



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**INMUNOMODULACIÓN FUNCIONAL POR  
LEVADURAS DE AMBIENTES MARINOS Y SUS  $\beta$ -  
GLUCANOS EN CABRITOS RECIÉN NACIDOS**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación en Biotecnología )

P r e s e n t a

**Miriam Goretty Angulo Villavicencio**

La Paz, Baja California Sur, febrero de 2020.

## ACTA DE LIBERACIÓN DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13:00 horas del día 11 del Mes de febrero del 2020, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado y Formación de Recursos Humanos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

**"Inmunomodulación funcional por levaduras de ambientes marinos y sus  $\beta$ -glucanos en cabritos recién nacidos"**

Presentada por el alumno:

**Miriam Goretty Angulo Villavicencio**

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACIÓN EN Biotecnología

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACIÓN DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

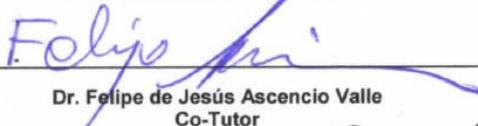
### LA COMISIÓN REVISORA



Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez  
Director/Co-Director de Tesis



Dra Maria Ángeles Esteban Abad  
Co-Tutora



Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle  
Co-Tutor



Dr. Dariel Tovar Ramirez  
Co-Tutor



Dr. Ramón Cepeda Palacios  
Co-Tutor



Dra. Gracia Alicia Gómez Anduro,  
Directora de Estudios de Posgrado y  
Formación de Recursos Humanos

## **Conformación de comités**

### **Comité tutorial**

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

**Director de Tesis**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Dra. María Ángeles Esteban Abad

**Co-tutora**

Universidad de Murcia

Dr. Ramón Cepeda Palacios

**Co-tutor**

Universidad Autónoma de Baja California Sur

Dr. Dariel Tovar Ramírez

**Co-tutor**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

**Co-tutor**

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C.

### **Comité revisor de tesis:**

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dra. María Ángeles Esteban Abad

Dr. Ramón Cepeda Palacios

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

### **Jurado de examen de grado:**

Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez

Dra. María Ángeles Esteban Abad

Dr. Ramón Cepeda Palacios

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

### **Suplentes:**

Dra. Martha Reyes Becerril

Dr. Ricardo Vázquez Juárez

## Resumen

La etapa más susceptible a enfermedades infecciosas en caprinos es la neonatal. *Escherichia coli* causa colibacilosis en cabritos y la inmunidad pasiva no siempre es suficiente para prevenirla. Los antibióticos son efectivos para combatir infecciones bacterianas, pero generan residuos en la carne y el ambiente. Una de las alternativas al uso de antibióticos es promover el desarrollo y la maduración del sistema inmune mediante probióticos e inmunoestimulantes. Actualmente, en estudios sobre probióticos en pequeños rumiantes se evalúan parámetros productivos, aunque sigue siendo muy escasa la información de los efectos inmunomoduladores de levaduras y glucanos. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue caracterizar *in vitro* e *in vivo* el potencial probiótico e inmunoestimulante ( $\beta$ -glucanos) de las levaduras *Y. lipolytica* N6, *S. halophilus* 4N16 y *D. hansenii* CBS8339 para cabritos recién nacidos. La evaluación *in vitro* demostró que *D. hansenii* y sus  $\beta$ -glucanos incrementaron ( $p < 0.05$ ) la viabilidad de leucocitos de sangre periférica de caprinos después de un reto con *E. coli* en comparación con las otras levaduras probadas y el control (leucocitos no estimulados). La habilidad fagocítica aumentó ( $p < 0.05$ ) después del reto y la producción de óxido nítrico aumentó ( $p < 0.05$ ) antes y después del reto en leucocitos estimulados con  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii*. Además, se encontró una estimulación temprana de la expresión de genes relacionados con las vías de señalización de  $\beta$ -glucanos. Con base en los resultados *in vitro* el potencial probiótico de *D. hansenii* vía oral se evaluó en cabritos durante 30 días. En general, los parámetros de la respuesta inmune innata y el nivel de expresión de genes de vías de señalización relacionadas con el sistema inmune aumentaron ( $p < 0.05$ ) al día 15 de la administración del probiótico. Adicionalmente, se evaluaron los efectos *in vitro* del entrenamiento inmunológico por el  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* en monocitos caprinos, así como sus efectos *in vivo* mediante la administración oral en cabritos tras el desafío con lipopolisacárido (LPS). *In vitro*, los monocitos entrenados con  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* aumentaron ( $p < 0.05$ ) la transcripción de genes de los marcadores de superficie de macrófagos, así como la supervivencia celular y la habilidad fagocítica tras el reto con LPS. En el experimento *in vivo*, los cabritos estimulados con dos dosis de  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* mostraron un aumento ( $p < 0.05$ ) en la actividad de explosión respiratoria y la transcripción de los marcadores de superficie de macrófagos en células sanguíneas, y la producción de IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF $\alpha$  en plasma posterior (2.5 h) al reto con LPS. Este estudio ha demostrado por primera vez que se indujo inmunidad entrenada con dosis orales de  $\beta$ -glucano tras la exposición a LPS en mamíferos utilizando cabritos neonatos como especie modelo de estudio.

**Palabras clave:**  $\beta$ -glucano, levadura, inmunidad entrenada, probióticos.



---

Vo. Bo. Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez  
Director de tesis

## Summary

The most susceptible stage to infectious diseases in goats is the neonatal. *Escherichia coli* causes colibacillosis in newborn goats and passive immunity is not always enough to prevent it. Antibiotics are effective against bacterial infections, but generate waste in meat and environment. One alternative to antibiotics is to promote the development and maturation of immune system through probiotics and immunostimulants. Currently, probiotic studies in small ruminants evaluate productive parameters, although information on the immunomodulatory effects of yeasts and glucans remains very scarce. Therefore, this study aimed to characterize *in vitro* and *in vivo* probiotic and immunostimulant potential ( $\beta$ -glucans) of yeasts *Y. lipolytica* N6, *S. halophilus* 4N16 and *D. hansenii* CBS8339 for newborn goats. The *in vitro* evaluation showed that *D. hansenii* and its  $\beta$ -glucans increased ( $p < 0.05$ ) the cell viability goat's peripheral blood leukocytes upon *E. coli* challenge compared to the other yeasts and control (unstimulated leukocytes). Phagocytic ability increased ( $p < 0.05$ ) upon challenge and nitric oxide production increased ( $p < 0.05$ ) before and after challenge in leukocytes stimulated with  $\beta$ -glucans from *D. hansenii*. In addition, an early stimulation of gene expression related to  $\beta$ -glucan signaling pathways was found. Based on the *in vitro* results, the probiotic potential of *D. hansenii* orally was evaluated in newborn goats for 30 days. In general, parameters of the innate immune response and immune-related gene expression level of signaling pathways increased ( $p < 0.05$ ) on day 15 of probiotic administration. Additionally, the *in vitro* effects of immunity training by  $\beta$ -glucan from *D. hansenii* in goat monocytes were evaluated, as well as their effects *in vivo* by oral administration in newborn goats upon lipopolysaccharide (LPS) challenge. *In vitro*, monocytes trained with  $\beta$ -glucan from *D. hansenii* increased ( $p < 0.05$ ) gene transcription of macrophage surface markers, as well as cell survival and phagocytic ability after LPS challenge. In the *in vivo* experiment, newborn goats stimulated with two doses of  $\beta$ -glucan from *D. hansenii* showed an increase ( $p < 0.05$ ) in respiratory burst activity and the transcription of macrophage surface markers in blood cells, and the production of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF $\alpha$  in plasma upon (2.5 h) LPS challenge. This study has demonstrated for the first time that trained immunity was induced with oral doses of  $\beta$ -glucan after exposure to LPS in mammals using newborn goats as a study model.

**Keywords:**  $\beta$ -glucan, yeast, goats, trained immunity, probiotics, immunostimulant.



---

Vo. Bo. Dr. Carlos Eliud Angulo Valadez  
Director de tesis

## Dedicatoria

*A mis padres, quienes me guían y apoyan siempre*

*A mi esposo, quien me apoya incansablemente*

## **Agradecimientos**

Agradezco ampliamente al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con el número 465466 para la obtención de mi grado de Doctora en Ciencias.

Al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste (CIBNOR), a todo el personal administrativo, técnico y científico por todas las facilidades prestadas durante el periodo de mi doctorado en la institución.

A los proyectos “Conservación y aprovechamiento de la biodiversidad de microorganismos marinos: Fortalecimiento de la contribución de los mares al desarrollo económico nacional” CONACyT-PDCPN2014-01/248033 y “Fortalecimiento de la infraestructura de investigación y desarrollo de biotecnología enfocada hacia una sola salud: Interfaz Animal-Hombre-Ecosistema” CONACyT-INFR-2014-01/225924, por el financiamiento brindado para hacer posible esta investigación.

Al Dr. Carlos Angulo, mi director de tesis quien siempre estuvo dispuesto a ayudarme y apoyarme cuando lo necesitaba y por sus grandes enseñanzas para mi formación.

A la Dra. María Angeles Esteban, que a pesar de la distancia siempre estuvo al pendiente de mi trabajo dispuesta a aportar y apoyar mucho para que saliera adelante.

Al Dr. Dariel Tovar por sus enseñanzas y el gran apoyo en el laboratorio cuando lo necesité.

Al Dr. Felipe Ascencio, por todo el apoyo brindado durante todo el recorrido de este camino.

Al Dr. Ramón Cepeda, por su gran apoyo con los cabritos y sus enseñanzas dentro del sector pecuario. Gracias por toda su paciencia.

A la Dra. Martha Reyes, por su apoyo en las técnicas inmunológicas, cultivo de células primarias y análisis de citometría de flujo. Gracias por toda la confianza que ha depositado en mí, por su extraordinario apoyo y por introducirme al mundo de la inmunología.

Agradezco a la Universidad Autónoma de Baja California Sur por brindarme sus instalaciones y apoyo para los ensayos experimentales. Doy también mis sinceros agradecimientos a quienes estuvieron detrás de los bioensayos y me ayudaron a sacar adelante mi trabajo: nuevamente al Dr. Ramón Cepeda, Margarita Mendoza, Isabel Toledo, Perla Ginera, Dante Gijon por ayudarnos con el nacimiento, pesaje y alimentación de cabritos; así como en el muestreo de sangre de los cabritos.

A todos mis compañeros del Grupo de Vacunología e Inmunología: Vero, Perlita, Dante, Asdrú, Abel, Kevyn, Ana, Crystal, Karen, Norma, Dra. Ely y Dr. Luis. Así como a mis compañeras CIBEñas Caro, Erika y Anaís.

A Noé Medina, por ayudarme en la toma de muestras sanguíneas de cabritos en la primera etapa, gracias por tus enseñanzas.

Al M.C. René Rebollar y al Dr. Humberto Mejía, técnico e investigador, respectivamente, del laboratorio de Biotecnología de Organismos Marinos, por brindarnos un muy apreciado espacio en su laboratorio.

A la teacher Diana Fischer por sus asesorías en la escritura del inglés para la publicación de los artículos científicos desarrollados en esta investigación.

Agradezco al personal técnico que me brindó apoyo con el uso y manejo de algunos equipos necesarios para realizar la investigación. Al MVZ Manuel Melero, QFB Víctor Moyron, Dr. Martín Martínez, Dra. Carmen Rodríguez, Eulalia Meza, M. C. Patricia Hinojosa y M. C. Julio Hernández.

Y mi más enorme agradecimiento va para mis papás Juanita (Pany) y José Alfredo (Pepe), quienes sin titubear me apoyaron y guiaron en cada minuto, cada decisión y cada dilema, gracias por ser los excelentes padres toda la vida. Gracias por estar.

Agradezco también extraordinariamente a mi esposo Agustín, por estar siempre acompañándome, por apoyarme y escucharme cuando más lo requiero.

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	<b>i</b>
<b>Summary</b> .....	<b>ii</b>
<b>Dedicatoria</b> .....	<b>iii</b>
<b>Agradecimientos</b> .....	<b>iv</b>
<b>Contenido</b> .....	<b>vii</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>xi</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>xiv</b>
<b>Abreviaturas</b> .....	<b>xv</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
2.1 Enfermedades infecciosas en cabritos recién nacidos .....	3
2.1.1 Enfermedades que provocan diarreas neonatales .....	3
2.2 Sistema inmune de caprinos.....	6
2.2.1 Anatomía y función.....	6
2.2.2 Células del sistema inmune.....	7
2.2.2.1 Células del sistema inmune innato y su función .....	7
2.2.2.2 Células del sistema inmune adaptativo y su función.....	9
2.2.3 Moléculas principales del sistema inmune .....	10
2.2.4 Reconocimiento.....	12
2.2.4.1 Reconocimiento de patógenos del sistema inmune innato .....	12
2.2.4.2 Reconocimiento de antígenos del sistema inmune adaptativo ...	13
2.2.5 Regulación .....	13
2.3 Inmunidad pasiva .....	14
2.4 Inmunidad innata entrenada .....	15
2.5 Levaduras aisladas de ambientes marinos extremos .....	16
2.6 Levaduras como probióticos en animales.....	17
2.7 Reconocimiento de levaduras probióticas.....	19
2.8 $\beta$ -glucanos de levaduras como inmunoestimulantes .....	20
2.9 Reconocimiento de $\beta$ -glucanos.....	21
2.9.1 Vía dependiente de Syk .....	21
2.9.2 Vía independiente de Syk.....	22

2.9.3	Señalización por TLR .....	22
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>23</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>23</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>24</b>
5.1	Objetivo general.....	24
5.2	Objetivo particulares .....	24
<b>6.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
6.1	Cepas de levaduras marinas .....	24
6.2	Características microbiológicas .....	25
6.2.1	Crecimiento .....	25
6.2.2	Actividad antimicrobiana por microdilución en líquido .....	25
6.3	Características probióticas.....	26
6.3.1	Resistencia a sales biliares .....	26
6.3.2	Resistencia a diferentes pHs.....	26
6.3.3	Capacidad de adhesión al intestino de caprinos .....	26
6.4	Obtención de lisados de levaduras .....	27
6.5	Extracción de $\beta$ -glucanos.....	27
6.6	Caracterización de $\beta$ -glucanos por resonancia magnética nuclear (RMN).....	28
6.7	Peso molecular de glucanos .....	28
6.8	Extracción de leucocitos de sangre periférica.....	29
6.9	Estimulación de leucocitos de sangre periférica de caprinos.....	30
6.10	Viabilidad de leucocitos estimulados con lisados y $\beta$ -glucanos de levaduras marinas.....	30
6.11	Parámetros inmunológicos .....	31
6.11.1	Fagocitosis .....	31
6.11.2	Explosión respiratoria .....	32
6.11.3	Producción de óxido nítrico .....	32
6.11.4	Expresión génica.....	32
6.12	Potencial probiótico de la levadura seleccionada en cabritos recién nacidos.....	35
6.12.1	Bioensayo <i>in vivo</i> .....	35
6.12.2	Propiedades inmunoestimulantes de la levadura seleccionada ( <i>in vitro</i> ).....	35

6.13	Evaluación de inmunidad innata entrenada en monocitos caprinos por $\beta$ -glucano <i>D. hansenii</i> CBS8339 .....	36
6.13.1.1	Extracción de monocitos de sangre periférica de caprinos .....	36
6.13.1.2	Estimulación de monocitos .....	36
6.13.1.3	Microscopia óptica .....	37
6.13.1.4	Viabilidad de monocitos y macrófagos entrenados .....	37
6.13.1.5	Fagocitosis.....	38
6.13.1.6	Expresión de genes de marcadores de superficie celular y citocinas.....	38
6.13.2	Evaluación de inmunidad innata entrenada en monocitos de cabritos recién nacidos por el $\beta$ -glucano de <i>D. hansenii</i> ( <i>in vivo</i> ) .....	38
6.13.2.1	Explosión respiratoria en células sanguíneas .....	40
6.13.2.2	Producción de óxido nítrico.....	40
6.13.2.3	Actividad de lisozima .....	40
6.13.2.4	Producción de citocinas en plasma.....	40
6.13.2.5	Expresión de genes de marcadores de superficie celular, citocinas y reguladores del metabolismo de la glucosa en muestras de sangre periférica de cabritos recién nacidos.....	41
6.14	Análisis estadístico .....	41
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
7.1	Características microbiológicas .....	42
7.1.1	Crecimiento de las cepas de levaduras.....	42
7.1.2	Actividad antimicrobiana.....	42
7.1.3	Crecimiento de las levaduras frente a sales biliares de caprinos .....	43
7.1.4	Crecimiento de las levaduras a diferentes pHs .....	44
7.1.5	Capacidad de adherencia al intestino de caprinos .....	45
7.2	Caracterización de $\beta$ -glucanos extraídos de levaduras aisladas de ambientes marinos.....	47
7.2.1	Rendimiento de $\beta$ -glucanos respecto a masa seca.....	47
7.2.2	Espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) .....	47
7.2.3	Peso molecular de los glucanos.....	49
7.3	Viabilidad celular .....	49
7.4	Propiedades inmunoestimulantes de levaduras aisladas de ambientes marinos y $\beta$ -glucanos ( <i>in vitro</i> ).....	51
7.4.1	Fagocitosis .....	51

7.4.2	Explosión respiratoria .....	53
7.4.3	Producción de óxido nítrico .....	55
7.4.4	Expresión génica .....	57
7.5	Potencial probiótico de <i>D. hansenii</i> CBS8339 en cabritos recién nacidos ( <i>in vivo</i> ).....	66
7.5.1	Viabilidad celular .....	66
7.5.2	Explosión respiratoria .....	67
7.5.3	Producción de óxido nítrico .....	68
7.5.4	Expresión génica .....	69
7.6	Evaluación de inmunidad innata entrenada en monocitos caprinos por $\beta$ -glucano de <i>D. hansenii</i> CBS8339 .....	76
7.6.1	Evaluación de inmunidad innata entrenada <i>in vitro</i> .....	76
7.6.1.1	Microscopía óptica de monocitos .....	76
7.6.1.2	Viabilidad de células entrenadas .....	76
7.6.1.3	Fagocitosis de células entrenadas .....	76
7.6.1.4	Expresión génica de marcadores de superficie de monocitos y macrófagos .....	79
7.6.2	Evaluación de inmunidad innata entrenada <i>in vivo</i> .....	80
7.6.2.1	Explosión respiratoria en células sanguíneas .....	80
7.6.2.2	Producción óxido nítrico en plasma .....	81
7.6.2.3	Actividad de lisozima en plasma .....	81
7.6.2.4	Producción de citocinas en plasma.....	82
7.6.2.5	Expresión de genes de marcadores de superficie celular, citocinas y moduladores en células de sangre periférica de cabritos recién nacidos..	83
<b>8.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>86</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>101</b>
<b>10.</b>	<b>LITERATURA CITADA .....</b>	<b>102</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>117</b>

## Lista de figuras

<b>Figura 1.</b> Línea del tiempo del procedimiento de estimulación de monocitos caprinos.....	37
<b>Figura 2.</b> Esquema de dosificación de $\beta$ -glucano de <i>D. hansenii</i> en el bioensayo <i>in vivo</i> con cabritos recién nacidos. ....	39
<b>Figura 3.</b> Curva de crecimiento de <i>Y. lipolytica</i> N6, <i>S. halophilus</i> 4N16 y <i>D. hansenii</i> CBS8339. ...	42
<b>Figura 4.</b> Crecimiento (UFC/mL) de <i>D. hansenii</i> CBS8339, <i>Y. lipolytica</i> N6 y <i>S. halophilus</i> 4N16 frente sales biliares de caprinos. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. ....	44
<b>Figura 5.</b> Crecimiento (UFC/mL) de <i>D. hansenii</i> CBS8339, <i>Y. lipolytica</i> N6 y <i>S. halophilus</i> 4N16 a diferentes pHs. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.....	45
<b>Figura 6.</b> Adherencia de levaduras marcadas con DTAF a yeyuno de cabritos. a) PBS (control). b) <i>D. hansenii</i> CBS8339. c) <i>Y. lipolytica</i> N6. d) <i>S. halophilus</i> 4N16. Imágenes observadas por microscopía de fluorescencia usando el objetivo de aumento 40x (aumento final 400x). ....	46
<b>Figura 7.</b> Adherencia de levaduras marcadas con DTAF a duodeno de cabritos. a) PBS (control). b) <i>D. hansenii</i> CBS8339. c) <i>Y. lipolytica</i> N6. d) <i>S. halophilus</i> 4N16. Imágenes observadas por microscopía de fluorescencia usando el objetivo de aumento 40x (aumento final 400x). ....	46
<b>Figura 8.</b> Espectros de RMN de protón de la región de carbohidratos de glucano particulado insoluble en agua en un disolvente mixto (DMSO- $d_6$ ) a 80 °C. a) <i>D. hansenii</i> CBS8339, b) <i>Y. lipolytica</i> N6 y c) <i>S. halophilus</i> 4N16. ....	48
<b>Figura 9.</b> Efecto de los lisados de <i>D. hansenii</i> CBS8339, <i>Y. lipolytica</i> N6 y <i>S. halophilus</i> 4N16 sobre la viabilidad de los leucocitos de sangre periférica de caprinos a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con <i>E. coli</i> . DMSO se utilizó como control negativo de la viabilidad celular. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.....	50
<b>Figura 10.</b> Efecto de los $\beta$ -glucanos de <i>D. hansenii</i> CBS8339, <i>Y. lipolytica</i> N6 y <i>S. halophilus</i> 4N16 sobre la viabilidad de los leucocitos de sangre periférica de caprinos a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con <i>E. coli</i> . DMSO se utilizó como control negativo de la viabilidad celular. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos..	51
<b>Figura 11.</b> Habilidad fagocítica de leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con <i>D. hansenii</i> CBS8339, <i>Y. lipolytica</i> N6 y <i>S. halophilus</i> 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con <i>E. coli</i> . Leucocitos sin estímulo representan el grupo control. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos..	52
<b>Figura 12.</b> Habilidad fagocítica de leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los $\beta$ -glucanos de <i>D. hansenii</i> CBS8339, <i>Y. lipolytica</i> N6 y <i>S. halophilus</i> 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con <i>E. coli</i> . Leucocitos sin estímulo representan el grupo control y la estimulación con Curdlan representa un control positivo. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.....	53
<b>Figura 13.</b> Explosión respiratoria de leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con <i>D. hansenii</i> CBS8339, <i>Y. lipolytica</i> N6 y <i>S. halophilus</i> 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con <i>E. coli</i> . Leucocitos sin estímulo representan el grupo control. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos..	54
<b>Figura 14.</b> Explosión respiratoria de leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los $\beta$ -glucanos de <i>D. hansenii</i> CBS8339, <i>Y. lipolytica</i> N6 y <i>S. halophilus</i> 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con <i>E. coli</i> . Leucocitos sin estímulo representan el grupo control y la estimulación con Curdlan representa un control positivo. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.....	55

- Figura 15.** Concentración de nitritos como metabolito estable de la producción de óxido nítrico en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos..... 56
- Figura 16.** Concentración de nitritos como metabolito estable de la producción de óxido nítrico en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control y la estimulación con Curdlan representa un control positivo. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos..... 57
- Figura 17.** Expresión relativa de los receptores a) Dectina-1 y b) TLR2 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos..... 58
- Figura 18.** Expresión relativa de los moduladores intracelulares a) Raf-1, b) Syk, c) MyD88 y d) TRAF6 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos..... 59
- Figura 19.** Expresión relativa de los factores de transcripción a) NF $\kappa$ B y b) AP-1 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. .... 60
- Figura 20.** Expresión relativa de las citocinas a) IL-1 $\beta$ , b) TNF- $\alpha$  y c) IL-10 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos..... 61
- Figura 21.** Expresión relativa de los receptores a) Dectina-1 y b) TLR2 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control y la estimulación con Curdlan representa un control positivo. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. .... 62
- Figura 22.** Expresión relativa de los moduladores intracelulares a) Raf-1, b) Syk, c) MyD88 y d) TRAF6 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control y la estimulación con Curdlan representa un control positivo. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. .... 64
- Figura 23.** Expresión relativa de los factores de transcripción a) NF $\kappa$ B y b) AP-1 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e

- inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control y la estimulación con Curdlan representa un control positivo. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. .... 65
- Figura 24.** Expresión relativa de las citocinas a) IL-1 $\beta$ , b) TNF- $\alpha$  y c) IL-10 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control y la estimulación con Curdlan representa un control positivo. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. .... 66
- Figura 25.** Viabilidad de leucocitos de sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retados *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Se utilizó DMSO como control negativo de la viabilidad celular. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. .... 67
- Figura 26.** Explosión respiratoria en leucocitos sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retados *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. .... 68
- Figura 27.** Concentración de nitritos como metabolito estable de la producción de óxido nítrico en leucocitos sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retados *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. .... 69
- Figura 28.** Expresión génica de Dectina-1 y TLR2 en leucocitos sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retados *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. .... 70
- Figura 29.** Expresión génica de TLR4 y TLR6 en leucocitos sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retados *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. .... 71
- Figura 30.** Expresión génica de Raf-1, Syk y MyD88 en leucocitos sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retados *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. .... 72
- Figura 31.** Expresión génica de NF $\kappa$ B y AP-1 en leucocitos sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retados *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. .... 73
- Figura 32.** Expresión génica de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en leucocitos sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retados *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. .... 75
- Figura 33.** Diferenciación celular *in vitro* de monocitos caprinos. Se muestran imágenes de monocitos capturadas al día 0 (D0), monocitos con los tres grupos: control,  $\beta$ -glucano de *D. hansenii*

