



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA SUR

Área de conocimiento de ciencias del mar
Departamento Académico de Biología Marina

Posgrado en Ciencias Marinas y Costeras

TESIS

Modulación de la respuesta inmune en ratones Balb/c administrados con *Grammatophora sp* y *Lactobacillus fermentum* A15 por vía mucosal.

Que para obtener el título de:

Maestro en Ciencias Marinas y Costeras

Orientación en Acuacultura

Presenta:

Gaspar Alejandro Petitt Higuera

Director:

Dra. Maurilia Rojas Contreras

Director externo:

Dr. Armando Acosta Domínguez

La Paz Baja California Sur, Junio de 2016

RESUMEN

En la actualidad existe una gran demanda de sustancias que ayudan en la activación del sistema inmune con el objetivo de prevenir enfermedades y aumentar la eficiencia de nuevas vacunas y vías de administración. Las sustancias inmunomoduladoras tienen la capacidad de modificar la respuesta inmune, ya sea estimulándola o suprimiéndola. Varios reportes sugieren que los probióticos y las microalgas tienen potencial como agentes inmunoestimuladores, con carácter adyuvante gracias a componentes bioactivos y mecanismos que benefician la respuesta celular y humoral en el hospedero. El objeto de este estudio fue evaluar la inmunomodulación de ratones Balb/c por *L. fermentum* A15 y *Gramatophora* sp administradas vía mucosal a través de análisis bioquímicos e inmunológicos. Los resultados obtenidos mostraron una producción de microalgas con un crecimiento de 1.3×10^6 UFC/ml, un peso húmedo de 2kg tras cosecharla de tres tanques de 1800 L y 210 g de biomasa liofilizada, con una carga bacteriana de 2×10^2 UFC/g. La bacteria A15 presentó a las 12 h de incubación una cuenta viable de 3.35×10^9 UFC/ml. El análisis bioquímico de la microalga arrojó un 28% de lípidos y 10% de proteína, La composición de la emulsión obtenida de la microalga aplicada nasalmente fue de 1.8 mg de proteína y 2.8 mg de lípidos. Los resultados de la evaluación in vivo utilizando ratones Balb/c administrados con diferentes concentraciones de probióticos (*Lactobacillus fermentum* A15 a 1×10^5 , 1×10^7 y 1×10^9 vía oral y 1×10^5 vía nasal) y microalgas (*Grammatophora* sp. a 0.5 y 1.5% de acuerdo al consumo diario de alimento, por vía oral y una emulsión a partir de la concentración 0.5% por vía nasal) a través del análisis del suero sanguíneo y varios órganos mostraron: Los sueros de organismos administrados oralmente con microalgas y probióticos aglutinan visiblemente a las microalgas y al probiótico. Sin embargo la aglutinación fue más abundante en la microalga que en el probiótico. La capacidad de translocación de bacterias ácido lácticas a bazo y pulmón fue confirmada en los tratamientos con probióticos, orales y nasales. Los resultados de los títulos de IgG a través de los Ensayos de ELISA analizados por medio de un ANOVA de una sola vía, con un intervalo de confianza del 95% mostraron diferencias significativas en un aumento en

títulos de IgG a los 28 días después de la primera administración oral de microalga y probiótico y cuando los ratones fueron administrados por vía nasal con el probiótico y la microalga, los títulos de IgG fueron similares a los 14 días, sin embargo aumentaron a los 28 días en el tratamiento del probiótico. La especificidad de los anticuerpos en suero fue analizada por Western Blot mostrando una banda intensa alrededor de 29 kD en los tratamientos orales de *L. fermentum* A15 y de *Grammatophora sp* al 0.5%. Por otro lado la microalga presentó una dosis efectiva media de 2.52 mg/ml en la prueba con DPPH de actividad antioxidante. Con estos resultados se puede concluir que los probióticos y las microalgas en las concentraciones administradas activan el sistema inmune, reflejándose en un aumento de inmunoglobulinas en el suero de los ratones tratados respecto a los no tratados como control. Los probióticos además cuentan con proteínas inmunogénicas de la pared celular y/o membrana celular, existiendo un posible efecto prebiótico por parte de la microalga con la bacteria probiótica administrada y con las propias del organismo.

DEDICATORIA

A mi hermana Elena Fabiola Higuera

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Maurilia Rojas Conteras, por su apoyo en estos años de enseñanza y convivencia.

Al Dr. Marco Antonio Cadena Roa, Dr. Carlos Rangel Dávalos, Dr. José Alfredo Guevara Franco, como miembros del Cuerpo académico en Alimentación de Zonas Costeras y Áridas, su apoyo en los proyectos y dedicación siempre serán buena guía.

Al Dr. Armando Acosta Domínguez y Dra. María Elena Sarmiento del instituto Finlay en la Habana Cuba, sin su trabajo la idea de este proyecto no se hubiera vuelto real.

Al Dr. Juan Manuel Pacheco Vega y al técnico Ing. Elizabeth Bravo del Laboratorio de Microalgas y al técnico Carlos Aguilar Cruz del Laboratorio de Histología de la Unidad Pichilingue de la UABCS.

Al Dr. Ricardo Vázquez Juárez y al grupo de trabajo del Laboratorio de Genómica.

Al Dr. Amaury Cordero Tapia y al Técnico Guadalupe del Bioterio de CIBNOR por el apoyo en la estancia y realización del bioensayo.

Al Dr. Rogelio Hernández Pando y a su grupo de trabajo en el área de patología en el Instituto de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

Al Dr. Pablo Misael Arce Amézquita y al M.C. Francisco Nieto Navarro del laboratorio de farmacognosia de la UABCS.

Al M.C. Francisco Javier Jiménez Ordaz, por su apoyo y disposición al trabajo y por su amistad

Al grupo de trabajo del Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la UABCS.

A CONACYT por el apoyo al otorgarme la beca de maestría.

A CIMACO por la realización de una nueva etapa profesional

ÍNDICE

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	IDENTIFICACION Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA	5
III.	ANTECEDENTES	7
	1. PROBIÓTICOS	7
	1. 1 Generalidades	7
	1. 2 <i>Lactobacillus</i>	7
	1. 3 <i>Lactobacillus fermentum</i>	8
	1. 4 <i>Lactobacillus fermentum A15</i>	9
	2. MICROALGAS.....	10
	2. 1 Generalidades	10
	2. 2 Diatomeas	11
	2. 3 <i>Grammatophora sp.</i>	12
IV.	JUSTIFICACIÓN	14
V.	OBJETIVOS	16
	1. Objetivo general.....	16
	1. 1 Objetivos específicos.....	16
VI.	HIPÓTESIS	17
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	18
	1. MICROALGA	19
	2. PROBIÓTICO	24
	3. DOSIS DE MICROALGA Y PROBIÓTICO	25
	4. PRUEBA DE AGLUTINACIÓN	29
	5. MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE RATONES BALB/C	30
	5.1 Diseño Experimental.....	30
	6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSLOCACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	32

	7. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY WHOLE CELL, ELISA)	32
	8. ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS	33
	9. CULTIVO DE <i>LACTOBACILLUS FERMENTUM</i> A15 UTILIZANDO A <i>GRAMMATOPHORA SP.</i> COMO PREBIÓTICO	36
	10. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE <i>GRAMMATOPHORA SP.</i>	37
VIII.	RESULTADOS	40
	1. MICROALGA	41
	2. PROBIÓTICO	42
	3. DOSIS DE MICROALGA Y PROBIÓTICO	43
	4. PRUEBA DE AGLUTINACIÓN	47
	6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSLOCACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	48
	7. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY WHOLE CELL, ELISA)	50
	8. ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS	55
	9. CULTIVO DE <i>LACTOBACILLUS FERMENTUM</i> A15 UTILIZANDO A <i>GRAMMATOPHORA SP</i> COMO PREBIÓTICO	60
	10. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE <i>GRAMMATOPHORA SP.</i>	63
IX.	DISCUSIÓN	66
	1. MICROALGA	67
	2. PROBIÓTICO	68
	3. DOSIS DE MICROALGAS Y PROBIÓTICO	69
	4. PRUEBA DE AGLUTINACIÓN	71
	6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSLOCACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS.....	72
	7. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY WHOLE CELL, ELISA)	74
	8. ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS	75

	9. CULTIVO DE <i>LACTOBACILLUS FERMENTUM</i> UTILIZANDO A <i>GRAMMATOPHORA SP</i> COMO PREBIÓTICO	76
	10. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE <i>GRAMMATOPHORA SP</i>	77
X.	CONCLUSIONES	78
XI.	RECOMENDACIONES	79
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
XIII.	ANEXOS	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Componentes del medio de cultivo F/2	20
Tabla 2. Componentes del medio F/2 por litro	21
Tabla 3. Volumen del inóculo requerido para escalar el cultivo de microalga.....	21
Tabla 4. Diluciones de BSA para la elaboración de la curva estándar de proteínas. 27	
Tabla 5. Datos de concentración de la curva estándar del extracto de <i>Grammatophora sp.</i>	38
Tabla 6. Datos de concentración de la curva estándar de DPPH	39
Tabla 7. Conteos de células en cámara de Neubauer del cultivo de microalgas <i>Grammatophora sp.</i>	41
Tabla 8. Pesos obtenidos en el proceso de la determinación de lípidos de una muestra de <i>Grammatophora sp.</i>	44
Tabla 9. Datos de absorbancia en la determinación de proteínas por el método de Bradford	45
Tabla 10. Concentración de proteínas hidrosolubles de <i>Grammatophora sp.</i>	46
Tabla 11. Mezcla de reacción de la actividad antioxidante del extracto de <i>Grammatophora sp.</i> con DPPH, absorbancia medida a 515 nm.....	63
Tabla 12. Concentración de inhibición del DPPH y porcentaje de inhibición	64
Tabla 13. Promedio de inhibición del extracto etanólico de <i>Grammatophora sp.</i> ante DPPH	64

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del escalamiento del cultivo de microalgas	21
Figura 2. Curva estándar de DPPH a 515 nm	39
Figura 3. Curva de crecimiento del cultivo de <i>Grammatophora sp.</i>	41
Figura 4. Curva estándar de proteína de <i>Grammatophora sp.</i>	45
Figura 5. Log UFC/órgano de Bazo en Agar MRS. Cada barra se refiere a los tiempos y tratamientos analizados.	49
Figura 6. Log UFC de Pulmón en Agar MRS. Cada barra se refiere a los tiempos y tratamientos analizados..	49
Figura 7. Títulos de IgG totales en suero de Ratón Balb/c a los 14, 28 y 35 días de la administración oral de <i>L. fermentum</i> A15 y <i>Grammatophora sp.</i> , utilizando <i>L. fermentum</i> A15 como antígeno. Los tratamientos administrados fueron: T1 (probiótico a 1×10^5 UFC/ml), T2 (probiótico a 1×10^7 UFC/ml), T3 (probiótico a 1×10^9 UFC/ml), T4 (microalga a 0.5%), T5 (microalga a 1.5%) y T6 (PBS como control)...	51
Figura 8. Títulos de IgG totales en suero de Ratón Balb/c a los 14, 28 y 35 días de la administración nasal de <i>L. fermentum</i> A 15 y <i>Grammatophora sp.</i> , utilizando a <i>L. fermentum</i> A 15 como antígeno. Los tratamientos administrados fueron: T7 (probiótico a 1×10^7 UFC/ml), T8 (microalga a 0.5%), T9 (PBS como control).	52
Figura 9. Título de IgG totales en suero de Ratón Balb/c a los 14, 28 y 35 días de la administración oral de <i>L. fermentum</i> A 15 y <i>Grammatophora sp.</i> , utilizando a <i>Grammatophora sp.</i> como antígeno. Los tratamientos administrados fueron: T1 (probiótico a 1×10^5 UFC/ml), T2 (probiótico a 1×10^7 UFC/ml), T3 (probiótico a 1×10^9 UFC/ml), T4 (microalga a 0.5%), T5 (microalga a 1.5%) y T6 (PBS como control)...	53
Figura 10. Títulos de IgG en suero de Ratón Balb/c a los 14, 28 y 35 días de la administración nasal de <i>L. fermentum</i> A15 y <i>Grammatophora sp.</i> , utilizando a <i>Grammatophora sp.</i> como antígeno. Los tratamientos administrados fueron: T7 (probiótico a 1×10^7 UFC/ml), T8 (microalga a 0.5%), T9 (PBS como control).	54
Figura 11. Perfil de proteínas superficiales de la cepa <i>L. fermentum</i> A15 obtenido por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12 %. Todos los carriles cargados con proteínas de <i>L. fermentum</i> A15. MW; prestained SDS-PAGE Standars, Low Range.. ..	56

Figura 12. Perfil de proteínas de la pared y/o membrana celular de la cepa de *Grammatophora* sp. obtenido por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12 %. Todos los carriles cargados con proteínas de *Grammatophora* sp. MW; prestained SDS-PAGE Standars, Low Range.. 57

Figura 13. Western Blot de proteínas de *L. fermentum* A 15 ensayadas con suero de ratones y utilizando como anticuerpo secundario IgG anti-raton conjugada con HRP en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) . MW; prestained SDS-PAGE Standars, Low Range, Carril 1: T2, Probiótico administrado oralmente (1x10⁷ UFC/ml), Carril 2: T4, Microalga administrada oralmente (0.5 % respecto al alimento consumido diariamente). Carril 3: T7, Probiótico administrado nasalmente (1x10⁵ UFC/ml) y Carril 4: T8, Microalga administrada nasalmente.. 58

Figura 14. Western Blot de la suspensión de proteínas de *Grammatophora* sp utilizando suero de ratones administrados con diferentes antígenos en cada carril y el anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con HRP en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). MW; prestained SDS-PAGE Standars, Low Range, Carril 1: Probiótico oral 1x10⁵, Carril 2: Probiótico oral 1x10⁷, Carril 3: Probiótico oral 1x10⁹, Carril 4: Probiótico nasal 1x10⁵, Carril 5: Microalga oral 0.5%, Carril 6: Microalga oral 1.5%, Carril 7: Microalga nasal, Carril 8: Control oral y Carril 9: Control nasal..... 59

Figura 15. Log UFC/ml del cultivo de *L. fermentum* A15 inoculado en la suspensión de *Grammatophora* sp como medio de cultivo y cuantificado por cuenta viable en agar MRS al tiempo 0 del cultivo. Como control se incubaron PBS y Microalgas sin inocular..... 60

Figura 16. Log UFC/ml del cultivo del Probiótico en la suspensión de *Grammatophora* sp utilizando agar MRS para la cuantificación a las 24 h de la incubación..... 61

Figura 17. Log UFC/ ml del cultivo de *L. fermentum* A15 en la suspensión de *Grammatophora* sp. utilizando agar MRS a las 48 h de la inoculación. 61

Figura 18. Log UFC/ml del cultivo de *L. fermentum* A15 en la suspensión de *Grammatophora* sp. utilizando agar MRS a los tiempos 0, 24 y 48 h de Incubación. 62

Figura 19. Curva estándar del extracto de *Grammatophora* sp. ED = 2.52 mg/ml... 65

I. INTRODUCCIÓN

El sistema inmune nos protege de ataques de microorganismos o moléculas externas y ajenas al cuerpo, en ocasiones estos agentes también pueden ser propios del organismo creando una respuesta autoinmune. El sistema inmune del hospedero lleva a cabo un proceso de respuesta a moléculas extrañas para el sistema, desatando una cascada de reacciones de reconocimiento y activación de células o moléculas del sistema inmunitario innato y adaptativo (Valor y De la Torre, 2013). La respuesta celular del sistema inmunitario innato es activada en primera instancia por elementos reconocidos rápidamente y con cierta especificidad sin generar una memoria inmunitaria, considerada la primera línea de defensa del organismo contra infecciones. Esta respuesta inicial considerada inespecífica trabaja de la mano con la respuesta humoral del sistema inmunitario adaptativo, donde se genera una memoria inmunitaria en un lapso más amplio, con una alta especificidad contra antígenos (sustancias que inducen una respuesta inmune) previamente reconocidos (Galdeano y Perdigo, 2006).

La entrada de los agentes exógenos al organismo puede ser de dos formas: 1) la entrada activa al romperse la piel y 2) de forma pasiva al traspasar la barrera de células epiteliales y llegar a la superficie protegida por mucosas como es el caso de los sistemas respiratorio, gastrointestinal y urogenital. Estas barreras físicas encontradas en las mucosas tienen una alta actividad inmunitaria, primeramente generando protección inespecífica por medio de células fagocitarias, células dendríticas y citocinas, y posteriormente una respuesta adaptativa por medio de linfocitos y anticuerpos, sin embargo a pesar de su alta actividad inmunitaria los antígenos son menos inmunogénicos resultando en una mayor tolerancia para mantener una homeostasis en el sistema (Rhee y Lee, 2012).

En el proceso de activación de la respuesta del sistema inmune, la respuesta innata tiene mecanismos celulares o bioquímicos para proteger de manera predeterminada al organismo de los antígenos extraños de manera rápida. Estos mecanismos

responden de la misma manera contra microorganismos o sus componentes en cada ocasión que se presente una infección, siendo específicos para estructuras afines entre grupos de microorganismos pero sin distinción ni diferencias sutiles en dichas estructuras. Al entrar los microorganismos a través de las barreras epiteliales los macrófagos son las primeras células que protegen al hospedero. Los macrófagos en su superficie tienen receptores para detectar antígenos y fagocitarlos, además otros macrófagos se activan al detectar estructuras en los microorganismos y promueven diferentes respuestas. Algunos macrófagos secretan citocinas, proteínas que se encargan de regular la respuesta o la activación de la respuesta innata o adaptativa. Otros macrófagos presentan los antígenos por medio de células presentadoras de antígenos (APC's) transfiriendo el antígeno a células T (linfocitos T). El sistema inmune adaptativo formado por las células T puede reconocer los antígenos presentados por medio de receptores específicos de las células T (TCR's). Diferentes tipos de linfocitos T (células T cooperadoras y células T citotóxicas) actúan en conjunto para destruir o presentar y activar Células B en la generación de inmunoglobulinas. Las células B generan anticuerpos específicos para cada antígeno y lo destruyen (Palomino, et al., 2009).

La regulación de la respuesta inmune está dada por factores inmunológicos y no inmunológicos. Las citocinas son moléculas del sistema inmune que se encargan de regular las reacciones que ocurren en la respuesta de defensa. La respuesta inespecífica del sistema inmune a cualquier agente extraño al organismo trae como consecuencia la inflamación en las zonas de tejido para aislar y destruir al agente dañino. La importancia de la polarización de linfocitos T colaboradores del tipo 1 y 2 (Th1 y Th2), se encuentra dada por diferentes citocinas que se encuentran autorreguladas para generar un equilibrio en la respuesta celular y humoral. Los linfocitos Th1 controlan la inmunidad celular, activan los linfocitos citolíticos naturales (linfocitos NK) y los macrófagos para que destruyan microorganismos. Los linfocitos Th2 controlan la inmunidad humoral, ya activados por un receptor de linfocitos T (RLT), su actividad induce la estimulación de la producción de anticuerpos (linfocitos

B, células plasmáticas) de modo que se eliminan los antígenos que están fuera de las células (Vergara, et al., 2009).

La inmunización por vacunas tradicionales vía parental promueven una pobre activación y respuesta del sistema inmune en mucosas y es mucho menos efectiva en sitios mucosales donde generalmente se presenta el mayor número de casos de infección, por lo que comparada con una inmunización directamente en vía mucosal se puede obtener un mayor beneficio al activar el sistema inmunitario de forma local, en mucosas, y de forma sistémica (Lamm, M. E., 1997, Neutra M. R. y Kozłowski P. A., 2006). Tanto la falta de inmunogenicidad generada por los antígenos en zonas mucosales como la falta de adyuvantes en la vacunación por vía oral o nasal han promovido una búsqueda y estudio continuo de sustancias que modulen la respuesta inmune, es decir sustancias que puedan ayudar a generar una respuesta más eficiente, rápida y prolongada. La modulación de la respuesta inmune se refiere al efecto dado por alguna molécula en el proceso autoregulador del sistema de defensa inmunitario. Las sustancias inmunoestimuladoras son un grupo muy variado, de naturaleza química, origen y actividad biológica específica. Dichas sustancias inmunomoduladoras tienen la capacidad de modular la respuesta inmune, ya sea estimulándola o suprimiéndola (Takx-Kohlen, B. C., 1992). Aquellas sustancias de gran interés son los agentes inmunopotenciadores, los cuales tienen dos funciones principalmente: una es la estimulación de la resistencia no específica del huésped y otra la potenciación en la inmunogenicidad del antígeno en una vacuna durante la inmunización experimental con vistas a la producción de antisueros (Azuma, 1992). Los adyuvantes son sustancias inmunoestimuladoras, definidos como agentes con la capacidad de potenciar y modular la respuesta inmune contra antígenos. Por otra parte, el rol que juegan las bacterias en el intestino como un regulador de la salud ya ha sido estudiado ampliamente. Un probiótico se ha definido como microorganismos vivos que proveen efectos benéficos a la salud de un hospedero al ser administrado de manera adecuada (WHO/FAO, 2002).

En la actualidad se conocen los procedimientos para determinar si algunas sustancias o células como, diatomeas o bacterias probióticas podrían ser utilizadas

como adyuvantes al agregarse con algunas vacunas en diferentes vías de administración no tan convencionales como lo es la vía oral y nasal. El análisis de anticuerpos de carácter local o sistémico como inmunoglobulinas A y G, y el análisis de moléculas del sistema inmune como las diversas citocinas podrían darnos una mejor idea de la modulación en el sistema inmune generada por diatomeas y probióticos.

