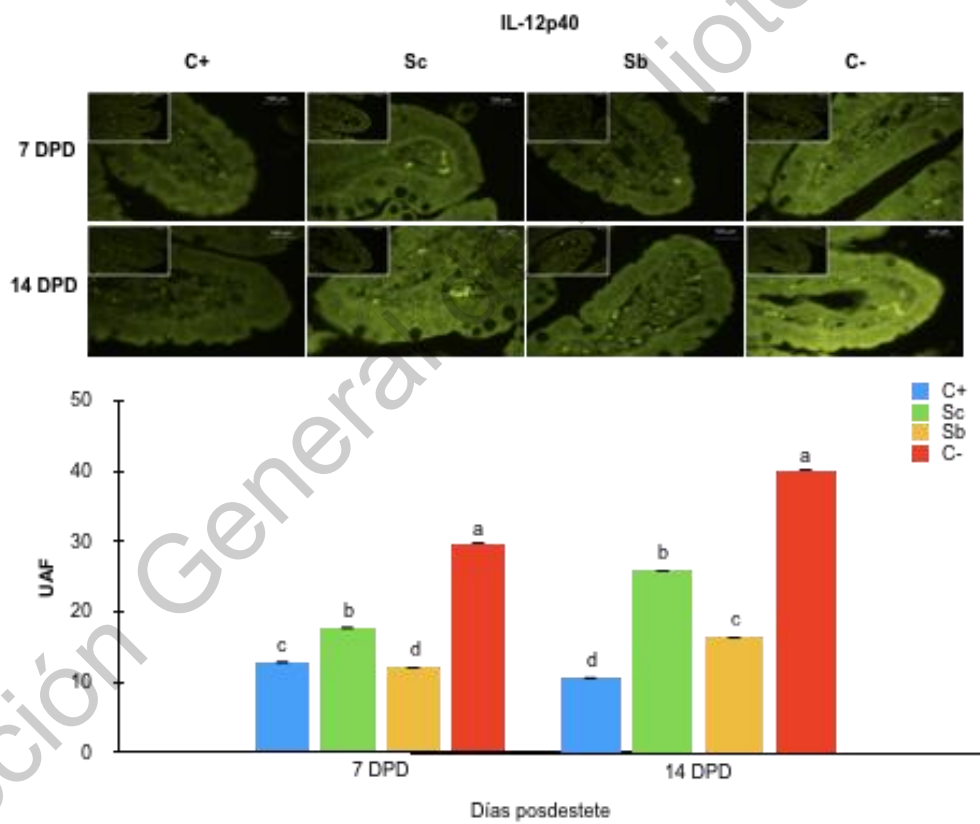


Figura 31. Concentración de IL-12p40 en íleon de cerdos destetados alimentados con diferentes dietas experimentales a los 7 y 14 días postdestete (DPD). a,b,c,d Barras con diferentes literales son significativamente diferentes ($P < 0.001$).

Al día 14 posdestete, las concentraciones de IL-12p40 de los lechones alimentados con la dieta Sc tuvieron un 143%, Sb con 53% y C- con 278% más que con aquellos animales del grupo C+ (26.0, 16.5 y 40.5 vs 10.7 UAF respectivamente). La concentración de IL-12p40 entre los animales que consumieron Sc y Sb disminuyó 35% en el grupo Sb (26.0 vs 16.5 UAF, respectivamente). Comparando la concentración de esta interleucina entre los animales que consumieron C- y las dietas con Sc y Sb se observó una disminución del 36% y 59% respectivamente (40.5 vs 26.0 UAF para Sc y 16.5 UAF para Sb) (Figura 31).

7. Discusión

Experimento 1:

En la prueba de comportamiento la falta de diferencias significativas tiene diversas explicaciones, una de ellas es que los animales tuvieron una ganancia de peso similar a pesar de la variación observada, la cual es normal durante esta etapa (primera semana posdestete) debido al consumo errático de alimento (Campbell *et al.*, 2013), el cual conlleva a que unos suban y otros bajen de peso. Posteriormente, durante la segunda semana posdestete se observa un incremento de peso en todos los animales debido al mayor consumo de alimento, puesto que los cerdos ya han podido adaptarse a la dieta. La ausencia de diferencias significativas entre nuestros grupos, probablemente fue debido a la variación observada entre los datos de cada tratamiento, posiblemente al incrementar el número de animales y de corrales experimentales, nos permita observar diferencias que nos ayuden a apreciar el efecto de nuestras dietas.

El objetivo de este primer experimento fue observar el efecto de las dietas suplementadas con dos diferentes levaduras vivas (*S. cerevisiae* y *S. boulardii*) sobre el comportamiento productivo, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las dietas. Existen discrepancias entre los resultados obtenidos al suplementar con *S. cerevisiae* en dietas iniciadoras para lechones, puesto que

algunos grupos de investigación han observado buenos resultados sobre el comportamiento productivo (Bontempo *et al.*, 2006, Shen *et al.*, 2009; Trckova *et al.*, 2014); mientras que otros no han obtenido los resultados esperados en el consumo de alimento y ganancia de peso (van Heugten *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 2015). van Heugten *et al.* (2003) mencionan que el uso de *S. cerevisiae* mejora el comportamiento productivo de los animales siempre y cuando se agreguen antimicrobianos promotores de crecimiento; mientras que Jiang *et al.* (2015) indican que la mejoría en el comportamiento productivo empleando *S. cerevisiae* se observa durante la tercera semana posdestete (15-21 días). Por otro lado, *S. boulardii* no ha sido empleado en experimentos que evalúen el comportamiento productivo de lechones recién destetados, sin embargo, de acuerdo con los datos observados en el presente estudio se puede inferir que al no observarse diferencias significativas entre los grupos de animales que consumieron ambas levaduras, estas tienen un efecto similar. Entonces, las diferencias con los datos observados en la literatura, pueden ser debidas al tipo de levaduras empleadas, dosis, duración de la suplementación de las levaduras, composición de las dietas y condiciones sanitarias de la granja (Bontempo *et al.*, 2006; Trckova *et al.*, 2014).