( $\beta$ G) y PMA al día 4 (D4) y 6 (D6) por microscopía de campo claro en un objetivo de aumento 40x (aumento final 400x).....	77
<b>Figura 34.</b> Viabilidad de monocitos caprinos al día 6 estimulados con $\beta$ -glucano de <i>D. hansenii</i> ( $\beta$ G) y PMA, retados con LPS (tinción con Ioduro de Propidio). Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.....	78
<b>Figura 35.</b> Habilidad fagocítica de monocitos y macrófagos caprinos al día 6 estimulados con $\beta$ -glucano de <i>D. hansenii</i> ( $\beta$ G) y PMA, retados con LPS. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.....	78
<b>Figura 36.</b> Expresión génica de los receptores (a) CD11b, (b) CD11c, (c) F4/80 y (d) la citoquina IL-1 $\beta$ en monocitos de sangre periférica de caprinos entrenados con $\beta$ -glucanos de <i>D. hansenii</i> ( $\beta$ G) (7 días) y retados con LPS. Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. ....	79
<b>Figura 37.</b> Explosión respiratoria en sangre periférica de cabritos recién nacidos estimulados con el $\beta$ -glucano de <i>D. hansenii</i> ( $\beta$ -Dh) y el $\beta$ -glucano de <i>S. cerevisiae</i> ( $\beta$ -Sc) en el día -1 (presangrado) y el día 0 (retados con LPS). Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos..	80
<b>Figura 38.</b> Concentración de nitritos como metabolito estable de la producción de óxido nítrico en plasma de cabritos recién nacidos estimulados con el $\beta$ -glucano de <i>D. hansenii</i> ( $\beta$ -Dh) y el $\beta$ -glucano de <i>S. cerevisiae</i> ( $\beta$ -Sc) en el día -1 (presangrado) y el día 0 (retados con LPS). Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. ....	81
<b>Figura 39.</b> Actividad de lisozima en plasma de cabritos recién nacidos estimulados con el $\beta$ -glucano de <i>D. hansenii</i> ( $\beta$ -Dh) y el $\beta$ -glucano de <i>S. cerevisiae</i> ( $\beta$ -Sc) en el día -1 (presangrado) y el día 0 (retados con LPS). Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. ....	82
<b>Figura 40.</b> Producción de citocinas a) IL-1 $\beta$ , b) IL-6 y c) TNF- $\alpha$ en plasma de cabritos recién nacidos estimulados con el $\beta$ -glucano de <i>D. hansenii</i> ( $\beta$ -Dh) y el $\beta$ -glucano de <i>S. cerevisiae</i> ( $\beta$ -Sc) en el día -1 (presangrado) y el día 0 (retados con LPS). Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. ....	83
<b>Figura 41.</b> Expresión relativa de los genes de los marcadores de superficie celular (a) CD11b, (b) CD11c y (c) F4/80 y las citocinas (d) IL-1 $\beta$ y (e) TNF- $\alpha$ en células de sangre periférica de caprinos entrenados con $\beta$ -glucanos de <i>D. hansenii</i> ( $\beta$ -Dh) y $\beta$ -glucanos de <i>S. cerevisiae</i> ( $\beta$ -Sc) en el día -1 (presangrado) y el día 0 (retados con LPS). Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. ....	84
<b>Figura 42.</b> Expresión génica de los reguladores (a) AKT, (b) mTOR y (c) H1F1 $\alpha$ en células de sangre periférica de caprinos entrenados con $\beta$ -glucanos de <i>D. hansenii</i> ( $\beta$ -Dh) y $\beta$ -glucanos de <i>S. cerevisiae</i> ( $\beta$ -Sc) en el día -1 (presangrado) y el día 0 (retados con LPS). Las barras representan la media $\pm$ error estándar de la media (EMM) ( $n=3$ por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos. ....	85

## Lista de tablas

<b>Tabla I.</b> Patógenos que causan diarrea en cabritos .....	5
<b>Tabla II.</b> Secuencias de primers utilizados en este estudio. ....	34
<b>Tabla III.</b> Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las levaduras marinas contra bacterias patógenas (porcentaje de inhibición). ....	43
<b>Tabla IV.</b> Rendimiento de glucanos de las cepas de levaduras. Expresado como el porcentaje de glucanos extraídos de la biomasa seca. ....	47
<b>Tabla V.</b> Peso molecular de los glucanos aislados de levaduras de ambientes marinos. ....	49

## Abreviaturas

**ADN:** Ácido desoxiribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ADNc:** Ácido desoxiribonucleico complementario

**ADCC:** *Antibody dependent cellular cytotoxicity* (Citotoxicidad dependiente de anticuerpos)

**ACK:** *Ammonium-Chloride-Potassium* (Amonio-Cloruro-Potasio)

**AKT:** *Serine/Threonine Kinase* (Proteína Serina/treonina quinasa)

**AP-1:** *Activator protein 1* (Proteína activadora 1)

**APC:** *Antigen-presenting cells* (Células presentadoras de antígeno)

**BCG:** *Bacillus de Calmette-Guérin*

**CDR:** *C-type lectin-like carbohydrate recognition domain* (dominio de reconocimiento de carbohidratos tipo lectina C)

**CLR:** *C-type lectin receptors* (Receptores de lectina tipo C)

**DMSO:** *Dimethyl Sulfoxide* (Dimetilsulfóxido)

**DTAF:** *5-(4,6-Dichlorotriazinyl) Aminofluorescein* (5- (4,6-diclorotriazinil) aminofluoresceína)

**ELISA:** *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas)

**ERO:** Especies reactivas oxígeno

**HIF1-  $\alpha$ :** *Hypoxia-inducible factor 1-alpha* (La subunidad alfa del factor 1 inducible por hipoxia)

**IFN- $\gamma$ :** Interferón gamma

**Ig:** Inmunoglobulina

**IL:** Interleucina

**LPS:** *Lipopolisacárido*

**MALT:** *Mucosa-associated lymphoid tissue* (Tejido linfoide asociado a mucosas)

**mDC:** *Myeloid dendritic cell* (células dendríticas mieloides)

**MHC:** *Major histocompatibility complex* (Complejo mayor de histocompatibilidad)

**mTOR:** *Mammalian Target of Rapamycin* (proteína diana de rapamicina en células de mamífero)

**MyD88:** *Myeloid differentiation primary response 88* (Respuesta primaria de diferenciación mieloides 88)

**NAD<sup>+</sup>/NADH:** *Nicotinamide adenine dinucleotide* (Dinucleótido de nicotinamida y adenina)

**NBT:** *Nitro blue tetrazolium* (nitroazul de tetrazolio)

**NEMO:** *NF-kappa-B essential modulator* (modulador esencial de NF $\kappa$ B)

**NFAT:** *nuclear factor of activated T-cells* (Factor nuclear de células T activadas)

**NF $\kappa$ B:** *Nuclear factor kappa light chain enhancer of activated B cells* (Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas)

**NOD:** *Nucleotide-binding oligomerization domain-like receptors* (Dominio de unión a nucleótidos y oligomerización)

**NOM:** Norma oficial mexicana

- PAMPs:** *Pathogen-associated molecular patterns* (Patrones moleculares asociados a patógenos)
- PBS:** *Phosphate buffered saline* (Buffer fosfato salino)
- PMA:** *Phorbol 12-myristate 13-acetate* (Forbol miristato acetato)
- PRR:** *Pattern recognition receptors* (Receptores de reconocimiento de patrones)
- Raf-1:** *Proto-oncogene serine/threonine-protein kinase* (protooncogén serina/treonina-proteína quinasa)
- RIGI:** *Retinoic acid-inducible gene-1-like receptors* (receptores tipo gen I inducible por ácido retinoico)
- RMN:** Resonancia Magnética Nuclear
- SEC-MALS:** *Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle Light Scattering* (cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz multiángulo)
- SFB:** Suero Fetal Bovino
- TGF- $\beta$ :** *Transforming growth factor beta* (Factor de crecimiento transformante beta)
- TLR:** *Toll like-receptor* (Receptores tipo Toll)
- TNF- $\alpha$ :** *Tumor necrosis factor alpha* (Factor de necrosis tumoral)
- TRAF-6:** *Tumor necrosis factor receptor (TNFR)-associated factor 6* (Factor 6 asociado al receptor del factor de necrosis tumoral (TNFR))
- UFC:** Unidades formadoras de colonias
- WSSV:** *White spot syndrome virus* (Virus del síndrome de la mancha blanca)
- YPD:** *Yeast extract peptone dextrose* (extracto de levadura peptona dextrosa)

## 1. INTRODUCCIÓN

La etapa más susceptible a enfermedades infecciosas en la crianza de caprinos es la neonatal (comprendida del día 0 al 30 de edad) (Piccione *et al.*, 2008). La inmunidad pasiva por el consumo de anticuerpos presentes en el calostro de la madre protege parcialmente a los cabritos neonatos de infecciones en esta etapa, pero desafortunadamente, la protección transmitida no siempre es suficiente para controlar eficazmente las enfermedades neonatales (Tourais-Esteves *et al.*, 2008). Por lo tanto, el establecimiento del microbioma en el tracto gastrointestinal, en especial de microorganismos benéficos (probióticos), es crítico para su desarrollo funcional y la maduración de su sistema inmune (Chaucheyras-Durand *et al.*, 2008). En esta misma etapa, el contacto con patógenos secundarios (de baja virulencia) o moléculas similares a patógenos (inmunoestimulantes) favorece el desarrollo y el fortalecimiento del sistema inmune, en especial de las mucosas (Petrunov *et al.*, 2007).

Los probióticos “son microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud” (OMS/FAO, 2006). Además de las bacterias, se ha demostrado que las levaduras de diversos orígenes pueden funcionar como probióticos en animales mediante uno o más mecanismos de acción. En comparación, los inmunoestimulantes son moléculas que promueven la respuesta inmune de manera inespecífica (Thacker, 2010) o compuestos químicos que se encuentran como elementos estructurales de microorganismos, como los  $\beta$ -1,3/1,6 glucanos presentes en la pared celular de levaduras, hongos y bacterias (Karumuthil-Melethil *et al.*, 2014).

Existe un gran interés en la búsqueda de microorganismos marinos y sus funciones para procesos biotecnológicos y de salud. Diversos estudios se han centrado en el gran potencial de estos microorganismos marinos para su uso como fuente de fármacos, agentes microbianos, probióticos y como productores de sustancias bioactivas (Poli *et al.*, 2010; Oren, 2010). En los ambientes marinos existe una amplia diversidad de levaduras y en el CIBNOR contamos con una colección cada

vez más grande de levaduras marinas aisladas de ambientes extremos. Por otra parte, las propiedades, configuraciones y mecanismos de acción de moléculas inmunoestimulantes de levaduras marinas son aun escasamente conocidas. Sin embargo, existen ejemplos actuales sobre el potencial de esas moléculas ( $\beta$ -glucanos, quitinas) obtenidas de microorganismos, principalmente para su aplicación en humanos y acuicultura (Leentjen *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2016).

Actualmente, en la mayoría de los estudios sobre probióticos en pequeños rumiantes se evalúan parámetros productivos tales como, crecimiento, fermentación en rumen rendimiento y producción de leche (Zicarelli *et al.*, 2016). Sin embargo, son escasos los estudios donde se evalúan los efectos inmunomoduladores de levaduras en pequeños rumiantes (Ekwemalor *et al.*, 2017). De igual manera, son pocos los estudios que describen los efectos inmunoestimulantes de los  $\beta$ -glucanos en caprinos (Benda y Mádr, 1991; Medina-Córdova *et al.*, 2018). No obstante, se han demostrado fuertes efectos inmunomoduladores de  $\beta$ -glucanos de levaduras en cerdos y vacas (Stuyven *et al.*, 2009; Uchiyama *et al.*, 2012).

La búsqueda de probióticos e inmunoestimulantes de microorganismos marinos es relevante en el campo de la inmunobiotecnología humana y animal, y particularmente, no se ha estudiado en caprinos hasta el momento. Por lo tanto, el objetivo de esta investigación es caracterizar el potencial probiótico e inmunoestimulante de levaduras aisladas de ambientes marinos y sus  $\beta$ -glucanos para cabritos recién nacidos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Enfermedades infecciosas en cabritos recién nacidos

La etapa más susceptible a enfermedades infecciosas en la crianza de caprinos es la neonatal. Las principales y más frecuentes enfermedades observadas son las infecciones gastrointestinales como la diarrea y neumonía (Bonilla, 2001).

#### 2.1.1 Enfermedades que provocan diarreas neonatales

La diarrea neonatal en cabritos no tiene un agente causal específico, sin embargo, los rotavirus, *E. coli* enterotoxigénica, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium parvum* y *Eimeria* spp. se consideran los principales patógenos causantes de diarreas (Nagy *et al.*, 1983; Cepeda-Palacios *et al.*, 2015; Tabla I). La diarrea infecciosa que afecta a los cabritos principalmente ocurre en sistemas intensivos donde se utilizan potreros y corrales, los cuales fomentan la progresiva acumulación de infecciones a menos que se manejen con mucho cuidado (Angus *et al.*, 1982).

Los rotavirus son virus que pertenecen a la familia *Reoviridae*, son icosaédricos no envueltos, que poseen un genoma de 11 segmentos de ARN de doble cadena que codifican para seis proteínas virales estructurales y cinco proteínas no estructurales (Matthijnssens *et al.*, 2011). *E. coli* es una bacteria anaeróbica facultativa y algunas cepas de este patógeno potencial, son una importante causa de diarrea en todas las especies de animales de granja (Holland, 1990). *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) produce enterotoxinas, así como *E. coli* verotoxigénica (VTEC) y *E. coli* necrotoxigénica, que se han asociado con diarreas neonatales en animales domésticos (Cid *et al.*, 1999). Muñoz *et al.* (1996) observaron que cabritos infectados con *E. coli* presentaron anorexia, postración y diarrea con ausencia de fiebre; además de observar mortalidades menores a 30% y morbilidades de hasta el 60%. Por otra parte, *Salmonella* es un género de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae*, son bacilos Gram-negativos, anaeróbicos facultativos no formadores de esporas. Estas bacterias se caracterizan clínicamente por

provocar septicemia (infección generalizada), enteritis (inflamación gastrointestinal), diarreas muy acuosas y fiebres altas en el ganado caprino (Mahmood *et al.*, 2014); presentando además morbilidades altas (90%) y mortalidades medias (40%) (Muñoz *et al.*, 1996). Otra bacteria importante es *C. perfringens*, una bacteria Gram-positiva, anaeróbica y formadora de esporas (McDonel, 1980) que es capaz de producir enfermedades en ovejas y cabras, la mayoría de las cuales se denominan genéricamente enterotoxemia (Uzal, 2008). En los trabajos realizados por Muñoz *et al.* (1996) se evidenciaron morbilidades bajas (10%), sin embargo, las mortalidades se mostraron muy elevadas ya que todos los animales infectados por *C. perfringens* murieron. *Cryptosporidium parvum* es un parásito protozooario intracelular que causa la enfermedad conocida como cryptosporidiosis (de Graaf *et al.*, 1999). En los brotes de diarrea causados por *C. parvum*, la morbilidad y mortalidad pueden ser más altas en cabritos menores a dos semanas de edad y los signos clínicos que presentan principalmente son diarrea acompañada de la excreción de un gran número de ooquistes, así como anorexia y dolor abdominal (Muñoz *et al.*, 1996). Finalmente, *Eimeria spp.* es un parásito que causa Coccidiosis una enfermedad con alta prevalencia en caprinos (Abo-Shehada y Abo-Farieha, 2003). En cabritos infectados experimentalmente con ooquistes esporulados de cinco especies mixtas de *Eimeria*, la principal manifestación de la coccidiosis entérica fue la diarrea (Mohammed *et al.*, 2000). Esta enfermedad trae pérdidas económicas en el crecimiento de los animales y en la posible mortalidad relacionadas con la diarrea, sin embargo, no se ha realizado una estimación precisa de las pérdidas en la crianza intensiva o extensiva (Chartier y Paraud, 2012).

**Tabla I.** Patógenos que causan diarrea en cabritos

<b>Agente causal</b>	<b>Signos clínicos</b>	<b>Mortalidad* (%)</b>	<b>Morbilidad* (%)</b>	<b>Referencia</b>
Rotavirus grupo A (RVA) y B (RVB)	Anorexia, postración, diarrea con ausencia de fiebre	0%	25 %	Alkan <i>et al.</i> , 2012; Muñoz <i>et al.</i> , 1996
<i>Escherichia coli</i>	Anorexia, postración, diarrea con ausencia de fiebre	30%	5-60%	Drolet <i>et al.</i> , 1994; Muñoz <i>et al.</i> , 1996
<i>Salmonella spp</i>	Diarrea muy acuosa con fiebre alta	40%	90%	Mahmood <i>et al.</i> , 2014; Muñoz <i>et al.</i> , 1996
<i>Clostridium perfringens</i>	Enfermedad “enterotoxemia” y “enfermedad del riñón pulposo” depresión, anemia, diarrea inconsistente.	100%	10%	Uzal, 2008; Muñoz <i>et al.</i> , 1996
<i>Cryptosporidium parvum</i>	Apatía, depresión, anorexia, dolor abdominal, diarrea acompañada de derramamiento de un gran número de ooquistes.	Arriba de 35%	90-95 %	Muñoz <i>et al.</i> , 1996
<i>Eimeria spp.</i>	Diarrea, anorexia, depresión y debilidad.	-	-	Cepeda-Palacios <i>et al.</i> , 2015

\*La morbilidad y mortalidad son referencia de los experimentos realizados por Muñoz *et al.* (1996).

## 2.2 Sistema inmune de caprinos

### 2.2.1 Anatomía y función

El sistema inmune protege a los animales contra la invasión microbiana y por lo tanto es esencial para la vida (Tizard, 2013). El sistema inmune comprende de una serie de órganos, tejidos, células y moléculas que actúan contrarrestando la infección por patógenos. Uno de los tejidos del sistema inmune es la médula ósea donde se lleva a cabo la hematopoyesis (Williams, 2012). Además, en pequeños rumiantes el sistema inmune está integrado por diferentes órganos linfoides, que se dividen en primarios y secundarios (Weiss, 1972). El órgano primario de linfocitos T es el timo en todas las especies, mientras que los órganos primarios de linfocitos B son médula ósea y las placas de Peyer. Los linfocitos B y T migran y colonizan los órganos linfoides secundarios (Landsverk *et al.*, 1991; Seva *et al.*, 1999) que incluyen los nódulos linfáticos, el bazo y el tejido linfoide asociado a las mucosas (“MALT”, *mucosa-associated lymphoid tissue*) (Tizard, 2013).

El timo se encuentra localizado en la cavidad torácica delante y debajo del corazón y en caprinos se extiende hasta el cuello por la glándula tiroides. Su tamaño varía, siendo más grande en animales jóvenes alcanzando un pico de tamaño a los 4 meses de edad y en animales adultos puede ser muy pequeño y difícil de encontrar (Pritchard, 1988). Es un importante órgano responsable de la diferenciación y maduración de los linfocitos T (Williams, 2012).

Por otra parte, las placas de Peyer son órganos linfoides localizados en las paredes del intestino delgado. Así, en los rumiantes jóvenes, del 80 al 90% de las placas de Peyer se encuentran en el íleon (Halleraker *et al.*, 1990). En contraste con las placas de Peyer ileales, que se desarrolla a una edad temprana, las placas de Peyer yeyunales se desarrollan en animales adultos (Reynolds y Morris, 1983). En los rumiantes jóvenes, las placas de Peyer ileales pueden alcanzar 2 m. La función de las placas de Peyer ileales es ser sitio de proliferación rápida de células B (Reynolds *et al.*, 1985; Tizard, 2013).

Los nódulos o ganglios linfáticos son filtros redondos colocados estratégicamente en los vasos linfáticos de tal manera que pueden muestrear antígenos transportados en la linfa (Willard-Mack, 2006). Los ganglios linfáticos consisten en una cápsula debajo de la cual hay una red reticular llena de linfocitos, macrófagos y células dendríticas, que actúan como un filtro o trampas para detectar partículas extrañas (Tilney, 1971; Tizard, 2013).

Al igual que los nódulos linfáticos filtran antígenos en la linfa, el bazo lo hace en la sangre. Así mismo, el bazo tiene dos divisiones con distinta función: (1) la pulpa roja, cuya función es filtrar partículas y células rojas muertas (eritrocitos), además de actuar como un reservorio de monocitos inmaduros; y (2) la pulpa blanca cuya función es proporcionar un sitio para la activación de la respuesta inmune contra antígenos en la sangre. (Mebius y Kraal, 2005; Scothorne, 1985; Wennberg y Weiss, 1969).

Entre los órganos linfoides secundarios se encuentra el MALT situado a lo largo de la superficie de todos los tejidos mucosos (Cesta, 2006). La principal función del MALT es producir y secretar anticuerpos específicamente inmunoglobulina A (IgA) a través de las superficies mucosas (Gormley *et al.*, 1998).

## **2.2.2 Células del sistema inmune**

### **2.2.2.1 Células del sistema inmune innato y su función**

Entre las células que forman parte del sistema inmune innato encontramos a los eosinófilos, basófilos, mastocitos, neutrófilos, células NK (*Natural Killer*), monocitos, macrófagos y células dendríticas que se describen a continuación.

Los eosinófilos son granulocitos que se encuentran en circulación, MALT y órganos linfoides. Su principal función es la liberación del contenido de sus gránulos (desgranulación) que contienen histamina, leucotrienos, prostaglandina, especies reactivas de oxígeno (ERO), y citocinas (Rothenberg y Hoga, 2006).

Otras potentes células efectoras del sistema inmune innato son los basófilos y mastocitos. Al igual que los eosinófilos, son granulocitos capaces de liberar rápidamente mediadores proinflamatorios en el medio extracelular (Schneider *et al.*, 2010; Migalovich-Sheikhet *et al.*, 2012).

Los neutrófilos son granulocitos que pueden representar hasta el 70% de la población total de leucocitos circulantes (Kruger *et al.*, 2015). Los neutrófilos adoptan varios mecanismos efectores que tienen como objetivo combatir la propagación de la infección o matar al patógeno invasor. El primero es la desgranulación en respuesta a señales de activación tales como la IL-8 y el interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ); lo cual resulta en la liberación de una serie de péptidos antimicrobianos tales como defensinas, la enzima catepsina y lactoferrina, que tienen efectos tóxicos directos sobre las bacterias (Peters *et al.*, 2010). Una segunda función efectora es la fagocitosis de las bacterias, que coloca al patógeno dentro de un fagosoma (vacuola intracelular) donde se liberan ERO (Lee *et al.*, 2003). A este proceso de liberación de ERO se le llama explosión respiratoria y es directamente tóxico para los patógenos (Robinson, 2008).

Las células NK son linfocitos granulares grandes que tienen una potente citotoxicidad celular contra células tumorales y células infectadas por virus (Trinchieri, 1989). Las células NK se pueden activar mediante un proceso conocido como citotoxicidad dependiente de anticuerpos (“ADCC” *antibody dependent cellular cytotoxicity*), donde los anticuerpos que se unen a la superficie de células infectadas son reconocidos por receptores de las células NK lo que activa dichas células e induce la liberación de su contenido en sus gránulos (Vivier *et al.*, 2008). Entre las moléculas liberadas se encuentran la perforina, una enzima que origina pequeños agujeros en la membrana de las células infectadas y provoca la lisis celular; y la granzima que entra en la célula y provoca apoptosis (Osińska *et al.*, 2014).

Los monocitos constituyen el 5% de los leucocitos circundantes en la sangre y son células inflamatorias que pueden mediar los daños tisulares (Kantari *et al.*, 2008). Cuando existe una infección, los monocitos pueden migrar rápidamente a los tejidos, donde pueden madurar a macrófagos o células dendríticas (Jakubzick *et al.*, 2017). Dentro de los tejidos, los macrófagos diferenciados son las células fagocitarias primarias del sistema inmune y son responsables de fagocitar una multitud de sustancias extrañas, incluyendo toxinas, macromoléculas, desechos celulares, células enteras muertas y microorganismos (Davies *et al.*, 2013). Además, los macrófagos son considerados células presentadoras de antígeno (“APC” *antigen-presenting cells*) (Unanue, 1984).

Las células dendríticas (“DC” *Dendritic Cells*) se caracterizan por tener una morfología particular que implica extensiones celulares largas conocidas como dendritas (Bancheray y Steinman, 1998). Existen diferentes subpoblaciones de DC, que se localizan en diferentes tejidos, las cuales pueden ser definidas por pertenecer al linaje mielóide o linfóide. Las DC mieloides (mDC) derivan de los monocitos y son las APC más eficaces, capaces de activar una respuesta de células T específica de antígeno.

#### **2.2.2.2 Células del sistema inmune adaptativo y su función**

Las células T se diferencian en células T (CD4<sup>+</sup>) cooperadoras o helper (Th) o en células T (CD8<sup>+</sup>) citotóxicas (“CTL” *cytotoxic T lymphocytes*). Las células Th se caracterizan por la expresión de la molécula CD4 (Alberts *et al.*, 2002). Las células Th CD4<sup>+</sup> median la respuesta inmune mediante la secreción de citocinas específicas. Estas células llevan a cabo múltiples funciones, como la activación de otras células del sistema inmune innato, linfocitos B y linfocitos T citotóxicos; además de estar involucradas en la supresión de la respuesta inmune (Luckheeram *et al.*, 2012). Dependiendo de que citocinas produzcan, las células pueden diferenciarse en Th1 y Th2, entre otras (Tao *et al.*, 1997). Esta diferenciación determina el tipo de respuesta inmune que un individuo desarrolla, y cada respuesta

se adecua mejor para eliminar un patógeno en particular. Por ejemplo, las respuestas inmunes mediadas por Th1 combaten infecciones virales intracelulares, mientras que las respuestas inmunes mediadas por Th2 son capaces de eliminar parásitos extracelulares (Constant y Bottomly, 1997).