II. IDENTIFICACION Y DELIMITACIÓN DEL PROBLEMA

Es necesario enfrentar las enfermedades de problemática actual, principalmente aquellas conocidas desde hace muchos años y que siguen siendo una gran problemática o que se pronostica una problemática futura. Estas son el blanco de estudio para el desarrollo de vacunas. Enfermedades como el VIH-SIDA, Malaria, tuberculosis, diversos tipos de cáncer, Alzheimer, entre muchas otras se encuentran a la espera de vacunas de nueva generación y adyuvantes que signifiquen un gran avance contra dichas enfermedades. Las vacunas de nueva generación aunque son más seguras y específicas, generalmente pierden inmunogenicidad al momento de ser purificadas para asegurar su inocuidad, por lo que es de gran importancia que al momento de la inmunización estas vayan acompañadas de un adyuvante que pueda activar al sistema inmune de forma adecuada de acuerdo a la vacuna y enfermedad a combatir y vía de administración. Actualmente se busca que estas sustancias inmunomoduladoras no solo desarrollen una buena respuesta inmune, sino también que su costo, desarrollo, producción, aplicación y demás características que implica la inmunización de un gran número de personas sea adecuado. Las vías de administración mucosales como la oral y la nasal son una respuesta relativamente nueva para enfrentar dificultades de las nuevas vacunas. Se ha reportado que algunos microorganismos producen sustancias inmunomoduladoras que podrían usarse como adyuvantes, tal es el caso de las bacterias probióticas y microalgas que combinan el efecto benéfico para la salud, gracias a sus propiedades y su capacidad adyuvante con la posibilidad de ser administradas por vía mucosal (Betlec y Strukeli, 2012). De acuerdo a estudios realizados, las bacterias ácido lácticas destacan por su capacidad para estimular el sistema inmunitario del hospedero, generando protección específica y se ha demostrado que las bacterias son utilizadas como adyuvantes cuando se administran por vía oral (Bautista-Garfias, 2001). Del mismo modo las microalgas muestran una interacción con el sistema inmune, por sus compuestos como, omega-3, Acido Eicosapentaenoico (EPA), Acido Docosahexaenoico (DHA), Acido Alfa-linolenico y metabolitos importantes para muchos procesos biológicos en el humano siendo utilizados para la biotecnología en nuevos medicamentos y pudiera

usarse como sustancias adyuvantes (Doughman et. al., 2007), sin embargo el conocimiento sobre estos mecanismos de modulación del sistema inmune aun no quedan claros por lo que es necesario su estudio.

III. ANTECEDENTES

1. PROBIÓTICOS

1.1 Generalidades

Los probióticos son definidos como microorganismos vivos que al ser administrado en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud al hospedero (FAO/WHO, 2006). Algunas características que clasifican a un microorganismo como probiótico son: inocuos, resistencia a sales biliares y ácido gástrico, capacidad de adhesión a superficies epiteliales, sobrevivencia al tránsito intestinal, colonización, modulación de la microbiota y capacidad antagónica contra especies patógenas (Hill, et al., 2014). De acuerdo a estudios realizados las bacterias ácido lácticas, destacan por su capacidad para estimular el sistema inmunitario del hospedero generando protección específica y se ha demostrado que las bacterias son utilizadas como adyuvantes cuando se administran por vía oral (Bautista-Garfias, 2001). Diversos estudios señalan un efecto benéfico en el sistema inmune, tracto gastrointestinal y respiratorio, así como prevención y control de infecciones bacterianas y virales (Yeo et al. 2014). Dentro de los géneros de bacterias probióticas podemos destacar dos de las más importantes, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Vieira, Teixeira y Martins, 2013).

1.2 *Lactobacillus*

Aunque los beneficios de los probióticos no han podido compilarse y describir a ciencia cierta los mecanismos que utilizan para generar un beneficio al hospedero, se tienen muchos estudios que ponen las pruebas en la mesa respecto a sus funciones. Bautista-Garfias y colaboradores en el 2001, comprueban que la administración oral de *Lactobacillus casei* (Lbc) tiene un efecto benéfico en la infección por parásitos en ratones, disminuyendo el número de parásitos adultos y de larvas en tratamientos con Lactobacilos vivos y en menor proporción con células muertas, concluyendo que

la colonización por parte de Lbc tiene un mejor efecto, otros estudios con Lbc reportan que estos microorganismos promueven la activación de macrófagos (Kato, Yokokura y Mutai, 1983 y Perdigon et al., 1986). También otros estudios han demostrado un efecto positivo y de protección contra infecciones vírales en el tracto respiratorio superior, activando el sistema innato y humoral al administrarse de forma nasal *Lactobacillus casei* Shirota y *Lactobacillus rhamnosus* (Olivares et al., 2007 y Harata et al., 2010).

La activación del sistema inmune celular y humoral puede ser promovida por diferentes aspectos en la administración de un probiótico, una de ellas es la dosis administrada, Wen y colaboradores en el 2012, realizaron un experimento donde utilizaron diferentes dosis de *Lactobacillus acidophilus* co-administrados oralmente con una vacuna para humano en el biomodelo cerdo, ellos concluyeron que una dosis adecuada puede generar una inmunoestimulación o inmunoregulación, pero una inadecuada puede ser inefectiva al momento de promover INF- γ y células T reguladoras. Una gran mayoría de los trabajos realizados con probióticos sugieren la utilización de estas bacterias para activar el sistema inmunitario de forma celular inespecífica (Prescott et al., 2005, Galdeano y Perdigo, 2006 y McClemens et al., 2013) pero algunos autores concluyen que la modulación del sistema inmune va de la mano de una activación del sistema inespecífico y el sistema inmunitario de memoria, por lo que el efecto a largo plazo puede verse estimulado al administrar un probiótico (Prescott et al., 2005), sin embargo el mecanismo de acción es todavía desconocido.

1.3 *Lactobacillus fermentum*

Una de las bacterias probióticas más utilizadas y estudiadas en el área de ciencias médicas y en la industria de alimentos es *Lactobacillus casei* Shirota, pero existe un gran número de especies estudiadas y utilizadas hoy en día con muy buenos resultados, una de ellas es *Lactobacillus fermentum*, la cual en diversos estudios muestra que promueve una respuesta de células Th1, IFN- γ , citocinas

proinflamatorias, IgG de manera localizada y sistémica (Maassen et al., 2000 y Prescott et al., 2005). Esvaran y Conway, 2012 y Yeo et al., 2014, realizan bioensayos para evaluar su capacidad adyuvante y para conocer los mecanismos de acción para modular el sistema inmune en infecciones de *Salmonella typhimurium* y virus de la influenza. Señalan la actividad adyuvante que puede tener al ser administrada junto con algunas vacunas, dada la respuesta de Th1, macrófagos, células T citotóxicas y IgA específicas al ser administradas oral y nasalmente, así como la translocación en bazo de estas bacterias benéficas.

1.4 *Lactobacillus fermentum* A15

La cepa ácido láctica con potencial probiótico *L. fermentum* A15 ha sido estudiada *in vitro* por Cosío-Castro en 2009, probando la capacidad de dicha cepa para ser utilizada como un probiótico. La cepa fue aislada de heces de niños de preescolar aparentemente sanos en el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Baja California Sur. Se probó su capacidad de sobrevivir en condiciones ácidas de los jugos gástricos y sales biliares en el sistema gastrointestinal, su capacidad antagonista ante cepas enteropatógenas y se evaluó su capacidad de adhesión a moco intestinal humano por la prueba de Dot Blot (Rojas-Contreras y Conway, 1996). En esta investigación se llevó a cabo su valoración de acuerdo a un ensayo *in vivo* en ratones Balb/c para comprobar su capacidad inmunomoduladora.

2. MICROALGAS

2.1 Generalidades

Las microalgas son organismos unicelulares de gran importancia en la cadena trófica en los océanos, son microorganismos fotosintéticos que se han utilizado a lo largo del tiempo por el hombre como alimento y para animales como en la acuicultura. Las microalgas son fuente de productos en diversas áreas de importancia industrial como son hidrocarburos, biofertilizantes, bioremediación, industria de cosméticos, biotecnología, alimentos, industria farmacéutica y salud (Raposo et al., 2013) de tal forma que en las últimas cuatro décadas se han aislado gran variedad de compuestos, y se ha demostrado en muchos de ellos una actividad biológica de interés (Faulkner, 2002). Las microalgas han sido reconocidas como proveedores químicos y farmacéuticos novedosos y diversos, siendo estas consideradas dentro de los recursos marinos como productores actuales de componentes altamente bioactivos (Shi-mizu, 1996). Estos componentes bioactivos producidos por las microalgas pueden ser: ácidos grasos poliinsaturados (PUFA), esteroides, proteínas y enzimas, vitaminas y pigmentos, polisacáridos, entre otros (Raposo et al. 2013). En diversas investigaciones con microalgas se ha reportado que presentan un valor nutricional excelente, por lo que son utilizadas en cultivos de diferentes larvas (peces, crustáceos, moluscos) para su crecimiento saludable (Brown, 2002), son ricas en vitaminas y en sustancias para terapia anticancerosa y potenciadoras del sistema inmune. Del mismo modo las microalgas muestran una interacción con el sistema inmune, por compuestos como omega-3, Acido Eicosapentaenoico (EPA), Acido Docosahexaenoico (DHA), Acido Alfa-linolenico, compuestos antioxidantes y metabolitos importantes para muchos procesos biológicos en el hombre siendo utilizados para la biotecnología en nuevos medicamentos y pudiera usarse como sustancias adyuvantes (Doughman et. al., 2007). Una reciente opción en la producción de sustancias y búsqueda de sustancias bioactivas, son las diatomeas con un alto porcentaje en ácidos grasos poliinsaturados y de sustancias antioxidantes como carotenos, pigmentos, etc. Su estudio ha demostrado una

actividad antitumoral, antiinflamatoria, nutracéutica, entre otras que pueden ayudar en el manejo de enfermedades de importancia (Affan, 2006; Kim, et al., 2013 y Pacheco-Vega, et al., 2015).

2. 2 Diatomeas

Las diatomeas son una de las microalgas más comunes en el ambiente marino, son una de las fuentes más importantes de biomasa. Representan alrededor del 40% de la producción primaria en los océanos y en la biosfera representa el 20% de la fijación de CO₂. Además la biodiversidad de estas microalgas asciende hasta 10⁷ especies (Norton, et al., 1996), por su gran diversidad de especies y metabolitos bioactivos generados toman gran importancia en diversas industrias, de las que destacan la industria de alimentos, acuicultura y suplementos alimenticios y para la salud (Lebeau y Robert, 2003). Estos microorganismos contienen pigmentos que actúan como antioxidantes, uno de los más importantes de ellos la fucoxantina con capacidad antiinflamatoria, anti-diabetes, anticancerígeno (Peng et al., 2011) y otros componentes polisacáridos funcionan como inmunoestimulantes, mayormente probados en acuicultura (Dalmo et al., 1998). Otras características a destacar es el uso de la diatomeas para generar inmunoglobulinas monoclonales de humanos para combatir hepatitis B (Hempel y Maier, 2012). También un campo explorado al utilizar las estructuras nanométricas encontradas en la pared celular de una gran diversidad de diatomeas, ha sido la nanotecnología, ésta ha puesto su interés en las estructuras de sílice de la pared celular de estos organismos para generar estructuras con vista a funciones biológicas (Jamali et al., 2012). Dentro del grupo de diatomeas existe una gran variedad de especies, formas simétricas y diferentes composiciones en la pared celular. De forma general estas microalgas tienen sus organelos dentro de estructuras de sílice llamadas frústulas. Estas estructuras están compuestas por dos valvas sobrelapadas. La frústula está compuesta por tres capas sucesivas, la primera capa en el interior de la célula de nombre diatotepum en contacto con otra estructura llamada plasmalema, la segunda capa consta de la cubierta de sílice y la tercera

capa consta de una cubierta de mucilago donde se encuentran unidos compuestos exopolisacáridos (Daniel et al., 1987; Underwood y Paterson, 2003).

2.3 *Grammatophora sp.*

El conocimiento de las diatomeas usualmente se ha venido dando conforme las necesidades de fuentes de combustibles y alimentos, por lo que su estudio se ha visto enfocado al conocimiento de estos microorganismos. *Grammatophora sp.* es una diatomea bentónica aislada en la bahía de La Paz, B.C.S. por parte del Laboratorio de Microalgas de la Unidad Pichilingue de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (Pacheco-Vega, et. al., 2015). Los estudios realizados con otras especies de diatomeas usualmente hablan de los metabolitos o sustancias purificadas a partir de las microalgas, algunos de estos compuestos de interés en el área médica son: exopolisacáridos, antioxidantes, carotenoides, glucanos, ácidos grasos poliinsaturados, proteínas de adhesión, etc. Uno de los componentes bioactivos que se han estudiado por sus beneficios en la salud humana es un carotenoide llamado fucoxantina que se puede encontrar en diatomeas, este tiene la propiedad de inhibir la respuesta inflamatoria suprimiendo la respuesta de citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6, entre otros mediadores para la acción de macrófagos (kim, et al., 2013).

Guzmán y colaboradores en el 2003, menciona la actividad antiinflamatoria y propiedades inmunomoduladoras como la actividad farmacológica de polisacaridos sulfatados de una diatomea. Por otro lado estudios sobre otros polisacaridos llamados glucanos han destacado la importancia de estos compuestos por su actividad antitumoral, estimulando el sistema inmune innato por medio de receptores en células dendríticas y pueden ser utilizados como agentes terapéuticos al modular la respuesta inmune (Vannucci et al. 2013).

Doughman y colaboradores en el 2007, y Abyor y colaboradores en el 2011 ponen énfasis en la utilización de microalgas como productores de ácidos grasos

poliinsaturados EPA y DHA para el empleo en diversas áreas entre ellas la de la salud humana contrarrestando y previniendo enfermedades cardiacas, cáncer, diabetes tipo 2 y arteriosclerosis. Destacan la importancia de estos componentes como elementos para la nutrición y medicina de la salud pública. Affan y colaboradores en el 2006, en un trabajo sobre el cultivo de *Grammatophora marina* en diferentes condiciones de temperatura, salinidad y distintas concentraciones de nutrientes, se analizó su composición bioquímica y capacidad antioxidante, obteniendo que esta especie tiene un alto contenido de lípidos y una actividad quelante muy significativa, además comparada con antioxidantes comerciales, el extracto metanólico al 80% muestra una prometedora capacidad adyuvante, sin embargo sería necesario un sistema de extracción más eficiente para purificar los componentes activos.

Pacheco-Vega y colaboradores en 2015, realizaron un estudio donde analizaron los componentes de diversas microalgas, entre ellas a *Grammtophora sp* en la alimentación de *Artemia franciscana*. De acuerdo a este trabajo se obtuvo la mayor proporción de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) al alimentar a *Artemia* con respecto a las demás microalgas utilizadas. Los datos obtenidos en el análisis de PUFAs en las microalgas solas, obtuvieron el más alto porcentaje de ácido decosahexaenoico con 2.83 % respecto a las demás microalgas y al control *Chaetoceros muelleri*.

Diversos estudios ponen en evidencia que el empleo de microalgas puede tener un efecto positivo en la activación del sistema inmune y su modulación. Hoy en día no solo el empleo de las microalgas por sus componentes aislados se utiliza en los estudios terapéuticos, si no que la transformación de estas células para la expresión de proteínas en cloroplastos son una alternativa real en administraciones mucosales para las enfermedades de los seres humanos (Surzycki et al. 2009).

IV. JUSTIFICACIÓN

Existe un gran número de enfermedades que actualmente no cuentan con una vacuna eficiente. Actualmente, es necesario el desarrollo de nuevas vacunas, nuevos adyuvantes y estrategias de inmunización. En particular, los altos costos (cadena de frío) y dificultades de financiación de campañas de vacunación han hecho de suma importancia en países en desarrollo lograr mejores vacunas. Entre las líneas de mayor importancia según especialistas en el desarrollo de vacunas, la administración oral o vacunas comestibles es una estrategia que reduciría los costos de la cadena de frío, transporte, distribución, administración, etc. Así como también el desarrollo de nuevos adyuvantes que sirvan como estimulantes del sistema inmune.

El Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Baja California Sur cuenta con una colección de bacterias con propiedades probióticas a partir de humanos, las cuales tienen la capacidad de crecer y adherirse en moco gastrointestinal e interactuar antagónicamente con algunos patógenos, elementos de gran importancia para evaluar la inmuno-potenciación por vía oral. Adicionalmente en La unidad de Pichilingue, en el laboratorio de Microalgas, se ha venido trabajando en la búsqueda de nuevas especies de microalgas autóctonas con gran potencial biotecnológico y acuícola, lográndose obtener algunas con excelente composición bioquímica y nutricional que ofrecen grandes perspectivas para su uso en la inmunoestimulación por vía mucosal.

Teniendo en cuenta los elementos anteriores, el uso de bacterias probióticas y microalgas en la formulación de alimentos y como adyuvantes de administración oral es una estrategia de gran valor para el desarrollo de nuevos inmunomoduladores del sistema inmune. Para esto es importante conocer la respuesta mucosal *in vivo* al administrar estos microorganismos. Hasta el momento no se tiene información suficiente para describir la respuesta o mecanismos de acción de microalgas y probióticos como adyuvantes o como elementos inmunoestimulantes del sistema inmune administrados por vía mucosal. Gracias a las características de cultivo tanto de bacterias probióticas como de microalgas, estas podrían ser una alternativa para

disminuir costos en el desarrollo y producción de vacunas, además de favorecer procedimientos de conservación para operaciones de inmunización en países en desarrollo.

V. OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar la inmunomodulación de ratones Balb/c por *L. fermentum* y *Gramatophora sp* administradas en forma oral y nasal.

1.1 Objetivos específicos

1. Evaluar la capacidad de translocación de bacterias ácido lácticas a bazo y pulmón durante la exposición a *Lactobacillus fermentum* A15 de ratones Balb/c
2. Evaluar la inmunogenicidad de *L. fermentum* A15 y *Gramatophora sp.* administradas por vía mucosal a ratones Balb/c
3. Evaluar la especificidad de los anticuerpos producidos en ratones tratados por medio de un Western Blot.
4. Evaluar la capacidad prebiótica de *Grammatophora sp.* en un cultivo mixto con *L. fermentum* A15
5. Evaluar la actividad antioxidante de *Gramatophora sp.*

VI. HIPÓTESIS

La bacteria probiótica y/o la microalga administradas por vía mucosal a ratones, produce una respuesta inmune significativa modificando la producción de anticuerpos e incrementando la translocación de las bacterias ácido lácticas.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROALGA

Cepa de Microalga

Para la realización de los bioensayos previstos, se utilizó una cepa de microalga del genero *Grammatophora sp.*, la cual fue aislada a partir de agua de mar (plancton) de diversos puntos de la zona del golfo de california, trabajo realizado previamente (Pacheco-Vega, et. al., 2015). La microalga fue proporcionada por el Laboratorio de Microalgas de la Unidad Pichilingue de la Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Cultivo de microalgas

Se calculó la cantidad necesaria de biomasa de microalga en peso seco para dos bioensayos de acuerdo al porcentaje de adición al alimento balanceado. Los porcentajes fueron 1, 3 y 5% de microalga. Las necesidades diarias de alimentación del organismo modelo es de 15 g por cada 100 g de peso vivo, para organismos de 25 g.

La microalga fue aislada en agar marino DIFCO elaborado con agua de mar estéril a una concentración de 20% de agar. La siembra de la microalga se realizó en medio F/2 elaborado con agua de mar estéril en matraces Erlenmeyer (Tabla 1). Las microalgas se mantuvieron en tubos de agar marino inclinado con tapa de rosca, a una temperatura de 18° C, luz artificial constante, sin aireación para preservar mayor tiempo activa la cepa. Para realizar un stock de trabajo se hicieron diluciones seriadas de la cepa en medio F/2 por duplicado, se revisaron en un microscopio compuesto Olympus y se sembró uno de los tubos de 15 ml en un matraz Erlenmeyer de 125 ml con medio F/2 el cual se utilizó como inóculo.

Tabla 1. Componentes del medio de cultivo F/2

Concentraciones molares por litro de los nutrientes del medio "F/2" de Guillard y Ryther (1962).	
Nutrientes mayores	Concentración
NaNO ₃	0.880 mM
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0.036 mM
Na ₂ SiO ₃ 9H ₂ O	0.054 mM
Metales traza	Concentración
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.040 µM
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.080 µM
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.050 µM
MnCl ₂ 4H ₂ O	0.090 µM
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.030 µM
Vitaminas	Concentración
Cianocobalamina (B12)	0.50 µg
Biotina	0.50 µg
Tiamina (B1)	100.00 µg

Escalamiento del cultivo de Microalgas

Se resembró la microalga a partir del stock de trabajo inoculando 15 ml en matraces de 125 ml con medio F/2, el cual se mantuvo a una temperatura de 24° C con luz artificial durante 8 días sin aireación.

Se escaló el cultivo a matraces de 1L, 4 L, 19 L (garrafones) y finalmente a tanques de 1800 L (Figura 1). Se agregó medio F/2 al agua de mar esterilizada en los matraces o agua de mar filtrada (en el caso de los volúmenes mayores de 20 L y 1800 L se filtró a 1 µm), en proporción al volumen que se inocularía (Tabla 2).