En cuanto a la incidencia de diarrea, se presentaron diferencias entre los animales que consumieron la dieta con antibiótico (C+) con los animales suplementados con *S. boulardii* (Sb), siendo el segundo grupo el que presentó más días la diarrea, muy probablemente debido al estrés del destete al que estaban sometidos los lechones inhibiendo la acción del probiótico. Diversos autores han obtenido resultados opuestos, ya que la adición de la levadura viva ejerció un efecto positivo sobre las diarreas en los animales que la consumieron, disminuyendo su incidencia y severidad (Trckova *et al.*, 2014; Hancox *et al.*, 2015). Los animales del grupo C+ pudieron superar esta situación probablemente debido al antibiótico, tal como lo han sugerido algunos autores, pues el antibiótico al ser empleado como promotor de crecimiento inhibe a las bacterias patógenas y de esta manera se disminuye la incidencia y severidad de la diarrea (Cromwell, 2002; Gaskins *et al.*, 2002); tal como

se observó en los resultados del presente trabajo, donde la severidad de la diarrea fue menor en aquellos animales que consumieron la dieta con antibiótico, lo cual coincide con los resultados obtenidos por Trevisi *et al.* (2015). La edad posdestete influyó tanto a la incidencia como a la severidad de la diarrea, muy probablemente debido al incremento en el consumo, ya que esto supone una mayor presencia de alimento en el tracto gastrointestinal, lo cual implica un desafío digestivo permitiendo la mayor presencia de sustrato para la fermentación bacteriana lo que causa disturbios, observándose una mayor diarrea (Lallès *et al.*, 2007).

Experimento 2:

Durante este trabajo, el desempeño productivo de los animales estuvo dentro de los parámetros reportados en la granja experimental durante los 14 días posdestete (Escobar *et al.*, 2015; Reis de Souza *et al.*, 2019). Sin embargo, la pobre ganancia diaria de peso observada durante la primera semana posdestete, probablemente está relacionada con el estrés al cual los animales están expuestos debido a los cambios fisiológicos e inmunológicos que sufren (Campbell *et al.*, 2013). Este problema se acentuó en aquellos animales que consumieron las dietas libres de antibióticos (Sc, Sb, y C-). La reducción en el peso corporal puede atribuirse al bajo consumo de alimento observado después del destete, lo cual provocó un periodo temporal de desnutrición (Bruininx *et al.*, 2001; Campbell *et al.*, 2013).

Durante la segunda semana posdestete se observó un mejor consumo de alimento asociado al incremento en la ganancia de peso, muy probablemente debido a que los animales superaron los efectos detrimentales del destete, mejorando su estado de confort (Tao *et al.*, 2016). La mejor ganancia diaria de peso observada en los lechones que consumieron la dieta con antibiótico (C+) durante la segunda semana posdestete, fue probablemente debido al efecto promotor de crecimiento del antibiótico (Cromwell, 2002; Gaskins *et al.*, 2002). A pesar de que las levaduras no estimularon el crecimiento de los animales de manera similar al antibiótico durante

la segunda semana posdestete, los lechones del grupo Sb reaccionaron de manera positiva durante esta semana en comparación con la primera semana posdestete (Cuadro 7 y Figura 26). Sin embargo, es necesario realizar más estudios con un mayor número de animales que nos ayuden a corroborar los efectos de *S. boulardii* sobre el desempeño productivo de los lechones al destete.

Las citocinas juegan un papel muy importante en la respuesta inmune, pero también participan en el mantenimiento de la integridad tisular (Pié *et al.*, 2004). Al destete, se esperan cambios en las concentraciones de citocinas en el intestino debido a las abruptas modificaciones en los componentes del alimento, aunado a los factores estresantes durante esta etapa, acompañando importantes adaptaciones morfológicas y funcionales en el intestino.

La disbiosis en el medio ambiente intestinal causada por el cambio de alimentación durante el destete induce un proceso inflamatorio, dirigiendo al organismo a la activación del NF- κ B y a la subsecuente producción de citocinas proinflamatorias (Czerucka y Rampal, 2002; Lawrence, 2009; McFarland, 2010; Palma *et al.*, 2015); por lo tanto, la atrofia en las vellosidades puede observarse (Stein y Kil, 2006; Lallès *et al.*, 2007). Estos problemas se ven acentuados cuando los lechones recién destetados son alimentados con dietas libres de antibiótico. Los resultados de la presente investigación corroboran las observaciones anteriormente mencionadas con los animales del grupo C- (sin antibiótico y sin probióticos), presentando las concentraciones más elevadas en los marcadores de la inflamación.

El proceso inflamatorio también afectó la altura de las vellosidades, ya que los lechones alimentados con el tratamiento C- mostraron las vellosidades más atrofiadas tanto al día 7 como al 14 posdestete, tal como lo describieron Pié *et al.* (2004) y Nyachoti *et al.* (2006). Estos autores encontraron que el destete aunado a dietas sin antibiótico y sin probióticos generan una disbiosis intestinal, cambiando el ambiente y conduciendo a una respuesta inflamatoria que produce muerte celular

generando vellosidades atróficas. Esta atrofia también puede ser debido a un incremento en la apoptosis y en la disminución en el reemplazo de enterocitos dentro de las criptas (Jiang *et al.*, 2015).