Las células T citotóxicas son conocidas así debido a su capacidad citolítica principalmente frente a células infectadas por virus y células tumorales (Andersen *et al.*, 2006). Estas células expresan la molécula CD8 (Castelli *et al.*, 2000). El reconocimiento mediante receptores activa la maquinaria citolítica de los CTLs, que pueden destruir células diana.

Las células B son linfocitos responsables principalmente de la producción de anticuerpos, además de desempeñar otras funciones inmunes incluyendo presentación de antígenos, producción de múltiples citocinas y una capacidad de supresión atribuida a la secreción de IL-10 (Mauri y Bosma 2012).

### **2.2.3 Moléculas principales del sistema inmune**

Entre las moléculas involucradas en el sistema inmune podemos encontrar las citocinas y los anticuerpos, entre otras (Tizard, 2013).

Las citocinas son proteínas sintetizadas y secretadas por las células del sistema inmune que inician y controlan las respuestas inmunes al comunicarse entre las mismas células. Normalmente se liberan de la célula en respuesta a diferentes estímulos, tales como la presencia de bacterias patógenas o virus. Las citocinas liberadas entonces ejercen sus efectos biológicos sobre una célula blanco a través de un receptor específico (Myers y Murtaugh, 1995). Consecuentemente, estas citocinas les dan señales a células inmunes cercanas y evocan una respuesta funcional que puede implicar la proliferación, activación celular, migración, secreción adicional de citocinas e iniciación de otras funciones efectoras. Existen familias de citocinas, entre ellas: interleucinas, interferones, factores de crecimiento y quimiocinas (Foster *et al.*, 2001). Cuando estas proteínas actúan como

moduladores de la inflamación, se clasifican en citocinas pro-inflamatorias y anti-inflamatorias.

Las citocinas que son secretados por las células inmunes innatas incluyen: TNF la cual es producida por macrófagos y media la destrucción celular; IL-1 secretada por macrófagos y células dendríticas y se encarga de la activación de células endoteliales; IL-10 la cual es producida por macrófagos y células T e inhibe la producción de IL-12 y TNF- $\alpha$ ; IL-12 que es secretada por macrófagos y células dendríticas y activa a células NK; entre otras (Lacy y Stow, 2011, Sivangala y Sumanlatha, 2015).

Las citocinas que median y regulan las respuestas inmune adaptativas principalmente incluyen: IL-2 la cual es producida por células T y es un factor de proliferación de células T y B; IL-4 que es secretada por células T CD4<sup>+</sup> y mastocitos y promueve la diferenciación de linfocitos CD4<sup>+</sup>; IL-5 producida por células T CD4<sup>+</sup> y estimula la proliferación y diferenciación de los linfocitos B inducidos por antígenos; el factor de crecimiento transformante (TGF- $\beta$ ) secretado por células T pero también por macrófagos y se encarga de inhibir la proliferación de células T y B; IFN el cual es producido por células T y NK y su función es incrementar la expresión de moléculas complejo mayor de histocompatibilidad (“MHC” *Major Histocompatibility Complex*) clase I y II, entre otras (Sivangala y Sumanlatha, 2015). Los anticuerpos o inmunoglobulinas son glicoproteínas encontradas en fluidos corporales o como receptores de antígenos en las células B. Las principales funciones de los anticuerpos consisten en (1) la unión al antígeno a través del reconocimiento de formas moleculares, conocidas como epítopos, e (2) inducir una respuesta efectora a través de la unión del anticuerpo con receptores de superficie celular (Williams, 2012). A diferencia de los humanos donde se han encontrado 5 principales clases de inmunoglobulinas, en el ganado se han encontrado 4 clases IgG, IgA, IgM, e IgE; y se distinguen por sus diferencias en las regiones C de las cadenas “H” (Goldman y Prabhakar, 1996; Nezlin, 1998).

## 2.2.4 Reconocimiento

Un concepto muy importante en inmunología es el reconocimiento de moléculas extrañas por el sistema inmune. Los microorganismos exógenos son capaces de producir una serie de múltiples proteínas, carbohidratos y glicolípidos, que pueden ser reconocidos por receptores celulares que se encuentran en la superficie de algunas células inmunes. El reconocimiento de patógenos más estudiado se lleva a cabo a través de los receptores de reconocimiento de patrones (“PRRs”, *pattern recognition receptors*). En general los PRRs se expresan en la superficie celular o en compartimientos intracelulares y son estimulados por la presencia de patrones moleculares asociados a patógenos (“PAMPs”, *pathogen-associated molecular patterns*) como algunos componentes de la pared celular (los lipopolisacáridos, peptidoglicanos o flagelinas) o algunos componentes intracelulares como ADN y ARN de cadena doble o sencilla que también forman parte de los virus (Kawai y Akira, 2011). Entre los PRRs se encuentran los receptores tipo Toll (“TLRs”, *Toll-like receptors*), moléculas de lectina tipo C (“CLR”, *C-type lectin receptors*), tales como el receptor de manosa (Mcgreal *et al.*, 2005) y el receptor de  $\beta$ -glucanos (como dectina-1) (Brown, 2006).

### 2.2.4.1 Reconocimiento de patógenos del sistema inmune innato

Una de las razones por las cuales se considera que las células del sistema inmune innato no proporcionan inmunidad específica se debe a la naturaleza de sus receptores. Las células del sistema inmune innato pueden diferenciar entre organismos extraños y su propio tejido. El reconocimiento de las estructuras moleculares de los patógenos da como resultado la activación de vías de señalización similares y la inducción de mecanismos inmunes innatos (Williams, 2012).

Los TLRs reconocen las estructuras microbianas evolutivamente conservadas y proporcionar señales para la activación celular. Cada TLR reconoce

específicamente un tipo de componente microbiano, tales como lipopolisacárido (LPS), lipopéptidos, ARN o ADN.

#### **2.2.4.2 Reconocimiento de antígenos del sistema inmune adaptativo**

Las células B y T reconocen antígenos a través de receptores específicos expresados en la superficie de membrana, conocidos como TCR y BCR (*T Cell Receptor* y *B Cell Receptor*, respectivamente).

Los TCR expresados en las células Th y CTL les permiten reconocer antígenos extraños que han sido procesados enzimáticamente en péptidos cortos (Clambey *et al*, 2014).

El BCR es una inmunoglobulina que se encuentra en la superficie de la membrana (William, 2012). El BCR funciona como un receptor eficiente que fagocita un antígeno permitiendo que sea procesado por la célula B y presentado a células Th (DeFranco, 1993).

#### **2.2.5 Regulación**

Las respuestas inmunes activan muchas vías intracelulares a través de los PRRs. Tras el reconocimiento de PAMPs, los PRRs desencadenan cascadas de señalización intracelulares que resultan en la activación de factores de transcripción como el factor nuclear kappa-B (“NF- $\kappa$ B” *nuclear factor kappa-B*), el factor nuclear de células T activadas (“NFAT” *nuclear factor of activated T-cells*) y la proteína activadora 1 (“AP-1” *activator protein 1*) (Kawai y Akira, 2011).

El factor de transcripción NF- $\kappa$ B es un complejo de proteínas que pertenecen a la familia Rel (Zandi *et al.*, 1997). Las proteínas NF- $\kappa$ B se encuentran en el citoplasma en asociación con otras proteínas inhibidoras, llamadas inhibidores del NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B) (Li y Verma, 2002). La activación de NF- $\kappa$ B se lleva a cabo por medio de un gran número de inductores. Posteriormente, las proteínas I $\kappa$ B se fosforilan y son degradadas por el proteasoma; esta degradación de I $\kappa$ B permite que el NF- $\kappa$ B se

trasloque al núcleo y se una a los promotores para regular la transcripción de un gran número de genes, incluidos péptidos antimicrobianos, citocinas, quimiocinas, proteínas de respuesta al estrés y proteínas anti-apoptóticas (Ghosh *et al.*, 1998). Además, las proteínas pertenecientes a la familia de factores de transcripción NFAT también desempeñan un papel central en la transcripción de genes inducibles durante la respuesta inmune (Rao *et al.*, 1997). Estas proteínas se activan por la estimulación de receptores y se regulan mediante la movilización de calcio (Weiss y Littman, 1994; Kelly y Siebenlist, 1995). La estimulación del receptor y la movilización del calcio resultan en la activación de muchas enzimas intracelulares, entre ellas la calmodulina, un importante regulador de las proteínas NFAT; las cuales a su vez regulan la transcripción de genes que codifican proteínas de señalización, citocinas y receptores de superficie celular (Rao, 1994). Por otra parte, el factor de transcripción AP-1 está compuesto por miembros de las familias Jun y Fos que pertenecen al grupo bZIP de proteínas de unión al ADN. Se sabe que la actividad de AP-1 es inducida por una amplia gama de estímulos que incluyen factores de crecimiento, citocinas, neurotransmisores y estrés celular (Karin, 1995).

### **2.3 Inmunidad pasiva**

El calostro es la primera secreción de la glándula mamaria después del parto que contiene altas concentraciones de inmunoglobulinas y confieren inmunidad pasiva a los cabritos neonatos, así como a otros animales recién nacidos (Linzell y Peaker, 1971). Los anticuerpos maternos, producidos durante la respuesta inmune a antígenos microbianos, son transportados desde el plasma sanguíneo al calostro antes del parto (Ata *et al.*, 1989). La principal clase de inmunoglobulinas transferida es la IgG subclase 1. La eficiencia de absorción de estos anticuerpos es más alta en las primeras horas de vida del animal y disminuye rápidamente. Los niveles de inmunoglobulinas en el calostro se encuentran influenciados por diferencias entre las cabras, así como de la presencia de mastitis. Además, el transporte de la madre a otro rebaño poco antes del parto puede causar la ausencia de anticuerpos específicos en el calostro (Neubauer y Schone 1979; Pisarska *et al.*, 2002). La

transmisión de anticuerpos maternos mediante la inmunidad pasiva debe proteger al recién nacido durante este período de vulnerabilidad, pero desafortunadamente, la protección transmitida no siempre es suficiente para controlar eficazmente las enfermedades neonatales (Tourais-Esteves *et al.*, 2008).

## 2.4 Inmunidad innata entrenada

El sistema inmune innato es generalmente visto como primitivo y que en contraste con el sistema inmune adaptativo no posee memoria. Sin embargo, se ha observado en plantas y animales invertebrados que carecen de inmunidad adaptativa, que la inmunidad innata manifiesta un estado de inmunidad mejorado después de un estímulo (Van der Meer *et al.*, 2015). Además, esto mismo ha sido ocasionalmente descrito en vertebrados incluyendo a humanos (Arala-Chaves y Sequeira, 2000). En los últimos años este fenómeno ha sido estudiado a mayor detalle y se le ha acuñado el término de inmunidad innata entrenada (Netea *et al.*, 2016). La inmunidad innata entrenada es un nuevo concepto que describe la capacidad del sistema inmune innato para generar memoria, activando mecanismos mediante los cuales, después de una primera infección con algún patógeno, aumentan su capacidad para proteger contra una reinfección del mismo o de diferentes patógenos (Levy y Netea, 2013). La inmunidad entrenada puede ser inducida por una variedad de estímulos, entre ellos, BCG (*Bacillus de Calmette-Guérin*, vacuna contra *Mycobacterium bovis*),  $\beta$ -glucanos y lipopolisacáridos bacterianos (LPS) (Buffen *et al.*, 2014; Petit y Wiegertjes 2016; Quintin *et al.*, 2012).

Entre las principales células del sistema inmune innato que pueden ser entrenadas se encuentran los monocitos y macrófagos. Se ha descrito que la estimulación con  $\beta$ -glucanos (mediante la vía del receptor dectina-1) produce una respuesta inmune mejorada a través de la inducción de una reprogramación epigenética, específicamente cambios estables en la trimetilación de histonas. Estos cambios conducen a la activación celular y la producción mejorada de citocinas (Aleem, 2013; Saeed *et al.*, 2014; Garcia-Valtanen *et al.*, 2017). Además, el entrenamiento

celular, también conduce a una reprogramación metabólica, donde los monocitos entrenados muestran un alto consumo de glucosa, producción de lactato y una relación NAD<sup>+</sup>/ NADH y con un aumento en la glucólisis dependiente de la activación de la proteína diana de rapamicina en células de mamífero (“mTOR” *mammalian Target of Rapamycin*) a través de la vía Dectina-1/Akt/HIF1 $\alpha$  (Cheng et al., 2014).

## 2.5 Levaduras aisladas de ambientes marinos extremos

Existe un gran interés por usar los microorganismos marinos en procesos biotecnológicos y relacionados con la salud. Diversos estudios se han centrado en el gran potencial de estos microorganismos marinos para su uso como fuente de fármacos, agentes microbianos, probióticos y como productores de sustancias bioactivas (Poli *et al.*, 2010; Oren, 2010). Los extremófilos son microorganismos capaces de vivir en condiciones extremas, como a altas y bajas temperaturas (termófilos y psicrófilos, respectivamente), altas concentraciones de sal (halófilos), pH ácidos o alcalinos (acidófilos y alcalófilos, respectivamente), entre otros (Poli *et al.*, 2010). Además, los extremófilos marinos crecen en ambientes calientes, fríos y salados; por lo cual, se espera que sus lípidos, enzimas y biopolímeros presenten propiedades únicas para adaptarse a condiciones extremas (Sekova *et al.*, 2015). Se han estudiado algunas especies de levaduras como *Yarrowia lipolytica* y *Debaryomyces hansenii* que tienen la capacidad de adaptarse a diversas condiciones ambientales, y que además pueden crecer en varios sustratos y sintetizar productos útiles en biotecnología (Petersen y Jespersen, 2004). *D. hansenii* tiene diversas características que le confieren su potencial biotecnológico, como producir y acumular altas cantidades de lípidos (Hammond y Glatz, 1988) y tener una alta capacidad de halotolerancia para mantener su equilibrio osmótico (Gonzalez-Hernandez *et al.*, 2005). Por otra parte, *Y. lipolytica* también posee propiedades únicas que la hacen prometedora en la investigación y biotecnología: (1) puede crecer en ambientes con grandes cantidades de carbono y nitrógeno; (2) es capaz de sintetizar grandes cantidades de enzimas (lipasas, proteasas, entre

otras) (Hofmeyer *et al.*, 2014); (3) tiene la capacidad de crecer rápidamente en condiciones desfavorables, como en pHs extremadamente altos (10.0) y bajos (3.0) (Barth y Gaillardin, 1996). Por otro lado, se ha estudiado el potencial en aplicaciones biotecnológicas de la levadura marina *Sterigmatomyces halophilus*. Interesantemente, Ali *et al.*, (2014) demostraron que *S. halophilus* tiene actividad antimicrobiana contra *E. coli*, un patógeno que se utilizará en los estudios de reto infeccioso en esta investigación. Todas estas características hacen que el uso de las levaduras sea prometedor para aplicaciones que mejoren la salud de animales y humanos (Breuer y Harms, 2006).

## **2.6 Levaduras como probióticos en animales**

Durante mucho tiempo se han utilizado los antibióticos como prevención y principal tratamiento y prevención contra enfermedades (Abd El-Tawab *et al.*, 2016). Sin embargo, la administración de estos fármacos tiene varias desventajas. Por ejemplo, su uso inapropiado de los antibióticos ha generado patógenos resistentes, lo cual ha provocado crisis sanitarias (Maron *et al.*, 2013). Otra desventaja es que se han observado bacterias resistentes en el medio ambiente de las explotaciones ganaderas y en productos cárnicos (Gundogan *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Otros problemas se asocian a la transferencia de los residuos de antibióticos a los alimentos (Chen *et al.*, 2005) y a la eliminación de algunos microorganismos benéficos para la salud de los animales (Spika *et al.*, 1987). Por lo tanto, el uso de los antibióticos ha sido prohibidos en muchos países y con ello se ha intensificado la búsqueda de alternativas adecuadas con efectos beneficiosos. Entre estas alternativas se encuentran los probióticos y los inmunoestimulantes (Kuhn *et al.*, 2005). Se ha observado que el uso de probióticos en pequeños rumiantes modulan benéficamente la microbioma del rumen (Sandine 1979, Musa *et al.*, 2009), aumentan la digestibilidad y la absorción de nutrientes (Krehbiel *et al.*, 2003, Abd El-Ghani 2004), lo que produce un mayor rendimiento productivo en los animales.

Los probióticos actúan mediante diversos mecanismos como son la competencia de los sitios de adhesión y nutrientes con los patógenos (Rolfe, 2000; Guillot, 2003), la producción de compuestos antimicrobianos (De Vuyst y Vandamme, 1994), y la estimulación de células y moléculas inmunes (Isolauri *et al.*, 1995; Ekwemalor *et al.*, 2017). Por otra parte, los criterios de selección que debe ser considerados para las cepas utilizadas como probióticos son: (1) no ser patogénico para el hospedero, (2) adherirse al epitelio intestinal, (3) sobrevivir al proceso de digestión (pH, bilis), (4) producir sustancias antimicrobianas, (5) estabilizar la microbiota intestinal y/o (6) estimular el sistema inmune (Koop-Hoolihan, 2001). Existen numerosos trabajos sobre el estudio del potencial de levaduras (principalmente *Saccharomyces cerevisiae*) como probióticos en porcinos, bovinos, equinos, ovinos y aves de importancia productiva donde se evalúa principalmente parámetros directamente relacionados con la producción (Vohra *et al.*, 2016). Entre los parámetros evaluados se encuentran: rendimiento de crecimiento, producción y composición de la leche, digestibilidad y calidad de la carne. Por ejemplo, en caballos se demostró que la administración de *S. cerevisiae* (levadura seca comercial: Biosprint) mejora significativamente la digestión de las fracciones de fibra de la dieta (Agazzi *et al.*, 2011). Así mismo, la ingesta de *S. cerevisiae* (levadura seca comercial: CNCM I-1077, Lallemand SAS) aumentó los rendimientos diarios de leche, proteína y lactosa en vacas (Bitencourt *et al.*, 2011). Existen diversos estudios que reportan que la levadura probiótica *S. cerevisiae* o sus derivados pueden reducir el riesgo de incidencia de infecciones intestinales y prevenir diarreas post destete en porcinos después de un reto con patógenos (Casas y Dobrogosz 2000; Jensen *et al.*, 2013). Por otra parte, *D. hansenii* ha sido estudiada como potencial probiótico en peces. La administración de esta levadura en la dieta de dorada (*Sparus aurata*) aumenta parámetros inmunológicos como la explosión respiratoria (Reyes-Becerril *et al.*, 2008). Así mismo, la incubación con la levadura *Y. lipolytica* aumenta la respuesta inmune innata en leucocitos de riñón cefálico y bazo de huachinango (*Lutjanus peru*) (Alamillo *et al.*, 2017). La administración de *S. halophilus* en peces estimula la

respuesta inmune (incremento niveles IgM, aumento de expresión de citocinas) (Reyes-Becerril *et al.*, 2017).

Los estudios sobre el potencial probiótico de levaduras en caprinos han sido pocos y la mayoría de éstos se enfocan en el análisis de parámetros productivos. Algunos de estos estudios reportan que en caprinos adultos y cabritos no se observaron cambios en dichos parámetros como: aumento de peso y producción de leche al administrar tanto probióticos comerciales como *S. cerevisiae* (Ataşoğlu *et al.*, 2010; Zicarelli *et al.*, 2016). Sin embargo, se ha observado que la administración de *S. cerevisiae* en hembras con lactancia temprana aumenta la producción de leche (Stella *et al.*, 2007). No obstante, existe un estudio donde se observa un aumento de la expresión de genes relacionados con la respuesta inmune innata y adaptativa en caprinos después del destete a los cuales se les administró un probiótico comercial (probiótico comercial consorcio de *Lactobacillus acidophilus*, *S. cerevisiae*, *Enterococcus faecium*, *Aspergillus oryza* y fructooligosacaride) en la dieta (Ekwemalor *et al.*, 2017).

## **2.7 Reconocimiento de levaduras probióticas**

Las levaduras contienen quitinas, mananos, y glucanos presentes en su pared celular (PAMP's) que son reconocidos por diferentes PRR's que se encuentran en diversas células del sistema inmune (Janeway y Medzhitov, 2002). Estas moléculas pueden ser reconocidas por 4 clases PRR's: (1) TLR's, (2) CLR, (3) NOD y (4) receptores del tipo RIGI (gen I inducible por ácido retinoico). En este sentido, los mananos pueden ser reconocidos por Dectina-2, TLR2 y TLR4. Por ejemplo, el TLR2 puede reconocer fosfolipomananos (Jouault *et al.*, 2003), mientras que el TLR4 es capaz de reconocer tanto mananos enlazados a oxígeno como a mananos enlazados a nitrógeno (Netea *et al.*, 2006; Kawai y Akira, 2011).

## 2.8 $\beta$ -glucanos de levaduras como inmunoestimulantes

Los inmunoestimulantes que son compuestos naturales que modulan el sistema inmune aumentando la resistencia del hospedero contra patógenos (Bricknell y Dalmo, 2005). Los  $\beta$ -glucanos han recibido atención debido a sus efectos inmunoestimulantes efectivos (Chethan *et al.*, 2017). Los  $\beta$ -glucanos son oligosacáridos no digeribles que se encuentran en la pared celular de levaduras, hongos, bacterias y ciertas plantas (Bobadilla *et al.*, 2010). Estos oligosacáridos consisten en unidades de  $\beta$ -(-1,3)-D-glucopiranosil que forman un esqueleto que contiene cadenas laterales unidas aleatoriamente dispersas por enlaces  $\beta$ -1,6 (Khalkhane *et al.*, 2013). Los mecanismos de acción de los  $\beta$ -glucanos para modular el sistema inmune inician mediante la estimulación de la fagocitosis por neutrófilos y macrófagos (Rubin-Bejerano *et al.*, 2007; Małaczewska *et al.*, 2010), la producción de citocinas como IL-1, IL-9, TNF- $\alpha$  (Brown y Gordon, 2001), y la estimulación de la producción de ERO en neutrófilos y monocitos (Vetvicka *et al.*, 1996). Además, existen características químicas en los  $\beta$ -glucanos que pueden influir sobre sus efectos inmunoestimulantes, éstas son diferencias en el tipo de enlaces y ramificación, solubilidad, masa molecular y estructuras terciarias (Vetvicka *et al.*, 2008; Wilson *et al.*, 2015). Se ha visto que la estimulación *in vitro* de monocitos y neutrófilos de cerdos, los  $\beta$ -glucanos de diferentes fuentes (levadura, hongos, algas y bacterias) tienen un poder inmunoestimulante, activando mecanismos del sistema inmune como la producción de ERO (Sonck *et al.*, 2010). Adicionalmente, se observó actividad inmunoestimulante de  $\beta$ -glucanos de diversas levaduras (*Candida parapsilosis*, *Hortaea werneckii*, *Candida spencermartinsiae*, *Candida haemulonii*, *Candida oceani*, *Debaryomyces fabryi*, *Debaryomyces nepalensis* y *Meyerozyma guilliermondii*) en larvas de langostino después de un reto con el virus del síndrome de la mancha blanca (“WSSV” *white spot syndrome virus*) (Wilson *et al.*, 2015).

## 2.9 Reconocimiento de $\beta$ -glucanos

Los  $\beta$ -glucanos funcionan como PAMP's y son reconocidos mediante el receptor Dectina-1 en células del sistema inmune innato (Iliev *et al.*, 2012). El reconocimiento de los  $\beta$ -glucanos se da mediante el dominio de reconocimiento de carbohidratos tipo lectina C ("CDR" *C-type lectin-like carbohydrate recognition domain*). Posteriormente, se ensambla un complejo multimérico de Dectina-1 que dispersa las tirosinas fosfatasa CD45 y CD48 y desbloquea el espacio necesario para que el ligando se asocie al receptor (Drummond y Brown, 2011). Tras la unión del  $\beta$ -glucano, el motivo hemITAM del dominio citoplasmático de Dectina-1 se fosforila por una tirosina quinasa no receptora la Src. Luego, la tirosina quinasa Syk se une al motivo hemITAM fosforilado. La fagocitosis mediada por Syk ocurre instantáneamente. Además, Syk también inicia la denominada respuesta transcripcional integrada ("ITR" *Integrated Transcriptional Response*). Existen dos principales vías de señalización por Dectina-1 que dependen de si la señal se propaga de modo dependiente de Syk o independiente de Syk (Kerrigan y Brown, 2010; Masuda *et al.*, 2012). No obstante, el reconocimiento de  $\beta$ -glucanos ha sido principalmente descrito en modelos murinos y humanos.

### 2.9.1 Vía dependiente de Syk

Syk inicialmente induce la activación de la fosfolipasa C $\gamma$  (PLC $\gamma$ ), que utiliza dos vías de activación dependiendo de los mensajeros secundarios. PLC $\gamma$  sintetiza diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) mediante la digestión de fosfatidilinositol (3,4,5) –trifosfato (PIP3), que es un fosfolípido que se encuentra en la membrana plasmática (Xu *et al.*, 2009). Cuando DAG es el mensajero, la PKC se activa e induce la formación del complejo proteico CARD9-Bcl10-Malt1 (CBM) en el citoplasma (Saijo y Iwakura, 2011). El complejo CBM participa en dos diferentes rutas: (1) las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) fosforilan las quinasas ERK, JNK y p38, las cuales se trasladan hacia el núcleo y se unen al factor de transcripción AP-1; (2) la proteína TRAF6 activa el complejo NEMO (modulador

esencial de “NFκB” *NF-kappa-B essential modulator*) que es la asociación de las proteínas p50 y p60 al factor de transcripción NFκB (Batbayar *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2012). Por otra parte, cuando IP3 es el mensajero se liberan iones de calcio de su reservorio citosólico, este aumento de calcio induce calcineurina, lo cual provoca la activación del factor de transcripción NFAT (Greenblatt *et al.*, 2010).