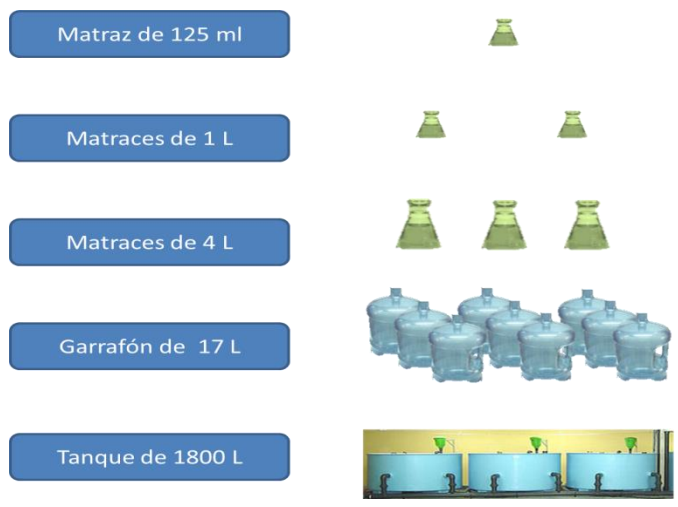


Figura 1. Esquema del escalamiento del cultivo de microalgas

Tabla 2. Componentes del medio F/2 por litro

Nutrientes	Volumen/Litro
macronutrientes	1ml
micronutrientes	1ml
vitaminas	0.5 ml
silicatos	1ml

Los volúmenes de inóculo en cada nivel del cultivo (volúmenes de escalamiento) aparecen en la Tabla 3.

Tabla 3. Volumen del inóculo requerido para escalar el cultivo de microalga

Volumen del cultivo	Inóculo
Matraz de 1 L	125 ml
Matraz de 4 L	660 ml
Garrafón de 17 L	1.3 L
Tanques de 1800 L	51 L

Al agua de mar filtrada se le agregó 1 ml de hipoclorito de sodio por cada litro de agua con el objetivo de desinfectarla eliminando cualquier microorganismo. El agua se dejó 24 horas con el cloro antes de ser neutralizada para su posterior inoculación. El cloro fue neutralizado con 1 ml de Tiosulfato de sodio al 15% por cada litro de agua de mar.

Los cultivos de 125 ml y 1L se mantuvieron sin aireación, con luz artificial 24 horas y a una temperatura de 24° C. Los cultivos de 4 L, 17 L y 1800 L se mantuvieron en el laboratorio R2 de la unidad Pichilingue con flujo constante de aireación (aire filtrado con filtros UV), luz natural a temperatura ambiente (promedio de 27° C).

Conteo celular de Microalgas en cultivo

Se realizaron conteos de la concentración de biomasa que presentaron los cultivos de las microalgas, para conocer el momento de la cosecha. Los conteos se realizaron mediante el uso de una cámara de Neubauer, con ayuda de un microscopio Olympus en un objetivo de 10X. Se tomó una muestra de cada Tanque de 1800 L en tubos de microcentrífuga estériles. Los conteos se realizaron por triplicado durante siete días en los cuales se mantuvo el cultivo (Tabla 3).

Se contaron las células y se expresan en número de células por mililitro, se multiplicaron las células totales por 10 ,000.

$$1\text{mL}=10,000 \times 0.1 = 1000 \text{ mm}^3; \text{ El resultado se expresa en células/ml.}$$

Cosecha de la biomasa

El cultivo se dejó sin aireación durante toda la noche para que la biomasa se precipitara. Al día siguiente se agregó a los tanques de cultivo Hidróxido de sodio (600 ml de solución de NaOH 40%) para acelerar la precipitación. Se retiró la tubería de aireación central.

Se retiró el agua de mar por bombeo dejando la microalga concentrada en un pequeño volumen de agua donde la biomasa no fuera arrastrada por la bomba. Posteriormente se utilizó una bomba pequeña para sacar la biomasa del tanque y recuperarla en garrafrones de 20 L. Los garrafrones llenos de microalga fueron dejados toda la noche a 18° C para nuevamente precipitar la biomasa y retirar el agua excedente.

La microalga concentrada en los garrafrones fue centrifugada a 5000 rpm por 20 minutos. La pasta concentrada de microalga fue puesta en un bote de plástico sanitizado y guardada a una temperatura de - 40° C.

Conservación de las Microalgas

Posteriormente las microalgas se mantuvieron en congelación a una temperatura de -85° C y para su conservación fueron liofilizadas. La biomasa se descongeló y se hicieron alícuotas 30 ml en tubos cónicos de 50 ml y se congeló nuevamente a - 85° C. Después fue liofilizada en el Laboratorio de Nutrición de CIBNOR.

Análisis Microbiológico de las Microalgas liofilizadas

Se evaluó la calidad microbiológica de las microalgas liofilizadas realizando una cuenta viable en agar marino (DIFCO). Se hicieron diluciones seriadas y se sembraron 100 µl como inóculo en cajas Petri con agar marino, se incubaron a 30° C por 24 horas. Posteriormente se hizo el conteo de las colonias.

2. PROBIÓTICO

Cepa Probiótica

Para la realización de los bioensayos previstos, se utilizó una cepa ácido láctica del género y especie *Lactobacillus fermentum* (A15) con potencial probiótico, la cual fue aislada de heces de humanos y estudiada en trabajos realizados previamente. Se le realizaron ensayos de adhesión a moco intestinal, pruebas de antagonismo contra patógenos humanos, entre otras pruebas para determinar su potencial como cepa probiótica. La cepa probiótica fue proporcionada por el Laboratorio de Ciencia y Tecnología de Alimentos de la Universidad Autónoma de Baja California Sur.

Cultivo bacteriano

La cepa *Lactobacillus fermentum* A15 que se encontraba guardada a -85° C fue reactivada en agar MRS (DIFCO) por estría cruzada y se incubó en jarra de anaerobiosis a una temperatura de 37° C por 48 horas. Posteriormente la cepa fue resembrada en caldo MRS (DIFCO) e incubada a 37° C por 12 a 18 horas seguidamente la cepa fue guardada en glicerol al 40% a una temperatura de -20° C.

Evaluación del cultivo bacteriano por cuenta viable

Se resembró la bacteria probiótica en caldo MRS (DIFCO) se incubó durante toda la noche a 37° C. Al día siguiente se hicieron diluciones seriadas (10^{-1} a 10^{-7}) y se sembraron en agar MRS y agar Rogosa (DIFCO), estas se incubaron en jarra de anaerobiosis a 37° C durante 48 horas.

La cuenta viable se realizó en un contador de colonias, contando la placa de la dilución que presentó un crecimiento de 30 a 300 colonias.

3. DOSIS DE MICROALGA Y PROBIÓTICO

Preparación de la dosis de microalga

Dosis oral de la microalga

Se pesó una cantidad de microalga liofilizada de acuerdo a cada porcentaje de microalga propuesto inicialmente (1, 3 y 5% del alimento consumido diariamente por parte del organismo modelo (cantidad o % de alimento, Gregory et al. 2013 modificado). La microalga se homogenizó en 300 µl de PBS y se sonicó por tres ciclos de 3 minutos en agua con hielo. La dosis fue refrigerada hasta su administración.

Dosis intranasal de la microalga

Fracción acuosa

Se pesaron 0.056 g (de acuerdo al 1.5% del alimento consumido diariamente por el organismo modelo) de la microalga liofilizada, y se le agregaron 300 µl de solución inyectable, se sonicó por tres ciclos de 3 minutos en agua fría, para después ser centrifugada a 14000 rpm durante un tiempo de 15 minutos, se extrajeron 100 µl del sobrenadante y se colocaron en un tubo de microcentrífuga estéril. La cantidad de proteína de la muestra fue determinada por el método de Bradford.

Fracción lipídica

En un tubo de microcentrífuga se colocó 1 ml de sobrenadante con el extracto lipídico de 50mg de microalga, para la porción lipídica de la dosis intranasal obtenido por el método de Folch, 1957 el solvente se evaporó utilizando nitrógeno y se resuspendieron los lípidos disolviéndolos en 50 µl de etanol 96°.

Emulsión

Se realizó una emulsión con las fracciones lipídica y acuosa de la microalga, agregando los 50 µl de etanol con lípidos disueltos a 50 µl de sobrenadante, se utilizó un vórtex para homogenizar la solución gradualmente. Se observaron al microscopio las pequeñas gotas lipídicas formadas. Esta emulsión se administró intranasalmente 10µl en cada fosa nasal de los ratones con una punta de micropipeta directamente en las fosas nasales.

Determinación de Lípidos totales en la microalga (por gravimetría).

Se colocaron tubos de borosilicato de 10 ml en un horno de temperatura controlada a 80 °C por 24 horas (como mínimo) hasta peso constante. Se colocaron los tubos en un desecador y se dejaron enfriar por 1 hora, se registró el peso de cada uno de los tubos.

Se pesaron 50 mg de microalgas, se agregaron 6 ml de solución Folch (cloroformo: metanol 2:1 v/v). La muestra se sónico durante 15 minutos en agua con hielo, posteriormente se dejó toda la noche a - 85° C para la extracción de lípidos totales.

Al día siguiente se centrifugo a 14,000 rpm por 15 minutos y 2 ml del sobrenadante (obtenido por el método de Folch) se colocaron en un nuevo tubo a peso constante y se evaporó a sequedad con nitrógeno. Los tubos Se pusieron nuevamente en el horno de temperatura controlada a 30 °C por 24 horas. Se determinó por gravimetría la cantidad de lípidos en la muestra de microalgas

Determinación de proteína de las microalgas (Bradford en placa de 96 pozos)

Se diluyó el reactivo de Bradford (Bio Rad, Protein Assay) 1:5 en agua destilada estéril y se filtró con un filtro de jeringa de 0.45 μm de poro, posteriormente se guardó en un frasco ámbar para proteger contra la luz hasta su uso.

Para realizar la curva de calibración se hicieron diluciones a partir de BSA a una concentración de 1.0 mg/ml. Las diluciones con los volúmenes de BSA y agua se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Diluciones de BSA para la elaboración de la curva estándar de proteínas

Tubos	1	2	3	4	5	6
Concentración final (mg/ml)	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1
Volumen de BSA (μl)	0	20	40	60	80	100
Volumen de agua destilada (μl)	100	80	60	40	20	0
Volumen final (μl)	100	100	100	100	100	100

En una placa de 96 pozos se agregaron 200 μl del reactivo de Bradford diluido 1:5 en cada pozo, después se le agregaron 10 μl de cada dilución de BSA por duplicado. Se mezclaron cuidadosamente sin generar burbujas. Posteriormente se incubó la placa a temperatura ambiente por 5 minutos. Tras la incubación se prosiguió a la lectura de la absorbancia de la placa a 415 nm por medio de un equipo lector de placas, Biorad 550 (Tabla 9). Las muestras de sobrenadante de microalgas se trataron de la misma manera que las diluciones para la curva estándar. Se elaboró una gráfica en Excel con los datos obtenidos y por medio de la ecuación lineal se determinó la concentración de proteínas del sobrenadante de las microalgas (Figura 4).

Preparación de la dosis de probiótico

Dosis oral del probiótico

La bacteria probiótica fue resembrada en caldo MRS y se incubó durante toda la noche a 37° C. Al día siguiente se hicieron diluciones seriadas para tener la concentración deseada (1×10^5 , 1×10^7 y 1×10^9) (Pellaton et al., 2012), antes de centrifugar el cultivo. Se centrifugó 1 ml del cultivo a 5000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente y se retiró el sobrenadante, se le agregó PBS para lavar el cultivo homogenizándolo y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. Una vez lavado el pellet celular se resuspendió en 300 μ l de PBS, posteriormente se refrigeró hasta su administración.

Dosis intranasal del probiótico

Para la administración intranasal se preparó la dosis de acuerdo al procedimiento anterior (administración oral) resuspendiendo el pellet celular en un volumen de 10 μ l de PBS el cual se refrigeró hasta su administración (Pellaton et al., 2012).

4. PRUEBA DE AGLUTINACIÓN

Para evaluar la presencia de anticuerpos contra el probiótico y la microalga, se llevó a cabo una prueba de aglutinación (Averbach, 1975) en suero. Los resultados de esta prueba se usaron para determinar posteriormente la dilución que se utilizó en las pruebas de ELISA.

Se usó el suero sanguíneo de ratones que no estuvieron en contacto con los antígenos (no inoculados con microalgas y probióticos) y de los ratones tratados y se observó la aglutinación. El procedimiento se hizo por medio de la extracción de sangre de los ratones anestesiados por punción cardiaca a blanco, la sangre se centrifugo a 3500 rpm por 10 minutos para obtener el suero, el cual se guardó a -80° C.

Se prepararon diluciones de bacterias probióticas y microalgas. En el caso de las bacterias probióticas se prepararon a una concentración de 3.4×10^9 UFC/ml y las microalgas a un porcentaje 0.05% tuvieron 2.4×10^8 células/ml. Por lo que se diluyó hasta una concentración 1×10^6 células/ml. Se Prepararon las diluciones de suero: PBS 1:40 (a 3.9 ml de PBS se agregaron 0.1 ml del suero) y 1:4 en tubos de ensaye limpios previamente rotulados con el número de registro de la muestra a analizar y la fecha de realización. Se utilizó un volumen por cada reacción de microaglutinación de 50 μ l en cada dilución.

Las diluciones del suero se agitaron y calentaron en baño maría por 30 minutos a 56° C. Se adicionaron 50 μ l en los pocillos de las placas de suero de los ratones y 50 μ l de la dilución 1×10^6 células/ml, la placa se cubrió de la luz y se incubó a 30° C durante 90 min. Una vez pasado el tiempo, se realizaron las lecturas de microaglutinación por visualización en microscopio en objetivo 10X.

5. MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE DE RATONES BALB/C

5.1 Diseño Experimental

Se utilizaron 144 ratones Balb/c administrados con *Graptophora sp* o *Lactobacillus fermentum* A15 por vía mucosal como se indica en los siguientes 9 tratamientos:

1. Administración oral del Probiótico (1×10^5) en 300 μ l
2. Administración oral del Probiótico (1×10^7)
3. Administración oral del Probiótico (1×10^9)
4. Administración oral de la microalga (Concentración 0.5% del alimento)
5. Administración oral de la microalga (Concentración 1.5% del alimento)
6. Administración oral de PBS como control.
7. Administración intranasal del probiótico (1×10^5 en 10 μ l)
8. Administración intranasal de sobrenadante de microalgas sonicadas y centrifugadas (10 μ l por cada fosa nasal)
9. Administración intranasal de solución PBS control (10 μ l por cada fosa nasal)

Sistema experimental

Se utilizaron 18 jaulas o cajas de aproximadamente 100 cm² de suelo por ratón de 30 g y 13 cm de altura como mínimo donde se pusieron 8 ratones por cada jaula. Las jaulas se prepararon conteniendo cama de virutas de madera (Nepco, Aspen hardwood Laboratory bedding) se limpiaron tres veces a la semana, cambiándoles cama, agua purificada acidificada (con ácido clorhídrico 14 ml/ 19 L) y alimento balanceado para roedor (Prolab, 2500 rodent 5p14). Los ratones se alimentaron diariamente ad libitum acceso de alimento y agua.

Se mantuvo a una temperatura estándar de 18°- 22° C. Con 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad con una distribución que permitió la misma intensidad de luz en todas las jaulas. Se evitaron generadores de ruidos y olores (Fuentes, 2008).

Esquema de inmunización

144 ratones Balb/c machos, jóvenes, entre 5 y 6 semanas de edad fueron divididos al azar en 9 tratamientos con 16 animales y cada grupo fue tratado de la siguiente forma:

La administración oral e intranasal del probiótico y la microalga se realizó en dos dosis con intervalo de 21 días (de los Ángeles García et al., 2013). La administración de los tratamientos orales se llevó a cabo con una cánula esofágica. La administración intranasal se llevó a cabo con una punta de micropipeta

Toma de muestras

Las muestras fueron tomadas al inicio del experimento y a los 14, 28 y 35 días después de la primera inmunización. Se registraron los pesos de los organismos en cada muestreo.

Las muestras de sangre fueron tomadas en cada tiempo a blanco por punción cardíaca a cuatro ratones anestesiados con Sofloran vet (PISA, isoflurano anestésico inhalado). La sangre se conservó en refrigeración durante el muestreo, después se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos en una centrifuga Eppendorf 5804R y el suero se almacenó a -85°C hasta su uso.

Después del sangrado a los ratones se les extrajeron los órganos, pulmones, hígado, riñón, bazo, corazón, glándula mamaria e intestino. Una tercera parte de cada órgano se utilizó para distribución sistémica del probiótico, otra tercera parte para cortes histológicos y la otra tercera parte se guardó en RNA later para posteriores estudios de expresión génica.

6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSLOCACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Se realizó la homogenización de las muestras de órganos con un homogenizador de tejidos con pistilos estériles y se procedió a realizar diluciones seriadas en 4.5 ml de buffer de fosfatos pH 7.2 (Las diluciones sembradas se basaron en pruebas previas con ratones control). Se sembró por vaciado en caja Petri 1 ml del inóculo homogenizado de cada dilución seleccionada en medio MRS y Agar Rogosa (DIFCO), se incubaron a 37° C durante 48^a 72 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se realizó el conteo de UFC en cada medio. El mismo procedimiento fue realizado en los 4 muestreos.

7. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY WHOLE CELL, ELISA)

Los títulos de anticuerpos IgG producidos por los ratones en tratamiento contra el probiótico *L. fermentum* A15 ó la microalga *Gramatophora sp* como antígenos fueron medidos a través de ensayos de ELISA (enzyme linked immunosorbent assay whole cell). Se llevaron a cabo 6 repeticiones en dos ensayos independientes.

Placas de 96 pozos (MaxiSorp Nunc) fueron cubiertas por el antígeno incubando toda la noche a temperatura ambiente (TA) con 100 µl de la suspensión bacteriana a una concentración de 1×10^6 UFC viables/pozo en 0.05 M PBS pH 7.4. Se bloquearon los sitios no específicos con 100 µl de buffer PBS con 3% de leche baja en grasa. Se incubó a TA por 30 minutos. Se lavaron los pozos de la placa adicionando a cada uno de ellos 200 µl de PBS-Tween 20 (PBS+T) 0,05%. Se repitió el lavado 2 veces más, en el último lavado se eliminó por completo el líquido residual, invirtiendo la placa sobre papel absorbente (aplicando golpes firmes). Las muestras de suero se diluyeron a 1:150 en PBS y fueron incubadas por 1 hora a TA en las placas previamente cubiertas con el probiótico y bloqueándose los sitios

específicos. Se lavaron los pozos de la placa adicionando a cada uno de ellos 200 µl de PBS-T 0,05%. Se repitió el lavado por 2 veces más, en el último lavado se eliminó por completo el líquido residual, invirtiendo la placa sobre papel absorbente (aplicar golpes firmes). Se pusieron 100 µl del anticuerpo secundario (IgG anti-mouse conjugada con HRP, Sigma-Aldrich) diluido 5:10,000 en PBS, se incubó por 1 h a TA. Se lavaron los pozos de la placa adicionando a cada uno de ellos 200 µl de PBS-T 0,05%. Se repitió el lavado por 2 veces más, en el último lavado se eliminó por completo el líquido residual, invirtiendo la placa sobre papel absorbente (aplicar golpes firmes). Para desarrollar el color, se agregaron 100 µl de una solución de o-phenyldiamine (OPD) (10 mg de OPD en 20 ml de 0.1 M buffer de citrato de sodio, pH 5, H₂O₂, 8 µl). La reacción se desarrolló en la oscuridad a temperatura ambiente durante 15 minutos. La absorbancia fue medida a 415 nm en un lector de placas de ELISA (BioRad Modelo 550). Con los datos obtenidos se realizó un análisis estadístico ANOVA de una vía y prueba de comparación múltiple Dunnet, se utilizó una $p < 0.05$.

8. ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS

Extracción de proteínas de pared y membrana celular

La cepa probiótica *L. fermentum* A15 se reactivó en agar MRS por estría cruzada incubando en jarra de anaerobiosis a 37° C por 48 horas, se sembró en caldo MRS incubando a 37° C durante toda la noche. Se resembró en medio LDM al 1 % y se incubó a 37°C hasta su fase de crecimiento logarítmico máximo. En este punto se cosecharon las células del cultivo, centrifugando a 3500 rpm por 5 min a 4 °C. El pellet se lavó dos veces con HEPES-Hank, se agregó una solución de cloruro de litio 1M y se incubó durante 1 hora a 4° C, después se centrifugó a 8000 rpm por 30 minutos. El sobrenadante fue filtrado utilizando una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm y dializado contra agua toda la noche a 4° C, el sobrenadante dializado fue liofilizado y guardado a 4° C. Las proteínas liofilizadas fueron resuspendidas en 50 µl

de agua desionizada estéril y se agregaron 50 μ l de buffer de la muestra (250 mM TRIS-HCl, pH, 6.8, 6% SDS, 5% glicerol, 0.05 mg/mg azul de bromofenol). Esta suspensión se incubó a 37°C por una hora y se desnaturalizó a 95° C por 5 minutos.

Electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes

La electroforesis en geles de poliacrilamida se llevó a cabo en un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad[®]), bajo las especificaciones del manual de procedimientos usando la técnica de Laemmli (1970).

Se elaboraron geles de poliacrilamida al 12% con SDS y se corrieron 20 μ l de cada una las muestras de extractos proteicos desnaturalizados en dos geles a 120 volts por 90 min. Un gel fue usado para tinción con azul de comassie y el otro para Western Blot.

Tinción de proteínas en geles de poliacrilamida con azul de coomassie

Una vez terminada la electroforesis un gel de poliacrilamida se colocó en un recipiente donde se le añadió solución de teñido con azul de coomassie (Ácido acético 10%, Metanol 40% y azul de Coomassie 0.1%) hasta cubrirlo. El gel se dejó incubando a temperatura ambiente y en agitación suave durante 2 horas, posteriormente se eliminó la solución de teñido y se agregó solución de desteñido hasta observar solo las bandas de proteínas teñidas. Una vez desteñido se elimina la solución y se agrega agua destilada. El perfil de proteínas es comparado con el marcador de peso molecular (BioRad) una vez que el gel es documentado en una imagen digital.

Western Blot con anticuerpos policlonales de ratón inmunizado con probiótico

Uno de los geles corridos por SDS PAGE fue transferido a una membrana de polyvinylidene difluoride (Immobilon; Millipore[®]) por medio de un equipo de transferencia (Trans Blot semi-dry transfer cell Bio Rad[®])

Se utilizó una membrana de teflón PVDF (Immobilon-P; Millipore) cortada del tamaño del gel y 12 trozos de papel filtro del mismo tamaño. Se hidrató introduciéndola por completo en un volumen pequeño de metanol por 2 segundos para inmediatamente después lavarla en agua destilada por 5 min e introducirla en un buffer de transferencia preparado de acuerdo a las instrucciones del manual (BioRad) para equilibrarla. Posteriormente la membrana se colocó dentro de la cámara de transferencia (Trans Blot) sobre una cama de papel filtro previamente humedecido con el buffer de transferencia, sobre la membrana se colocó el gel y por último más papel filtro húmedo, la transferencia se realizó a 10 V por 30 min. El Western Blot se continuó, usando anticuerpos policlonales anti mouse (IgG totales) ligados a peroxidasa producidos en conejo. La membrana se incubó en un volumen de 10 ml de una solución al 3% (p/v) de gelatina preparada con Tris buffered saline (TBS) por 30 min a temperatura ambiente y agitando suavemente. Se desechó la gelatina y se lavó dos veces por 10 min con 10ml de Tween Tris buffered saline (TTBS), 10 min. La membrana se incubó con el primer anticuerpo (50 µl en 10 ml del antibody buffer), se mantuvo en incubación por 90 min a temperatura ambiente y agitándose suavemente. Se desechó el primer anticuerpo y la membrana se lavó dos veces con 10 ml de TTBS, 10 minutos cada vez agitando suavemente. La membrana se incubó, con el anticuerpo secundario (Rabbit Anti mouse Horse Radish Peroxidase RAM-HRP) diluido (5 µl del anticuerpo en 10 ml del buffer del anticuerpo) se mantuvo en incubación por 60 min a temperatura ambiente y agitando suavemente. El RAM-HRP se desechó y la membrana se lavó dos veces con 10 ml de TTBS, y una con TBS 10 min cada vez agitado suavemente. Posteriormente la membrana se enjuagó con una solución de acetato de sodio 0.1 M pH 5.0, se desarrolló color con una solución conteniendo 3.5 mg de diamino-benzidina, 2.5 µl de

peróxido de hidrógeno en 10 ml de acetato de sodio 0.1 M preparada al momento de usarse. Después se desarrolló el color la reacción se detuvo con metabisulfito de sodio al 0.1 M y posteriormente la membrana se dejó secar a temperatura ambiente.

9. CULTIVO DE *LACTOBACILLUS FERMENTUM* A15 UTILIZANDO A *GRAMMATOPHORA SP.* COMO PREBIÓTICO

La cepa de *L. fermentum* A15 fue reactivada en agar Rogosa por estría cruzada, se incubó a 37° C por 48 horas en anaerobiosis. Se tomó una colonia aislada y se resembró en caldo MRS a 37° C por 18 horas. Se tomó 1 ml del cultivo crecido toda la noche, éste fue lavado dos veces con buffer de fosfatos (PBS) centrifugando en cada ocasión para concentrar el pellet celular. La Resuspensión celular se realizó agregando 1 ml de PBS. Por otro lado se sonicaron 18.75 mg de *Grammatophora* (0.5% de microalga de acuerdo al porcentaje agregado al alimento diario consumido por los ratones) en 1 ml de PBS. La microalga fue inoculada con *L. fermentum* A15 al 1% y al cultivo se le agregó glucosa al 2%. Se realizaron cultivos de *Grammatophora sp.* sin inocular. Los cultivos fueron muestreados al tiempo 0, 24 y 48 horas de incubación. Se realizaron diluciones seriadas, muestras tomadas (100 µl) fueron sembradas en agar MRS por extensión en superficie e incubadas a 37° C durante 48 horas en anaerobiosis. Las Unidades Formadoras de Colonia (UFC) fueron contadas a las 48 horas. Los resultados se expresaron en Log UFC/ml, graficando los tres tiempos en que se muestreo.

10. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *GRAMMATOPHORA SP.*

Extracto etanólico de *Grammatophora*

Se pesaron 5 gr de *Grammatophora sp* liofilizada y se colocó en un frasco. Se le agregó un volumen de etanol de 96° cubriendo la microalga, posteriormente se homogenizó y se dejó en la oscuridad durante 7 días a temperatura ambiente (aproximado 25° C). Después de los 7 días se obtuvo un extracto de la microalga filtrando la solución formada con la microalga y el etanol. Se puso en un frasco limpio. Se pusieron viales a peso constante en un horno con vacío a 40° C y 25 lb/pulg² los cuales fueron pesados y mantenidos en un desecador. A tres viales se les agregaron 200 µl del extracto de la microalga y se colocaron nuevamente en el horno durante 24 horas a 40° C y 25 lb/pulg² para su desecación. A las 24 horas los viales con el extracto sin etanol fueron pesados para determinar por diferencia la concentración obtenida del extracto en g.

Curva de la actividad antioxidante del extracto de *Grammatophora sp.*

Con el resto del extracto etanólico de la microalga se realizaron las siguientes reacciones con 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) de acuerdo a la siguiente tabla:

Tabla 5. Datos de concentración de la curva estándar del extracto de *Grammatophora sp.*

No.	Volumen Solución de <i>Grammatophora sp.</i> (µl)	Volumen de MeOH (µl)	Volumen de DPPH (µl)	Concentración del extracto mg/µl
1	30	170	800	0.525
2	60	140	800	1.050
3	90	110	800	1.575
4	120	80	800	2.100
5	150	50	800	2.625
6	180	20	800	3.150

Se hicieron las reacciones utilizando como blanco para cada reacción el mismo volumen de la microalga más metanol hasta llegar a 1 ml (sin el DPPH). Se realizaron las mezclas incubando 30 minutos después de agregar el DPPH a temperatura ambiente. La lectura se realizó en un espectrofotómetro BIO-RAD SmartSpec 3000 a una longitud de onda de 515 nm (Brand-Williams, et al., 1994). Se utilizó la curva estándar y la ecuación de la recta, previamente elaborada con diluciones del reactivo DPPH (el reactivo que presenta color en su estado oxidado solo se diluye en metanol para obtener diferentes absorbancias de acuerdo a su concentración) para interpolar las absorbancias obtenidas en las reacciones de los extractos y encontrar la concentración del extracto que no reacciona con DPPH en mg/ml (Tabla 6).

Con los datos de concentración de los extractos obtenidos de la curva estándar se realizaron los cálculos para determinar la ED50 (Dosis Efectiva, que es la cantidad de fármaco que produce una respuesta terapéutica o efecto deseado en una fracción del extracto) del extracto de *Grammatophora sp* utilizando la ecuación de la curva estándar de la solución de DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) Tabla 6.

Tabla 6. Datos de concentración de la curva estándar de DPPH

No.	abs1	abs2	Conc. (mg/mL)	Conc. (μ M)
1	0.915	0.972	0.03600	91.3
2	0.447	0.462	0.01800	45.6
3	0.214	0.224	0.00900	22.8
4	0.094	0.103	0.00450	11.4

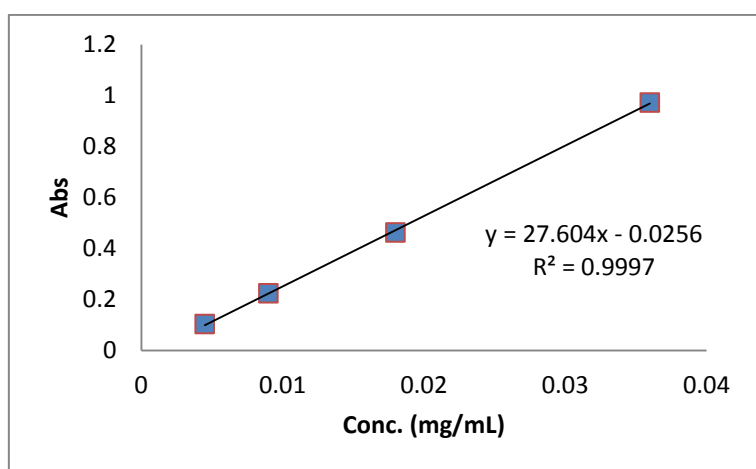


Figura 2. Curva estándar de DPPH a 515 nm

VIII. RESULTADOS

1. MICROALGA

Conteo celular del cultivo de Microalgas

El conteo celular de los tres tanques del cultivo de *Grammatophora sp.* a los 6 días de inoculo fue de 1.0×10^6 , 1.6×10^6 y 1.5×10^6 cel/ml respectivamente. El conteo de células de cada día se observa en la tabla 7 y en la Figura 3, en donde se observa una fase de adaptación de 5 días y posteriormente un crecimiento abundante.

Tabla 7. Conteos de células en cámara de Neubauer del cultivo de microalgas *Grammatophora sp.*

Tanque	día cero cel /ml	día 1 cel /ml	día 2 cel /ml	día 3 cel /ml	día 4 cel /ml	dia5 cel /ml	día 6 cel /ml
1	1250	2500	3750	8750	328750	947500	1026250
2	2500	2500	6250	15000	641250	890000	1665000
3	1250	7500	10000	20000	771250	1110000	1572500

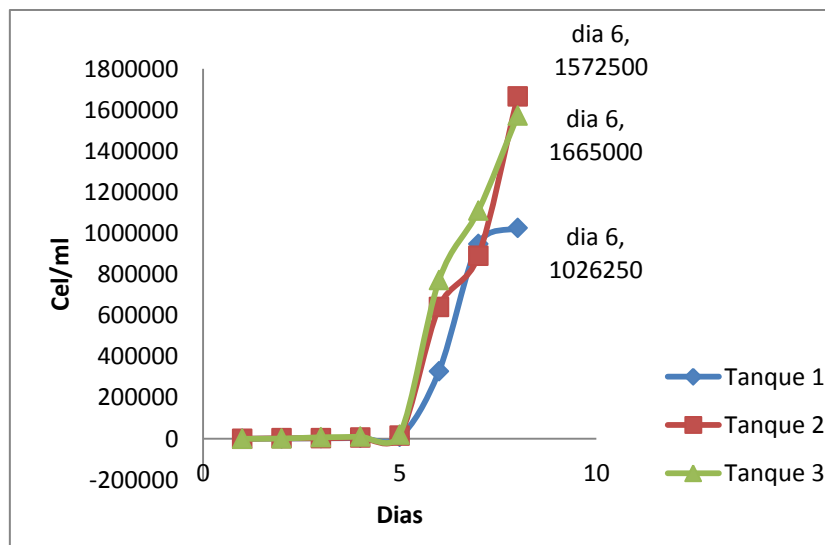


Figura 3. Curva de crecimiento del cultivo de *Grammatophora sp.*

Cosecha y conservación de las Microalgas

Se obtuvo una biomasa en peso húmedo de 2kg tras cosechar la microalga de los tres tanques de 1800 L.

Tras los procesos de cosecha y liofilizado se obtuvieron 210 g de biomasa en peso seco. y las concentraciones del bioensayo fueron 0.5, 1 y 1.5%.

Análisis Microbiológico de las Microalgas liofilizadas

A las microalgas liofilizadas se les hizo un análisis microbiológico con el objetivo de verificar la calidad microbiológica y evitar problemas en la especificidad de los anticuerpos al momento del experimento. Se hizo el análisis por cuenta viable y se obtuvieron 2×10^2 UFC/ml.

2. PROBIÓTICO

Evaluación del cultivo bacteriano por cuenta viable

Con el fin de conocer las UFC/ml de un cultivo de la cepa A15 *Lactobacillus fermentum* incubado toda la noche, se realizó una cuenta viable en agar MRS, dándonos un resultado de 3.35×10^9 UFC/ml. Con este dato se calculó la concentración para la preparación de las dosis de bacterias probióticas A15.

3. DOSIS DE MICROALGA Y PROBIÓTICO

Dosis de microalga para administración oral.

Tomando como referencia a Fuentes 2008, donde se señala que las necesidades diarias de alimento y agua de ratones es de 15 g/100 g de peso vivo y 15 ml/ 100g peso vivo respectivamente, de tal manera que nuestros ratones con un peso de 25 g consumirían 3.75 g de alimento y 3.75ml de agua diarios. Conforme los porcentajes de microalgas que se agregarían al alimento (1, 3 y 5 %). Se calculó una biomasa necesaria de 450 mg de microalga peso seco. Sin embargo una evaluación preliminar in vivo con dichas concentración de microalga en PBS nos permitió ver que las cantidades calculadas eran demasiado para cada ratón por lo que se propuso 1.5 (56 mg) y 0.5% (19 mg).

Las concentraciones de microalgas fueron 0.5 y 1.5%, diluidas en 300 μ l de PBS y sonicadas, resultando una solución homogénea y sin presencia de partículas de gran tamaño, óptima para su administración.

Dosis de microalga para administración intranasal.

Fracción lipídica

La concentración de microalgas para la preparación de esta fracción fueron los lípidos obtenidos de 50 mg de microalga (14 mg) disueltos en 50 μ l de etanol, para administrar 10 μ l (2.8mg) de la fracción lipídica a cada ratón. 50 μ l de la fracción lipídica fue emulsionada con 50 μ l de la fase acuosa antes de aplicarla

Determinación de Lípidos (gravimetría).

Los resultados de la determinación de lípidos totales de microalgas se indican en la tabla 8, donde se observan las diferencias entre peso final e inicial. El promedio obtenido fue de 28 % de lípidos totales en una muestra de microalgas de 50 mg.

Tabla 8. Pesos obtenidos en el proceso de la determinación de lípidos de una muestra de 50 mg de *Grammatophora sp.*

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Peso lípidos (g)
Tubo 1	14.742	14.756	0.014
Tubo 2	14.787	14.800	0.013
Tubo 3	14.803	14.818	0.015
Promedio	-	-	0.014

$$\% LT = \frac{(P2 - P1)}{Pm} \times 100$$

% LT; porcentaje de lípidos totales
P2; peso del tubo con muestra seca
P1; peso del tubo con muestra
Pm; peso de la muestra

$$\% LT = \frac{(0.014)}{0.050} \times 100 = 28$$

Determinación de proteína soluble de la microalga. (Bradford en placa de 96 pozos).

Para la determinación de proteína se utilizó el sobrenadante de una solución de microalgas preparada con 56mg de microalga liofilizada y 300µl de solución inyectable y sonicada (Bradford, 1976). La curva estándar obtenida, con una R²= 0.9895 y los datos de la curva se muestran en la Figura 4 y en la Tabla 5.

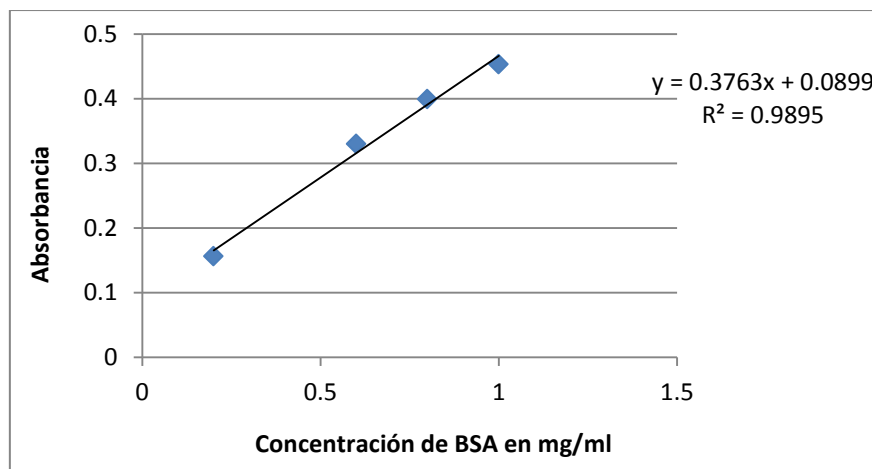


Figura 4. Curva estándar de proteína de *Grammatophora sp.*

Tabla 9. Datos de absorbancia en la determinación de proteínas por el método de Bradford (BioRad)

Muestras	Concentración (mg/ml)	Absorbancia
BSA	0.2	0.3505
BSA	0.6	0.538
BSA	0.8	0.612
BSA	1.0	0.6605

La concentración de proteínas fue calculada por triplicado utilizando la ecuación lineal generada en la curva estándar hecha con BSA y se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Concentración de proteínas hidrosolubles de *Grammatophora sp.*

Muestras	Absorbancia	Concentración (mg/ml)
Sobrenadante de microalgas 1	0.241	0.180
Sobrenadante de microalgas 2	0.254	0.185
Sobrenadante de microalgas 3	0.257	0.186

Los resultados mostraron que la parte soluble de la microalga presentó una concentración de proteína de 0.184 mg/ml (0.0552mg prot/56mg microalga en 300µl agua), equivalente al 10% de la microalga.

Fracción acuosa

Tomando en cuenta que la dosis proporcionada fue de 20 µl (10 µl de cada fracción acuosa y lipídica)/fosa nasal, la concentración de proteína en la dosis fue de 3.68 µg.

Dosis de probiótico

Las dosis orales de probiótico cepa A15 *Lactobacillus fermentum* realizadas empleando diluciones seriadas se realizó de la siguiente manera. Para la concentración de 3.34×10^9 UFC/ ml se utilizó el cultivo directo, para las otras concentraciones se realizaron cuatro diluciones y se realizó el mismo procedimiento de centrifugación y lavado para obtener un pellet y resuspender en PBS. Los resultados de la cuenta viable en las heces de los ratones utilizando un control, mostraron que las concentraciones más elevadas de bacterias ácido lácticas fueron encontradas en los ratones inoculados con la bacteria probiótica, comprobando que la supervivencia de las bacterias ácido lácticas en el sistema gastrointestinal de los ratones fue de 1.15×10^8 UFC/ml en el control y 2.79×10^8 en el tratamiento de probiótico.

La dosis para la administración intranasal fue realizada por medio de las diluciones seriadas de la misma manera que en la administración oral.

4. PRUEBA DE AGLUTINACIÓN

Los resultados de esta prueba mostraron que los sueros de organismos administrados oralmente con microalgas y probióticos aglutinan visiblemente a las microalgas y al probiótico. Sin embargo la aglutinación fue más abundante en la microalga que en el probiótico. Dicha aglutinación indicó la presencia de anticuerpos contra el probiótico y la microalga.

Asimismo los resultados mostraron que los sueros de los ratones control que no se inocularon con probiótico y microalga, no mostraron aglutinación visible en la microalga ni en el probiótico.

En la prueba de aglutinación del probiótico se tuvo que confirmar esta aglutinación en el microscopio (Nikon Eclipse E600) con el objetivo 100X donde se observó que muchos de los bacilos se encontraban pegados, pero no formaron una red o pastilla tan visible como en el caso de las microalgas.

6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSLOCACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

La capacidad de translocación de bacterias ácido lácticas a bazo y pulmón durante la exposición a *Lactobacillus fermentum* A15 de ratones Balb/c fue confirmada, mostrando un conteo mayor de UFC/órgano en bazo a los 14 días después de la administración del probiótico en los diferentes tratamientos. Siendo los tratamientos de probiótico 1×10^5 y 1×10^7 UFC/ml administrados oralmente, con un valor de 7.36 y 7.26 Log UFC/órgano. La Figura 5 muestra el logaritmo natural de las UFC encontradas en muestras de Bazo de Ratón Balb/c cuantificadas en Agar MRS de acuerdo a los diferentes tratamientos donde se aplicó el probiótico.

En el caso de pulmón se presentó una mayor concentración a los 28 días en las administraciones orales y en el nasal a los 14 días. Siendo el tratamiento probiótico 1×10^7 UFC/ml el que presenta mayor concentración con 3.8 Log UFC/órgano y en el caso del tratamiento nasal de 2 Log UFC/órgano. La Figura 6 muestra el logaritmo natural de las UFC encontradas en muestras de pulmón de Ratón Balb/c sembradas en Agar MRS de acuerdo a los diferentes tratamientos donde se aplicó el probiótico.