Las dietas suplementadas con antibiótico o probióticos (C+, Sc y Sb), modulan la producción de los marcadores de la inflamación, los cuales se mantuvieron en bajas concentraciones (Liu *et al.*, 2018) y mejoraron la altura de las vellosidades. La disminución de las citocinas proinflamatorias debida a los antibióticos presentes en la dieta, fue confirmada por los datos obtenidos en los lechones alimentados con la dieta C+. El efecto supresor de los antibióticos sobre las poblaciones bacterianas en el tejido del íleon, probablemente inhibió las cascadas de señalización que inducen la liberación de NF- κ B, la cual fue ligeramente marcada por el anticuerpo primario usado durante la técnica de inmunofluorescencia (Figura 28). La concentración de IL-6 también disminuyó debido a que es necesaria la activación de NF- κ B para poder ser sintetizada (Saavedra *et al.*, 2011). Por otro lado, el antibiótico presente en la dieta C+, disminuyó la síntesis y concentración de IL-12p40, probablemente debido a la disminución del estímulo generado por las bacterias patógenas y a la inhibición de la vía de señalización mediada por JAK/STAT (Trinchieri *et al.*, 2003). Es así como las dietas suplementadas con antibióticos controlan la respuesta inflamatoria y protegen indirectamente la mucosa intestinal, disminuyendo los efectos detrimentales del destete sobre las vellosidades intestinales (Stein y Kil, 2006; Thacker, 2013). Las vellosidades más largas observadas en los lechones del grupo C+, corroboran que las dietas suplementadas con antibióticos protegen la mucosa, evitando la atrofia.

El control de los marcadores de la inflamación en la mucosa del íleon debido a *S. cerevisiae* fue la esperada, ya que es sabido que las dietas suplementadas con esta levadura modulan las cascadas de señalización, evitando la traslocación de NF- κ B al núcleo e inhibiendo la expresión de los genes involucrados en la síntesis de IL-6 y TNF- α (Martins *et al.*, 2011; Kiarie *et al.*, 2012). Con respecto a IL-12p40, *S.*

cerevisiae probablemente inhibió tanto el complejo NF- κ B como el JAK/STAT, evitando la síntesis de dicha citocina y por tanto, disminuyendo la inflamación (Figura 22). El control de la inflamación en el íleon debido a la acción de *S. cerevisiae* fue suficiente para evitar una atrofia elevada de las vellosidades tanto al día 7 como 14 posdestete. La presencia de esta levadura en el intestino, promueve la exclusión competitiva, la producción de ácidos grasos de cadena corta y la síntesis de factores de crecimiento conduce a condiciones menos agresivas para la mucosa intestinal, evitando la pérdida de células y favoreciendo a las vellosidades y a la integridad de la mucosa intestinal (Kiarie *et al.*, 2012). De esta manera, los animales que consumieron la dieta con antibiótico (C+) no presentaron atrofia de vellosidades debido al control ejercido por éste sobre el medio ambiente intestinal; mientras que los animales que no consumieron ni antibiótico ni probiótico (C-) carecieron de dicho control, presentando una disbiosis importante que afectó el tamaño de las vellosidades.

Los animales alimentados con *S. boulardii* (dieta Sb), mostraron concentraciones de los marcadores de la inflamación similares a los lechones que consumieron la dieta C+, con bajas concentraciones de NF- κ B e IL-6 a los 7 y 14 días posdestete. El efecto inmunomodulatorio a nivel intestinal de *S. boulardii* es debido a la inhibición de las cascadas de señalización, tales como NF- κ B, complejo JAK/STAT y MAPK (proteínas quinasas activadas por mitógenos), causando que esta levadura funcione como un "inmunobiótico" disminuyendo la síntesis de citocinas proinflamatorias (Pothoulakis, 2009; Martins *et al.*, 2013) (Figura 22). Estos hallazgos concuerdan con algunos previos (Sougioultzis *et al.*, 2006; Czerucka *et al.*, 2007), donde observaron una disminución en la expresión de TNF- α e IL-6 en animales que consumieron *S. boulardii*. Otro beneficio observado al adicionar esta levadura a la dieta libre de antibióticos, fue el control de la inflamación crónica, con un ligero incremento en la concentración de IL-12p40 a los 14 días posdestete, el cual fue 54%, 143% y 278% mayor en los animales que consumieron las dietas Sb, Sc y C-, respectivamente, comparado con los animales del grupo C+. La eficiencia de *S.*

boulardii observada durante este trabajo, controlando la inflamación intestinal aguda y crónica tuvo un efecto positivo sobre la morfología de las vellosidades, apreciándose que los animales alimentados con Sb tuvieron un efecto similar a aquellos lechones del grupo C+, indicando que *S. boulardii* es muy eficiente para preservar la integridad intestinal, tal como fue observado por otros autores (Bontempo *et al.*, 2006). Esto muy probablemente debido a la producción de poliaminas, las cuales favorecen a la renovación celular epitelial, a la diferenciación y maduración de los enterocitos, permitiendo una recuperación de las vellosidades intestinales (Budiño *et al.*, 2005; McFarland, 2010; Rajput *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2015).