### **2.9.2 Vía independiente de Syk**

Además de las vías anteriores, se ha descrito que Dectina-1 desencadena una vía independiente de Syk que es mediada por la proteína Raf-1 y modula la activación de NFκB. Raf-1 se une al dominio citoplasmático de Dectina-1 y aumenta la fosforilación de la proteína p60 (Gringhuis *et al.*, 2009).

### **2.9.3 Señalización por TLR**

Por otra parte, el TLR 2/6 dimérico puede activarse con β-glucanos utilizando MyD88 para inducir el factor de transcripción NF-κB (Ferwerda *et al.*, 2010). MyD88 funciona como molécula adaptadora que atrae a una quinasa llamada quinasa 1 asociada al receptor de IL-1 (“IRAK” interleukin-1 receptor-associated kinase) (Gersuk *et al.*, 2006). Posteriormente, MyD88 recluta a IRAK-4, que después recluta a IRAK-1 y así, todo el complejo IRAK atrae a TRAF6. Consecuentemente, IRAK-4 fosforila IRAK-1, lo que provoca la disociación de TRAF6 del complejo. La liberación de la proteína TRAF6 atrae una variedad de moléculas que incluyen TAK-1, TAB-1/2, Uev1A y Ubc13 (Batbayar *et al.*, 2012). A partir de este punto, las vías de señalización de TLR y Dectina-1 comparten el complejo NEMO-IKK para iniciar la señalización de NFκB (Gantner *et al.*, 2003).

### 3. JUSTIFICACIÓN

Existe la necesidad de conservación e investigación para el aprovechamiento de recursos microbianos marinos con potenciales aplicaciones inmunobiotecnológicas innovadoras. Los ambientes marinos extremos han sido poco explorados y existen microorganismos que por su hábitat compiten para sobrevivir, produciendo moléculas que pueden estimular benéficamente el sistema inmune de animales y humanos. En la actualidad, se conoce muy poco sobre (1) el potencial probiótico de levaduras marinas de estos ambientes extremos y (2) el potencial inmunoestimulante de  $\beta$ -glucanos obtenidos de levaduras marinas de estos ambientes. Además, este enfoque de investigación (considerando la caracterización de microorganismos, sus moléculas y actividades biológicas; así como las células y posibles mecanismos de activación/regulación/efectores del sistema inmune) no se ha explorado anteriormente en cabritos neonatos, que son los caprinos más susceptibles a enfermedades infecciosas. Entonces, el desarrollo de probióticos e inmunoestimulantes tiene implicaciones socioeconómicas para los caprinocultores y para la obtención de productos derivados de caprinos para los consumidores. Finalmente, el reciente concepto de inmunidad innata entrenada, que propone el desarrollo de algún tipo de “memoria” en células del sistema inmune innato, no había sido abordado en rumiantes al inicio de esta tesis, aunque sí en ratones y humanos utilizando glucanos inyectados. Por todo ello, profundizar en los mecanismos inmunes que subyacen tras la administración oral de inductores de la inmunidad entrenada sería una contribución científica original no estudiada antes en mamíferos.

### 4. HIPÓTESIS

Si se ha demostrado que levaduras aisladas de ambientes marinos extremos son capaces de adaptarse a nuevos hábitats, poseen propiedades probióticas y son capaces de producir biomoléculas con potencial inmunoestimulante ( $\beta$ -glucanos), entonces, las levaduras aisladas de ambientes marinos y sus  $\beta$ -glucanos serán

capaces de estimular el sistema inmune y proteger a los cabritos recién nacidos antes y después de un reto infeccioso.

## **5. OBJETIVOS**

### **5.1 Objetivo general**

Caracterizar el potencial probiótico e inmunoestimulante de  $\beta$ -glucanos de levaduras aisladas de ambientes marinos en cabritos recién nacidos.

### **5.2 Objetivo particulares**

- a) Estudiar el potencial probiótico de levaduras de ambientes marinos *in vitro*.
- b) Analizar *in vitro* la actividad inmunoestimulante de  $\beta$ -glucanos aislados de dichas levaduras.
- c) Evaluar el potencial probiótico de la levadura seleccionada en cabritos recién nacidos (*in vivo*).
- d) Analizar la actividad inmunoestimulante del  $\beta$ -glucano seleccionado en cabritos recién nacidos (*in vivo*) en contexto de la inmunidad innata entrenada.

## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 Cepas de levaduras marinas**

Las cepas nombradas N6 y 4N16 identificadas como *Y. lipolytica* y *S. halophilus*, respectivamente, fueron aisladas de la salinera de Guerrero Negro (Baja California Sur, México). Además, también se utilizó la levadura *D. hansenii* (CBS8339) aislada de intestino de trucha arco iris (Andlid *et al.*, 1995). Las tres cepas fueron cultivadas en medio YPD líquido (Sigma, St. Louis, MO, USA; Peptona 20 g/L, Dextrosa 20 g/L, Extracto de levadura 10 g/L) suplementado con 1  $\mu$ L/mL de cloranfenicol (50 mg/mL) a 30°C con agitación constante (120 rpm) durante 24 a 48 h.

## 6.2 Características microbiológicas

### 6.2.1 Crecimiento

Las cepas fueron cultivadas en medio YPD a 30 °C con agitación constante y se tomaron mediciones de su densidad óptica (DO) a 600 nm en un lector de microplaca (BioRad, Model 3550 UV, Hercules, CA, USA) cada 4 h hasta las 48 h.

### 6.2.2 Actividad antimicrobiana por microdilución en líquido

Para determinar la actividad antimicrobiana de las levaduras contra algunos patógenos se utilizó el método de microdilución en líquido descrito por la *Society of Japanese Chemotherapy* (1990) con ligeras modificaciones. Primeramente, se obtuvieron los sobrenadantes de las levaduras marinas en fase estacionaria. Para ello, se centrifugaron los cultivos a 5,900 x g durante 10 min a 4 °C. Luego los sobrenadantes obtenidos se congelaron a -80 °C para romper células que hayan quedado y posteriormente se filtraron con un filtro *Acrodisc® Syringe Filters* con membrana de nylon de 0.2 µm.

Por otra parte, los cultivos de los patógenos (*Aeromonas veronii*, *Vibrio anguillarum* y *E. coli*) fueron reactivados en medio YPD y se ajustó su densidad celular a  $1 \times 10^8$  cél/mL. Posteriormente, se realizó una dilución 1:40 para obtener una concentración final de  $2.5 \times 10^6$  cél/mL. De la suspensión resultante se colocaron 20 µL en una microplaca de 96 pocillos MicroWell™, Nunc-Immuno™ y 80 µL de sobrenadante de las levaduras marinas. Después se incubaron a 30 °C y se midió su densidad óptica a 600 nm en un lector de microplaca (BioRad, Model 3550 UV, Hercules, CA, USA) al tiempo de fase exponencial tardía de cada patógeno. Como control negativo de inhibición se utilizaron los patógenos en medio YPD. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición con respecto al control negativo.

### **6.3 Características probióticas**

#### **6.3.1 Resistencia a sales biliares**

Las levaduras fueron reactivadas en medio YPD líquido a 30 °C durante 24 h con agitación de 120 rpm. Se tomaron 2 mL de cultivo y se centrifugó a 1,100 x g durante 10 min a 25 °C. El pellet recuperado se lavó con PBS estéril (*phosphate buffered saline*) y se prosigió a centrifugar a las mismas condiciones. Se resuspendió en PBS la biomasa recolectada y se ajustó la densidad óptica a 1 (600 nm, aproximadamente  $1 \times 10^9$  cél/mL). Seguido, se preparó medio YPD suplementado con bilis caprina al 10% obtenida de la vesícula biliar de caprinos sanos (2.5 partes de medio YPD, 2 partes de PBS y 0.5 partes de bilis). Posteriormente, se inocularon las levaduras (50  $\mu$ L en 500  $\mu$ L de medio, 10%) y se incubaron durante 1 h y 30 min a 30 °C sin agitación (Reyes-Becerril *et al.*, 2014). Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se realizaron diluciones seriadas de las cuales se tomaron 100  $\mu$ L para inocular placas con medio YPD agar por triplicado. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 24 h y el número de colonias fue contado.

#### **6.3.2 Resistencia a diferentes pHs**

Las levaduras fueron reactivadas en medio YPD líquido a 30 °C durante 24 h y 120 rpm. Posteriormente, se inocularon 600  $\mu$ L de las cepas ( $1 \times 10^9$  cél/mL) en 6 mL (1:10 v/v) de medio YPD líquido ajustado a diferentes pHs: 2.5, 3.5, 4.5 y 5.5 usando HCl 2M. Como control se utilizó medio líquido YPD a un pH de 6.5. Estos cultivos se incubaron durante 30 min a 30 °C y 120 rpm (Park *et al.*, 2006). Seguido, se realizaron diluciones seriadas de cada cultivo en PBS y se inocularon 100  $\mu$ L en placas con medio YPD agar por triplicado. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 24 h y el número de colonias fue contado.

#### **6.3.3 Capacidad de adhesión al intestino de caprinos**

Se ajustaron las cepas de levaduras cultivadas en YPD a una concentración de  $1 \times 10^9$  cél/mL en PBS para el marcaje con DTAF (5-(4,6-Dichlorotriazinyl)

*Aminofluorescein*). Para ello, se utilizaron 500  $\mu\text{L}$  de levaduras y 750  $\mu\text{L}$  de DTAF a una concentración de 1 mg/mL. Luego se incubaron en oscuridad durante 15 min con agitación constante (40 ciclos por min). Seguido, las levaduras se lavaron con PBS (5 veces, 400 x g, 5 min, temperatura ambiente) para eliminar el exceso de DTAF y se resuspendieron en PBS.

Para el ensayo de la capacidad de adhesión (Tovar *et al.*, 2002), se utilizaron muestras de intestino de un caprino sano que fue sacrificado de acuerdo a la normatividad de las guías bioéticas de México para evitar el estrés innecesario de los animales (NOM-062-ZOO-1999 y NOM -008-ZOO-1994). La muestra de intestino se dividió tomando una sección de duodeno y una de yeyuno. Ambas se lavaron con PBS y se incubaron durante 30 min con 200  $\mu\text{L}$  de la suspensión de cada cepa de levadura marcada. Se lavó el intestino con PBS para eliminar el exceso de levaduras y DTAF. Las muestras se embebieron en parafina y se seccionaron (5 mm) y se observaron bajo un microscopio de fluorescencia Olympus BX41 (Olympus, America Inc., Melville, NY, USA) y las imágenes fueron tomadas utilizando el software Image Pro Plus v. 9.0.

#### **6.4 Obtención de lisados de levaduras**

Los cultivos de levaduras se ajustaron a una densidad óptica de 1 a 600 nm ( $1 \times 10^9$  cél/mL, Ausubel, 1999) y se centrifugaron a 2,300 x g durante 15 min a 4 °C. Los pellets se resuspendieron en 1 mL de PBS y se realizó una dilución 1:10 para obtener una concentración de  $1 \times 10^8$  cél/mL. Posteriormente, se realizó la lisis celular mediante un sonicador digital Q125 a 90% de amplitud durante 3 min. Los lisados se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

#### **6.5 Extracción de $\beta$ -glucanos**

Para extraer los  $\beta$ -glucanos se cultivaron 5 mL de biomasa de las levaduras en 500 mL de medio YPD (4 matraces para cultivar 2000 mL) y se incubaron a 30 °C de 48 a 72 h a 120 rpm para obtener la biomasa necesaria para la extracción.

Posteriormente los cultivos fueron centrifugados a 5,500 x g por 15 min a 4 °C y una vez obtenida la biomasa se liofilizó (biomasa seca). Los  $\beta$ -glucanos fueron extraídos de la biomasa seca siguiendo la metodología de Williams *et al.*, (1991) con ligeras modificaciones. Se suspendieron 2 g de biomasa seca en 40 mL de NaOH 3% y se colocaron a 100 °C durante 3 h. Luego se mantuvieron a temperatura ambiente durante la noche. La suspensión se centrifugó a 8,228 x g durante 15 min para coleccionar el residuo insoluble, después este residuo se resuspendió en NaOH 3% y se repitió el procedimiento. Seguido, el residuo se resuspendió en 40 mL de ácido acético 0.5 N, se calentó a 75 °C durante 6 h y se centrifugó a 8,228 x g durante 15 min. La fracción insoluble se resuspendió en etanol, se llevó a ebullición y fue centrifugada a 8,228 x g para coleccionar el residuo, este paso se realizó tres veces. Luego el residuo se lavó con agua destilada, fue liofilizado por 48 h y el producto final ( $\beta$ -glucanos) fue usado para los ensayos (Wilson *et al.*, 2015).

#### **6.6 Caracterización de $\beta$ -glucanos por resonancia magnética nuclear (RMN)**

La caracterización de los  $\beta$ -glucanos se realizó mediante la técnica de resonancia magnética nuclear (Universidad de Murcia). Las muestras se analizaron en un espectrómetro de RMN Bruker Avance III 600 usando una criosonda CH a 72 °C. Se disolvieron de 10 a 25 mg de los glucanos en 1 mL de DMSO-d<sub>6</sub> a 80 °C. Luego se añadieron unas gotas de ácido trifluoroacético-D (99,8% de deuterado, *Cambridge Isotope Laboratories*) a la solución para desplazar el agua y las resonancias de protones de hidroxilo hacia abajo. Los desplazamientos químicos de RMN se referenciaron a la resonancia residual de protón de DMSO-d<sub>6</sub> a 2.50 ppm.

#### **6.7 Peso molecular de glucanos**

El análisis de los pesos moleculares se llevó a cabo mediante cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz multiángulo (“SEC-MALS” *Size Exclusion Chromatography with Multi-Angle Light Scattering*) en la Universidad de Toulouse (Toulouse, Francia). Se pesaron 4 mg de cada glucano en un tubo de vidrio.

Se añadió nitrato de sodio 0.1 M (eluyente SEC) a una concentración de 1 mg/mL. Las muestras se agitaron 3 h a 90 °C. Después de enfriar a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron y se filtraron a través de filtros de membrana de 0.45 µm. Se utilizaron patrones de peso molecular de β-glucano (P-MWBGS, meagzima) de 35,600 g/mol a 650,000 g/mol para calibrar el método. Las condiciones cromatográficas utilizadas fueron: columnas Shodex OHPAK SB804 HQ + SB 803HQ en serie, solución de nitrato de sodio (NaNO<sub>3</sub>) 50 mM como fase móvil, temperatura a 40 °C, flujo a 0.50 mL/min y 40 µL de volumen de inyección.

### **6.8 Extracción de leucocitos de sangre periférica**

Para la obtención de leucocitos se utilizaron caprinos de un sistema de producción estabulada en el Rancho El Ciruelito, La Paz, Baja California Sur. Las muestras de sangre periférica de cabras clínicamente sanas se obtuvieron en tubos BD Vacutainer® con heparina sódica (Franklin Lakes, NJ, EE. UU.) de acuerdo a la normatividad de las guías bioéticas de México (NOM-062-ZOO-1999 y NOM -008-ZOO-1994) para evitar el estrés innecesario de los animales. Para el aislamiento de los leucocitos en condiciones estériles se siguió la metodología de Azmi *et al.* (2006) con ligeras modificaciones. La sangre se diluyó con medio RPMI 1640 (heparina 3X) (1:1 v/v); luego se colocaron 1.25 mL en tubos Falcon de 15 mL que contenían 2 mL de Histopaque®-1077 y se centrifugaron a 357 x g a 20 °C durante 20 min. La capa leucocítica se recogió y se incubó a temperatura ambiente con 1 mL de buffer de lisis ACK (cloruro de amonio-potasio) para la lisis de eritrocitos durante 10 min. La reacción de lisis se detuvo con 3 mL de PBS y se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones. Luego, se suspendieron los leucocitos en RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10%) penicilina/estreptomicina (100 UI/mL, 100 mg/mL) y glutamina (1%). Finalmente, se verificó la viabilidad de los leucocitos con la prueba de exclusión de azul tirpano usando el contador de células automatizado TC20.

### **6.9 Estimulación de leucocitos de sangre periférica de caprinos**

Para la estimulación *in vitro* se utilizaron 1 mL de leucocitos de sangre periférica de caprino a una concentración de  $1 \times 10^6$  cél/mL por pozo en una placa para cultivo celular. Cada análisis se realizó por triplicado para cada grupo. Por cada grupo se realizaron dos ensayos: (1) donde los leucocitos solo fueron estimulados con las levaduras o  $\beta$ -glucanos durante 24 h; y (2) en donde los leucocitos fueron estimulados con las levaduras o  $\beta$ -glucanos durante 6 h y posteriormente se retaron con *E. coli* 23 (aislado clínico, serotipo: O157:H7) y se incubaron durante 18 h más. Ambos ensayos fueron estimulados con 200  $\mu$ L de las tres cepas de levaduras ( $1 \times 10^9$  cél/mL) o 200  $\mu$ L de  $\beta$ -glucanos (200  $\mu$ g/mL) e incubados a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se utilizó como control positivo un inmunoestimulante comercial: Curdlan de *Alcaligenes faecalis* (200  $\mu$ g/mL; Sigma, St. Louis, MO, USA). Al final de las 24 h de incubación se tomaron muestras para posteriores ensayos.

### **6.10 Viabilidad de leucocitos estimulados con lisados y $\beta$ -glucanos de levaduras marinas**

Se utilizó el ensayo de reducción de resazurina de acuerdo a Riss *et al.* (2016) para determinar la viabilidad de los leucocitos al ser estimulados con los lisados de levaduras de ambientes marinos y los  $\beta$ -glucanos. El grupo control positivo (leucocitos sin estímulo) se empleó como el 100% de viabilidad y el control negativo se utilizó DMSO como indicador de citotoxicidad. En una placa de 96 pocillos MicroWell™, Nunc-Immuno™ se colocaron 80  $\mu$ L por pocillo de leucocitos de sangre periférica de caprinos ( $1 \times 10^6$  cél/mL) con 20  $\mu$ L de lisados o  $\beta$ -glucanos de levaduras para estimular durante 1 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Además, como control positivo se utilizaron leucocitos sin estimulantes y como control negativo se utilizó un grupo con DMSO (1%), el cual es tóxico para las células (Yuan *et al.*, 2014). Posteriormente se agregaron 10  $\mu$ L de solución de resazurina y se incubaron por 24 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. La fluorescencia se registró en un lector de microplacas

de fluorescencia Varioskan™ Flash Multimode Reader a 560 nm (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

## **6.11 Parámetros inmunológicos**

### **6.11.1 Fagocitosis**

El porcentaje de células fagocíticas de los leucocitos de sangre periférica de cabritos recién nacidos fue evaluado mediante citometría de flujo (Rodríguez *et al.*, 2003). Para ello, se utilizó la levadura *S. cerevisiae* marcada con DTAF. Para dicho marcaje, primeramente, las levaduras fueron inoculadas en medio YPD suplementado con cloranfenicol (50 µg/mL) e incubadas a 30 °C con agitación constante durante 24 h. Luego, el cultivo fue centrifugado a 400 x g durante 10 min a temperatura ambiente, se eliminó el sobrenadante, y el pellet celular se resuspendió en PBS para posteriormente ajustar la concentración celular a  $1 \times 10^8$  cél/mL. Se prepararon 15 mL de la solución de DTAF (1 mg/mL) en PBS, y se mezcló con 10 mL de cultivo de levaduras ( $1 \times 10^8$  cél/mL). La mezcla se incubó durante 25 min, 40 ciclos/min, temperatura ambiente y en oscuridad. Posteriormente, se realizaron 5 lavados con PBS para eliminar el exceso de DTAF y se realizaron alícuotas. La fluorescencia de las levaduras fue comprobada mediante citometría de flujo.

Para evaluar el porcentaje de células fagocíticas de las muestras de los ensayos se tomaron 100 µL de leucocitos de sangre periférica de cabritos recién nacidos. Los leucocitos fueron incubados durante 30 min en oscuridad con 60 µL de levadura marcada con DTAF, posteriormente la fagocitosis se detuvo añadiendo 400 µL de PBS frío. La fluorescencia de las levaduras no fagocitadas fue eliminada utilizando azul de tripan. Se determinó la capacidad fagocítica detectando la fluorescencia en el canal FL-1 del citómetro S3e Cell Sorter (BioRadBiorad, Hercules, CA, USA).

### 6.11.2 Explosión respiratoria

Para evaluar la explosión respiratoria en leucocitos de sangre periférica de cabritos recién nacidos, se realizó el ensayo de azul de nitro-tetrazolio (NBT) de acuerdo a Kemenade *et al.* (1994). Para ello, se tomaron 100  $\mu$ L de cultivo celular por triplicado y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 mL. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 x g durante 1 min a temperatura ambiente y se eliminó el sobrenadante. Los pellets fueron resuspendidos en una solución de NBT (1 mg/mL) y se incubaron en oscuridad durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 1000 g/min a temperatura ambiente y se decantaron para eliminar la solución NBT. Después de ello, se añadieron 100  $\mu$ L de metanol 70% (v/v) y se incubaron durante 10 min. Se centrifugaron las muestras para eliminar el metanol y se añadieron 120  $\mu$ L de hidróxido de potasio 2 M así como 140  $\mu$ L de DMSO. Por último, se tomaron 200  $\mu$ L que fueron colocados en placas de 96 pozos para leer absorbancia en el espectrofotómetro Varioskan™ Flash Multimode Reader a 655 nm (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA).

### 6.11.3 Producción de óxido nítrico

La producción de óxido nítrico (ON) se determinó indirectamente midiendo la concentración de nitritos en las muestras mediante la reacción de Griess de acuerdo a Neumann *et al.* (1995). Para realizar este ensayo se añadieron 100  $\mu$ L de cultivo celular por triplicado en una placa de 96 pozos, se adicionó 100  $\mu$ L de reactivo de Griess (4 mg/mL) y se incubó durante 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Se leyó absorbancia en el espectrofotómetro a 540 nm.

### 6.11.4 Expresión génica

Se llevó a cabo la extracción de ARN total de las muestras de leucocitos mediante el uso del reactivo TRIzol® Reagent (Invitrogen EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con ADNsa I (Life Technologies) y se realizó la síntesis de ADNc a partir de 1  $\mu$ g de ARN, mediante el

kit de ImProm-II™ Reverse Transcription (Promega, EUA). Utilizando el ADNc sintetizado, se realizó el PCR en tiempo real para analizar los patrones de expresión de los genes involucrados en la respuesta inmunológica de cabritos recién nacidos utilizando CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System Bio-Rad (Bio-Rad).

Los primers utilizados se muestran en la Tabla II. Las mezclas de reacción se incubaron a 98 °C durante 30 s; seguido de 40 ciclos a 98 °C durante 10 s; a 60 °C durante 10 s, y finalmente a 65-95 °C para la curva de disociación (melt). La especificidad del producto de PCR en tiempo real se analizó mediante una curva de disociación realizada después de la amplificación en la que se observó un solo pico a la temperatura de fusión esperada ( $T_m$ ). El nivel de expresión de los genes se normalizó con el gen ribosómico 18s. La expresión relativa de cada gen en los grupos inmunoestimulados versus control se calculó mediante la ecuación de Pfaffl (Pfaffl, 2001). Los valores superiores a uno expresan un aumento, mientras que los valores inferiores a uno expresan una disminución.

**Tabla II.** Secuencias de *primers* utilizados en este estudio.

<b>Gen</b>	<b>Longitud del producto (pb)</b>	<b>No. de acceso NCBI</b>	<b>Secuencias (5'– 3')</b>
Dectina-1	226	XM_018048489.1	TGACTTGACTCACAGATCCTC AACGAGAGGATGCAGCAC
TLR2	155	NM_001285603.1	ATCGACAACATCATTGACTCC AGCAGAATCAGAATGGCAG
TLR4	205	NM_001285574.1	CAAATGATGTGTGCAGAGCC TGCTTTCACCTCTGCCATAC
TLR6	142	NM_001285540.1	TTCCACGTATCTCAGCTATCC TCCACTGACACACCATCC
Raf-1	140	XM_018066963.1	CGTGAACATCCTGCTCTTC CAATGTCAATCAGCTGGAAC
Syk	125	XM_005684191.3	CTAAGAAAGAGGCCATCCATAC TCTGCACACTCACTAGATGC
MyD88	110	JQ308783.1	CATGGCAGGCATCACTATTC GGATCATCTGTGGACAAAC
TRAF6	158	XM_018059228.1	ACCTGCAAGAGAACACCC ATTGTGGACTTCTGAGTGACG
NFκB	210	XM_005686634.3	CAATGGGTACTCAGTCTTCTTC ATGATGCTTCCAGTCTACCTATG
AP-1	101	XM_018044742.1	AGGAAGACAGGAGACAAGTGG CCGCCTCTTTTCCTTAC
IL-1β	109	D63351.1	ACATCCAGCTGCAGATTTCTC AAGACATGTTTCGTAGGCACG
TNF- α	170	NM_001286442.1	CTCAAGCCTCAAGTAACAAG CTGCGAGTAGATGAGGTAAG
IL-10		AJ458378.1	ACATCAAGGAGCACGTGAAC GATGTCAAACACTCACTCATGGC
18S	100	DQ149973.1	TCGGGGATTGCAATTATTC ACGGGCGGTGTGTACAAA
CD11b	193	XM_05697735.3	GAGAAAAACGCTGAAATCAAGG CATCACACTTCCACTTAGCTCTC
CD11c	194	XM_018040559.1	CAAAGCATTGTGACATTTGAC AAGTTGAGACGCAAGATGATG
F4/80	198	NM_018050945.1	GTGGAAATGCAGTATCTCGC CATTGCACTGAGATCTGTTGTC
EIF2B2	180	XM_013967316.2	ACAACGGAGAACATCGCAG ATTGACTGCCATCTCATGACC
AKT	190	NM_001285750.1	AACTTCTCTGTGGCCCAATGCC TCTCCTCCTCCTGCCTCTTGAG
mTOR	189	XM_018059919.1	GCACAATCATTCTCCTCATTGAG AATGCAGATAGTCGTCCAGGTTG
HIF1-α	160	XM_018053545.1	GAAATGCTTACACACAGAAATGGC GAATATGGCCTGTGCAGTGAAG

## **6.12 Potencial probiótico de la levadura seleccionada en cabritos recién nacidos**

### **6.12.1 Bioensayo *in vivo***

El bioensayo se realizó en la Unidad de Investigación de Ovinos y Caprinos de la Universidad Autónoma de Baja California Sur, México. Doce cabritos neonatos cruzados Saanen x Nubian ( $2.9 \pm 0.47$  kg de peso corporal) se dividieron inmediatamente después del nacimiento en dos grupos experimentales equilibrados en sexo y fecha de nacimiento. Al nacer, los cabritos fueron pesados, identificados por un collar con etiqueta y los cordones umbilicales fueron desinfectados. Los cabritos se mantuvieron en condiciones de establo con libre acceso a las madres para que pudieran alimentarse de su leche durante el ensayo experimental.