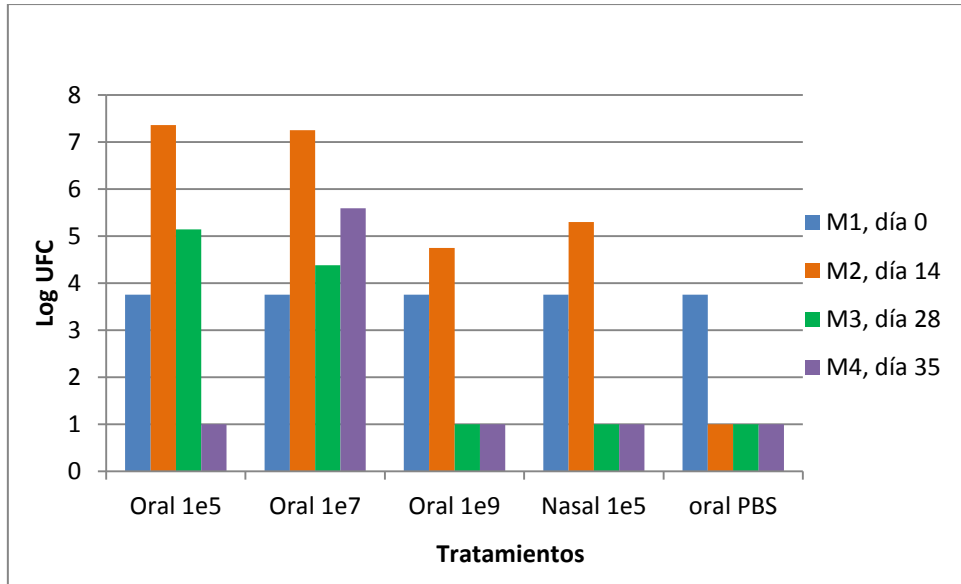


Figura 5. Log UFC/órgano de Bazo en Agar MRS. Cada barra se refiere a los tiempos y tratamientos analizados.

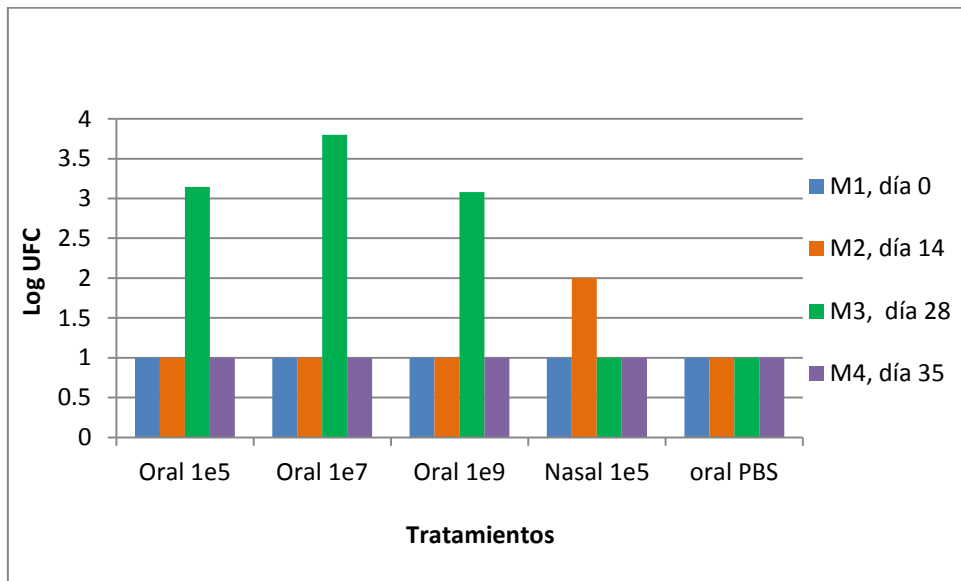


Figura 6. Log UFC de Pulmón en Agar MRS. Cada barra se refiere a los tiempos y tratamientos analizados.

7. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY WHOLE CELL, ELISA)

Para conocer los títulos de anticuerpos (IgG) en los sueros de ratón de los diferentes tratamientos se realizaron ensayos de ELISA y con los datos obtenidos se hizo un análisis de varianza de una vía y prueba de Dunnet con una significancia de $p < 0.05$. Los ensayos con placas recubiertas de *L. fermentum* A15, y tratadas con los sueros de ratones provenientes de los tratamientos a los 14, 28 y 35 días después de las administraciones orales con probiótico ó microalga mostraron los siguientes resultados. Los títulos más altos con diferencias significativas fueron obtenidos con los sueros de ratones administrados con la microalga, siendo mayores en el tratamiento de microalga 1.5% a los 28 días y menor en microalga 0.5% a los 35 días, Figura 7.

Los resultados de los ensayos en placas recubiertas con *L. fermentum* y tratadas con suero de ratones administrados nasalmente con probiótico o microalga, mostraron los títulos de anticuerpos más altos con diferencias significativas en los tratamientos de microalga y probiótico a los 14 días y en el caso de microalga también a los 35 días, Figura 8.

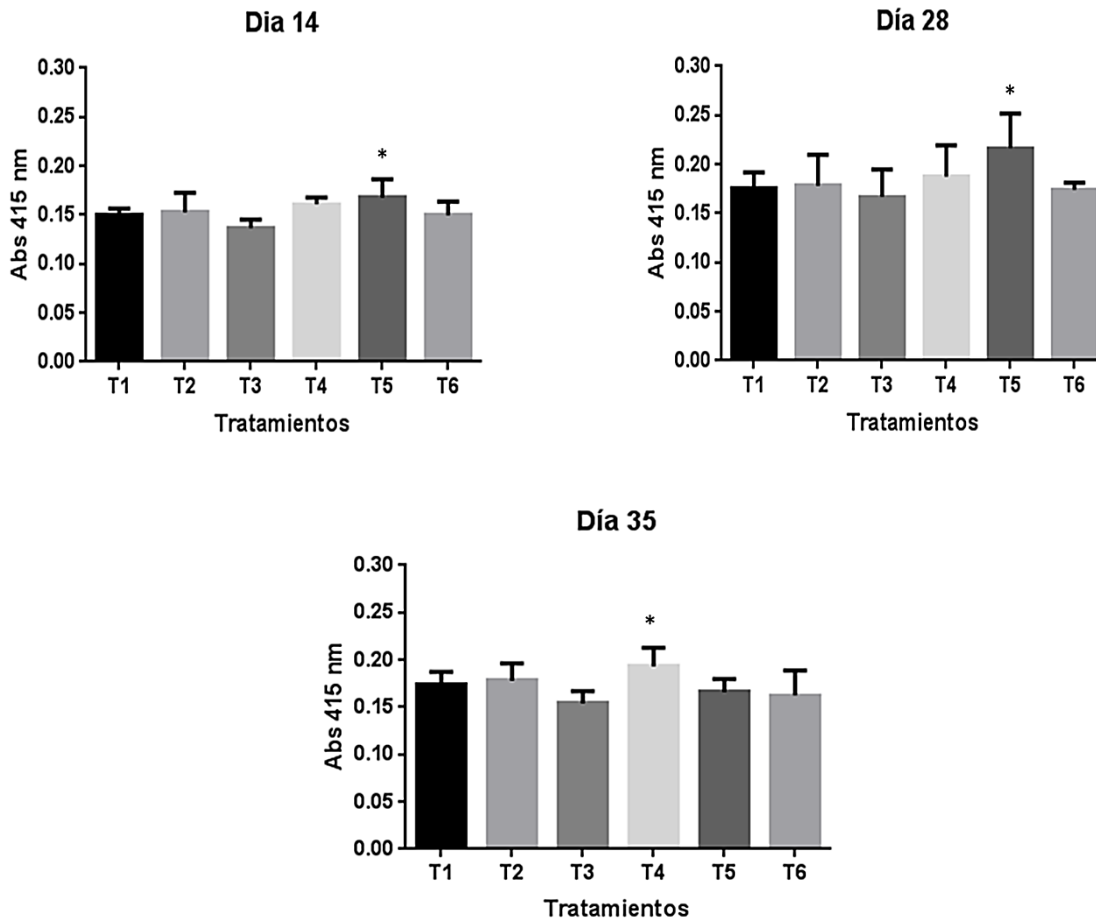


Figura 7. Títulos de IgG totales en suero de Ratón Balb/c a los 14, 28 y 35 días de la administración oral de *L. fermentum* A15 y *Grammatophora* sp. , utilizando *L. fermentum* A15 como antígeno. Los tratamientos administrados fueron: T1 (probiótico a 1×10^5 UFC/ml), T2 (probiótico a 1×10^7 UFC/ml), T3 (probiótico a 1×10^9 UFC/ml), T4 (microalga a 0.5%), T5 (microalga a 1.5%) y T6 (PBS como control).

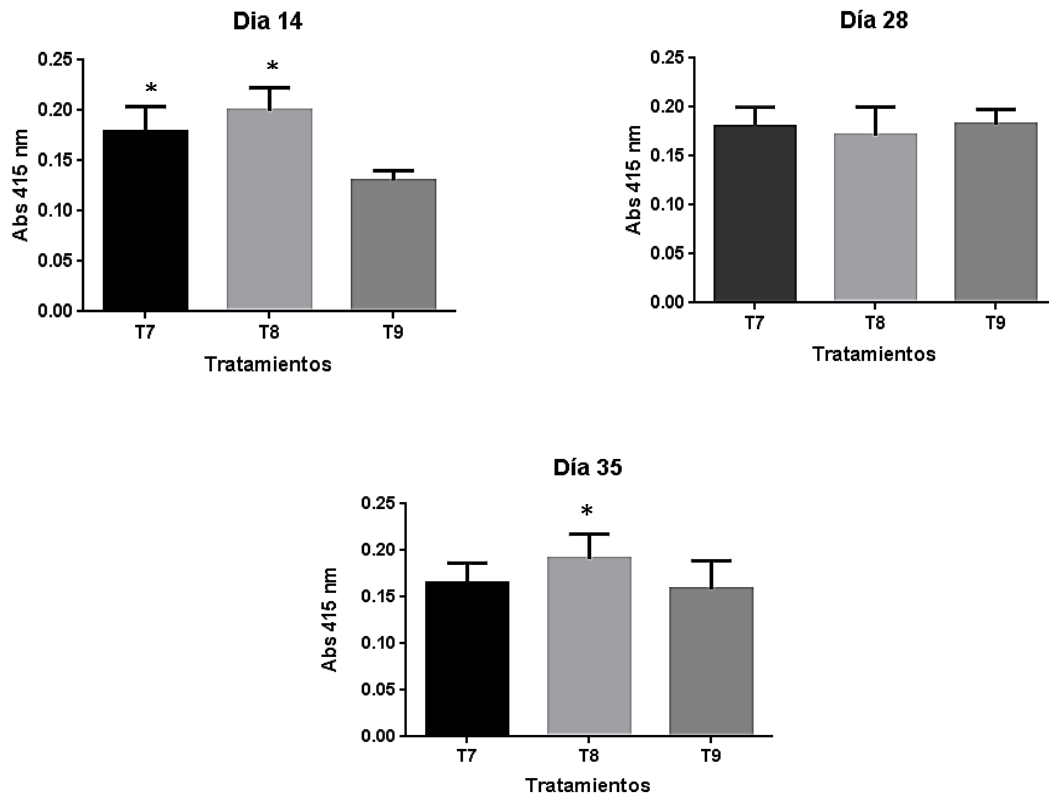


Figura 8. Títulos de IgG totales en suero de Ratón Balb/c a los 14, 28 y 35 días de la administración nasal de *L. fermentum* A 15 y *Grammatophora* sp., utilizando a *L. fermentum* A 15 como antígeno. Los tratamientos administrados fueron: T7 (probiótico a 1×10^7 UFC/ml), T8 (microalga a 0.5%), T9 (PBS como control).

Para los ensayos con placas recubiertas de *Grammatophora* sp. a los 14, 28 y 35 días después de las administraciones orales, se obtuvieron los títulos más altos con diferencias significativas en el tratamiento de microalga 1.5% a los 28 días, sin embargo también los tratamientos de microalga 0.5% y probiótico 1×10^9 tuvieron diferencia respecto el tratamiento control. Se muestra una mayor respuesta a los 14 días en el caso de tratamiento del probiótico 1×10^5 y 1×10^7 . Se muestra un aumento en los títulos del tratamiento microalga 1.5% llegando al punto más alto a los 35 días. También en el tratamiento de probiótico 1×10^7 los títulos permanecen elevados durante mayor tiempo.

Para los ensayos de las administraciones nasales, se obtuvieron los títulos de anticuerpos más altos con diferencias significativas en los tratamientos de microalga y probiótico a los 35 días.

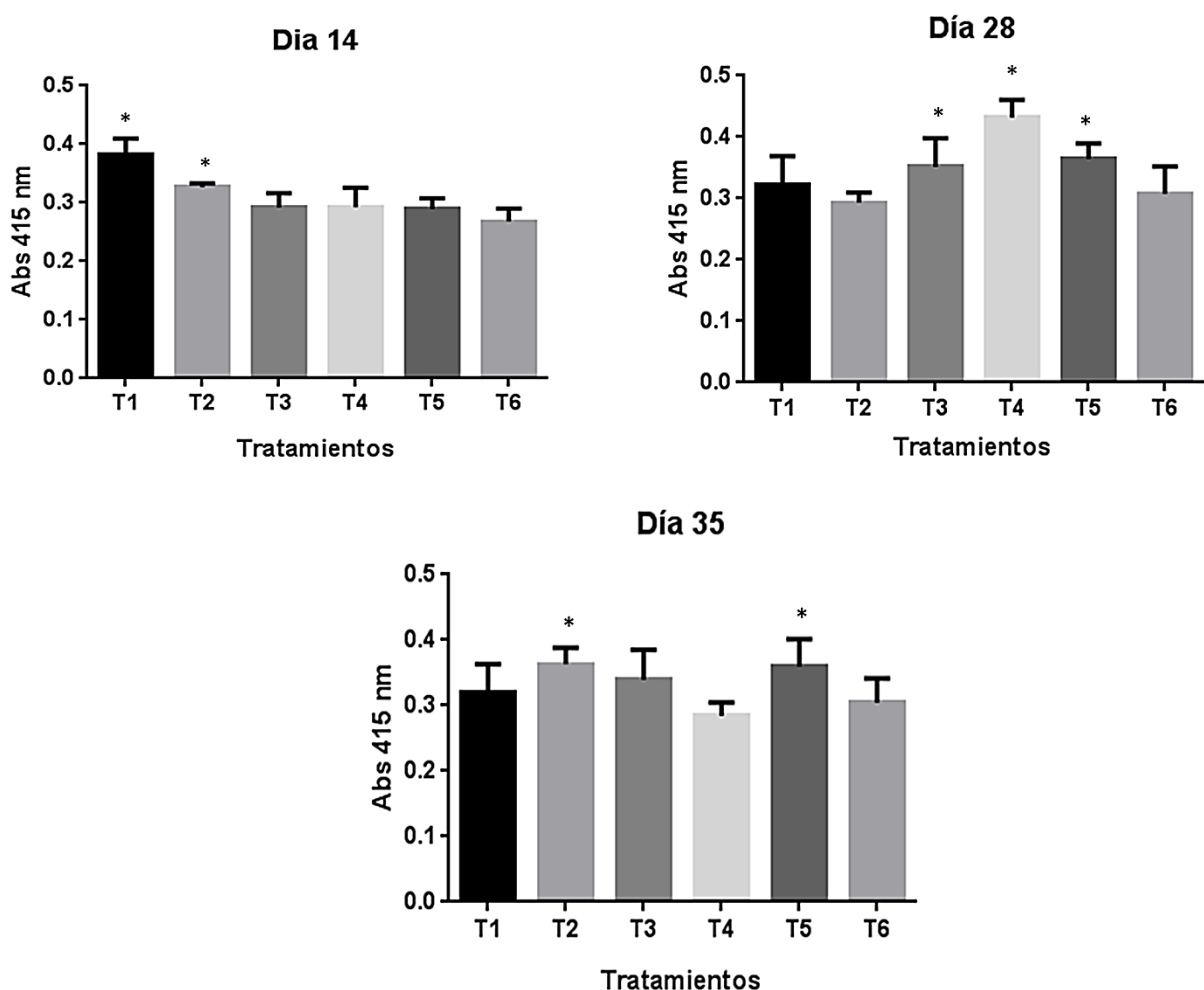


Figura 9. Título de IgG totales en suero de Ratón Balb/c a los 14, 28 y 35 días de la administración oral de *L. fermentum* A 15 y *Grammatophora* sp., utilizando a *Grammatophora* sp como antígeno. Los tratamientos administrados fueron: T1 (probiótico a 1×10^5 UFC/ml), T2 (probiótico a 1×10^7 UFC/ml), T3 (probiótico a 1×10^9 UFC/ml), T4 (microalga a 0.5%), T5 (microalga a 1.5%) y T6 (PBS como control). *diferencia significativa

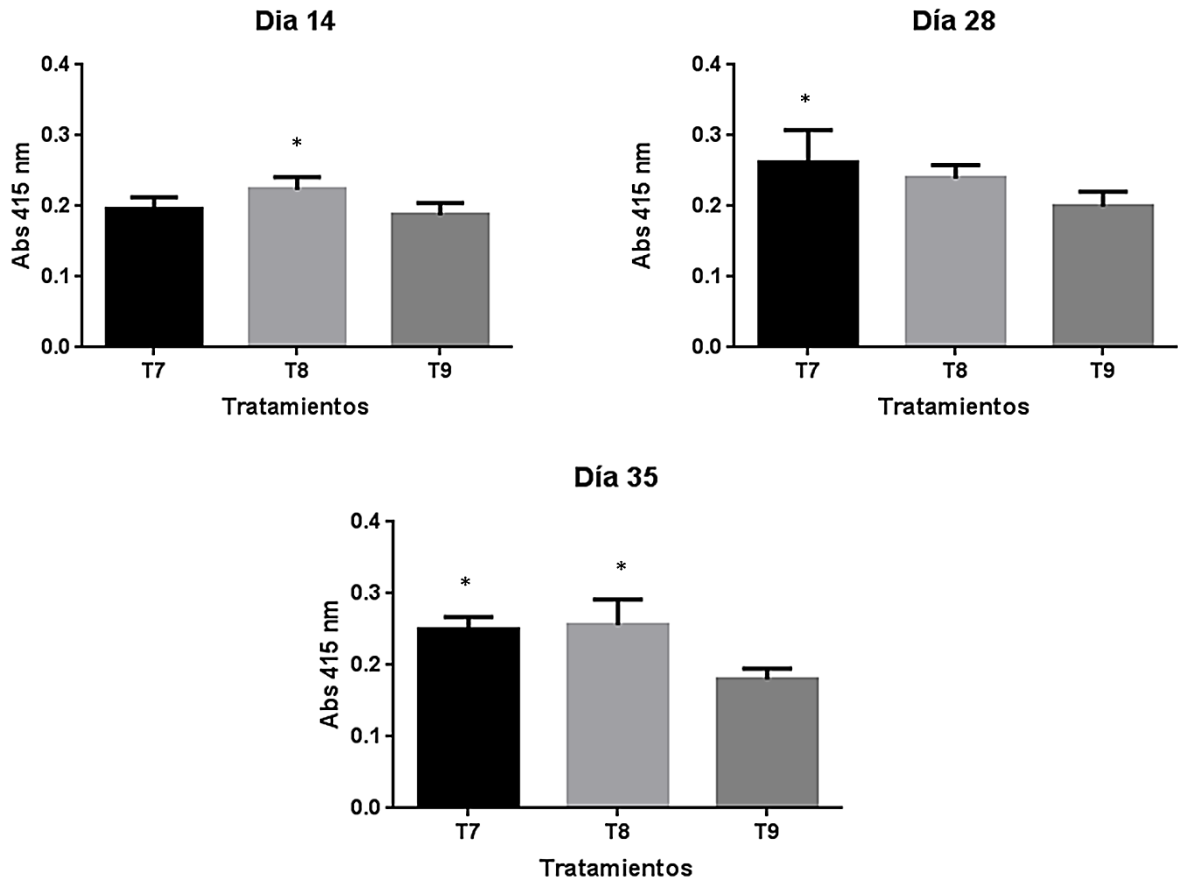


Figura 10. Títulos de IgG en suero de Ratón Balb/c a los 14, 28 y 35 días de la administración nasal de *L. fermentum* A15 y *Grammatophora* sp., utilizando a *Grammatophora* sp. como antígeno. Los tratamientos administrados fueron: T7 (probiótico a 1×10^7 UFC/ml), T8 (microalga a 0.5%), T9 (PBS como control).

8. ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS

El extracto de proteínas superficiales de *L. fermentum* A15 extraídas con el agente caotrópico Cloruro de Litio 1M, dializadas y liofilizadas fue rehidratado para medir la concentración de proteína (Abs.260 nm) en el Smart Spec 3000 Bio-Rad (1.0 de absorbancia = 50 µg/ml). La concentración de proteínas fue de 74 µg/ml.

El análisis de dicho extracto protéico fue analizado por SDS-PAGE al 12% y se obtuvo un perfil de bandeo de las proteínas de la pared y/o membrana celular de *L. fermentum* A15 mostrado en la figura11.

El extracto de proteínas de *Grammatophora*, extraído con un buffer (Tris-HCl 0.5 M, glicerol, SDS al 10%, mercaptoetanol y azul de bromofenol) y analizado por SDS-PAGE, se observa en la Figura 12. Se observan las bandas no definidas, lo que sugiere que otros compuestos de la microalga además de las proteínas fueron extraídos y están interfiriendo en la movilidad de las proteínas.