Las diferencias observadas entre los lechones alimentados con las dietas Sc y Sb, pueden ser explicadas por el hecho de que *S. boulardii* es metabólica y fisiológicamente diferente a *S. cerevisiae*, resultando en un comportamiento distinto, particularmente en lo que se refiere a la resistencia a diferentes temperaturas y al estrés generado por el ambiente ácido del estómago, las cuales son características importantes para que un microorganismo funcione como probiótico, llegando al intestino delgado y ejerciendo su acción (Cuadro 1) (McFarland, 2010; Lukaszewicz, 2012). Adicionalmente, hay muchos factores que pueden influenciar en los efectos ejercidos por las levaduras, tales como: grosor de la pared celular, resistencia a los cambios de pH, viabilidad en el tracto gastrointestinal y la habilidad de competir con otros microorganismos intestinales, influenciando en la capacidad para poder ejercer su acción (Fietto *et al.*, 2004; Edwards-Ingram *et al.*, 2007; Hudson *et al.*, 2016)

8. Conclusiones

Los hallazgos encontrados durante esta investigación sugieren que la inclusión tanto de *S. cerevisiae* como *S. boulardii* a dietas libres de antibiótico, pueden ayudar a mejorar la salud intestinal de lechones recién destetados. El efecto del antibiótico

como promotor de crecimiento en lechones no fue igualado por las alternativas propuestas. No obstante, *S. boulardii* fue capaz de mantener una buena altura de las vellosidades y ayudó a disminuir la respuesta inflamatoria sobre los marcadores pro-inflamatorios medidos, presentando resultados similares a la dieta suplementada con antibióticos, ayudando a mejorar la función intestinal durante el destete, por lo que, tiene un alto potencial para ser empleada como un aditivo nutricional en dietas libres de antibiótico. Sin embargo, es necesario continuar con estudios con un mayor número de animales que nos permita comprender más a fondo sobre el desempeño zootécnico, así como dilucidar el mecanismo molecular fundamental para la regulación de la inmunidad intestinal y la función de *S. boulardii*.

9. Bibliografía

- Abdi K., Singh N.J., Spooner E., Kessler B.M., Radaev S., Lantz L., Xiao T.S., Matzinger P., Sun P.D., Ploegh H.L. 2014. Free IL-12p40 monomer is a polyfunctional adapter for generating novel IL-12-like heterodimers extracellularly. *J. Immunol.* 192:6028-6036.
- Anaya J.M. 2003. Descripción molecular del TNF- α . *Reumatología* 19:112-120.
- Ball R.O. Aherne F.X. 1987. Influence of dietary nutrient density, level of feed intake and weaning age on Young pigs. II. Apparent nutrient digestibility and incidence and severity of diarrhea. *Can. J. Anim. Sci.* 67:1105-1115.
- Bekema J.E., van Egmond M. 2011. Immunoglobulin A. A next generation of therapeutic antibodies? *mAbs.* 3:352-361.
- Biesiada G., Czepiel J., Ptak-Belowska A., Targosz A., Krzysiek-Maczka G., Strzalka M., Konturek S.J., Brzozowski T., Mach T. 2012. Expression and release leptin and proinflammatory cytokines in patients with ulcerative colitis and infectious diarrhea. *J. Physiol. Pharmacol.* 63:471-481.
- Bontempo V., Di Giancamillo A., Savoini G., Dell'Orto V., Domeneghini C. 2006. Live yeast dietary supplementation acts upon intestinal morpho-

functional aspects and growth in weanling piglets. Anim. Feed Sci. Technol. 129:224-236.

- Bruininx E.M., van der Peet- Schering C.M., Schrama J.W., Vereijken P.F., Vesseur P.C., Everts H., den Hartog L.A., Beynen A.C. 2001. Individually measured feed intake characteristics and growth performance of group-housed weanling pigs: effects of sex, initial body weight, and body weight distribution within groups. J. Anim. Sci. 79:301–308.
- Budiño F.E., Thomaz M.C., Kronka R.N., Nakaghi L.S.O., Tucci F.M., Fraga A.L., Scandolera A.J., Huaynate R.A.R. 2005. Effect of probiotic and prebiotic inclusion in weaned piglet diets on structure and ultra-structure of small intestine. Braz. Arch. Biol. Technol. 48:921-929.
- Buts J.P., Bernasconi P., Vaerman J.P., Dive C. 1990. Stimulation of secretory IgA and secretory component of immunoglobulins in the small intestine of rats treated with *Saccharomyces boulardii*. Dig. Dis. Sci. 35:251-256.
- Buts J.P., Bernasconi P., Van Craynest M-P., Maldague P., Di Meyer R. 1986. Response of human and rat small intestinal mucosa to oral administration of *Saccharomyces boulardii*. Pedr. Res. 20:192-196.
- Buts J.P., De Keyser N., De Raedemaeker L. 1994. *Saccharomyces boulardii* enhances rat intestinal enzyme expression by endoluminal release of polyamines. Pediatric Res. 36:522-527.
- Buts J.P., De Keyser N., Marandi S., Hermans D., Sokal E.M., Chae Y.H.E., Lambotte L., Chanteux H., Tulkens P.M. 1999. *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. Gut 45:89-96.
- Buts J.P., Dekeyser N., Stiltmant C., Delem E., Smets F., Sokal E. 2006. *Saccharomyces boulardii* produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits *Escherichia coli* endotoxin by dephosphorylation. Pedr. Res. 60:24-29.
- Campbell J.M., Crenshaw J.D., Polo J. 2013. The biological stress of early weaned piglets. J. Anim. Sci. Biotechnol. 4:19-22.