Los grupos experimentales consistieron en (1) Control ( $n = 6$ ) y (2) *D. hansenii* (Dh,  $n=6$ ). Los cabritos del grupo llamado "Dh" recibieron diariamente 0.7 g/kg de peso corporal por día de la levadura viva *D. hansenii* cepa CBS8339 (Andlid *et al.*, 1995) durante 30 días. Las dosis de levadura resuspendidas en dos mL de leche de cabra recién ordeñada se administraron por vía oral a los cabritos mediante una jeringa (08:00 a.m.). Los cabritos del grupo control recibieron solo 2 mL de leche de cabra recién ordeñada.

Los caprinos fueron manipulados de acuerdo a la normatividad de las guías bioéticas de México para evitar el estrés innecesario de los animales (NOM-062-ZOO-1999 y NOM -008-ZOO-1994).

### **6.12.2 Propiedades inmunoestimulantes de la levadura seleccionada (*in vitro*)**

Se evaluaron todos los parámetros descritos anteriormente (secciones 6.10 y 6.11) en los leucocitos de sangre periférica de los cabritos recién nacidos de los grupos del bioensayo *in vivo*.

## **6.13 Evaluación de inmunidad innata entrenada en monocitos caprinos por $\beta$ -glucano *D. hansenii* CBS8339**

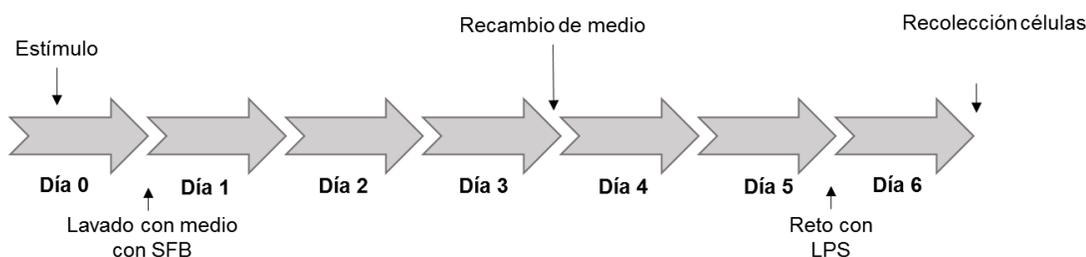
### **6.13.1.1 Extracción de monocitos de sangre periférica de caprinos**

Se adquirieron muestras de sangre periférica de cabras clínicamente sanas y se recogieron en tubos BD Vacutainer® con heparina sódica (Franklin Lakes, NJ, EE. UU.). Para el aislamiento de los monocitos se utilizó el kit Human Whole Blood Monocyte Isolation Kit (Bio Vision K933, San Francisco, EE.UU.). Al final, se suspendieron los leucocitos en RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino (10%, SFB) penicilina/estreptomicina (100 UI/mL, 100 mg/mL) y glutamina (1%). Finalmente, la viabilidad de los monocitos se verificó con la prueba de exclusión de Trypan Blue usando el contador de células automatizado TC20.

### **6.13.1.2 Estimulación de monocitos**

El procedimiento que se llevó a cabo para la estimulación de los monocitos se esquematiza en la línea del tiempo de la Fig. 1. Se colocaron 1000  $\mu$ L de monocitos ( $1 \times 10^6$  cél/pozo) en una placa para cultivo celular de 24 pocillos de fondo plano (Sigma, St. Louis, MO, USA) y en portaobjetos de cultivo celular Falcon® 4-well Culture Slide (Corning 354114, New York, EE. UU.), posteriormente, se incubaron a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub> durante 1 h para permitir la que los monocitos se adhieran a la placa. Transcurrido dicho tiempo, el medio fue retirado y se reemplazó con medio suplementado para el grupo control, medio con 5  $\mu$ g/mL de  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* ( $\beta$ -Dh) y medio con 20 pmol de PMA (forbol 12-miristato 13-acetato) que se utiliza para la diferenciación de monocitos. Después de 24 h, los tratamientos fueron lavados con medio RPMI (precalentado a 37 °C) y se reemplazaron con medio RPMI suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB, Gibco, Grand Island, NY, USA). Entonces, los monocitos se incubaron durante 5 días para permitir la diferenciación celular. Al tercer día de diferenciación se realizó un recambio de medio (“refreshing”) para garantizar que las células tuvieran los nutrientes necesarios. Después del periodo de diferenciación, el medio fue reemplazado y las células fueron retadas

con 10 ng/mL de LPS. A las 24 h después del reto, las células adheridas se desprendieron de las placas de cultivo usando la solución de trabajo Trypsin-EDTA 1X (10X, sigma, St. Louis, MO, USA) que inactiva la adhesión.



**Figura 1.** Línea del tiempo del procedimiento de estimulación de monocitos caprinos.

### 6.13.1.3 Microscopia óptica

Las células estimuladas en los portaobjetos de cultivo celular fueron observadas por microscopía a los días 0, 4 y 6. En cada día de observación, el medio RMPI fue retirado y entonces las células se fijaron a los portaobjetos con metanol al 100% durante 1 min. Posteriormente se decantó el metanol y los portaobjetos se secaron al aire. Las células fueron teñidas con el reactivo de Giemsa (Sigma, St. Louis, MO, USA) durante 25 min y después fueron lavadas con agua destilada para eliminar excedente del colorante. Por ultimo, los portaobjetos se dejaron secar y se observaron a través de un microscopio óptico Olympus BX41 (Olympus, America Inc., Melville, NY, USA) y las imágenes fueron tomadas utilizando el software Image Pro Plus v. 9.0

### 6.13.1.4 Viabilidad de monocitos y macrófagos entrenados

Se evaluó la proporción de células vivas utilizando la tinción con yoduro de propidio (PI, Sigma-Aldrich, Riccardi y Nicoletti, 2006). Se tomaron 500  $\mu$ L de monocitos caprinos, posteriormente se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en buffer de unión (0.1 M HEPES, 1.4 M NaCl, 25 mM CaCl<sub>2</sub>). Las células fueron teñidas con 5  $\mu$ L de PI (Sigma-Aldrich P4864) y se incubaron en oscuridad durante 15 min a

temperatura ambiente. Entonces, se analizaron las muestras mediante citometría de flujo (S3e Cell Sorter, BioRad) usando el canal FL-3 (PI). Los resultados fueron expresados como porcentaje de células vivas (PI-) y células muertas (PI+).

#### **6.13.1.5 Fagocitosis**

Se evaluó el porcentaje de células fagocíticas de los monocitos y macrófagos en sangre periférica de caprinos mediante citometría de flujo como se describe en el apartado 6.11.1.

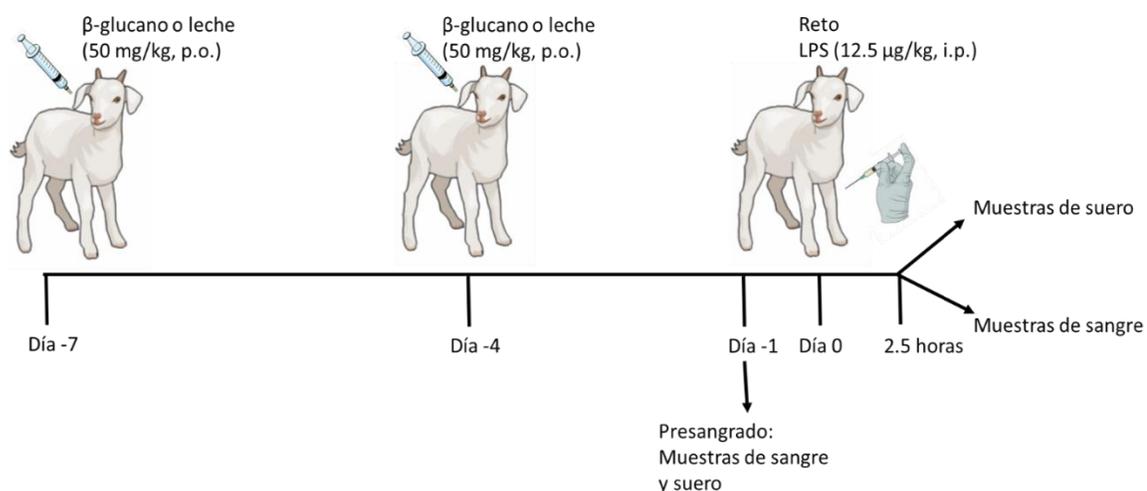
#### **6.13.1.6 Expresión de genes de marcadores de superficie celular y citocinas**

Se llevó a cabo la extracción de ARN total de las muestras de monocitos mediante el uso del reactivo TRIzol® Reagent (Invitrogen EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con ADNsa I (Life technologies) y se realizó la síntesis de ADNc a partir de 1 µg de ARN, mediante el kit de ImProm-II™ Reverse Transcription (Promega, EUA). Se realizó el PCR en tiempo real con el ADNc sintetizado utilizando algunos primers que se muestran en la Tabla II.

#### **6.13.2 Evaluación de inmunidad innata entrenada en monocitos de cabritos recién nacidos por el β-glucano de *D. hansenii* (in vivo)**

Este experimento se llevó a cabo en la Unidad de Investigación de Ovejas y Cabras de la Universidad Autónoma de Baja California Sur (UABCS, México). Los caprinos fueron manipulados de acuerdo a la normatividad de las guías bioéticas de México para evitar el estrés innecesario de los animales (NOM-062-ZOO-1999 y NOM -008-ZOO-1994). Doce cabritos machos recién nacidos Saanen × Nubian (edad: 3 a 5 días de nacidos, peso: 3.56 ± 0.58) fueron divididos dentro de 3 grupos experimentales. Al nacer, los cabritos se pesaron, se identificaron con una etiqueta en el cuello y se desinfectaron los cordones umbilicales. Los cabritos recién nacidos se mantuvieron en condiciones estables con acceso libre a la leche materna durante el ensayo experimental.

Los grupos experimentales consistían en (1) Control ( $n=4$ ), (2)  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* ( $\beta$ -Dh,  $n=4$ ) y (3)  $\beta$ -glucano de *S. cerevisiae* ( $\beta$ -Sc,  $n=4$ ). A los cabritos del grupo llamado  $\beta$ -Dh y  $\beta$ -Sc se les administró por vía oral dos dosis de 50 mg/kg de peso de cabrito de  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* y de  $\beta$ -glucano de *S. cerevisiae* (a los días -7 y -4) en 1 mL de leche materna de cabra, respectivamente. Los cabritos del grupo control recibieron 1 mL leche materna de cabra. En el experimento, se obtuvo sangre periférica de los cabritos en el día -1 (presangrado) para evaluar los parámetros inmunológicos preexistentes. En el día 0, todos los cabritos se inyectaron intraperitonealmente con 1 mL de una solución que contenía 12.5  $\mu$ g/kg de peso del cabrito de LPS de *E. coli* serotipo O55:B5 en solución salina. A las 2.5 h después de la inyección, se obtuvo sangre de cada cabrito y se recogió en tubos en tubos BD Vacutainer® con heparina sódica (Franklin Lakes, NJ, EE. UU; Fig. 2). Tres mL de sangre se destinaron para la extracción de ARN de sangre periférica y la actividad de explosión respiratoria; mientras que 2 mL de sangre se asignaron para la separación del plasma por centrifugación para los análisis de actividad de lisozima, producción de óxido nítrico y producción de citocinas. Las muestras de plasma se almacenaron a -20 °C hasta su uso.



**Figura 2.** Esquema de dosificación de  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* en el bioensayo *in vivo* con cabritos recién nacidos.

#### **6.13.2.1 Explosión respiratoria en células sanguíneas**

Para evaluar la explosión respiratoria en sangre periférica de cabritos recién nacidos, se realizó el ensayo de NBT (Kemenade *et al.*, 1994). Para ello, se tomaron 50  $\mu$ L de sangre de cada cabrito por triplicado en una placa de 96 pocillos MicroWell™, Nunc-Immuno™ y se incubaron durante 1 h a 37 °C. El sobrenadante se descartó y se lavó 3 veces con 100  $\mu$ L de PBS. Posteriormente se agregó 50  $\mu$ L de NBT (1 mg/mL) e incubó durante 1 h a temperatura ambiente en oscuridad. Enseguida, se descartó el sobrenadante y se incubó con 100  $\mu$ L de metanol al 100% de 2 a 3 min y después de ese tiempo el metanol fue descartado. Por último, se agregaron 60  $\mu$ L de KOH 2 M y 70  $\mu$ L de DMSO e inmediatamente se midió la densidad óptica en el espectrofotómetro (BioRad, Model 3550 UV, Hercules, CA, USA) a 655nm.

#### **6.13.2.2 Producción de óxido nítrico**

Se evaluó producción de óxido nítrico indirectamente con la concentración de nitrito en plasma de los cabritos mediante la reacción de Griess como se describe en el apartado 6.11.3.

#### **6.13.2.3 Actividad de lisozima**

Se colocaron 25  $\mu$ L de plasma de cada cabrito por pocillo en una placa de 96 pocillos. Se añadió 175  $\mu$ L de *Micrococcus lysodeikticus* (0.75 mg/mL; Sigma, St. Louis, MO, USA) y se leyó inmediatamente la densidad óptica a 450 nm (Litwack, 1995). La concentración de lisozima ( $\mu$ g/mL) se calculó a partir de una curva estándar con diferentes concentraciones de lisozima de huevo blanco de gallina ("HEWL" *Hen Egg White Lysozyme*).

#### **6.13.2.4 Producción de citocinas en plasma**

Para la detección de las citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  en el plasma de cabritos recién nacidos del experimento se utilizaron kits para ELISA (MyBiosource, San Diego, CA,

USA) siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración de citocinas fue determinada utilizando las curvas estándar proporcionadas por los kits.

#### **6.13.2.5 Expresión de genes de marcadores de superficie celular, citocinas y reguladores del metabolismo de la glucosa en muestras de sangre periférica de cabritos recién nacidos**

Para el aislamiento de ARN de sangre periférica de cada uno de los cabritos se transfirió 3 mL de sangre a un tubo cónico de 50 mL y se llevó a un volumen final de 45 mL con 1X RBC (“Red Blood Cell”) buffer de lisis. Posteriormente, se incubaron las muestras por 10 min a temperatura ambiente y se procedieron a centrifugar a 600 x g durante 10 min a temperatura ambiente. Se descartó sobrenadante y con cuidado se resuspendió el pellet celular en 1 mL de 1X RBC Buffer de lisis en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Enseguida, las muestras fueron centrifugadas a 1000 x g durante 2 min a temperatura ambiente. El pellet celular se resuspendió en DPBS estéril y se volvieron a centrifugar las muestras a las mismas condiciones. Por último, se añadieron 1000 µL del reactivo TRIzol y se procedió a extraer el ARN de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente, las muestras fueron tratadas con ADNsa I (Life technologies) y se realizó la síntesis de ADNc a partir de 1 µg de ARN, mediante el kit de ImProm-II™ Reverse Transcription (Promega, EUA). Utilizando el ADNc sintetizado, se realizó el PCR en tiempo real, utilizando primers para genes de marcadores de superficie celular, citocinas, reguladores de la glucólisis (tabla II).

#### **6.14 Análisis estadístico**

Todas las mediciones se llevaron a cabo por triplicado y se calculó la media y el error estándar de la media (*EMM*) de cada grupo. Los datos fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para determinar los efectos de los tratamientos. La comparación de medias fue realizada por el análisis posteriori de Duncan. Las diferencias se consideraron

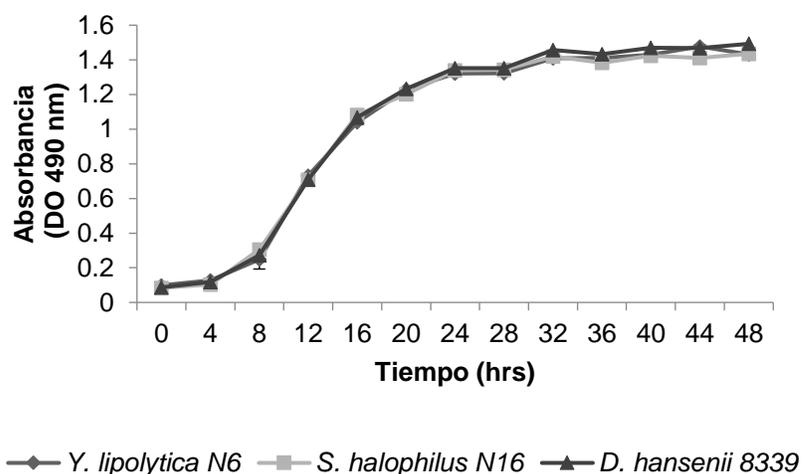
estadísticamente significativas cuando  $p < 0.05$ . Todos los datos fueron analizados con el software SPSS versión 19 (SPSS, Richmond, VA, USA).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Características microbiológicas

#### 7.1.1 Crecimiento de las cepas de levaduras

Las curvas de crecimiento de *D. hansenii* CBS8339 (“Dh”), *Y. lipolytica* N6 (“Yl”) y *S. halophilus* 4N16 (“Sh”) presentaron un patrón similar durante las 48 h: iniciando la fase exponencial aproximadamente a las 6 h, la fase exponencial tardía a las 24 h, y la fase estacionaria a las 30 h (Fig. 3).



**Figura 3.** Curva de crecimiento de *Y. lipolytica* N6, *S. halophilus* 4N16 y *D. hansenii* CBS8339.

#### 7.1.2 Actividad antimicrobiana

Los sobrenadantes de las cepas de las levaduras tuvieron una actividad antimicrobiana contra algunos patógenos. Se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de inhibición contra *E. coli* con los tres sobrenadantes de las levaduras, siendo la cepa *Dh* la que mostró un mayor porcentaje de inhibición

(53.42%). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas contra *V. anguillarum*. Además, se encontró un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de inhibición contra *A. veronii* con los tres sobrenadantes, siendo el de la cepa *Sh* (74.39%) el porcentaje de inhibición más alto. En general, los sobrenadantes de las tres cepas mostraron un porcentaje de inhibición mayor contra *A. veronii* que contra las otras bacterias patógenas (Tabla III).

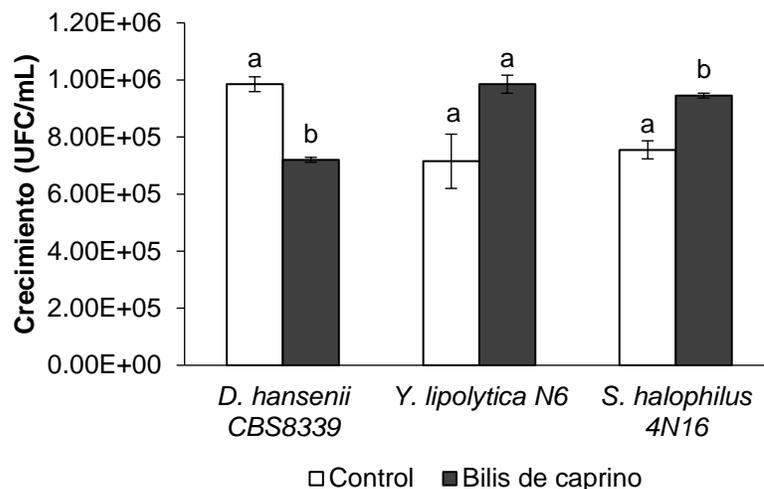
**Tabla III.** Actividad antimicrobiana de los sobrenadantes de las levaduras marinas contra bacterias patógenas (porcentaje de inhibición).

Levaduras	Inhibición %		
	<i>E. coli</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>A. veronii</i>
<i>D. hansenii</i> CBS8339	53.42 ± 1.04 <sup>c</sup>	56.05 ± 1.77 <sup>a</sup>	68.20 ± 0.69 <sup>a</sup>
<i>Y. lipolytica</i> N6	51.31 ± 0.30 <sup>b</sup>	59.89 ± 3.48 <sup>a</sup>	70.39 ± 1.07 <sup>b</sup>
<i>S. halophilus</i> 4N16	44.55 ± 1.36 <sup>a</sup>	57.72 ± 1.18 <sup>a</sup>	74.39 ± 1.03 <sup>c</sup>

Las diferencias en literales describen diferencias significativas entre grupos ( $p < 0.05$ ).

### 7.1.3 Crecimiento de las levaduras frente a sales biliares de caprinos

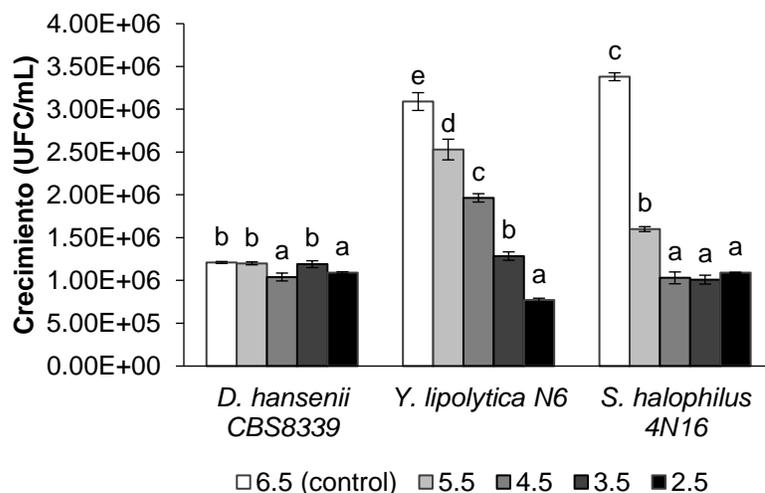
Los resultados muestran una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) del crecimiento de *Dh* cultivada en el medio con sales biliares; sin embargo, a pesar de la disminución su crecimiento fue de  $7.2 \times 10^5$  UFC/mL (Fig. 4).



**Figura 4.** Crecimiento (UFC/mL) de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16 frente sales biliares de caprinos. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

#### 7.1.4 Crecimiento de las levaduras a diferentes pHs

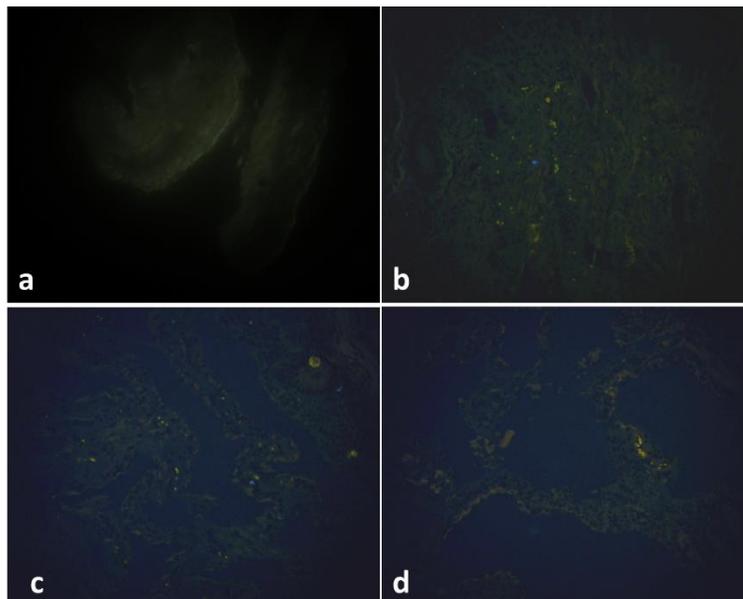
Además, la resistencia de las cepas de las levaduras a diferentes pHs se evaluó desde 2.5 hasta 6.5. Se observó que los diferentes pHs no afectan el crecimiento de *Dh* manteniendo valores de  $1.1 \times 10^6$  UFC/mL. Por otra parte, el crecimiento de *Yl* disminuyó ( $p < 0.05$ ) con un efecto pH dependiente. El crecimiento de *Sh* también tuvo una disminución significativa respecto del control (pH 6.5) al pH 5.5, seguido del pH 4.5 al 2.5 (Fig. 5,  $p < 0.05$ ).