SDS-PAGE de proteínas de *L. fermentum* A15 y *Grammatophora* sp.

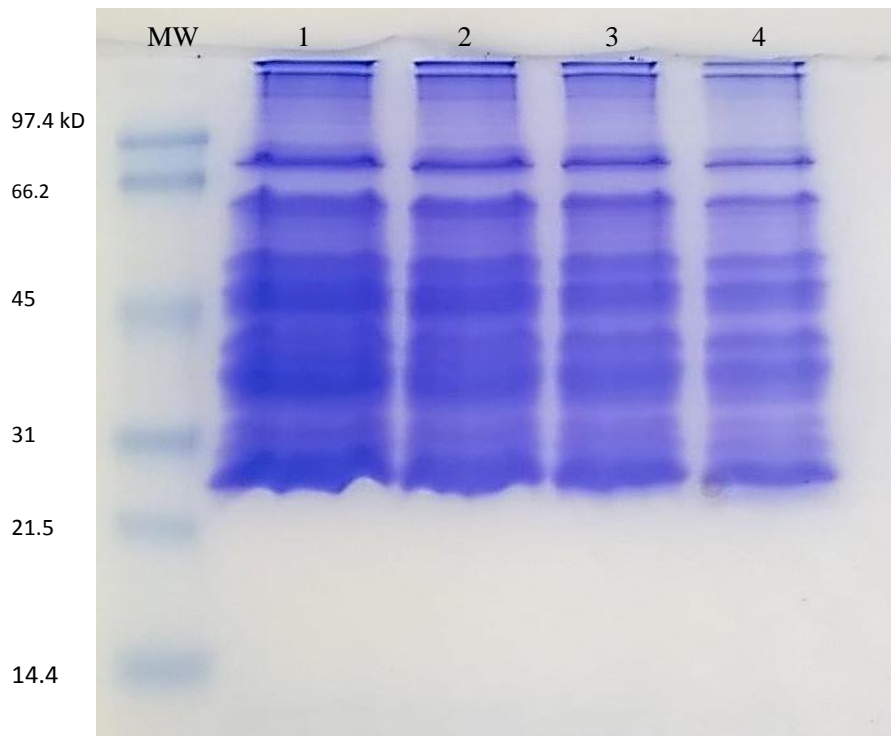


Figura 11. Perfil de proteínas superficiales de la cepa *L. fermentum* A15 obtenido por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12 %. Todos los carriles cargados con proteínas de *L. fermentum* A15. MW; prestained SDS-PAGE Standars, Low Range.

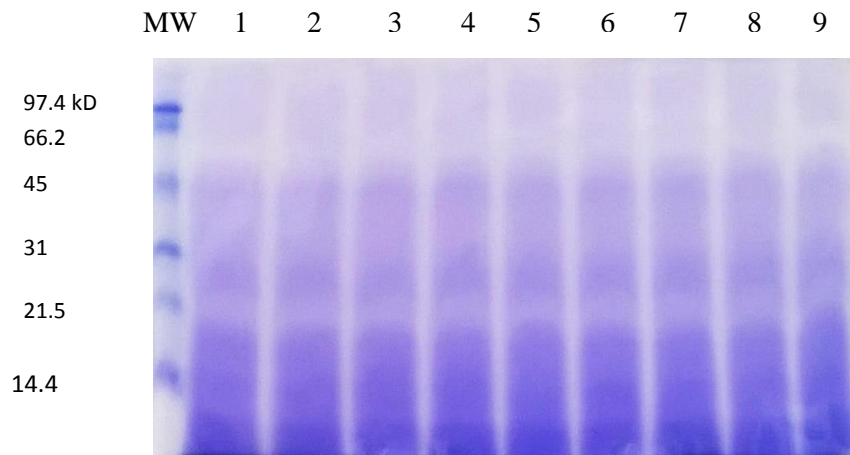


Figura 12. Perfil de proteínas de la pared y/o membrana celular de la cepa de *Grammatophora sp.* obtenido por SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12 %. Todos los carriles cargados con proteínas de *Grammatophora sp.* MW; prestained SDS-PAGE Standards, Low Range.

Western Blot con anticuerpos policlonales de ratón inmunizado con probiótico y Microalga.

Se hizo un western blot con el objetivo de conocer la especificidad de los anticuerpos producidos por ratones tratados con *L. fermentum* A15 y *Grammatophora sp.* De acuerdo a los títulos de anticuerpos más altos obtenidos en los ensayos de ELISA y tomando en cuenta la respuesta inmune específica se utilizaron los sueros de los tratamientos de probiótico oral 1×10^7 , microalga oral 0.5%, probiótico nasal y microalga nasal, utilizando una membrana con proteínas de *L. fermentum* A15. En este ensayo se obtuvieron dos bandas intensas de alrededor de 45 y 21.5 Kb en el tratamiento del probiótico 1×10^7 UFC/ml y una banda muy intensa entre 31 y 21.5 Kb

para el tratamiento de microalga 0.5%. Para los tratamientos nasales se perciben algunas bandas muy tenues.

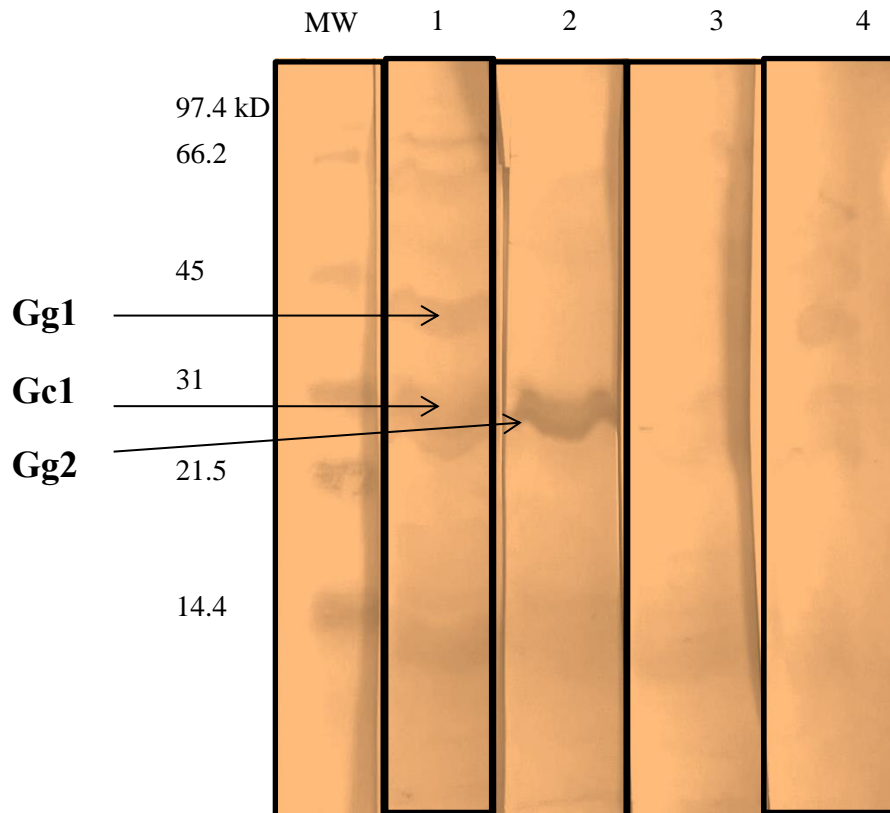


Figura 13. Western Blot de proteínas de *L. fermentum* A 15 ensayadas con suero de ratones y utilizando como anticuerpo secundario IgG anti-raton conjugada con HRP en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF) . MW; prestained SDS-PAGE Standars, Low Range, Carril 1: T2, Probiótico administrado oralmente (1×10^7 UFC/ml), Carril 2: T4, Microalga administrada oralmente (0.5 % respecto al alimento consumido diariamente). Carril 3: T7, Probiótico administrado nasalmente (1×10^5 UFC/ml) y Carril 4: T8, Microalga administrada nasalmente.

En el caso del western blot utilizando proteínas de *Grammatophora sp.* tenemos un resultado notorio sin embargo no específico. Se muestra un barrido coloreado en todos los tratamientos donde se administró oral y nasalmente el probiótico. Sin embargo el color fue más intenso para el tratamiento probiótico nasal, carril 4 de la figura 14.

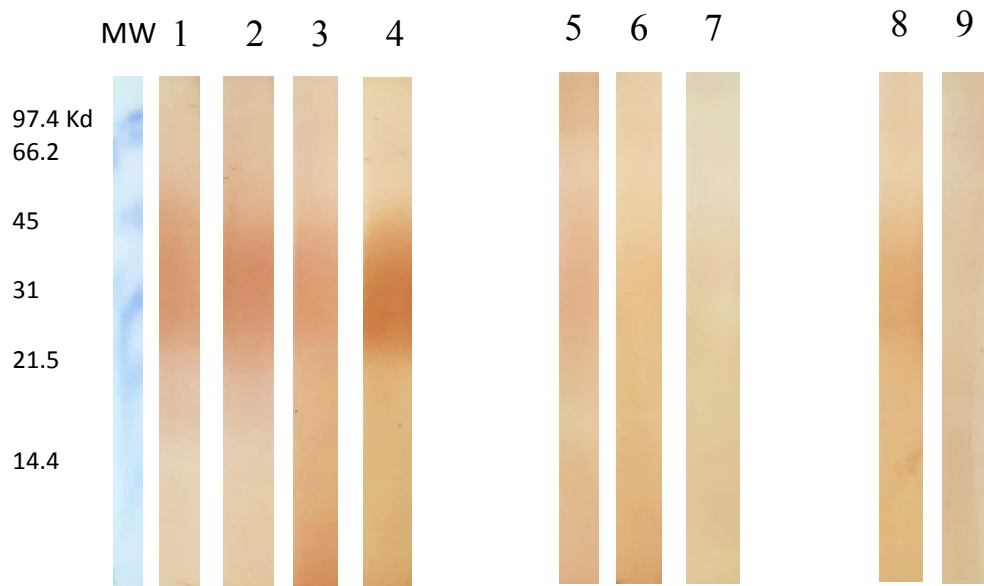


Figura 14. Western Blot de la suspensión de proteínas de *Grammatophora sp* utilizando suero de ratones administrados con diferentes antígenos en cada carril y el anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado con HRP en una membrana de fluoruro de polivinilideno (PVDF). MW; prestained SDS-PAGE Standars, Low Range, Carril 1: Probiótico oral 1×10^5 , Carril 2: Probiótico oral 1×10^7 , Carril 3: Probiótico oral 1×10^9 , Carril 4: Probiótico nasal 1×10^5 , Carril 5: Microalga oral 0.5%, Carril 6: Microalga oral 1.5%, Carril 7: Microalga nasal, Carril 8: Control oral y Carril 9: Control nasal.

9. CULTIVO DE *LACTOBACILLUS FERMENTUM* A15 UTILIZANDO A *GRAMMATOPHORA SP* COMO PREBIÓTICO

Los resultados obtenidos en los ensayos de ELISA donde se observa que los anticuerpos de los ratones administrados con la microalga, reconocen al probiótico como antígeno sugieren que la Gramatophora sirve como prebiótico de bacterias ácido lácticas autóctonas de los ratones. Para contrastar dicha información se desarrolló el cultivo de *L. fermentum* utilizando la microalga como medio de cultivo. Los resultados mostraron un total de 9.93 Log UFC/ml de bacterias a las 48 h de cultivo, determinadas por una cuenta viable en agar MRS. *L. fermentum* A15 fue inoculado inicialmente (tiempo 0), con 6×10^5 UFC figura 18.

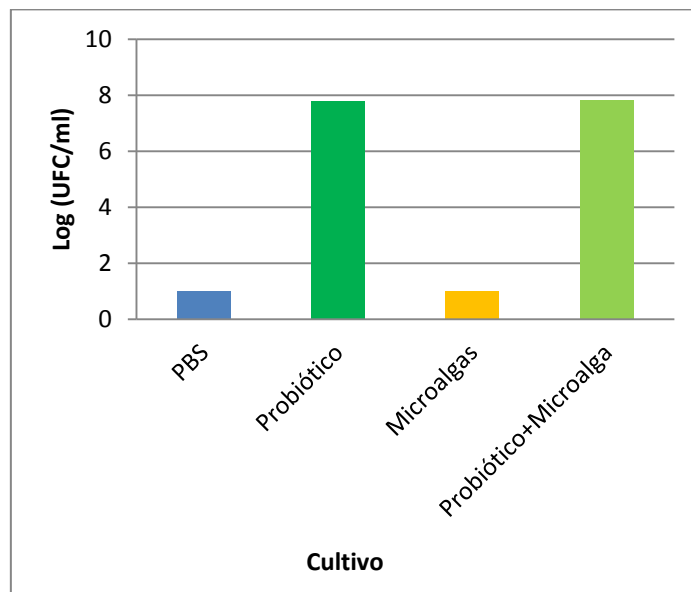


Figura 15. Log UFC/ml del cultivo de *L. fermentum* A15 inoculado en la suspensión de Gramatophora sp como medio de cultivo y cuantificado por cuenta viable en agar MRS al tiempo 0 del cultivo. Como control se incubaron PBS y Microalgas sin inocular.

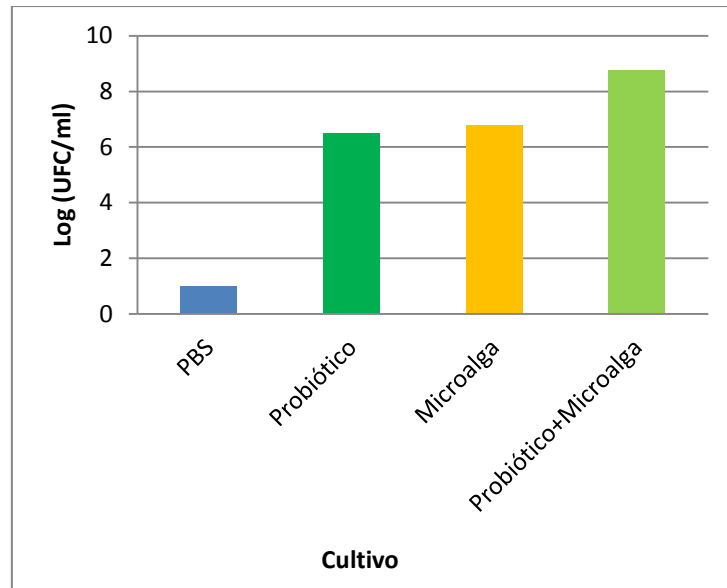


Figura 16. Log UFC/ml del cultivo del Probiótico en la suspensión de *Grammatophora sp* utilizando agar MRS para la cuantificación a las 24 h de la incubación.

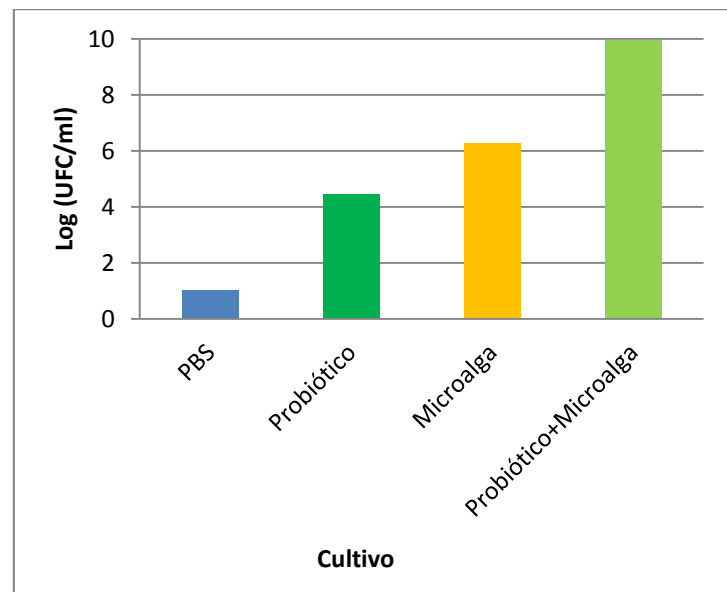


Figura 17. Log UFC/ ml del cultivo de *L. fermentum* A15 en la suspensión de *Grammatophora sp*. utilizando agar MRS a las 48 h de la inoculación.

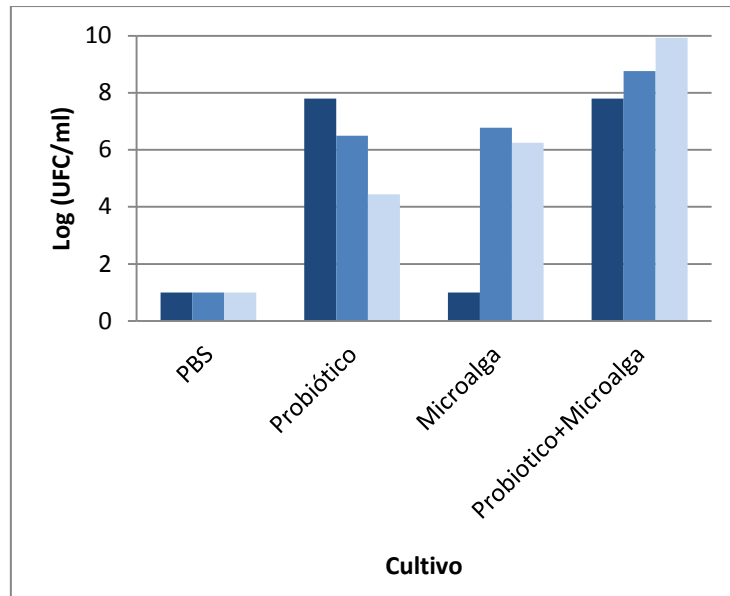


Figura 18. Log UFC/ml del cultivo de *L. fermentum* A15 en la suspensión de *Grammatophora* sp. utilizando agar MRS a los tiempos 0, 24 y 48 h de Incubación.

10. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE *GRAMMATOPHORA SP.*

Se evaluó la capacidad antioxidante de *Grammatophora sp.* por el método de DPPH (Brand-Williams, et al., 1994). Se realizaron diluciones de los extractos con el DPPH para obtener diferentes concentraciones y se midió su absorbancia a 515 nm (Tabla 11). Se graficó una curva estándar con una $R^2 = 0.9969$ (Figura 19). Por medio de la curva estándar del DPPH (figura 3) se calculó el porcentaje de inhibición promedio Tabla 12 y 13 y se obtuvo una dosis efectiva media de 2.52 mg/ml del extracto etanólico de la microalga.

Tabla 11. Mezcla de reacción de la actividad antioxidante del extracto de *Grammatophora sp.* con DPPH, absorbancia medida a 515 nm

Muestra	Vol. Sol. <i>Grammatophora</i> <i>sp.</i> (ml)	Vol. MeOH	Vol. DPPH	Conc. Extracto	Abs1	Abs2	Abs3
DPPH		0.2	0.8		0.774	0.765	0.768
1	0.03	0.17	0.8	0.525	0.663	0.65	0.622
2	0.06	0.14	0.8	1.05	0.592	0.584	0.568
3	0.09	0.11	0.8	1.575	0.543	0.500	0.471
4	0.12	0.08	0.8	2.1	0.500	0.415	0.394
5	0.15	0.05	0.8	2.625	0.434	0.390	0.333
6	0.18	0.02	0.8	3.15	0.327	0.269	0.301

Tabla 12. Concentración de inhibición del DPPH y porcentaje de inhibición

Muestra	Conc. DPPH1 (mg/ml)	Conc. DPPH2 (mg/ml)	Conc. DPPH3 (mg/ml)	% de inhibición 1	% de inhibición 2	% de inhibición 3
DPPH	0.0290	0.0286	0.0287			
1	0.0249	0.0245	0.0235	13.882	14.546	18.397
2	0.0224	0.0221	0.0215	22.761	22.894	25.202
3	0.0206	0.0190	0.0180	28.889	33.519	37.424
4	0.0190	0.0160	0.0152	34.267	44.270	47.127
5	0.0166	0.0151	0.0130	42.521	47.432	54.814
6	0.0128	0.0107	0.0118	55.903	62.737	58.846

Tabla 13. Promedio de inhibición del extracto etanólico de *Grammatophora sp.* frente DPPH

Muestra	Promedio	DESV STD	Error STD
1	15.608	2.438	1.408
2	23.619	1.372	0.792
3	33.278	4.273	2.467
4	41.888	6.753	3.899
5	48.256	6.187	3.572
6	59.162	3.428	1.979

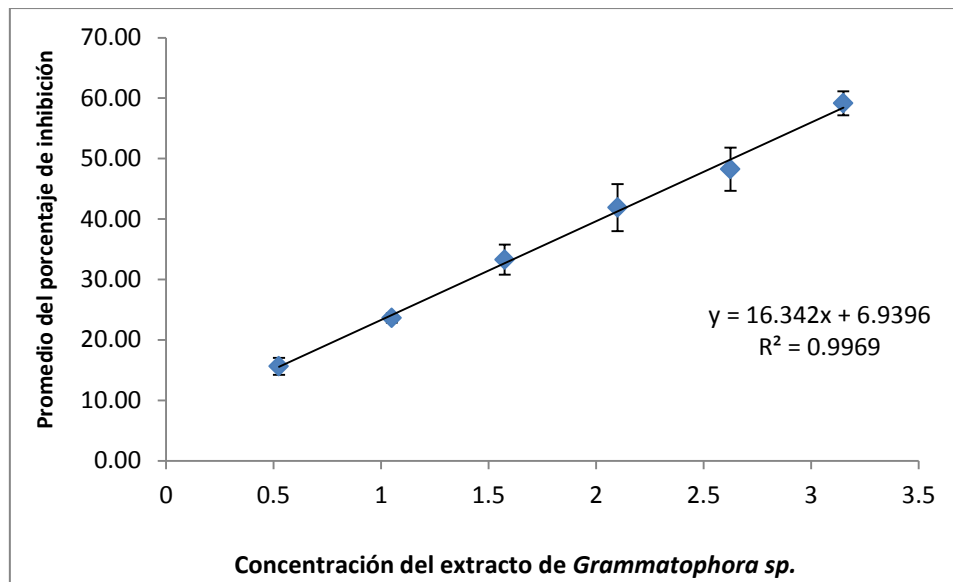


Figura 19. Curva estándar del extracto de *Grammatophora sp.* ED = 2.52mg/ml

IX. DISCUSIÓN

1. MICROALGA

El cultivo de microalgas fue realizado en una instalación con luz y temperatura ambiental de 12:12 h a una temperatura promedio del agua de 26.5° C en el mes de abril. El tanque 2 y 3 tuvieron un mayor crecimiento teniendo una concentración final de 1.6×10^6 y 1.5×10^6 cel/ml respectivamente, el tanque 1 tuvo un crecimiento menor con una concentración de 1.0×10^6 cel/ml, aunque en el mismo orden. Los tanques se ubicaron en un sistema abierto dentro de un edificio pero con interacción al medio, se midieron las temperaturas de los tres tanques siendo más baja la del tanque 1, ubicado al centro de la instalación y con menos tiempo de exposición de luz solar por lo que las condiciones eran menos favorables que en los otros dos tanques, resultando en una concentración menor. Los resultados de la densidad celular es similar a lo reportado por Pacheco Vega y colaboradores en 2015, donde menciona que el cultivo de *Grammatophora sp.* en un rango de 17.5 a 29° C tiene una concentración celular en cultivos al aire libre de 2×10^6 Cel/ml. Las pequeñas diferencias pudieron deberse a cambios en la radiación solar por condiciones climáticas. La composición química de la microalga especialmente el porcentaje de lípidos, proteínas y carbohidratos difiere un poco de la reportada quizás debido a las diferencias en la radiación solar.