- Castagliuolo I., Lamont T., Nikulasson S.T., Pothoulakis C. 1996. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits *Clostridium difficile* toxin A effects in the rat ileum. *Infect. Immun.* 64:5225-5232.
- Castagliuolo I., Riegler M.F., Valenick L., Lamont T., Pothoulakis C. 1999. *Saccharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect. Immun.* 67:302-307.
- Chaucheyras-Durand F., Durand H. 2008. Probiotics in animal nutrition and health. *Benef. Microb.* 1:3-9.
- Chen G., Goeddel D.V. 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science* 296:634-636.
- Chen X., Kokkotou E.G., Mustafa N., Bhaskar K.R., Sougioultzis S., o'Brien M., Pothoulakis C., Kelly C.P. 2006. *Saccharomyces boulardii* inhibits ERK1/2 mitogen-activated protein kinase activation both *in vitro* and *in vivo* and protects against *Clostridium difficile* toxin A-induced enteritis. *J. Biol. Chem.* 281:24449-24454.
- Choudhari A., Shinde S., Ramteke B.N. 2008. Prebiotics and probiotics as health promoter. *Vet. World* 1:59-61.
- Choy E. 2004. Clinical experience with inhibition of interleukin-6. *Rheums. Dis. Clin. North Am.* 30: 405-415.
- Cooper A.M., Khader S.A. 2006. IL-12p40: an inherently agonistic cytokine. *Trends Immunol.* 28
- Council for International Organization of Medical Sciences and The International Council for Laboratory Animal Science. 2012. International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. CIOMS-ICLAS.
- Cranwell P.D. 1995. Development of the neonatal gut and enzyme systems. CAB International. 99-154.
- Cromwell G.L. 2002. Why and how antibiotics are used in swine production. *Anim. Biotechnol.* 13:7-27.

- Czerucka D., Piche T., Rampal P. 2007. Review article: yeast as probiotics- *Saccharomyces boulardii*. Aliment. Pharmacol. Ther. 26:767-778.
- Czerucka D., Rampal P. 2002. Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. Microbes and Infection 4:733-739.
- Dalmaso G., Loubat A., Dahan S., Calle G., Rampal P., Czerucka D. 2006. *Saccharomyces boulardii* prevents TNF- α induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells. Res. Microbiol. 157:456-465.
- Diario Oficial de la Federación. 2001. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México, D.F.
- Dirkzwager A., Veldman B., Bikker P. 2005. A nutritional approach for the prevention of post weaning syndrome in piglets. Anim. Res. 54:231-236.
- Dong G., Zhou A., Yang F., Chen K., Wang K., Dao D. 1996. Effect of dietary protein levels on the bacterial breakdown of protein in the large intestine, and diarrhoea in early weaned piglets. Acta Vet. Zootec. Sin. 27:293-302.
- Drummond R.A., Saijo S., Iwakura Y., Brown G.D. 2011. The role of Syk/CARD9 coupled C-type lectins in antifungal immunity. Eur. J. Immunol. 41:276-281.
- Dubuquoy L., Jansson E., Deeb S., Rakotobe S., Karqui M., Colombel J.F., Auwerx J., Pettersson S., Desreumaux P. 2003. Impaired expression of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in ulcerative colitis. Gastroenterology. 124:1265-1276.
- Edwards-Ingram L., Gitsham P., Burton N., Warhurst G., Clarke I., Hoyle D., Oliver S.G., Stateva L. 2007. Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 73:2458-2467.
- Elmer G.W., Martin S.W., Horner K.L., McFarland L.V., Levy R.H. 1999. Survival of *Saccharomyces boulardii* in the rat gastrointestinal tract and effects of dietary fiber. Microbiol. Ecol. Health Dis. 11:29-34

- Escobar K., Reis de Souza T.C., Mariscal G., Aguilera A., Bernal M.G., Gómez J.G. 2015. Microbial fermentation patterns, diarrhea incidence, and performance in weaned piglets fed a low protein diet supplemented with probiotics. *Food Nutr. Sci.* 5:1776-1786.
- FAO/OMS. Informe del grupo de trabajo FAO/OMS sobre el borrador de directrices para la evaluación de los probióticos en los alimentos. Londres, Ontario, Canadá, 30 de abril y 1 de mayo 2002.
- Feghali C.A., Wright T.M. 1997. Cytokines in acute and chronic inflammation. *Frontiers in Bioscience.* 2:12-26.
- Fernández-Jiménez N., Castellanos-Rubio A., Plaza-Izurieta L., Irastorza I., Elcoroaristizabel X., Jauregi-Miguel A., López-Euba T., Tutau C., de Pancorbo M., Vitoria J.C., Bilbao J.R. 2014. Coregulation and modulation of NF- κ B related genes in celiac-disease: uncovered aspects of gut mucosal inflammation. *Hum. Mol. Genet.* 23:1298-1310.
- Fietto J.L.R., Araújo R.S., Valadão F.N., Fietto L.G., Brandão R.L., Neves M.J., Gomes F.C.O., Nicoli J.R., Castro I.M. 2004. Molecular and physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Can. J. Microbiol.* 50:615-621.
- Figueroa V.J.L., Chi M.E., Cervantes R.M., Dominguez V.I. 2006. Alimentos funcionales para cerdos al destete. *Vet. Méx.* 37:117-136.
- Gabay C., Kushner I. 1999. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N. Engl. J. Med.* 340: 448-454.
- Gaskins H.R., Collier C.T., Anderson D.B. 2002. Antibiotics as growth promotants: mode of action. *Anim. Biotechnol.* 13:29-42.
- Generoso S., Viana M., Santos R., Martins F.S., Machado J.A.N., Arantes R.M.E., Nicoli J.R., Correia M.I.T.D., Cardoso V.N. 2010. *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 protects against bacterial translocation, preserves gut barrier integrity and stimulates the immune system in a murine intestinal obstruction model. *Arch. Microbiol.* 192:477-484.