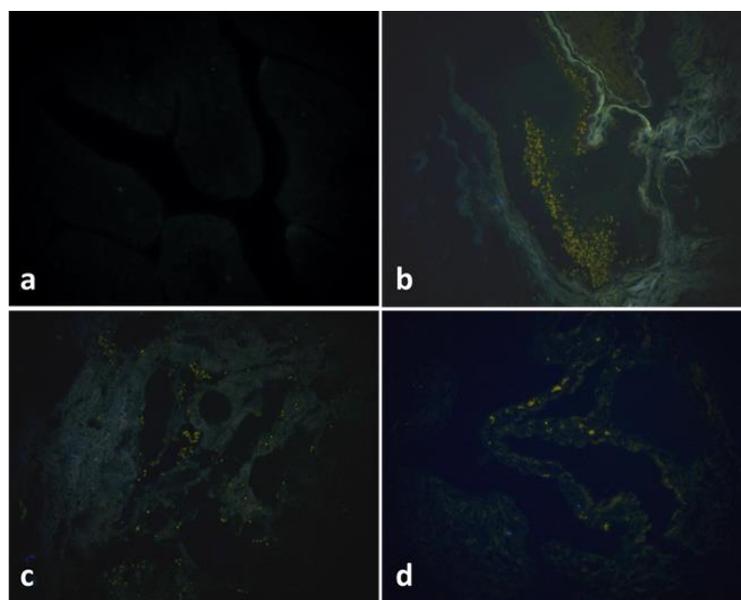
**Figura 5.** Crecimiento (UFC/mL) de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16 a diferentes pHs. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

### 7.1.5 Capacidad de adherencia al intestino de caprinos

El ensayo de capacidad de adherencia de las levaduras se realizó en secciones tanto de yeyuno como de duodeno del intestino de cabritos. Se observó una capacidad de adherencia por parte de las tres cepas de levaduras en las dos secciones (Fig. 6 y 7).



**Figura 6.** Adherencia de levaduras marcadas con DTAF a yeyuno de cabritos. a) PBS (control). b) *D. hansenii* CBS8339. c) *Y. lipolytica* N6. d) *S. halophilus* 4N16. Imágenes observadas por microscopía de fluorescencia usando el objetivo de aumento 40x (aumento final 400x).



**Figura 7.** Adherencia de levaduras marcadas con DTAF a duodeno de cabritos. a) PBS (control). b) *D. hansenii* CBS8339. c) *Y. lipolytica* N6. d) *S. halophilus* 4N16. Imágenes observadas por microscopía de fluorescencia usando el objetivo de aumento 40x (aumento final 400x).

## 7.2 Caracterización de $\beta$ -glucanos extraídos de levaduras aisladas de ambientes marinos

### 7.2.1 Rendimiento de $\beta$ -glucanos respecto a masa seca

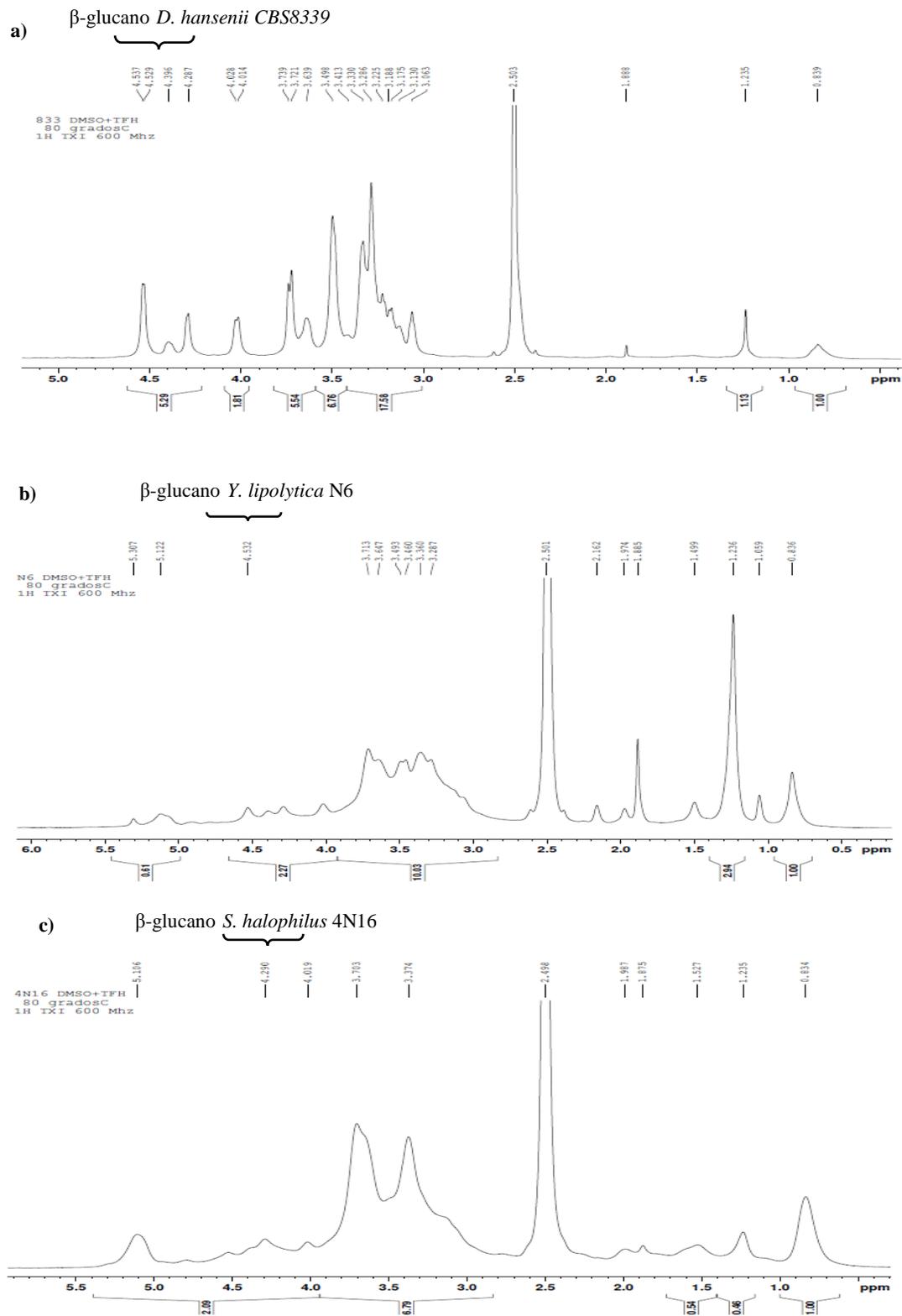
En la extracción de  $\beta$ -glucanos de todas las levaduras se obtuvieron rendimientos menores al 20% a partir de la biomasa seca (Tabla IV). A partir de 2.3 g de biomasa seca de *S. halophilus* se obtuvieron 0.4 g de glucanos (17.39% de rendimiento) mientras que de 2.7 g de biomasa seca de *D. hansenii* se obtuvo los mismos gramos de glucanos (14.81% de rendimiento). El menor rendimiento (9.52%) fue a partir de 2.1 g de biomasa seca de *Y. lipolytica* obteniendo 0.2 g de glucanos.

**Tabla IV.** Rendimiento de glucanos de las cepas de levaduras. Expresado como el porcentaje de glucanos extraídos de la biomasa seca.

Levaduras	Biomasa (g)	Biomasa seca (g)	Glucanos (g)	Rendimiento de glucanos (%)
<i>D. hansenii</i> CBS8339	8.5	2.7	0.4	14.81
<i>Y. lipolytica</i> N6	7.5	2.1	0.2	9.52
<i>S. halophilus</i> 4N16	8.8	2.3	0.4	17.39

### 7.2.2 Espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

Los espectros de RMN de protón de la región de carbohidratos particulados insolubles en agua de los glucanos de *D. hansenii*, *Y. lipolytica* y *S. halophilus* se muestran en la Fig. 8. La señal de protón anomérica en 4.3-4.6 es característica para  $\beta$ - (1,3)/(1,6)-glucanos (Synytsya y Novak, 2014); los espectros de RMN de protones de los glucanos de *D. hansenii*, *Y. lipolytica* y *S. halophilus* tenía resonancias correspondientes a 4.537, 4.532 y 4.290, respectivamente.



**Figura 8.** Espectros de RMN de protón de la región de carbohidratos de glucano particulado insoluble en agua en un disolvente mixto (DMSO-d<sub>6</sub>) a 80 °C. a) *D. hansenii* CBS8339, b) *Y. lipolytica* N6 y c) *S. halophilus* 4N16.

### 7.2.3 Peso molecular de los glucanos

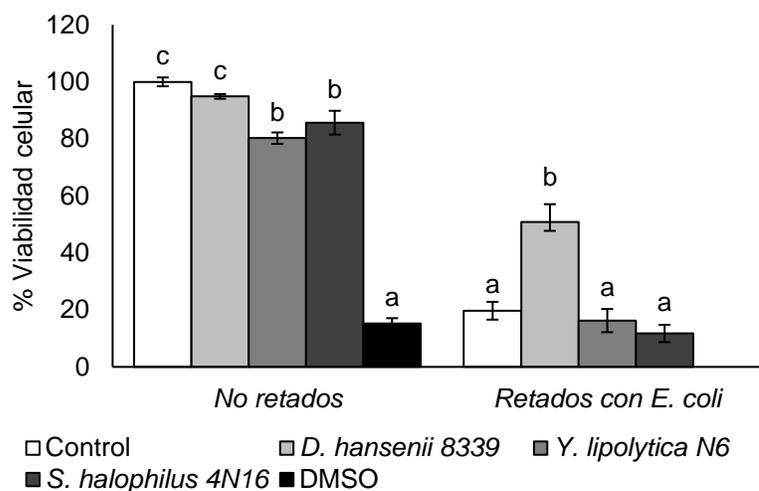
Los pesos moleculares de los glucanos obtenidos se muestran en la Tabla V. El glucano de *S. halophilus* fue el de mayor peso molecular con 24823.459 kDa, seguido del glucano de *Y. lipolytica* con 3301.53 kDa; mientras que el de menor peso molecular fue el glucano de *D. hansenii* con 404.94 kDa.

**Tabla V.** Peso molecular de los glucanos aislados de levaduras de ambientes marinos.

Levaduras	Peso molecular (kDa)
<i>S. halophilus</i> 4N16	24823.459
<i>Y. lipolytica</i> N6	3301.53
<i>D. hansenii</i> 8339	404.94

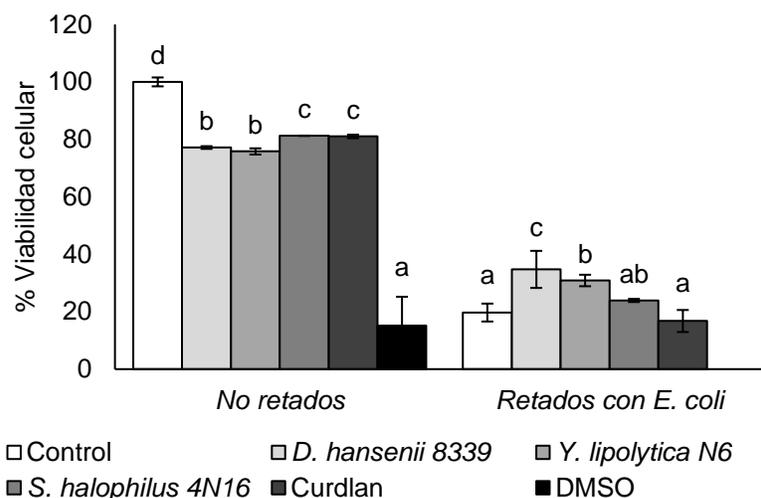
### 7.3 Viabilidad celular

Se observaron viabilidades celulares arriba del 80% en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con las 3 cepas de levaduras de ambientes marinos. En contraste, la viabilidad de los leucocitos tratados con DMSO se redujo significativamente hasta el 29% ( $p < 0.05$ ). Por otro lado, se observó un aumento significativo en la viabilidad de leucocitos estimulados con la cepa *Dh* (50%) después del reto patogénico con *E. coli* respecto al control (19.6%) y las cepas *Yl*, *Sh* (16.2 y 11.7%, respectivamente) (Fig. 9).



**Figura 9.** Efecto de los lisados de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16 sobre la viabilidad de los leucocitos de sangre periférica de caprinos a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. DMSO se utilizó como control negativo de la viabilidad celular. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

Se observaron valores arriba del 77% de viabilidad en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los  $\beta$ -glucanos aislados de las 3 cepas de levaduras de ambientes marinos. En cambio, la viabilidad de los leucocitos tratados con DMSO se redujo significativamente ( $p < 0.05$ ) hasta el 15%. De la misma manera que en la estimulación con las levaduras, se observó un aumento del 34.7% y 30.8% ( $p < 0.05$ ) en la viabilidad de leucocitos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de las cepas *Dh* y *Yl*, respectivamente, después del reto con el patógeno comparado con el control (19.7%) y los  $\beta$ -glucanos de *Sh* (23.9%) y Curdlan (16.8%) (Fig. 10).

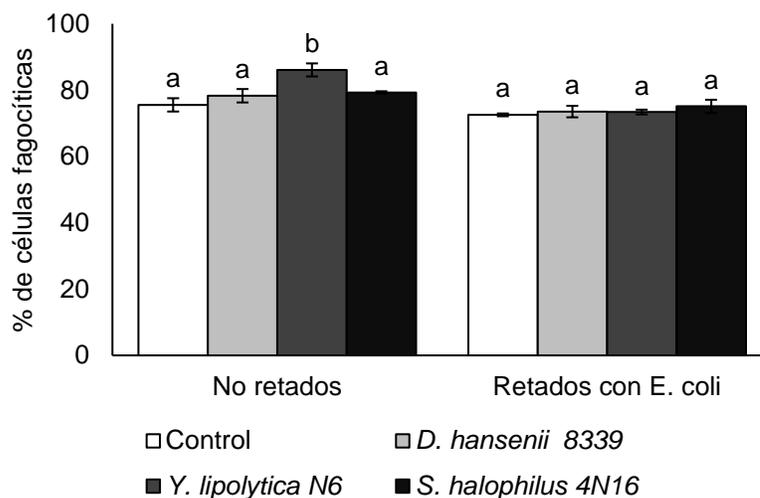


**Figura 10.** Efecto de los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16 sobre la viabilidad de los leucocitos de sangre periférica de caprinos a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. DMSO se utilizó como control negativo de la viabilidad celular. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

## 7.4 Propiedades inmunoestimulantes de levaduras aisladas de ambientes marinos y $\beta$ -glucanos (*in vitro*)

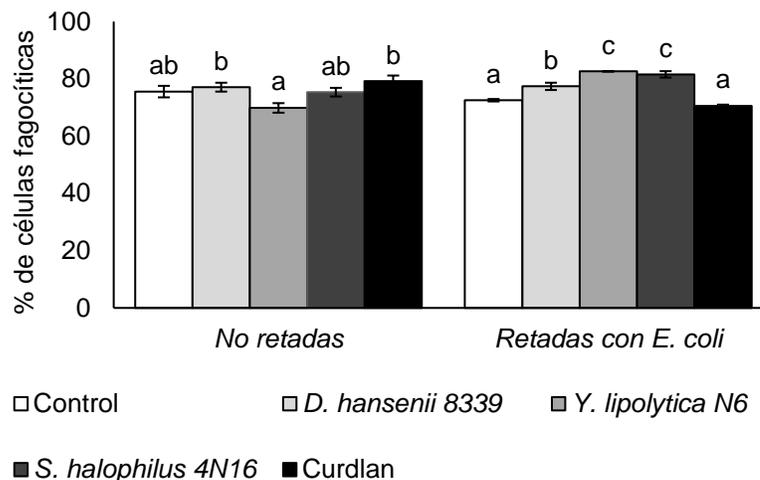
### 7.4.1 Fagocitosis

La habilidad fagocítica (porcentaje de células que fagocitan) aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos que fueron tratados con la levadura *Yl* (86%) respecto al control (75.5%), a *Dh* (78.3%) y a *Sh* (79.3%). Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) al incorporar la bacteria patógena a los leucocitos estimulados previamente con las tres cepas de levaduras (Fig. 11).



**Figura 11.** Habilidad fagocítica de leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmuoestimulación e inmuoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

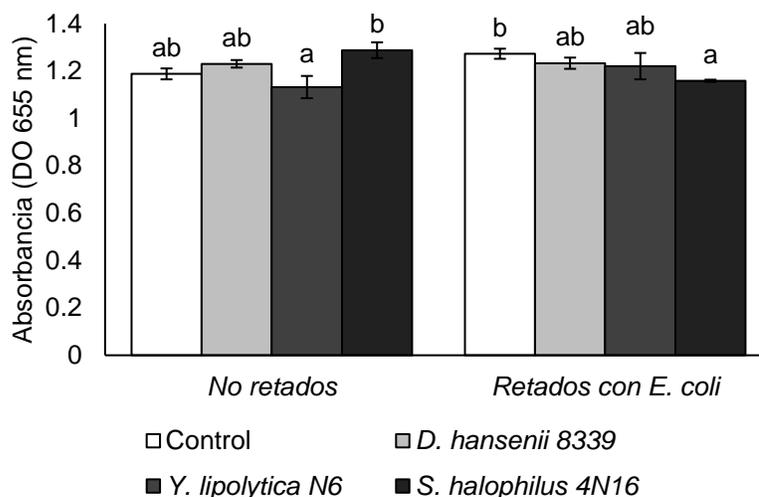
No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la habilidad fagocítica de los leucocitos que fueron estimulados con los  $\beta$ -glucanos de las tres cepas de levaduras. En contraste, cuando los leucocitos fueron retados con *E. coli*, se observaron aumentos significativos ( $p < 0.05$ ) de la habilidad fagocítica en los leucocitos que fueron estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *Yl* y *Sh* (82.6 y 81.6%, respectivamente), seguido por el grupo con el  $\beta$ -glucano de *Dh* (77.4%) respecto al control (72.5%) y al grupo con Curdlan (70.6%) (Fig. 12).



**Figura 12.** Habilidad fagocítica de leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control y la estimulación con Curdlan representa un control positivo. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

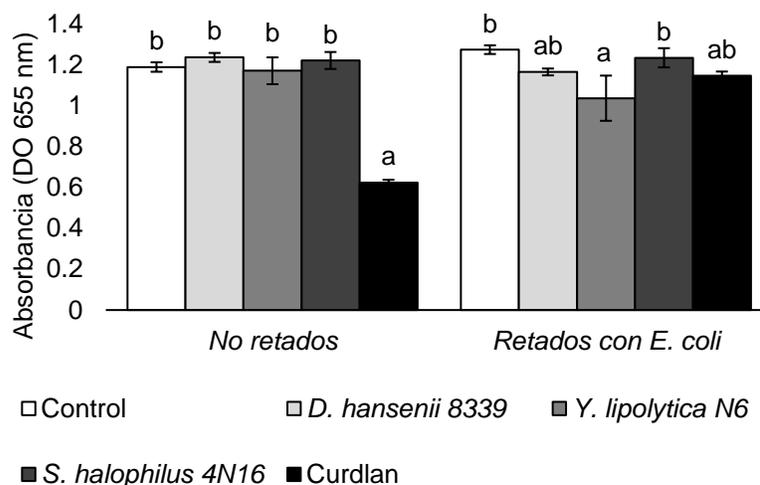
#### 7.4.2 Explosión respiratoria

En el análisis de la explosión respiratoria en leucocitos de sangre periférica de caprinos no se encontraron cambios significativos ( $p > 0.05$ ) cuando fueron estimulados con las cepas de las levaduras de ambientes marinos respecto al control; sin embargo, se encontró un aumento ( $p < 0.05$ ) de la explosión respiratoria en leucocitos inmunoestimulados con lisados de *Sh* respecto a los estimulados con *Yl*. Además, después del reto bacteriano se encontró una disminución ( $p < 0.05$ ) de la explosión respiratoria en leucocitos tratados con *Sh* respecto al control. Tanto los lisados de *Yl* como de *Dh* no mostraron cambios en este análisis (Fig. 13).



**Figura 13.** Explosión respiratoria de leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

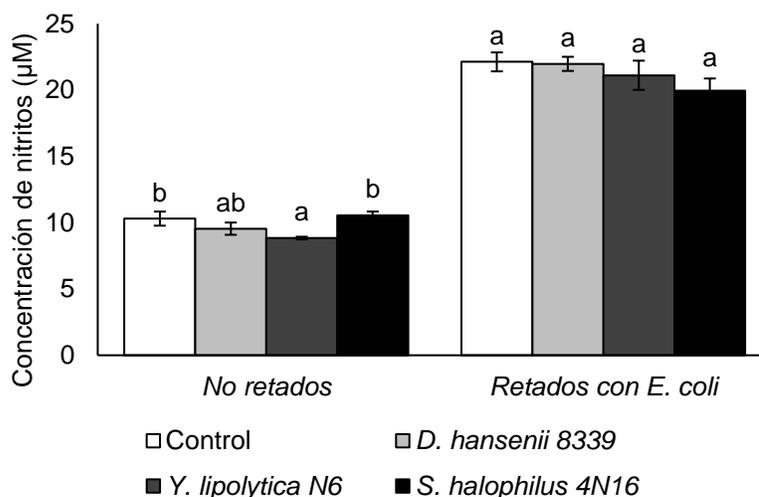
La explosión respiratoria disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en leucocitos con el grupo con Curdlan comparado con el grupo control y los  $\beta$ -glucanos de *Dh*, *Yl* y *Sh*. Posterior al reto patogénico se observó una disminución ( $p < 0.05$ ) de la explosión respiratoria en leucocitos incubados con el  $\beta$ -glucano de *Yl* respecto al control (leucocitos retados). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los demás grupos (Fig. 14).



**Figura 14.** Explosión respiratoria de leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control y la estimulación con Curdlan representa un control positivo. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

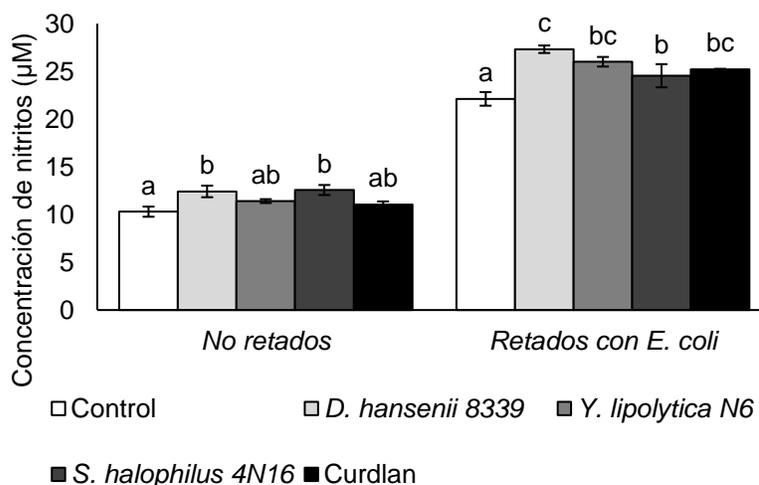
#### 7.4.3 Producción de óxido nítrico

La estimulación de leucocitos de sangre periférica de caprinos con las levaduras *Dh* y *Sh* no provocó cambios en la producción de óxido nítrico ( $p > 0.05$ ). Sin embargo, se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la concentración de nitritos en leucocitos que fueron tratados con la cepa *Yl* respecto al control y al grupo con la cepa *Sh*. Por otro lado, no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la producción de óxido nítrico en leucocitos estimulados con las tres cepas después del reto bacteriano (Fig. 15).



**Figura 15.** Concentración de nitritos como metabolito estable de la producción de óxido nítrico en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

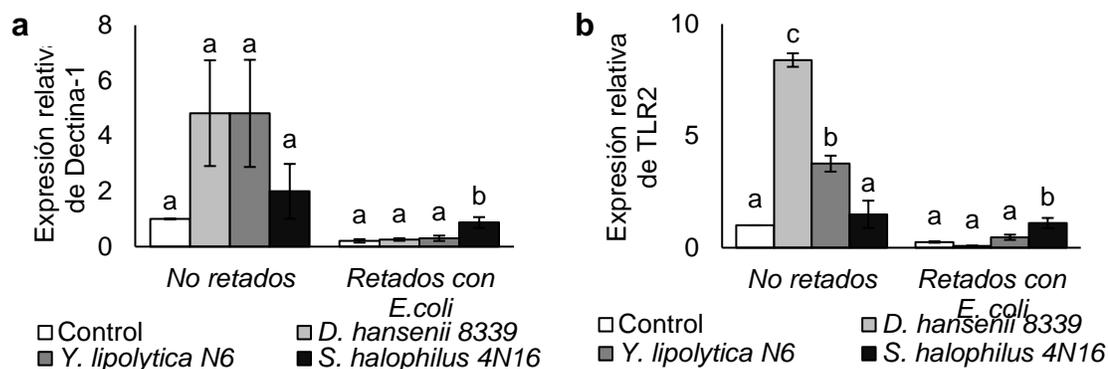
La producción de óxido nítrico aumentó ( $p < 0.05$ ) en leucocitos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *Dh* y *Sh* (12.42 y 12.57  $\mu\text{M}$ , respectivamente) comparado con el control (10.3  $\mu\text{M}$ ). Después del reto con *E. coli* los niveles de nitritos aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos estimulados con el  $\beta$ -glucano de *Dh* (27.32  $\mu\text{M}$ ), seguido por el  $\beta$ -glucano de *Yl* (26  $\mu\text{M}$ ), Curdlan (25.2  $\mu\text{M}$ ) y por último en leucocitos tratados con el  $\beta$ -glucano de *Sh* 4N16 (24.54  $\mu\text{M}$ ) respecto al grupo control (22.1  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 16).