En el cultivo de la microalga se obtuvo una biomasa en peso húmedo de 2kg tras cosechar la microalga de los tres tanques de 1800 L. Alrededor del 90% de la biomasa es agua según trabajos previos, y tras el proceso de liofilización, se obtuvieron 210 g de biomasa en peso seco. El análisis microbiológico por cuenta viable arrojó 2×10^2 UFC/ml, una concentración pequeña considerando que para evaluar algunos patógenos o efecto bacteriano se inocula 1×10^6 UFC/ml (Hedrich y Bullock, 2004) por lo que sugerimos no afectaría los resultados del efecto inmunológico generado por la microalga. Muchos de los estudios (Riquelme y Avendaño, 2003) señalan una fuerte correlación de bacterias en el crecimiento de microalgas por lo que es muy difícil separarlas u obtener un cultivo sano sin la

presencia de bacterias. La presencia de estas bacterias podría tener un beneficio en el efecto inmunogénico de la microalga para la estimulación del sistema inmune.

2. PROBIÓTICO

L. fermentum A15 con una cuenta viable en agar MRS de 3.35×10^9 UFC/ml se usó en la preparación de las dosis para los ratones. Estudios con diversas cepas de *Lactobacillus* utilizan para administraciones orales en los organismos experimentales y como dosis más alta una concentración de bacterias similar a la obtenida por cuenta viable (Nutten et al., 2012, Vintiñi, et al., 2010), sin embargo aún no se sabe con exactitud la concentración adecuada de administración de un probiótico. Muchos estudios coinciden en que ésta varía de acuerdo a cada cepa administrada y su efecto particular. Además algunos autores considerando la vía de administración modifican la concentración de las dosis. En el caso de una administración nasal, se administra una concentración de 1×10^6 UFC/ml cuando es un patógeno. En el caso de la cepa A15 se calculó la concentración para la preparación de tres diferentes dosis orales y una concentración baja para una dosis nasal, considerando el trabajo de Wen, et al., 2012.

3. DOSIS DE MICROALGAS Y PROBIÓTICO

El estudio de nuevas sustancias con un enfoque farmacológico muchas veces lleva consigo varios retos técnicos que deben superarse antes de evaluar una respuesta biológica *in vivo*. Las concentraciones de microalgas propuestas inicialmente fueron 1, 3 y 5% de acuerdo al porcentaje máximo posible de adición de un componente a un alimento balanceado. Dadas las condiciones físicas de la solución de microalga sonicada en 300 μ l de PBS (Fuentes, 2008) fue imposible técnicamente utilizarlas por lo denso de la solución y el por rechazo a ésta que presentaron los ratones. Se optó finalmente por dos concentraciones más bajas: 0.5 y 1.5%, las cuales presentaron características más adecuadas para su administración en ratones. La mayoría de los estudios que utilizan microalgas con potenciales usos de sustancias bioactivas o prácticas biotecnológicas en el área de la salud, utilizan los extractos purificados de sustancias importantes o bioreactores para producir dichas sustancias. Sin embargo, en esta investigación se busca el empleo de *Grammatophora sp* como célula microalgal completa, se evalúa la respuesta inmune de ratones contra las moléculas de la pared celular, considerando a éstas como agentes más inmunogénicos por ser el primer contacto para las células del sistema inmune de los ratones. Se ha reportado la administración de microalgas en un rango de 5 μ g – 50 μ g (Nuño et al. 2013), en éste estudio la administración oral fue de aproximadamente 18 mg y 56 mg (0.5% y 1.5% de acuerdo al porcentaje de alimento consumido por cada 100 g de peso vivo).

En el caso de la administración nasal, no se contó con algún estudio similar y en ensayos preliminares se tuvieron algunos obstáculos técnicos por lo que se diseñó una dosis en emulsión la cual consto de dos porciones, una lipídica obtenida por el método de Folch, 1957 y una proteica obtenida por sonicación y centrifugación, la cual se cuantifico por el método de Bradford (1976). Las moléculas hidrosolubles en el sobrenadante constan de proteínas y otras sustancias hidrosolubles de importancia como son antioxidantes y polisacáridos los cuales pueden tener un impacto importante en la respuesta inmune del ratón. Sin embargo las diatomeas tienen en su mayoría proteínas y polisacáridos asociados a la pared celular y estos

componentes no tienen buena solubilidad en soluciones acuosas (Gügi et al., 2015 y Swift y Wheeler, 1992). Por otro lado muchos estudios ya han reportado las cualidades de las diatomeas para la producción de lípidos y la importancia de los ácidos grasos poliinsaturados como el ácido decosaheptaenoico (DHA) que se encuentra en gran porcentaje en *Grammatophora sp.* y su papel en el sistema inmune se relaciona a la respuesta con moléculas que modulan la inflamación y esta a su vez se asocia a células del sistema inmune como citocinas proinflamatorias (Mantzioris, et al., 2000).

Por otro lado, los probióticos han sido ampliamente estudiados y se han usado desde hace más de un siglo. Actualmente es aceptado el rol que juegan estos organismos benéficos para la salud de los organismos, sin embargo aún se desconoce en gran medida la interacción y mecanismos de acción entre estos microorganismos y los organismos hospederos. La mayoría de los estudios coinciden en que cada cepa tiene cualidades distintas y las dosis de administración variaran de acuerdo a la cepa que se utilice y aun no se conoce una dosis, periodicidad en las administraciones, información clara de la respuesta en las vías de administración, etc. Para la cepa A15, se contó con información sobre su capacidad probiótica obtenida en estudios previos (Cosío-Castro, 2009), se propusieron tres dosis con una concentración alta 1×10^9 UFC/ml, una media 1×10^7 UFC/ml y una baja 1×10^5 UFC/ml en 300 μ l de PBS.

4. PRUEBA DE AGLUTINACIÓN

En la prueba de aglutinación para *L. fermentum* A15 y *Grammatophora* sp. en ratones que si fueron administrados con el probiótico y la microalga, se observó aglutinación, además ésta fue más marcada en suero de ratones a los cuales se les administro microalga oralmente. Esta respuesta puede ser menos especifica ya que el organismo tiene la capacidad para minimizar la respuesta inmune contra antígenos de bacterias no patógenas y evitar una respuesta constante contra cualquier sustancia que entre en el organismo. La sensibilidad de prueba de aglutinación se ve limitada por la presencia de IgM, anticuerpos que combaten una respuesta muy temprana a infecciones siendo las primeras inmunoglobulinas generadas como respuesta. En el caso de un probiótico mayormente distribuido en mucosas esta respuesta se da por IgA, por lo que la reacción de aglutinación en suero sanguíneo (IgG) sería menos efectiva. En contraste, la respuesta inmune contra un agente antigénico de naturaleza poco frecuente como es la microalga, sería mucho mayor, (Zúñiga, 2006).

6. EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE TRANSLOCACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Órganos como bazo y pulmón tienen como actividad en el organismo filtrar la sangre que oxigena el cuerpo y evitar infecciones promoviendo la formación de linfocitos y anticuerpos. Estos órganos están ligados al sistema linfático y en particular, los pulmones tienen la importante función de proveer oxígeno a las células, por lo que el daño a las finas estructuras del tejido pulmonar es de suma importancia ya que el sistema inmune actúa de especial manera con una respuesta inespecífica por medio de macrófagos alveolares. En esta investigación, los análisis microbiológicos realizados al bazo al pulmón de los ratones tratados para evaluar una posible translocación de microorganismos benéficos a estos órganos alejados del sitio de administración, mostraron que En la figura 6 se muestra que después de la administración de probiótico al día 14 los órganos presentaron un conteo de microorganismos mucho mayor que al tiempo cero pero disminuye en los siguientes muestreos, esto puede deberse a la acción celular y humoral que se genera en el bazo para combatir agentes exógenos como las células bacterianas. La translocación sistémica de bacterias patógenas es un evento más común por el daño que estas ejercen al epitelio intestinal, en estos casos bacterias comensales pueden atravesar el epitelio y translocarse al sistema encontrándose en otros órganos, sin embargo no es común encontrarlas en organismos sanos, además se ha visto que de las bacterias comensales translocadas el 8% son del género *Lactobacillus* (Macpherson y Uhr, 2000, Medina-Contreras, et al., 2011). Los resultados obtenidos en este estudio son similares a los encontrados por Esvaran y Conway en 2012, cuyos resultados mostraron en tratamientos no inmunizados un Log 8 de *Lactobacillus*, en este estudio se encontró Log 7.4 en bazo, sin embargo aún se desconoce estos mecanismos, solo atribuibles a un daño o modificación en la barrera epitelial.

Aunque existen evidencias de una relación entre el tejido linfoide de intestino y el tejido linfoide asociado a bronquios (mucosas pulmonares) (Bruzesse, et al., 2007) en este caso no tenemos las evidencias para asegurar que existe una translocación

o un tipo de transporte de estas bacterias administradas en el intestino y cuantificadas en pulmones. Por lo anterior, es necesario buscar más referencias bibliográficas que nos permitan elucidar el papel del sistema inmune en este tipo de relación o translocación.

En los pulmones de los ratones sometidos al tratamiento de administración nasal se obtuvo una cuenta viable de bacterias únicamente a los 14 días después de la primera administración de probiótico (1×10^5). Estos resultados sugieren que se presentó una respuesta inicial local del sistema inmune, en las mucosas pulmonares en especial en el pulmón, por parte de los macrófagos (sistema inmune innato), para ser eliminadas posteriormente. La respuesta debió ser inmediata, dado que estos datos son de los 14 días después de la primera administración. Se podría sugerir una posible colonización, sin embargo en vez de aumentar en una segunda administración esta disminuyó hasta no ser apreciable por lo que pudo haber activado al sistema inmune adaptativo para generar anticuerpos y eliminar estas bacterias (Wang, et al., 2011).

La acción de los probióticos no está desarrollada exclusivamente en el intestino, Por modulación de parámetros inmunológicos, tiene influencia en la absorción y secreción en la mucosa intestinal, después de la translocación bacteriana, o mediada por productos de la fermentación de carbohidratos y otros eventos metabólicos microbianos, los efectos probióticos también afectan otros sistemas orgánicos (De Vrese y Schrezenmeir, 2002, y Sharma, 2014).

7. ENSAYO DE INMUNOABSORCIÓN LIGADO A ENZIMAS (ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY WHOLE CELL, ELISA)

Los resultados de la evaluación de la respuesta inmune humoral generada por la administración de probiótico y microalga en las diferentes vías de administración, realizados por ensayos de ELISA mostraron que los tratamientos con mayores títulos de IgG y que presentan diferencias significativas para el día 28 fueron los tratamientos de microalgas. Esto se sugiere fue debido a la existencia de bacterias comensales, del grupo de las bacterias ácido lácticas donde muy posiblemente el género *Lactobacillus* se encuentre presente, así como *Lactobacillus fermentum* en la microbiota de ratón (Livingston, et al., 2010 y Tannok, 2008). Se sugiere que estas bacterias fueron previamente reconocidas por el sistema inmune, por lo que la cuando se aplicó en el tratamiento, la respuesta inmune se atenúo evitando una respuesta mayor. Por otro lado, estos resultados indican lo importante que es el efecto que puede provocar la administración de un prebiótico en la respuesta inmune, considerando que las microalgas pueden ser potenciales prebióticos y los carbohidratos que las componen pueden favorecer el crecimiento de la microbiota en los ratones. Algunos estudios han evaluado el cultivo de *Grammatophora* mas *Lactobacillus* y se vio que las células de *Grammatophora* sp. fueron dañadas por varias cepas probióticas, adhiriéndose a la superficie y dañando el cultivo (Hernández-Castro et al., 2014). En muchos estudios se ha reportado el perfil de proteínas superficiales de diferentes cepas de *Lactobacillus* en busca de proteínas responsables de la adhesión de esta bacteria a mucosas (Macías-Rodríguez et al., 2009) podría contar con proteínas antigénicas similares. Tanto el empleo de *Grammatophora* como prebiótico, como una similitud en la antigenicidad de las proteínas de diferentes cepas de *Lactobacillus* nos dan pie para decir que los títulos más elevados de IgG puedan deberse a la estimulación de cepas comensales del genero *Lactobacillus* en los ratones.

Para el empleo de *Grammatophora sp.* como antígeno, se obtuvo que a los 28 días de administración se tuvieron los títulos más elevados en los tratamientos de microalgas siendo significativamente diferentes al tratamiento control.

8. ESPECIFICIDAD DE ANTICUERPOS

Lactobacillus fermentum es un habitante normal del tracto gastrointestinal de muchos animales y de humanos (Hamili, 2016, Avila et al., 2010). El número de reportes de los efectos que promueven la salud atribuidos a *L. fermentum* han ido en incremento en los años recientes, donde la actividad antagónica contra enteropatógenos y la modulación del sistema inmune están bien documentadas (Vinderola, et al., 2004; Lin, et al., 2007; Zoumpopoulou, et al., 2008). La adherencia específica a mucosas de esta bacteria ha sido asociada con la estimulación del sistema inmune y con la inhibición de la adhesión de patógenos (Herías, et al., 1999). In *L. fermentum* 104R (*L. Reuteri* 104R), se reportó una proteína (MAPP) de alrededor de 29 KDa con la capacidad de enlazar mucus gastrointestinal de cerdo (Rojas-Contreras et al., 2002), sin embargo pocos reportes se han encontrado sobre la capacidad inmunogénica de esta proteína. *L. fermentum* cepa BCS87 es otra cepa identificada y caracterizada por su potencial probiótico e involucrada en la adhesión a mucus gastrointestinal de cerdos (Macías-Rodríguez, et al., 2009). Posteriormente en esta bacteria fueron encontradas dos proteínas superficiales. La proteína 32-Mmubp de 32 KDa fue caracterizada molecularmente como un componente de grupo de transportadores del ATP binding cassette (Macías-Rodríguez, et al., 2009), pero actualmente no se ha estudiado su capacidad inmunogénica. En esta investigación los resultados obtenidos sobre la especificidad de los anticuerpos por western blot nos mostraron que los sueros sanguíneos contienen anticuerpos que reconocen tanto proteínas de *L. fermentum* A15 en los tratamientos de probiótico 1×10^7 UFC/ml como de Microalga en el tratamiento 0.5% administrados oralmente. El Western Blot con los sueros del tratamiento del probiótico reconoció dos bandas intensas en las proteínas

superficiales del probiótico y el suero de los ratones administrados con el tratamiento de microalga 0.5% reconoció una banda muy intensa en la superficie de *L. fermentum*. Estos resultados indican que existe una relación del probiótico y la microalga con respecto a la estimulación del sistema inmune del ratón, se ha sugerido que hay un efecto prebiótico en la microalga, sin embargo se requieren más estudios para entender completamente esta interacción. La extracción de proteínas de *Grammatophora sp.* no resultó eficiente, y en el gel de Poliacrilamida SDS-PAGE se ven bandas barridas que pueden deberse a la asociación de proteínas con polisacáridos de la pared celular de la diatomea. Familias de proteínas de la pared celular de las diatomeas están asociadas a poliaminas y polisacáridos (Kröger, et al., 2008). Por lo tanto es necesario realizar una extracción y purificación de las proteínas para ver su antigenicidad, además del estudio de los polisacáridos que pueden también tener un carácter antigénico.

9. CULTIVO DE *LACTOBACILLUS FERMENTUM* UTILIZANDO A *GRAMMATOPHORA SP* COMO PREBIÓTICO

El cultivo de *L. fermentum* A15 inoculado en una suspensión de *Grammatophora sp.* como medio de cultivo mostró en medio selectivo para bacterias ácido lácticas MRS a las 48 horas un incremento de la cuenta viable bacteriana, sin embargo en los cultivos control donde no se inoculó el Probiótico se observó a las 24 horas un descenso, en el caso de las microalgas existe un crecimiento de bacterias en agar MRS que comienza a disminuir a las 48 horas. Dado que el cultivo se realizó en buffer de fosfatos y la fuente de carbono para el probiótico solo se encontraba en la microalga, este crecimiento lo podemos atribuir a la utilización de los carbohidratos presentes en la microalga, además en estudios de cultivos de *Grammatophora* y floculación de estas por asociación con bacterias probióticas del género *Lactobacillus* el resultado observado fue la degradación de las microalgas y adhesión de las bacterias y microalgas, por lo que se piensa en una utilización de los nutrientes,

siendo un posible prebiótico para cepas de *Lactobacillus* (Hernández-Castro et al., 2014).

10. ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE DE GRAMMATOPHORA SP.

Los mecanismos antioxidantes y de eliminación de las especies reactivas de oxígeno en las células están relacionados con los mecanismos de respuesta del sistema inmune, de modo que las células del sistema inmune utilizan algunas especies reactivas de oxígeno para eliminar a agentes exógenos como bacterias.

El análisis de la composición bioquímica de especies de *Grammatophora* reportado por Pacheco-Vega et al., 2015, mostró un mayor porcentaje de ácidos grasos polinsaturados más que los componentes proteicos y de carbohidratos. Por esta razón se le ha dado mayor importancia al empleo de este tipo de microalgas por su contenido de DHA y los beneficios de consumir omega 3. Gran porcentaje de estos lípidos son sustancias con capacidad antioxidante, por lo que en esta investigación se cuantificó la dosis efectiva media de antioxidantes en esta microalga. Las pruebas de la actividad antioxidante del extracto etanólico de *Grammatophora sp* tuvieron un resultado similar a los publicados por Brand-Williams y colaboradores en 1994 con una dosis efectiva media de 2.63 mg/ml en la prueba con DPPH utilizando antioxidantes purificados como el BHT en comparación con nuestro extracto de 2.52 mg/ml. Además en trabajos como el de Affan y colaboradores en 2006 podemos ver el alto porcentaje de actividad antioxidante con diferentes métodos de extracción para *Grammatophora marina*, que van de 41.2 % a un 86.5 % (concentración 2 mg/ml). En dicho estudio el extracto sin purificar tuvo una actividad antioxidante de 46.7%, muy similar a nuestro resultado expresado en ED50, siendo mayor la actividad antioxidante para *Gramatophora sp*.

X. CONCLUSIONES

- Los niveles de IgG totales en suero sanguíneo de los ratones aumentan tras la administración de probióticos y microalgas.
- De acuerdo a los resultados en los tratamientos administrados con microalga, podríamos sugerir que existe un efecto prebiótico de las microalgas al estimular la capacidad inmunogénica de cepas de *Lactobacillus fermentum* y quizás otras cepas de *Lactobacillus* que son parte de la microbiota intestinal de los ratones.
- Existen proteínas de la pared y/o membrana celular de *L. fermentum* A15 que son inmunogénicas y generan una respuesta específica del sistema inmune por medio de inmunoglobulinas presentes en el suero de los ratones tratados.
- *L. fermentum* A15 tiene la capacidad de utilizar componentes de *Grammatophora* sp. como nutrientes para incrementar su biomasa.
- La actividad antioxidante del extracto etanólico de *Grammatophora* sp. tiene una dosis efectiva media considerable tomando en cuenta que no se trata de un análisis de una sustancia pura.