- Ghosh S., Karin M. 2002. Missing pieces in the NF- κ B puzzle. *Cell*. 109 suppl:S81-96.
- Grivennikov S., Karin E., Terzic J., Mucida D., Yu G.Y., Vallabhapurapu S., Scheller J., Rose-John S., Cheroutre H., Eckmann L., Karin M. 2009. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*. 15:103-113.
- Hancox L.R., Le Bon M., Richards P.J., Guillou D., Dodd C.E.R., Mellits K.H. 2015. Animal. Effect of a single dose of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* on the occurrence of porcine neonatal diarrhoea. *Animal*. 9:1756-1758.
- Heo J.M., Opapeju F.O., Pluske J.R., Kim J.C., Hampson D.J., Nyachoti C.M. 2012. Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *J. Anim. Phys. Anim. Nutr.* 97:207-237
- Hudson L.E., McDemott C.D., Stewart T.P., Hudson W.H., Rios D., Fasken M.B., Corbett A.H., Lamb T.J. 2016. Characterization of the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* in the healthy mucosal immune system. *PloS ONE* 11:e0153351
- Jiang Z., Wei S., Wang Z., Zhu C., Hu S., Zheng C., Chen Z., Hu Y., Wang L., Ma X., Yang X. 2015. Effects of different forms of *Saccharomyces cerevisiae* on growth performance, intestinal development, and systemic immunity in early- weaned piglets. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6:47.
- Jones S.A. 2005. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J. Immunol.* 175:3463-3468.
- Kelesidis T., Pothoulakis C. 2012. Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders. *Ther. Adv. Gastroenterol.* 5:111-125.
- Kiarie E., Scott M., Krause D.O., Khazanehei H., Khafipour E., Nyachoti C.M. 2012. Interactions of *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product and in-

feed antibiotic on gastrointestinal and immunological responses in piglets challenged with *Escherichia coli* K88+1. J. Anim. Sci. 90:1-3.

- Klampfer L. 2011. Cytokines, inflammation and colon cancer. Curr. Cancer Drug Targets. 11:451-464.
- Klein S.M., Elmer G.W., McFarland L.V., Surawicz C.M., Levy R.H. 1993. Recovery and elimination of the biotherapeutic agent, *Saccharomyces boulardii*, in healthy human volunteers. Pharmac. Res. 10:1615-1619.
- Krammer M., Karbach U. 1993. Antidiarrheal action of the yeast *Saccharomyces boulardii* in the rat small and large intestine by stimulating chloride absorption, Z. Gastroenterol. 31:73-77.
- Lallès J.P., Bosi P., Smidt H., Stokes C.R. 2007. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. Proc. Nutr. Soc. 66:260-268.
- Lawrence T. 2009. The nuclear factor NF- κ B pathway in inflammation. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 1a001651.
- Lawrence T., Bebien M. 2007. IKK α in the regulation of inflammation and adaptative immunity. Biochem. Soc. Trans. 35:270-272.
- Lawrence T., Gilroy D.W., Colville-Nash P.R., Willoughby D.A. 2001. Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. Nat. Med 7:1291-1297.
- Lee S.K., Kim Y.W., Chi S.G. 2009. The effect of *Saccharomyces boulardii* on human colon cells and inflammation in rats with trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. Dig. Dis. Sci. 54:255-263.
- Liu Y., Espinosa C.D., Abelilla J.J., Casas G.A., Lagos L.V., Lee S.A., Kwon W.B., Mathai J.K., Navarro D.M.D.L., Jaworski N.W., Stein H.H. 2018. Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. Anim. Nutr. 4:113-125.
- Liu Y., Espinosa C.D., Abelilla J.J., Casas G.A., Lagos L.V., Lee S.A., Kwon W.B., Mathai J.K., Navarro D.M.D.L., Jaworski N.W., Stein H.H. 2018. Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. Anim. Nutr. 4:113-125.
- Lukaszewicz M. 2012. *Saccharomyces cerevisiae* var *boulardii*- Probiotic Yeast. INTECH. 385-398

- Makkink C.A., Negulescu G.P., Qin G., Verstegen M.W. 1994. Effect of dietary protein source on feed intake, growth, pancreatic enzyme activities and jejunal morphology in newly-weaned piglets. *Br. J. Nutr.* 72:353-368.
- Martins F., Nardi R., Arantes R.M.E., Rosa C., Neves M.J., Nicoli J.R. 2005. Screening of yeast as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and protect against enteropathogen challenge in mice. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 51:83-92.
- Martins F.S., Dalmaso G., Arantes R.M.E., Doye A., Lemichez E., Lagadec P., Imbert V., Peyron J.F., Rampal P., Nicoli J.R., Czerucka D. 2010. Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. *PLoS One* 5:e8925.
- Martins F.S., Elian S.D., Vieira A.T., Tiago F.C., Martins A.K., Silva F.C., Souza E.L., Sousa L.P., Araújo H.R., Pimenta P.F., Bonjardim C.A., Arantes R.M., Teixeira M.M., Nicoli J.R. 2011. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. *Int. J. Med. Microbiol.* 301:359-364.
- Martins F.S., Rodrigues A.C.P., Tiago F.C.P., Penna F.J., Rosa C.A., Arantes R.M.E., Nardi R.M.D., Neves M.J., Nicoli J.R. 2007. *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *J. Med. Microbiol.* 56:352-359.
- Martins F.S., Vieira A.T., Elian S.D.A., Arantes R.M.E., Tiago F.C.P., Sousa L.P., Araújo H.R.C., Pimenta P.F., Bonjardim C.A., Nicoli J.R., Teixeira M.M. 2013. Inhibition of tissue inflammation and bacterial translocation as one of the protective mechanisms of *Saccharomyces boulardii* against *Salmonella* infection mice. *Microbes Infect.* 15:270-279.