**Figura 16.** Concentración de nitritos como metabolito estable de la producción de óxido nítrico en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control y la estimulación con Curdlan representa un control positivo. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

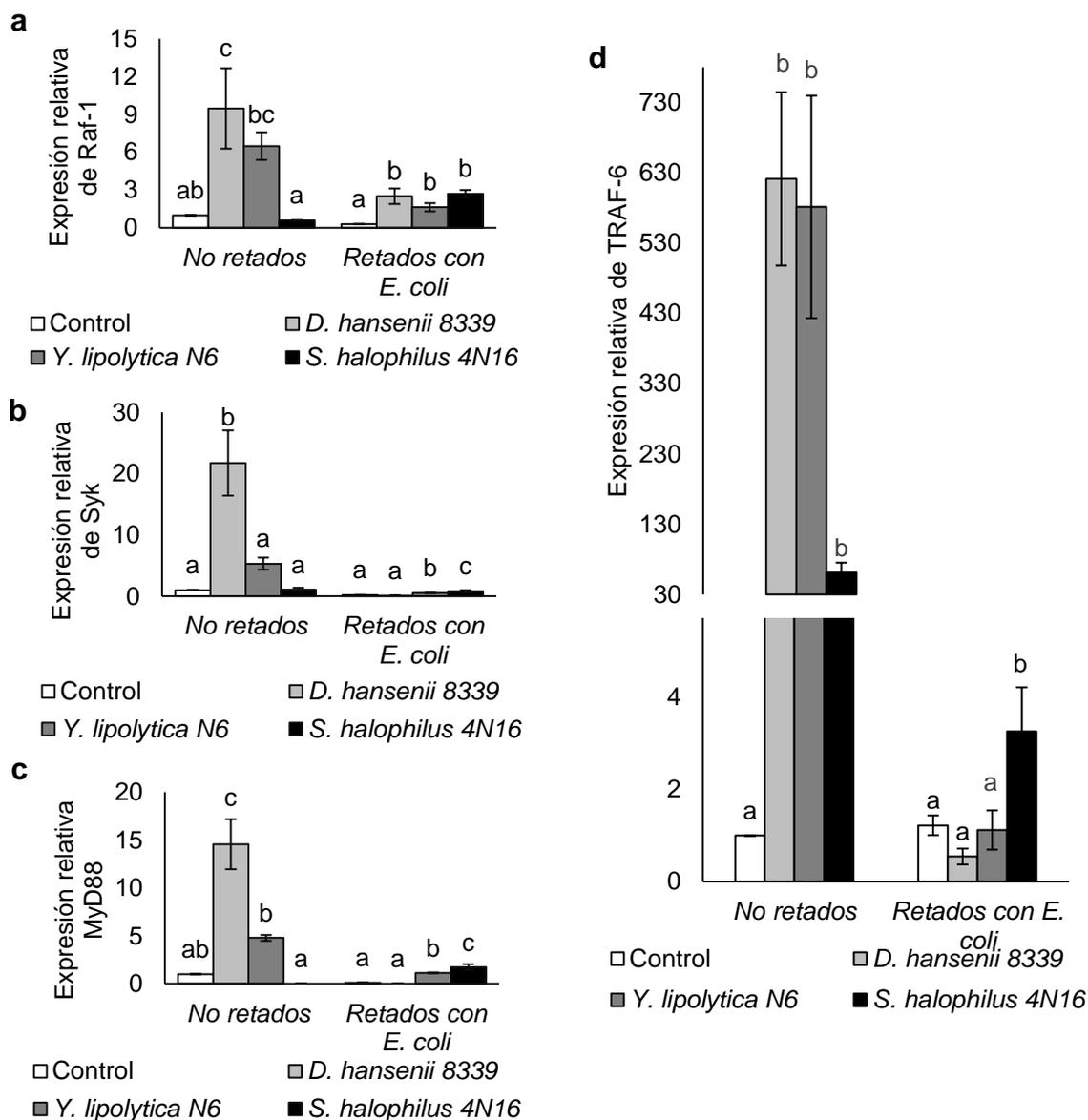
#### 7.4.4 Expresión génica

No se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en los niveles de transcripción de Dectina-1 en leucocitos de sangre periférica de caprinos. No obstante, los niveles de ARNm de TLR2 aumentaron ( $p < 0.05$ ) en leucocitos inmunoestimulados con las levaduras *Dh* y *Yl* antes del reto (Fig. 17).



**Figura 17.** Expresión relativa de los receptores a) Dectina-1 y b) TLR2 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inestímulo e inestímulo + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

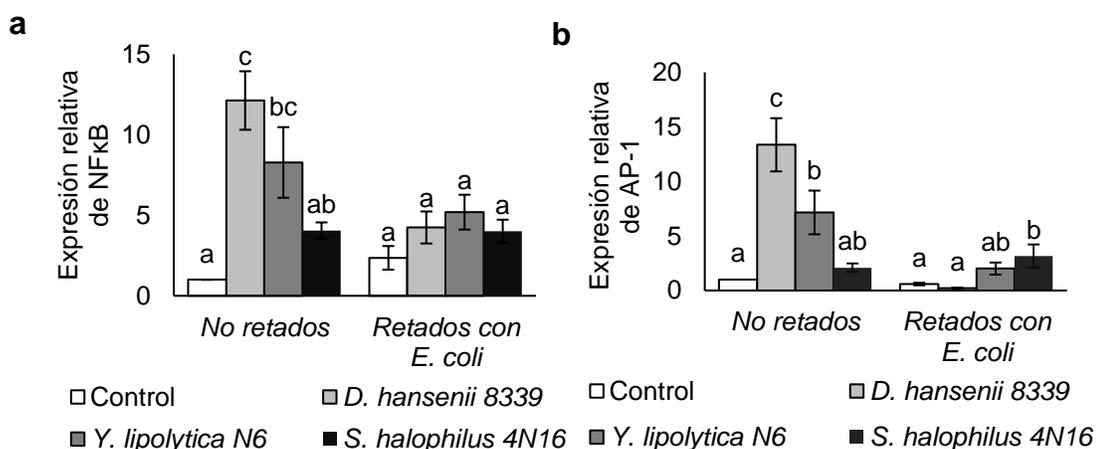
La expresión relativa del gen Raf-1 aumentó ( $p < 0.05$ ) después de la estimulación de leucocitos con lisados de las levaduras *Dh* y *Yl*. Si bien después del reto con *E. coli* se observó un aumento en la expresión del gen Raf-1 en leucocitos estimulados con las tres cepas de levaduras, estos niveles de expresión de ARNm fueron menores que en los leucocitos que no fueron retados. Además, se analizó los niveles de transcripción del modulador Syk, cuyos resultados muestran un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en su expresión solo en leucocitos tratados con *Dh* respecto al control y a las otras cepas de levaduras antes del reto; mientras que, después del reto, la expresión de este gen disminuyó ( $p < 0.05$ ) en leucocitos estimulados con las tres cepas. Por otra parte, se observó un aumento ( $p < 0.05$ ) en la expresión del gen MyD88 en leucocitos estimulados con *Dh* y *Yl* respecto al control. En contraste, después del reto se observó una disminución ( $p < 0.05$ ) en la expresión del gen MyD88 en leucocitos estimulados con estas dos cepas, y un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en leucocitos estimulados con *Sh*.



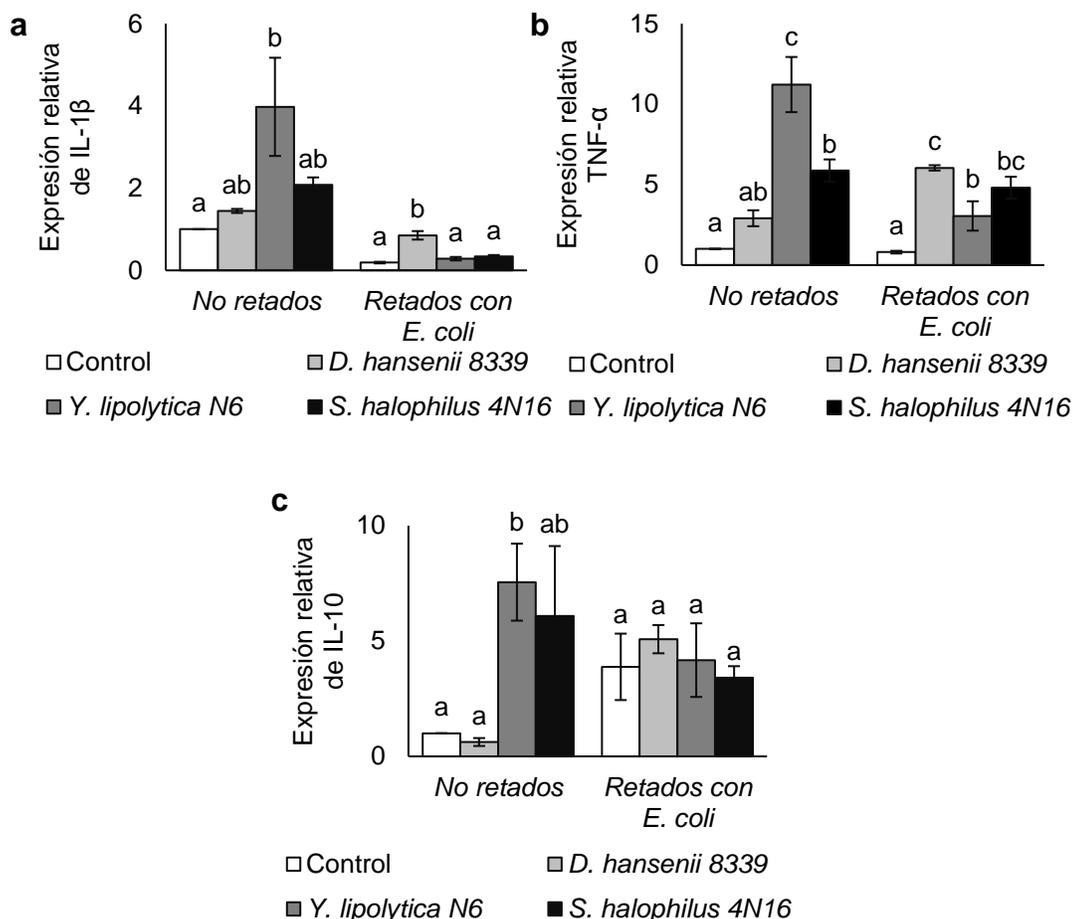
**Figura 18.** Expresión relativa de los moduladores intracelulares a) Raf-1, b) Syk, c) MyD88 y d) TRAF6 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

Adicionalmente, se analizaron los niveles de transcripción de un modulador más, TRAF6, el cual mostró aumentos significativos ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos incubados con las tres cepas de levaduras; y, al contrario, después del reto solo se observó un aumento en la expresión del gen ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos inmunoestimulados con *Sh* (Fig. 18).

Además, se analizó los niveles de ARNm de dos factores de transcripción: NFκB y AP-1. El nivel de expresión de ambos genes de factores de transcripción aumentó ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos estimulados con las cepas *Dh* y *Yl* respecto al control. En cambio, después del reto bacteriano no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en su expresión en comparación al control (Fig.19).



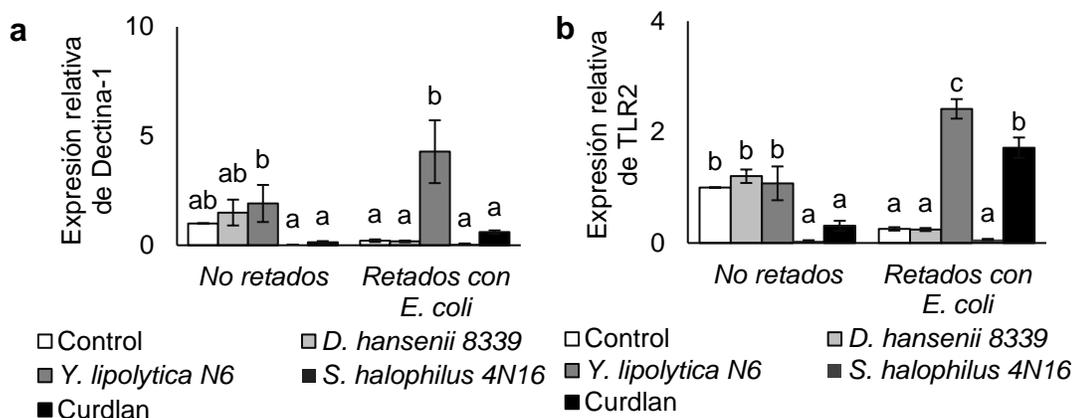
**Figura 19.** Expresión relativa de los factores de transcripción a) NFκB y b) AP-1 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.



**Figura 20.** Expresión relativa de las citocinas a) IL-1 $\beta$ , b) TNF- $\alpha$  y c) IL-10 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

Adicionalmente, se evaluaron los niveles de ARNm de las citocinas efectoras IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10. Los niveles de transcripción de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos inmunoestimulados con la cepa *Yl* respecto al control. Además, la expresión del gen TNF- $\alpha$  aumentó ( $p < 0.05$ ) en leucocitos incubados con *Sh*. Por otra parte, la expresión del gen TNF- $\alpha$  aumentó significativamente ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos

que fueron tratados con las tres cepas de levaduras después del reto infeccioso. Referente a los niveles de ARNm de la citoquina antiinflamatoria IL-10 se observó un aumento ( $p < 0.05$ ) solo en los leucocitos estimulados con *Yl* respecto al control (Fig. 20).



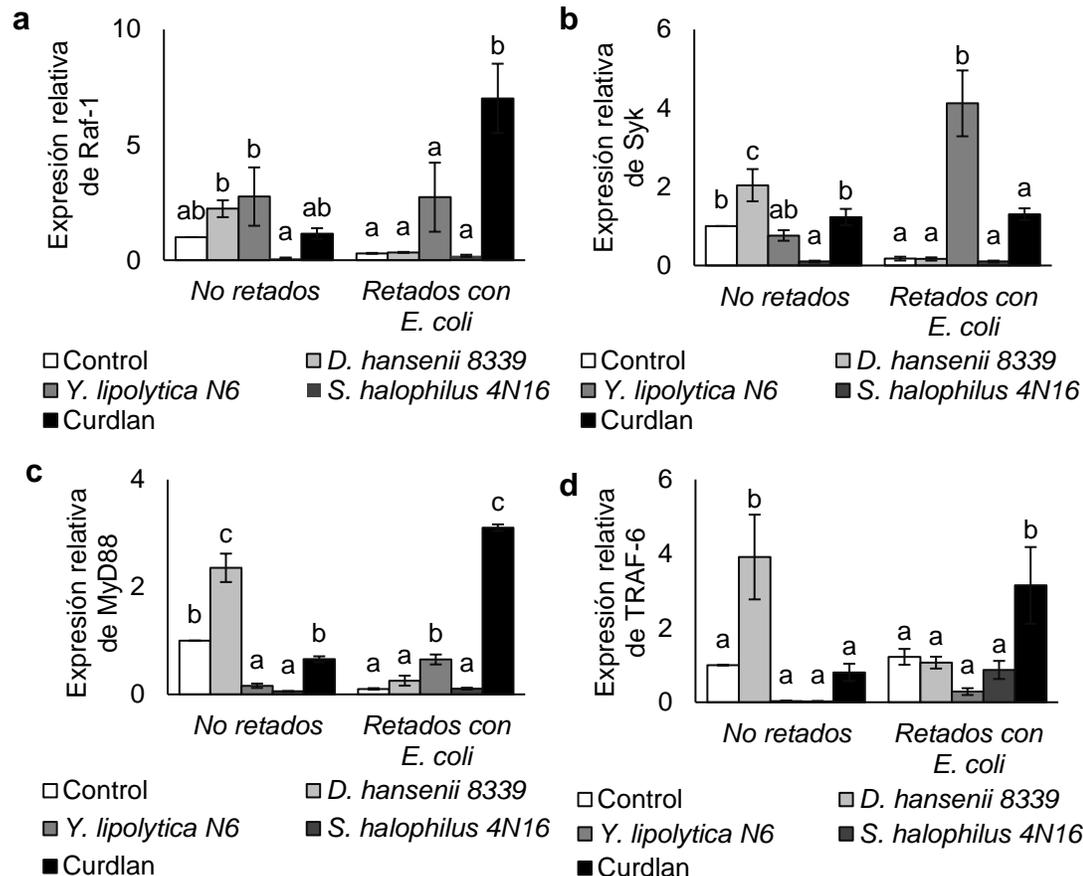
**Figura 21.** Expresión relativa de los receptores a) Dectina-1 y b) TLR2 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control y la estimulación con Curdlan representa un control positivo. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

Además, se analizó los niveles de transcripción de los receptores Dectina-1 y TLR2 en leucocitos estimulados con los  $\beta$ -glucanos aislados de las tres cepas. La expresión del gen Dectina-1 incrementó en leucocitos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *Dh* y *Yl*, sin embargo, este aumento no fue estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ) en comparación con el grupo de control. Además, la expresión del gen Dectina-1 disminuyó ( $p < 0.05$ ) en leucocitos expuestos a los  $\beta$ -glucanos de *Sh* y Curdlan. Después del reto bacteriano, los niveles de transcripción de Dectina-1 únicamente aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos

tratados con el  $\beta$ -glucano de *Yl*; mientras que fue similar entre los demás grupos (Fig. 21).

Los niveles de ARNm de TLR2 disminuyeron en los leucocitos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *Sh* y Curdlan. En cambio, los niveles de expresión de este gen en los otros grupos fueron similares al control. Por el contrario, la expresión del gen TLR2 aumentó ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *Yl* y Curdlan después de la exposición a *E. coli* en comparación con los grupos control (Fig. 21).

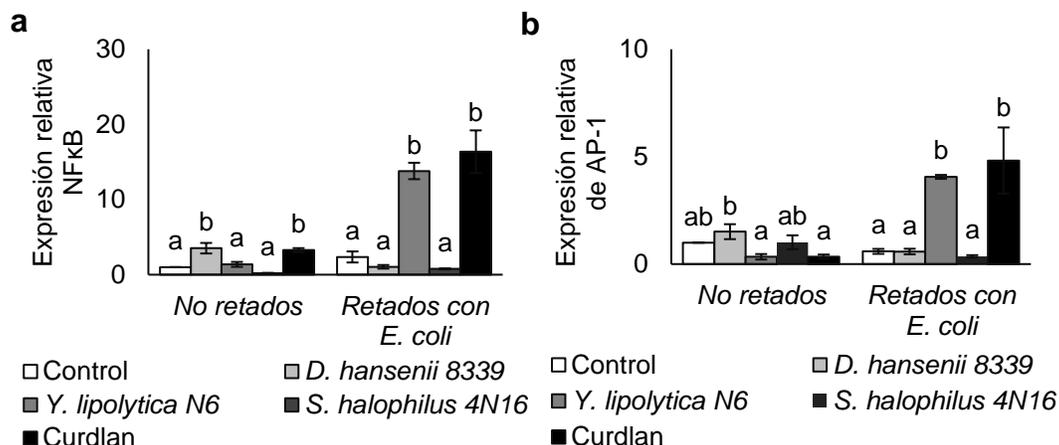
Se analizaron los niveles de transcripción de los moduladores Raf-1, Syk, MyD88 y TRAF6. La expresión del gen Raf-1 aumentó en leucocitos de los grupos con  $\beta$ -glucanos de *Dh* y *Yl* antes del reto bacteriano, pero no fue estadísticamente diferente ( $p > 0.05$ ) en comparación con el grupo control. Después del reto bacteriano, se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la expresión de este gen solo en los leucocitos del grupo Curdlan. Los niveles de ARNm de Syk únicamente aumentaron ( $p < 0.05$ ) antes del reto bacteriano en leucocitos estimulados con el  $\beta$ -glucano de *Dh* en comparación con el grupo control. Posterior al reto con *E. coli* se encontró un aumento significativo en la expresión relativa del gen Syk en leucocitos incubados con el  $\beta$ -glucano *Yl* con respecto a los otros grupos. Sorprendentemente, se observaron patrones de expresión génica similares en los genes MyD88 y TRAF6. Los leucocitos inmunoestimulados con el  $\beta$ -glucano de *Dh* aumentaron ( $p < 0.05$ ) los niveles de transcritos de MyD88 y TRAF6 en comparación con los grupos control y los otros  $\beta$ -glucanos antes del reto bacteriano. Después del reto con *E. coli*, la expresión del gen MyD88 incrementó ( $p < 0.05$ ) en leucocitos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *Yl* y Curdlan en comparación con los otros grupos. También, después del reto bacteriano, el nivel transcripcional de TRAF6 aumentó ( $p < 0.05$ ) solamente en leucocitos estimulados con Curdlan en comparación con los demás grupos (Fig. 22).



**Figura 22.** Expresión relativa de los moduladores intracelulares a) Raf-1, b) Syk, c) MyD88 y d) TRAF6 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inmunoestimulación e inmunoestimulación + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control y la estimulación con Curdlan representa un control positivo. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

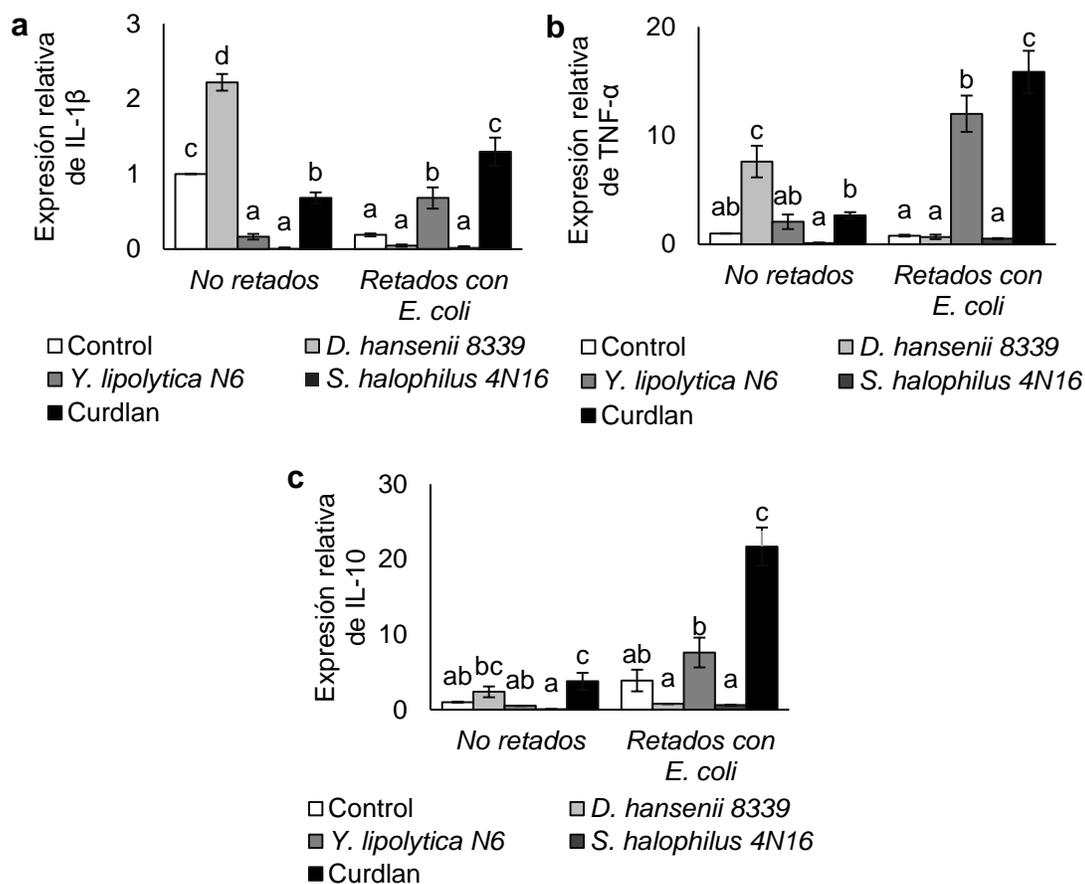
Además, se analizaron los niveles de ARNm de dos factores de transcripción. Primero, la expresión del gen NF $\kappa$ B aumentó ( $p < 0.05$ ) en los grupos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *Dh* y Curdlan en comparación con los demás grupos. Después de la estimulación con *E. coli*, los niveles de transcripción de NF $\kappa$ B y AP-

1 aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *Yl* y Curdlan (Fig. 23).



**Figura 23.** Expresión relativa de los factores de transcripción a) NF $\kappa$ B y b) AP-1 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inestímulo e inestímulo + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control y la estimulación con Curdlan representa un control positivo. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

Se determinó los niveles de ARNm de citocinas efectoras en los leucocitos estimulados con los diferentes  $\beta$ -glucanos. Los niveles de transcripción de las citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  aumentaron ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos estimulados con el  $\beta$ -glucano de *Dh* en comparación con los otros grupos. En contraste, después del reto con *E. coli*, los niveles de ARNm de estas citocinas aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en leucocitos estimulados con Curdlan; y la expresión del gen TNF- $\alpha$  también aumentó por la estimulación con el  $\beta$ -glucano de *Yl*. Por otra parte, la transcripción del gen de la citoquina antiinflamatoria IL-10 solo incrementó ( $p < 0.05$ ) en el grupo estimulado con Curdlan antes y después del reto bacteriano (Fig. 24).