XI. RECOMENDACIONES

- Es necesario ensayos que evidencien la translocación de la cepa *L. fermentum* A15 en un experimento *in vivo* con organismos infectados con un patógeno intestinal.
- Aun es necesario identificar que proteínas u otras moléculas de la bacteria y la microalga generan la respuesta inmune, secuenciando el péptido amino terminal e internos. Realizar ensayos de SDS-PAGE y Western Blot utilizando varias cepas de *Lactobacillus*.
- Realizar un ensayo *in vitro* utilizando las microalgas como fuente de nutrientes del probióticos, teniendo como control el cultivo de *L. fermentum* A15 sin microalgas para probar el efecto prebiótico. Sería conveniente también probar varias cepas de bacterias ácido lácticas, tratamiento con UV de las microalgas y un agar selectivo para *Lactobacillus* como agar Rogosa.
- Dados los resultados de actividad antioxidantes de una forma general, es necesario realizar extracciones con diferentes solventes para probar fracciones extraídas de *Grammatophora* sp. Considerando la gran cantidad de componentes que podrían tener una actividad antioxidante se podría realizar un estudio por HPLC utilizando los estándares de antioxidantes conocidos.

XII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abyor, N., Ariyanti, D., and Hadiyanto, H., 2011. Potential Production of Polyunsaturated Fatty Acids from Microalgae, 2(1), 13–16.
- Affan, A., Karawita, R., Jeon, Y., Kim, B., and Lee, J., 2006. Growth Characteristics, Bio-chemical Composition and Antioxidant Activities of Benthic Diatom *Grammatophora marina* from Jeju Coast , Korea, 21(1), 141–148.
- Ávila, José, Ávila, Manuel, Tovar, Belkis, Brizuela, María, Perazzo, Yurimaua and Hernández, Helis. 2010. Probiotic Properties of Strains of *Lactobacillus* Genus Extracted from Intestinal Tract of Farm Animals. Revista Científica, FCV-LUZ / Vol. XX, Nº 2, 161 – 169
- Azuma, I., 1992. Synthetic immunoadjuvants: application to nonspecific host stimulation and potentiation of vaccine immunogenicity. *Vaccine*;10:1000-6.
- Bautista-Garfias, C.R., Ixta-Rodriguez, O., Martinez-Gomez, F., Lopez, M.G. and Aguilar- Figueroa B.R., 2001. Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered orally to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. *Parasite*. 8: p226-228.
- Bautista-Garfias, C.R. and Ixta- Rodriguez, O., 2004. Immunization of BALB/c mice whith an antigen from *Trichinella spiralis* muscle larvae using *Lacobacillus casei* as adyuvant. *Vet. Méx.* (4)35.Paginas
- Betlec, A., Ravnikar M. and Strukelj B., 2012. Lactic acid bacteria as oral delivery systems for biomolecules. *Pharmazie*. 67(11):891-8.
- Bozarth, A. Maier, U.G. and Zauner, S., 2009. Diatoms in biotechnology: Modern tools and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 82, 195–201.

- Bradford, Marion M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72, 248-254 (1976).
- Brand Williams, W., Cuvelier, M. E. and Berset, C., 1994. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 28. 25-30
- Brown, M. R., 2002. Nutritional value of microalgae for aquaculture. In: Cruz-Suárez, L. E., Ricque-Marie, D., Tapia-Salazar, M., Gaxiola-Cortés, M. G., Simoes, N. (Eds.). *Avances en Nutrición Acuícola VI. Memorias del VI Simposium Internacional de Nutrición Acuícola. 3 al 6 de Septiembre del 2002. Cancún, Quintana Roo, México.*
- Bruzzese, E., Raia V., Immacolata-Spagnuolo M., Volpicelli M., Luigi-Maiuri and Guarinoemail, A., 2007. Effect of *Lactobacillus* GG supplementation on pulmonary exacerbations in patients with cystic fibrosis: A pilot study. *Clinical Nutrition*. Vol. 26, (3) p322–328.
- Cosio-Castro, Alejandra, 2009. Análisis del efecto probiótico de bacterias ácido lácticas aisladas en humanos. Instituto Tecnológico de la Paz.
- Daniel, G.F., Chamberlain, A.H.L. and Jones, E.B.G., 1987. Cytochemical and electron microscopical observations on the adhesive materials of marine fouling diatoms, *British Phycological Journal*, 22:2, 101-118, DOI: 10.1080/00071618700650131
- Dalmo, R., Martinsen, B., Horsberg, T., Ramstad, A., Syvertsen, C., Seljelid, R. and Ingebrigtsen, K., 1998. Prophylactic effect of $\beta(1,3)$ -D-glucan (laminaran) against experimental *Aeromonas salmonicida* and *Vibrio salmonicida* infections. *J. Fish Dis.*, 21, 459–462.
- De los Ángeles García María, Borrero Reinier, Marrón Reynel, Lanio María E, Canet Lien, Otero Oscar, Kadir Ramlah, Suraiya Siti, Zayas Caridad, López Yamilé,

- Norazmi Mohd Nor, Sarmiento María E and Acosta Armando, 2013. Evaluation of specific humoral immune response and cross reactivity against *Mycobacterium tuberculosis* antigens induced in mice immunized with liposomes composed of total lipids extracted from *Mycobacterium smegmatis*. BMC Immunology, 14(Suppl 1):S11 <http://www.biomedcentral.com/1471-2172/14/S1/S11>
- De Vrese M, Schrezenmeir J., 2002. Probiotics and non-intestinal infectious conditions. Br J Nutr;88:59–66.
- Doughman Scott D., Srirama Krupanidhi and Carani B. Sanjeevi, 2007. Omega-3 Fatty Acids for Nutrition and Medicine: Considering Microalgae Oil as a Vegetarian Source of EPA and DHA. 1-6.
- Esvaran M., Conway, P.L. 2012. Strain dependent protection conferred by *Lactobacillus spp.* administered orally with a *Salmonella Typhimurium* vaccine in a murine challenge model. Vaccine 30 2654– 2661
- FAO/WHO, 2006. Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. FAO Food and Nutrition paper 85. ISBN 92-5-105513-0.
- Faulkner, D.J., 2002. Marine natural products. Nat. Prod. Rep. 19, 1–48.
- Folch J., Lee M. y Sloane Stanley G.H., 1957. “A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues”. J. Biol. Chem.
- Fuentes Paredes, Flor de María, Rosa Amelia Mendoza Yanavilca, Arturo Lorenzo Rosales Fernández y Rosario Alberto Cisneros Tarmeño, 2008. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud.
- Galdeano, C. M., and Perdigo, G., 2006. The Probiotic Bacterium *Lactobacillus casei* Induces Activation of the Gut Mucosal Immune System through Innate Immunity, 13(2), 219–226. doi:10.1128/CVI.13.2.219

- Gregory James A., Topol Aaron B., Doerner David Z. and Mayfiel Stephen, 2013. Alga-Produced Cholera Toxin-Pfs25 Fusion Proteins as Oral Vaccines. *Applied and Environmental Microbiology* p. 3917–3925
- Guzman, S., Gato, A., Lamela, M., Freire-Garabal, M. and Calleja, J.M., 2003. Anti-Inflammatory and immunomodulatory activities of polysaccharide from *Chlorella stigmatophora* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytother.* 17, 665–670.
- Gügi Bruno, Le Costaouec Tinaïg, Burel Carole, Lerouge Patrice, Helbert William and Bardor Muriel. 2015. Diatom-Specific Oligosaccharide and Polysaccharide Structures Help to Unravel Biosynthetic Capabilities in Diatoms. *Mar. Drugs*, 13, 5993-6018; doi:10.3390/md13095993
- Halimi, Shahnaz and Mirsalehian Hedrich, Akbar, 2016. Assessment and comparison of probiotic potential of four *Lactobacillus* species isolated from feces samples of Iranian infants. *Microbiol Immunol* ; 60: 73–81 doi: 10.1111/1348-0421.12352
- Harata, G., He, F., Hiruta, N., Kawase, M., Kubota, A., Hiramatsu, M. and Yausi, H., 2010. Intranasal administration of *Lactobacillus rhamnosus* GG protects mice from H1N1 influenza virus infection by regulating respiratory immune responses, 50, 597–602. doi:10.1111/j.1472-765X.2010.02844.x
- Hedrich, H. and Bullock, G., 2004. *The Laboratory mouse*, Elsevier, Academic Press 600 pp. ISBN0-12-336425-6.
- Hempel, F.; Maier, U.G., 2012. An engineered diatom acting like a plasma cell secreting human IgG antibodies with high efficiency. *Microb. Cell Factories*, 11, doi:10.1186/1475-2859-11-126.
- Herias M.V., Hessle, C., Telemo, E., Midtvedt, T., Hanson, L.A., and Wold, A.E., 1999. Immunomodulatory effect of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. *Clinical and Experimental Immunology*. 116, 283-290.

- Hernández-Castro, J. E., 2014. Interacción mixotrófica de microalgas marinas y bacterias probióticas con enfoque a la formación de bioflocs para acuicultura. Universidad Autónoma de Baja California Sur. 52 pp.
- Hill Colin, Guarner Francisco, Reid Gregor, Gibson Glenn R., Merenstein Daniel J., Pot Bruno, Morelli Lorenzo, Canani Roberto Berni, Flint Harry J., Salminen Seppo, Calder Philip C., Sanders Holmgren Mary Ellen, Czerkinsky C, Eriksson K. and Mharandi A., 2003. Mucosal immunisation and adjuvants: a brief overview of recent advances and challenges. *Vaccine*;21 Suppl 2:S89-95.
- Jamali, A.A.; Akbari, F.; Ghoraklu, M.M.; de la Guardia, M.; Khosroushahi, A.Y., 2012. Applications of diatoms as potential microalgae in nanobiotechnology. *BiolImpacts*, 2, 83–89.
- Kato, I., Yokokura, T., & Mutai, M., 1983. Macrophage Activation by *Lactobacillus casei* in Mice, 27(7), 611–618.
- Kim Jeong Hwa, Sang Min Kim, Cheol-Ho Pan, Joong-Kook Choi and Jae Kwon Lee, 2013. Evaluation of Anti-inflammatory Activities and Mechanisms of Microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *J Appl Biol Chem* (2013) 56(2), 61–67
- Kim, K.N., Heo, S.J., Yoon, W.J., Kang, S.M., Ahn, G., Yi, T.H. and Jeon, Y.J., 2011. Fucoxanthin inhibits the inflammatory response by suppressing the activation of NF- κ B and MAPKs in lipopolysaccharide-induced RAW 264.7 macrophages. *Eur. J. Pharmacol.*, 649, 369–375
- Kröger, N. and Poulsen, N., 2008. Diatoms from cell wall biogenesis to nanotechnology. *Annu. Rev. Genet.*, 42, 83–107.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lamm M.E., 1997. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu Rev Microbiol*; 51:311-40.

- Lebeau, T. and Robert, J.M., 2003. Diatom cultivation and biotechnologically relevant Current and putative products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 60, 624–632.
- Lin Wen-Hsin, Yu Bi, Jang Sheng-Hon and Tsen Hau-Yang, 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe*, Volume 13, Issues 3–4, Pages 107-113.
- Livingston Megan, Loach Diane, Wilson Michelle, Tannock W Gerald and Baird Margaret. 2010. Gut commensal *Lactobacillus reuteri* 100-23 stimulates an immunoregulatory response. *Immunology and Cell Biology* 88, 99–102.
- Maassen, C. B. M., Holten-neelen, C. Van, Balk, È., Bak-glashouwer, J. H. Den, Leer, R. J., Laman, J. D., Claassen, E. 2000. Strain-dependent induction of cytokine pro® les in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains, 18, 2613–2623.
- Macías-Rodríguez, M.E. et al., 2009. *Lactobacillus fermentum* BCS87 expresses mucus- and mucin-binding proteins on the cell surface. *Journal of applied microbiology*, 107(6), pp.1866–74.
- Macpherson AJ, Uhr T., 2000. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 303:1662–5.
- Mantzioris E, Cleland LG, Gibson R, Neumann M, Demasi M, James M., 2000. Biochemical effects of a diet containing foods enriched with n-3 fatty acids. *Amm J ClinNutr* 72:42-48.
- Marciani DJ. 2003. Vaccine adjuvants: role and mechanisms of action in vaccine immunogenicity. *Drug Discov* ;8:934-43.
- Medina-Contreras O, Geem D, Laur O, Williams IR, Lira SA, Nusrat A, 2011. CX3CR1 regulates intestinal macrophage homeostasis, bacterial translocation, and colitogenic Th17 responses in mice. *J Clin Invest*;121: 4787–95.

- McClemens, J., Kim, J. J., Wang, H., Mao, Y.K., Collins, M., Kunze, W. and Khan, W. I., 2013. *Lactobacillus rhamnosus* ingestion promotes innate host defense in an enteric parasitic infection. *Clinical and vaccine immunology: CVI*, 20(6), 818–26. doi:10.1128/CVI.00047-13.
- Neutra M.R. and Kozlowski P.A., 2006. Mucosal vaccines: the promise and the challenge. *Nat Rev Immunol*; 6:148-58.
- Nguema-Ona, E., Vické-Gibouin, M., Gotté, M., Plancot, B., Lerouge, P., Bardor, M. and Driouich, A., 2014. Cell wall O-glycoproteins and N-glycoproteins: Aspects of biosynthesis and function. *Front. Plant Sci.* 2014, 5, doi:10.3389/fpls..00499.
- Norton, T.A.; Melkonian, M.; Andersen, R.A., 1996. Algal biodiversity. *Phycologia*, 35, 308–326.
- Nuño, K., Villarruel-López, a., Puebla-Pérez, a. M., Romero-Velarde, E., Puebla-Mora, a. G. and Ascencio, F. 2013. Effects of the marine microalgae *Isochrysis galbana* and *Nannochloropsis oculata* in diabetic rats. *Journal of Functional Foods*, 5(1), 106–115. doi:10.1016/j.jff.2012.08.011.
- Nutten, S., Thierry, A., Boudousqui, C., Barbier, N., Blanchard, C. and Corth, B. (2012). Intragastric and Intranasal Administration of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 Modulates Allergic Airway, 2012. doi:10.1155/2012/686739.
- Olivares, M., Díaz-Roperero, M. P., Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Fonollá, J., Navas, M. and Xaus, J., 2007. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)*, 23(3), 254–60. doi:10.1016/j.nut.2007.01.004.
- Pacheco Vega, J. M., Cadena Roa, M. a., Ascencio, F., Rangel Davalos, C. and Rojas Contreras, M., 2015. Assessment of endemic microalgae as potential food for *Artemia franciscana* culture. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(1), 23–32. doi:10.3856/vol43-issue1-fulltext-3.

- Palomino, I., Pereira, J. y Koenig C., 2009. Células y órganos del sistema inmune. Fundamentos de inmunología básica y clínica. Ed. Universidad de Talca, Chile.
- Pellaton Céline, Sophie Nutten, Anne-Christine Thierry, Caroline Boudousquié, Nathalie Barbier, Carine Blanchard, Blaise Corthésy, Annick Mercenier, and François Spertini, 2012. Intra-gastric and Intra-nasal Administration *Lactobacillus paracasei* NCC2461 modulates allergic airway Inflammation in Mice. International Journal of Inflammation. doi:10.1155/2012/686739.
- Peng, J.; Yuan, J.-P.; Wu, C.-F.; Wang, J.-H., 2011. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in Brown seaweeds and diatoms: Metabolism and bioactivities relevant to human health. Mar. Drugs, 9, 1806–1828.
- Perdigon, G., Elena, M., Macias, N.D.E., Alvarez, S., Oliver, G., Pesce, A.A. and Holgado, D.E.R., 1986. Effect of Perorally Administered Lactobacilli Activation in Mice Macrophage, 53(2), 404–410.
- Prescott, S. L., Dunstan, J. a, Hale, J., Breckler, L., Lehmann, H., Weston, S., & Richmond, P. 2005. Clinical effects of probiotics are associated with increased interferon-gamma responses in very young children with atopic dermatitis. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 35(12), 1557–64. doi:10.1111/j.1365-2222.2005.02376.x
- Raposo, M. F. D. J., de Moraes, R. M. S. C. and Bernardo de Moraes, A. M. M., 2013. Bioactivity and applications of sulphated polysaccharides from marine microalgae. *Marine drugs*, 11(1), 233–52. doi:10.3390/md11010233.
- Rhee, J. H., & Lee, S. E. 2012. Clinical experimental vaccine Mucosal vaccine adjuvants update.
- Riquelme, C.E., 2003. Interacción bacteria-microalga en el ambiente marino y uso potencial en acuicultura. , pp.725–736.

- Rojas-Contreras, M. and P.L. Conway. 1996. Colonization by lactibacilli of piglet small intestinal mucus. *Journal of Applied Bacteriology*. DOI: 10.1111/j.1365-2672.1996.tb03535.x.
- Sharma Rohit, Kapila Rajeev , Dass Gulshan y Kapila Suman, 2014. Improvement in Th1/Th2 immune homeostasis, antioxidative status and resistance to pathogenic *E. coli* on consumption of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* fermented milk in aging mice. *AGE* 36:9686.
- Shimizu, Y., 1996. Microalgal metabolites: a new perspective. *Ann. Rev. Microbiol.* 50, 431–465.
- Sorokin, C. 1973. Dry weight, packed cell volume and optical density. In: J.R. Stein (ed.). *Handbook of phycological methods. Culture methods and growth measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, 321-343 pp.
- Surzycki, R., Greenham, K., Kitayama, K., Dibal, F., Wagner, R., Rochaix, J., ... Surzycki, S., 2009. Factors effecting expression of vaccines in microalgae. *Biologicals*, 37(3), 133–138. doi:10.1016/j.
- Swift, D.M.; Wheeler, A., 1992. Evidence of an organic matrix from diatom biosilica. *J. Phycol.* 28, 202–209.
- Tannock GW. The search for disease-associated compositional shifts in bowel bacterial communities of humans. *Trends Microbiol* 2008; 16: 488–495.
- Takx-Kohlen BC., 1992. Immunomodulators. Future prospects. *Pharm Weekbl Sci*;14:24-52.
- Taylor, P., & Daniel, G. F., 2015. Cytochemical and electron microscopical observations on the adhesive materials of marine fouling diatoms, (April), 37–41. doi:10.1080/00071618700650131.

- Underwood, G.J.C. and Paterson, D.M., 2003. The importance of extracellular carbohydrate production by marine epipelagic diatoms. *Adv. Bot. Res.*, 40, 83–240.
- Valor L., and Inmaculada de la Torre, 2013. Comprender el concepto de Inmunogenidad. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España. *Elservier Doyma*. 9(1):1-4.
- Vannucci, L., Krizan, J., Sima, P., Stakheev, D., Caja, F., Rajsiglova, L. and Saieh, M. 2013. Immunostimulatory properties and antitumor activities of glucans (Review). *International journal of oncology*, 43(2), 357–64. doi:10.3892/ijo.2013.1974
- Vergara C., Ulises, Zúñiga M., Claudio e Palomo G., Iván, 2009. Regulación de la respuesta inmune. *Fundamentos de inmunología básica y clínica*. Ed. Universidad de Talca, Chile. 278 pp.
- Vieira, A.T., Teixeira, M.M. and Martins, F.S., 2013. The Role of Probiotics and Prebiotics in Inducing Gut Immunity. *Frontiers in Immunology*, 4(December), 1–12. doi:10.3389/fimmu.2013.00445.
- Vinderola, C. G., M. Medici, and Perdigon, G., 2004. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulation capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 96:230–243.
- Vintiñi, E., Villena, J., Alvarez, S., & Medina, M. 2010. Administration of a probiotic associated with nasal vaccination with inactivated *Lactococcus lactis*-PppA induces effective protection against pneumococcal infection in young mice. *Clinical and experimental immunology*, 159(3), 351–62. doi:10.1111/j.1365-2249.2009.04056.x
- Wang B, Huang Q, Zhang W, Li N, Li J. 2011. *Lactobacillus plantarum* prevents bacterial translocation in rats. *Digestive Diseases and Sciences*. 56:3187.

Wen, K., Li Guohua, Bui Tammy, Liu Fangning, Li Yanru, Kocher Jacob, Lin Lin, Yang Xingdong, Lijuan Yuan, 2012. High dose and low dose *Lactobacillus acidophilus* exerted differential immune modulating effects on T cell immune responses induced by an oral human rotavirus vaccine in gnotobiotic pigs. *Vaccine*, 30(6), pp.1198–1207. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.11.107>.

WHO/FAO, 2002. Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada. April, May. Guidelines for evaluation of probiotics in food.

Yeo, J.-M., Lee, H.-J., Kim, J.-W., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Choi, I.-S., & Song, C.-S. 2014. *Lactobacillus fermentum* CJL-112 protects mice against influenza virus infection by activating T-helper 1 and eliciting a protective immune response. *International immunopharmacology*, 18(1), 50–4. doi:10.1016/j.intimp.2013.10.020.

Zoumpopoulou G., Foligne B., Christodoulou K., Granette C., Pot B., Tsakalidou E. (2008). *Lactobacillus fermentum* ACA-DC 179 displays probiotic potential in vitro and protects against trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis and Salmonella infection in murine models. *Int. J. Food Microbiol.* 121 18–26 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.10.013

Zúñiga Katime, 2006. Widal test - clinical interpretation. *Rev Panam Infectol* ;8(2):40-44.