- McCracken B., Spurlock M.E., Roos M.A., Zuckermann F.A., Gaskins R. 1999. Weaning anorexia may contribute to local inflammation in the piglet small intestine. *Biochem. Mol. Act Nutr.* 129:613-619.
- McFarland L. 2010. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces cerevisiae boulardii* in adult patients. *World J. Gastroenterol.* 16:2202-2222.
- Mitsuyama K., Sata M., Rose-John S. 2006. Interleukin-6 trans-signaling in inflammatory bowel disease. *Cytokine & Growth factor Reviews* 17:451-461.
- Moré M., Swidinski A. 2015. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis- a review. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 8:237-255.
- Murray P.J. 2007. The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J. Immunol.* 178:2623-2629.
- Nabuurs M.J.A., Hoogendoorn A., Van der Molen E.J., Van Osta A.L.M. 1993. Villus height and crypt depth in weaned and unweaned pigs, reared under various circumstances in the Netherlands. *Rest. Vet. Sci.* 55:78-84.
- Naugler W.E., Karin M. 2008. The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer. *Trends Mol. Med.* 14:109-119.
- Neurath M., Becker C, Barbulescu K. 1998. Role of NF- κ B in immune and inflammatory responses in the gut. *Gut.* 43:856-860.
- Nyachoti C.M., Omogbenigun F.O., Rademacher M., Blank G. 2006. Performance responses and indicators of gastrointestinal health in early-weaned pigs fed low-protein amino acid-supplemented diets. *J. Anim. Sci.* 85:125-134.
- Opapeju F.O., Krause D.O., Payne R.L., Rademacher M., Nyachoti C.M. 2009. Effect of dietary protein level on growth performance, indicators of enteric health, and gastrointestinal microbial ecology of weaned pigs induced with postweaning colibacillosis. *J. Anim. Sci.* 87:2635-2643.
- Palma M., Zamith-Miranda D., Martins F.S., Bozza F.A., Nimrichter L., Montero-Lomeli M., Marques E.T.A., Douradinha B. 2015. Probiotic

Saccharomyces cerevisiae strains as biotherapeutic tolos: is there room for improvement?. Appl. Microbiol. Biotechnol. 99:6563-6570.

- Pié S., Lallès J.P., Blazy F., Laffitte J., Sève B., Oswald I.P. 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. J. Nutr. 134:641-647.
- Pothoulakis C. 2009. Review article: Anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. Aliment. Pharmacol. Ther. 8: 826-833.
- Pothoulakis C., Kelly C.P., Joshi M.A., Gao N., O'Keane C.J., Castagliuolo I., Lamont T. 1993. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. Gastroenterol. 104:1108-1115.
- Quintero M.A., Huerta L.N. 1996. Uso de probióticos en la nutrición de cerdos, una revisión. Rev. Cient. FCV-LUZ. 4:75-82.
- Rajkowska K., Kunicka A., Rygata A. 2012. Probiotic activity of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* against human pathogens. Food Technol. Biotechnol. 50:230-236.
- Rajput I.R., Li L.Y., Xin X., Wu B.B., Juan Z.L., Cui Z.W., Yu D.Y., Li W.F. 2013. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus subtilis* B10 on intestinal ultrastructure modulation and mucosal immunity development mechanism in broiler chickens. Poult. Sci. 92:956-965.
- Rakoof-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. 118:229-241.
- Reis de Souza T., Mariscal L.G., Escobar G.K. 2010. Algunos efectos fisiológicos y nutricionales que afectan la incidencia de diarreas posdestete en lechones. Vet. Méx. 41:275-288.
- Reis de Souza T., Mariscal L.G., Escobar G.K., Aguilera B.A., Magné B.A. 2012. Cambios nutrimentales en el lechón y desarrollo morfofisiológico de su aparato digestivo. Vet. Méx. 43:155-173.
- Reis de Souza T.C., Aguilera A., Rubio S., Machado Y., Escobar K., Gómez J.G., Mariscal-Landín G. 2019. Growth performance, diarrhoea incidence,

and nutrient digestibility in weaned piglets fed an antibiotic-free diet with dehydrated porcine plasma or potato protein concentrate. *Ann. Anim. Sci.* 19:159-172.

- Rivera-Zavala J.B., Molina-Aguilar C., Pérez-Mendoza M., Olguín-Martínez M., Hernández-Muñoz R., Báez-Ruiz G.A., Díaz-Muñoz M. 2017. Daytime restricted feeding modifies the daily regulation of fatty acid β -oxidation and lipoprotein profile in rats. *Brit. J. Nutr.* 117:930-941.
- Rodrigues A.C.P., Cara D.C., Fretez S.H.G.G., Cunha F.Q., Vieira E.C., Nicoli J.R., Vieira L.Q. 2000. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system in gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.* 89:404-414.
- Saavedra R.P.G., Vasquez D.G.M., González N.L.A. 2011. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia* 24:157-166.
- Sánchez M.F., Domínguez L.A., Yamamoto F.J. 2008. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 14:4280-4288.
- Sanchez-Muñoz F., Dominguez-Lopez A., Yamamoto-Furusho J. 2008. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* 14:4280-4288.
- Sangild P.T., Petersen Y.M., Schmidt M., Elnif J., Petersen T.K., Buddington R.K., Greisen G., Michaelsen K.F., Burrin D.G. 2002. Preterm birth affects the intestinal response to parenteral and enteral nutrition in newborn pigs. *J. Nutr.* 132:2673-2681.
- SAS Institute .1994. SAS/STAT User's Guide USA.
- Scheller J., Grötzinger J., Rose-John S. 2006. Updating interleukin-6 classic and trans-signaling. *Signal Transduction* 6:240-259.
- Shen Y.B., Piao X.S., Kim S.W., Wang L., Liu P., Yoon I., Zhen G. 2009. Effects of yeast culture supplementation on growth performance, intestinal health, and immune response of nursery pigs. *J. Anim. Sci.* 87:2614-2624.
- Sougioultzis S., Simeonidis S., Bhaskar K.R., Che X., Anton P.M., Keates S., Pothoulakis C., Kelly C.P. 2006. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble

anti-inflammatory factor that inhibits NF- κ B-mediated IL-8 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 343:69-76.

- Stein H.H., Kil D.Y. 2006. Reduced use of antibiotic growth promoters in diets fed to weanling pigs: dietary tools, part 2. *Anim. Biotechnol.* 17:217-231.
- Stier H., Bischoff S. 2016. Influence of *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 on the gut-associated immune system. *Clin. Exp. Gastroenterol.* 9:269-279.
- Sun S.C. 2011. Non-canonical NF- κ B signaling pathway. *Cell Res.* 21:71-85.
- Tao X., Xu Z., Men X. 2016. Transient effects of weaning on the health of newly weaning piglets. *Czech J. Anim. Sci.* 61:82–90.
- Thacker P.A. 2013. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 4:35.
- Trckova M., Faldyna M., Alexa P., Sramkova Z., Gopfert E., Kumprechtova, Auclair E., D’Inca R. 2014. The effects of live yeast *Saccharomyces cerevisiae* on postweaning diarrhea, immune response, and growth performance in weaned piglets. *J. Anim. Sci.* 92:767-774.
- Trevisi P., Colombo M., Priori D., Fontanesi L., Galimberti G., Calò G., Motta V., Latorre R., Fanelli F., Mezullo M., Pagotto U., Gherpelli Y., D’Inca R., Bosi P. 2015. Comparison of three patterns of feed supplementation with live *Saccharomyces cerevisiae* yeast on postweaning diarrhea, health status, and blood metabolic profile of susceptible weaning pigs orally challenged with *Escherichia coli* FAac. *J. Anim. Sci.* 93:2225-2233.
- Trinchieri G., Pflanz S., Kastelein R.A. 2003. The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19:641-644.
- van Beers-Schreurs H.M.G., Nabuurs M.J.A., Vellenga L., van der Valk H.J.K., Wensing T., Breukink H.J. 1998. Weaning and the Weanling Diet Influence the Villous Height and Crypt Depth in the Small Intestine of Pigs and Alter the Concentrations of Short-Chain Fatty Acids in the Large Intestine and Blood. *J. Nutr.* 128:947-953.

- van Heugten E., Funderburke D.W., Dorton K.L. 2003. Growth performance, nutrient digestibility, and fecal microflora in weanling pigs fed live yeast. *J. Anim. Sci.* 81:1004-1012.
- van Horssen R., ten Hagen T.L.M., Eggermont A.M.M. 2006. TNF- α in cancer treatment: molecular insights, antitumor effects, and clinical utility. *The oncologist.* 11:397-408.
- Vásquez C.M., Vega A.H. 2012. Desarrollo del epitelio del tracto intestinal y su participación en la defensa del organismo en mamíferos. REDVET. Volumen 13 N° 7 <http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070712.html>.
- Walker W.A. 2008. Mechanism of action of probiotics. *Clin. Infect. Diseases* 46:S86-91.
- Williams B.A., Bosch M.W., Awati A., Konstantinov S.R., Smidt H., Akkermans A.D.L., Verstegen M.W.A., Tamminga S. 2005. In vitro assessment of gastrointestinal tract (GIT) fermentation in pigs: Fermentable substrates and microbial activity. *Anim. Res.* 54:191-201.
- Windey K., De Preter V. Y., Verbeke Z. 2012. Protein fermentation to gut health. *Mol. Nutr. Food Res.* 56:184-196.
- Xing Z., Gauldie J., Cox G., Baumann H., Jordana M., Lei X.F., Achong M.K. 1998. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J. Clin. Invest.* 101:311-320.
- Zandi E., Rothwarf D.M., Delhase M., Hayakama M., Karin M. 1997. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell.* 91:243-252.
- Zanello G., Berri M., Dupont J., Sizaret P.Y., D'Inca R., Salmon H., Meurens F. 2011a. *Saccharomyces cerevisiae* modulates immune gene expressions and inhibits ETEC-mediated ERK1/2 and p38 signaling pathways in intestinal epithelial cells. *PLoS ONE* 6:e18573.
- Zanello G., Meurens F., Berri M., Chevalleyre C., Melo S., Auclair E., Salmon H. 2011b. *Saccharomyces cerevisiae* decreases inflammatory responses

induced by F4+ enterotoxigenic *Escherichia coli* in porcine intestinal epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunol.* 141:133-138.

- Zanello G., Meurens F., Berri M., Salmon H. 2009. *Saccharomyces boulardii* effects on gastrointestinal diseases. *Curr. Issues Mol. Biol.* 11:47-58.
- Zundler S., Neurath M.F. 2015. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26:559-568.
- Zundler S., Neurath M.F. 2015. Interleukin-12: Functional activities and implications for disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 26:559-568.

Dirección General de Bibliotecas UFR