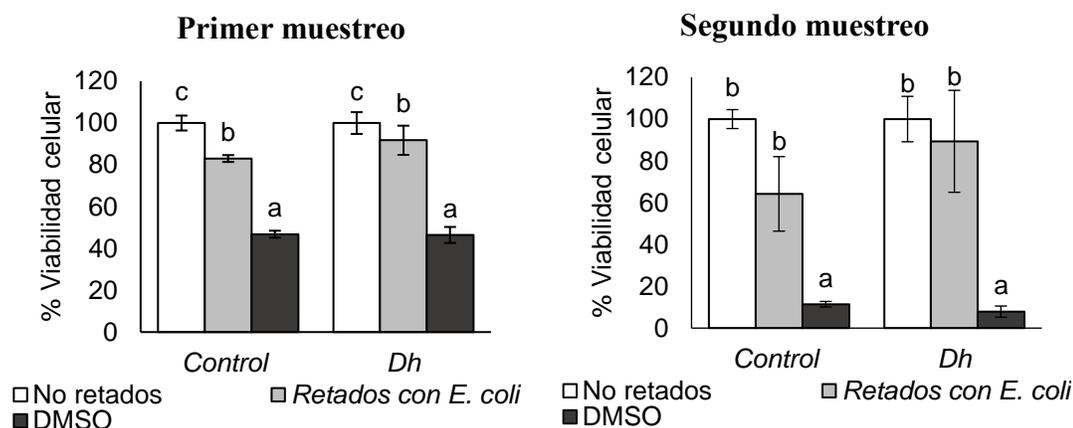
**Figura 24.** Expresión relativa de las citocinas a) IL-1 $\beta$ , b) TNF- $\alpha$  y c) IL-10 en leucocitos de sangre periférica de caprinos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16. Las muestras se tomaron a las 24 h de inestímulo e inestímulo + infección con *E. coli*. Leucocitos sin estímulo representan el grupo control y la estimulación con Curdlan representa un control positivo. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

## 7.5 Potencial probiótico de *D. hansenii* CBS8339 en cabritos recién nacidos (*in vivo*).

### 7.5.1 Viabilidad celular

Se evaluó la viabilidad de los leucocitos que fueron aislados de los cabritos recién nacidos alimentados con una dieta control y con una dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339. Posteriormente, los leucocitos fueron retados con *E. coli* 23

(serotipo O157:H7). A pesar de no observar diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre los leucocitos del grupo control con los del grupo con *D. hansenii* (*Dh*), se encontró una mayor viabilidad celular en los leucocitos de los cabritos alimentados con la dieta suplementada con la levadura y que fueron retados con la bacteria en los dos muestreos (Fig. 25).

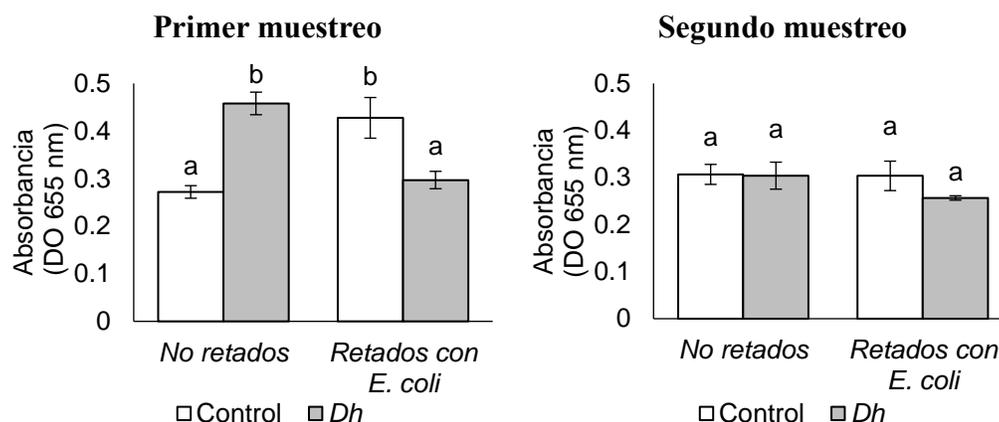


**Figura 25.** Viabilidad de leucocitos de sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retados *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Se utilizó DMSO como control negativo de la viabilidad celular. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (*EMM*) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

### 7.5.2 Explosión respiratoria

La producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) aumentó ( $p < 0.05$ ) durante los primeros 15 días (primer muestreo) en los leucocitos de cabritos recién nacidos que fueron suplementados con *Dh* en comparación con los leucocitos de cabritos del grupo control a los cuales no se les administró la levadura en la dieta. Sin embargo, después del reto *in vitro* con *E. coli*, se observó un efecto contrario, donde la explosión respiratoria disminuyó ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos de cabritos del grupo estimulados con la levadura respecto a los leucocitos de cabritos del grupo control.

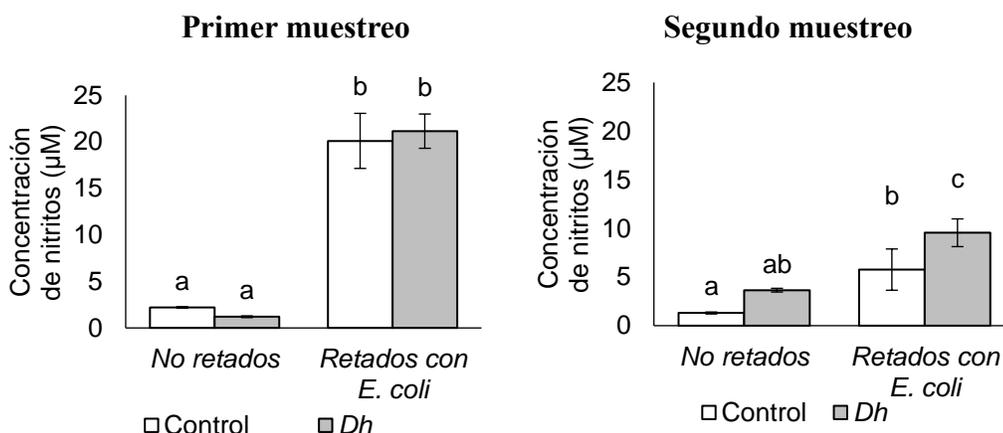
Por otra parte, a los 30 días (segundo muestreo) no se observaron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la actividad de explosión respiratoria (Fig. 26).



**Figura 26.** Explosión respiratoria en leucocitos sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retos *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

### 7.5.3 Producción de óxido nítrico

La producción de óxido nítrico no se vio afectada durante el primer muestreo con ninguno de los dos grupos, pero si aumentó cuando los leucocitos fueron retos con el patógeno, aunque no se encontraron diferencias estadísticas ( $p > 0.05$ ). Por otra parte, a los 30 días se observó una mayor producción de óxido nítrico ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos de cabritos que fueron alimentados con la dieta suplementada con *Dh* (9.5  $\mu$ M) comparado con los leucocitos del grupo control (5.7  $\mu$ M) (Fig. 27).

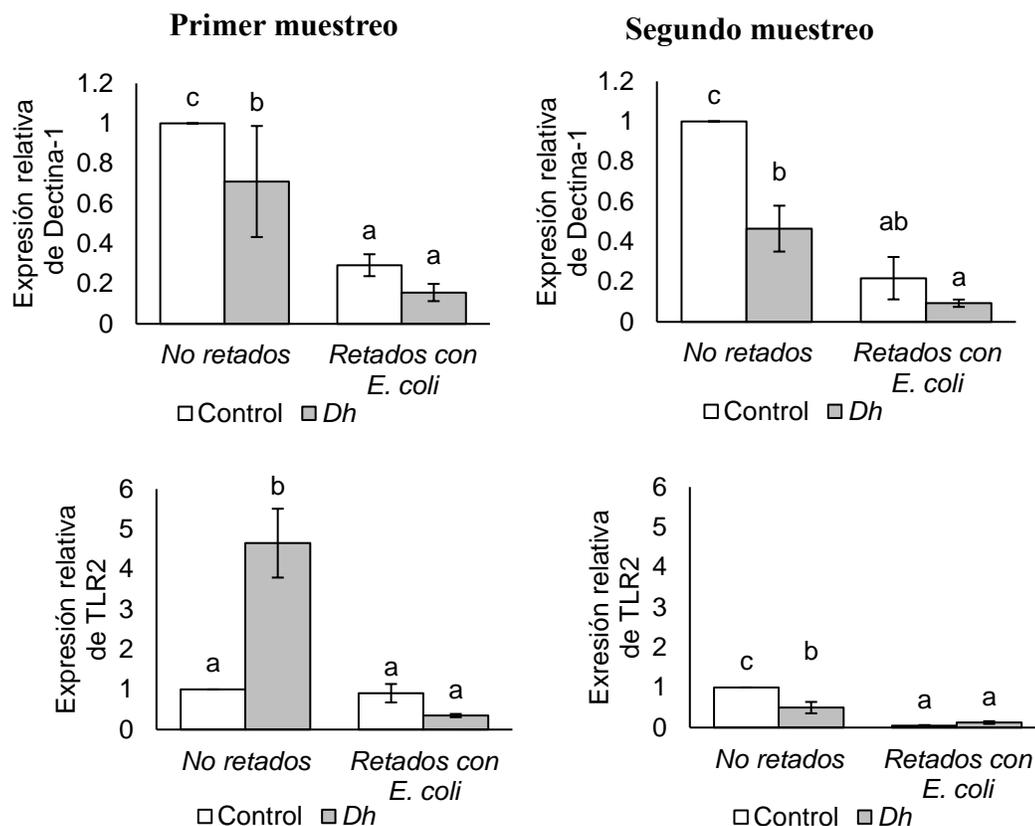


**Figura 27.** Concentración de nitritos como metabolito estable de la producción de óxido nítrico en leucocitos sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retos *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

#### 7.5.4 Expresión génica

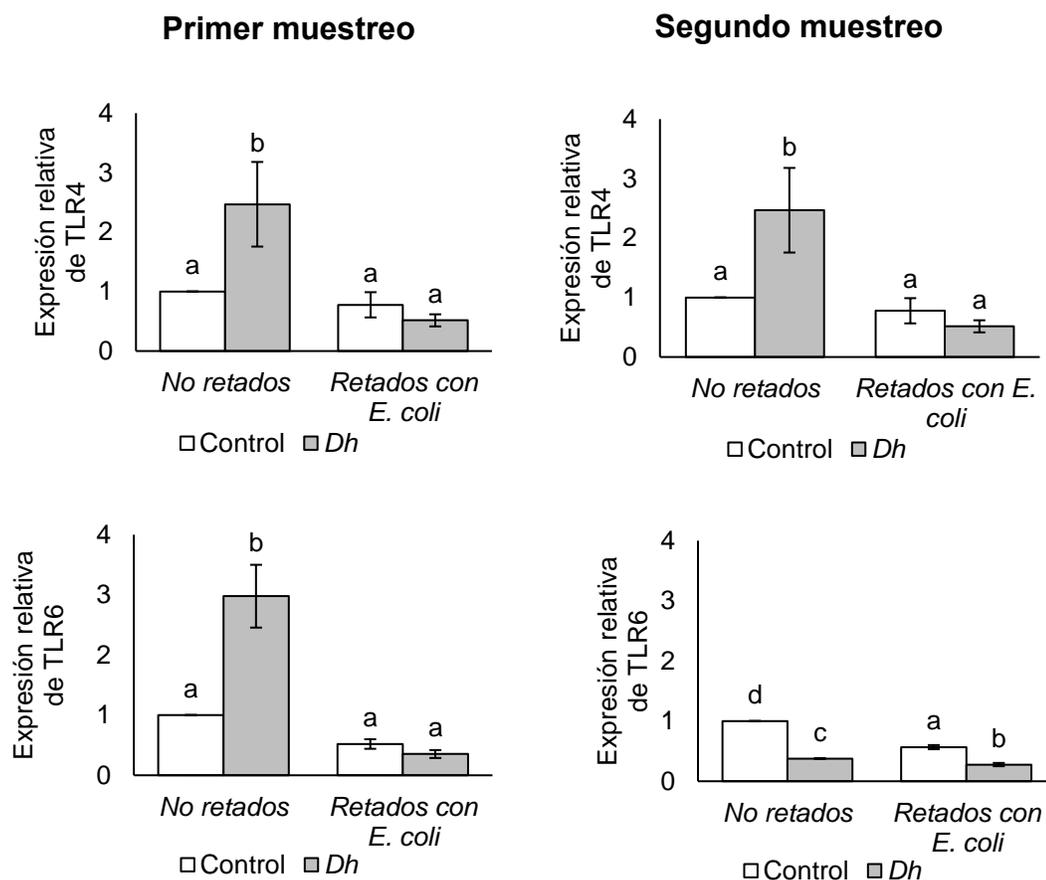
Se analizó la expresión de los genes de 4 receptores: Dectina-1, TLR2, TLR4 y TLR6. Durante los dos muestreos se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la expresión del gen Dectina-1 en los cabritos del grupo que fueron alimentados con la dieta suplementada con *Dh* con respecto al grupo control. De manera similar, después del reto se encontró una disminución ( $p < 0.05$ ) en la expresión del gen de este receptor (Fig. 28).

Interesantemente, los niveles de transcripción de TLR2 aumentaron ( $p < 0.05$ ) durante el primer muestreo en los leucocitos de los cabritos del grupo de *Dh* respecto al grupo control. Por el contrario, en el segundo muestreo se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la expresión del gen de TLR2 en los cabritos suplementados con *D. hansenii*. Sin embargo, después del reto bacteriano no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los dos tiempos (Fig. 28).

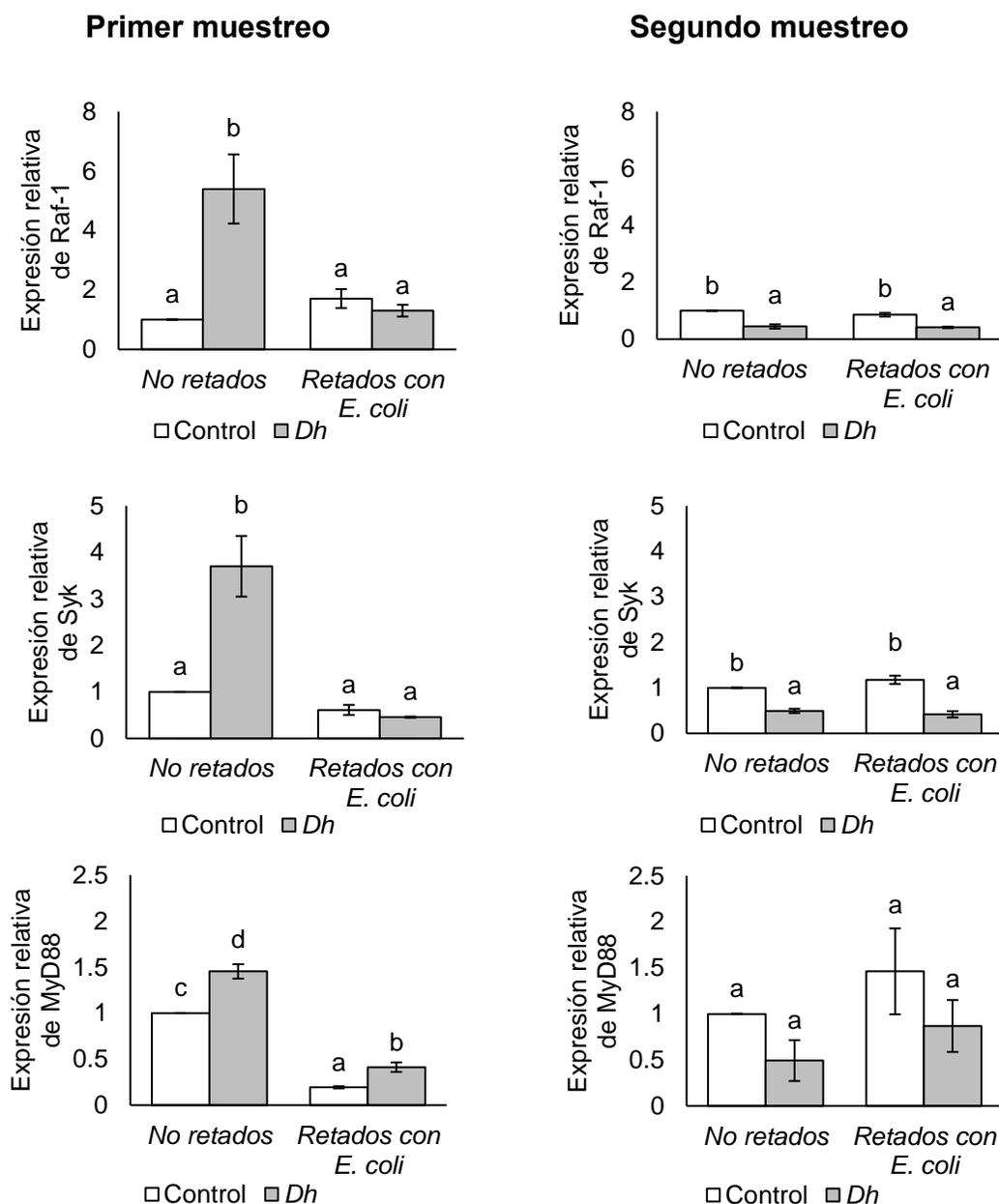


**Figura 28.** Expresión génica de Dectina-1 y TLR2 en leucocitos sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retos *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

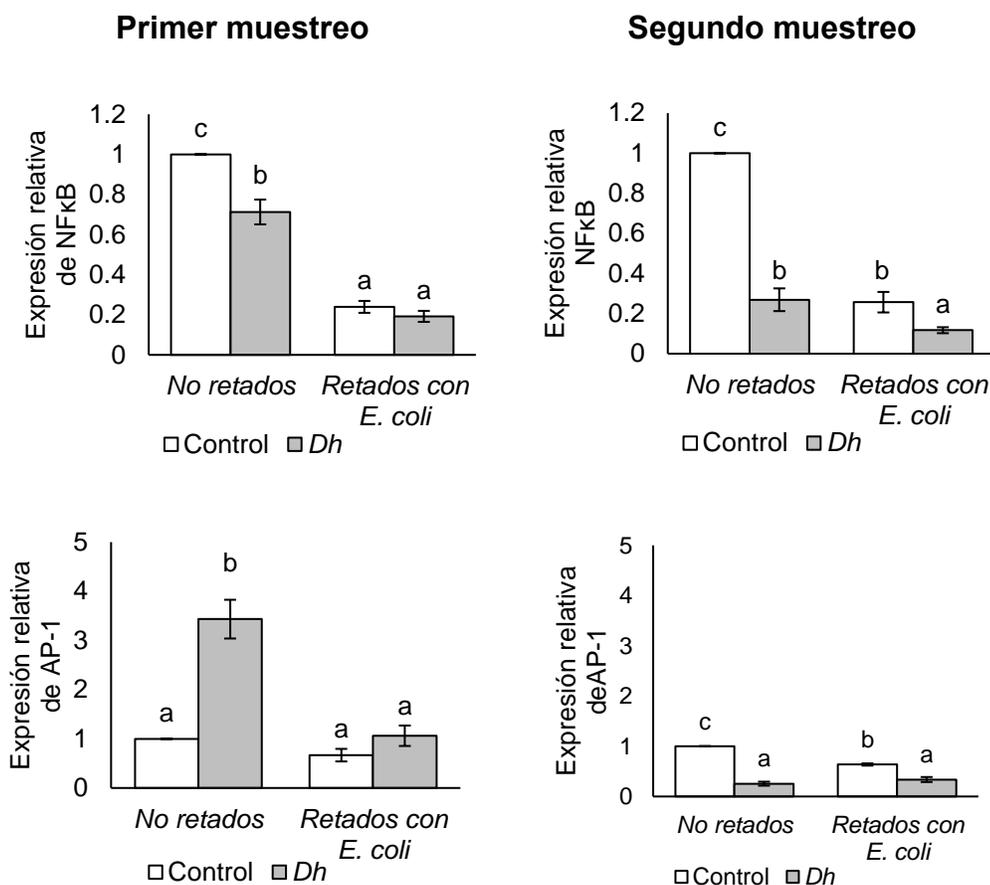
De forma similar a los niveles de transcripción del receptor TLR2, la expresión de los genes TLR4 y TLR6 aumentó ( $p < 0.05$ ) durante el primer muestreo en los leucocitos de cabritos a los que se les administró la levadura *Dh* en comparación del grupo control. Curiosamente, en el segundo muestreo se observó una disminución ( $p < 0.05$ ) en los niveles de expresión del gen TLR4 en los leucocitos del grupo *Dh* después del reto; mientras que una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la expresión del gen TLR6 fue observada antes y después del reto con *E. coli* (Fig. 29).



**Figura 29.** Expresión génica de TLR4 y TLR6 en leucocitos sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retos *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.



**Figura 30.** Expresión génica de Raf-1, Syk y MyD88 en leucocitos sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retos *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Las barras representan la media ± error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.



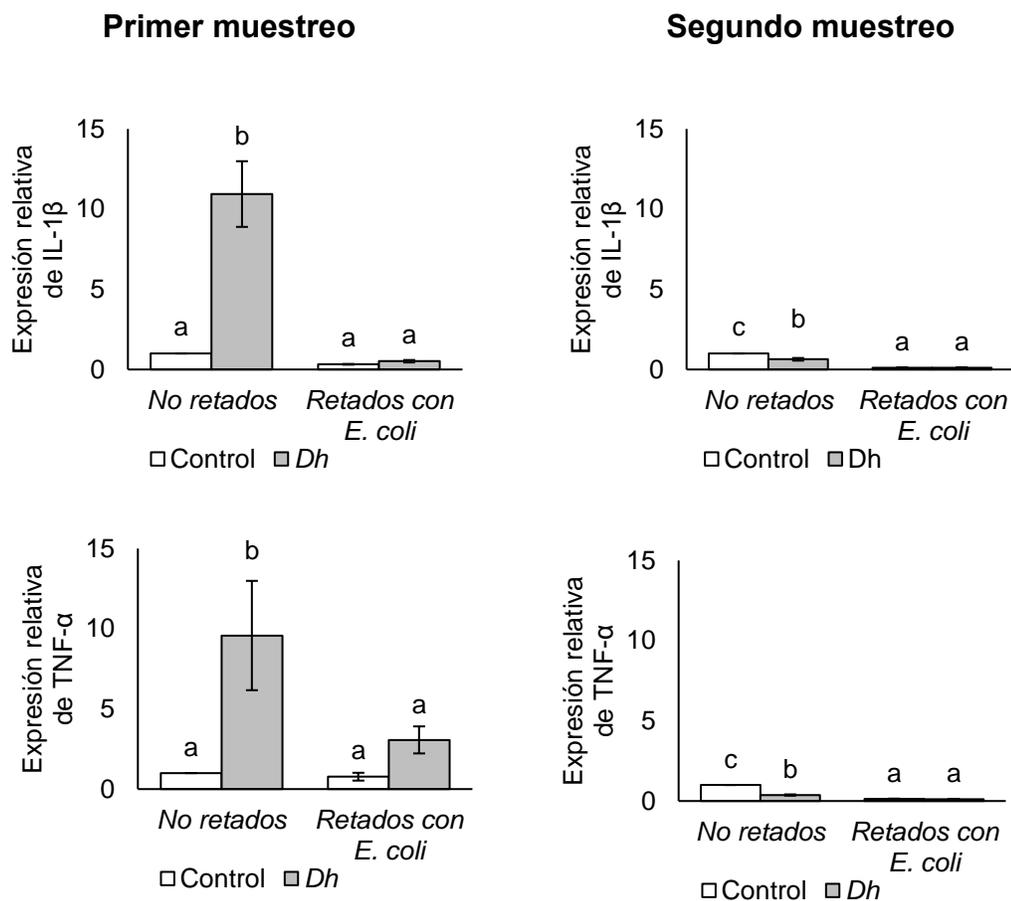
**Figura 31.** Expresión génica de NFκB y AP-1 en leucocitos sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retados *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

Curiosamente, se observaron patrones similares en los niveles de transcripción de los moduladores de la señalización Raf-1, Syk y MyD88. Durante el primer muestreo, se observaron aumentos significativos ( $p < 0.05$ ) en la expresión de los tres genes en los leucocitos de cabritos alimentados con la suplementación con *Dh* respecto al grupo control. Sin embargo, después del reto, la expresión de los genes de estos moduladores fue similar entre los dos grupos (a excepción de MyD88). En

contraste, en el segundo muestreo, los niveles de expresión de los genes Raf-1, Syk y MyD88 disminuyeron ( $p < 0.05$ ) en el grupo de leucocitos de cabritos estimulados con *Dh* antes y después del reto (Fig. 30).

La expresión del gen del factor de transcripción NFκB disminuyó ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos de los cabritos inmunoestimulados con la levadura en ambos muestreos antes y después del reto. En cambio, los niveles de transcripción de AP-1 aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos de cabritos que llevaron una alimentación suplementada con *Dh* durante 15 días. No obstante, estos niveles de transcripción disminuyeron ( $p < 0.05$ ) en los leucocitos de cabritos suplementados con la levadura durante el segundo muestreo antes y después del reto bacteriano (Fig. 31).

Finalmente, se analizó la expresión génica de dos citocinas proinflamatorias: IL1-β y TNF-α, las cuales siguieron un patrón similar de expresión. En los primeros 15 días (primer muestreo) se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la expresión de los genes de las dos citocinas efectoras en leucocitos de los cabritos inmunoestimulados con *Dh*. Curiosamente, en el segundo muestreo, los niveles de expresión de los genes IL1-β y TNF-α disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ) en leucocitos de los cabritos suplementados con la levadura. Sin embargo, después del reto no se encontraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) durante los dos muestreos (Fig. 32).



**Figura 32.** Expresión génica de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  en leucocitos sangre periférica de cabritos recién nacidos alimentados con dieta control y dieta suplementada con *D. hansenii* CBS8339 (*Dh*) y retados *in vitro* con *E. coli* en el primer muestreo (día 15) y segundo muestreo (día 30). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

## **7.6 Evaluación de inmunidad innata entrenada en monocitos caprinos por $\beta$ -glucano de *D. hansenii* CBS8339**

### **7.6.1 Evaluación de inmunidad innata entrenada *in vitro***

#### **7.6.1.1 Microscopía óptica de monocitos**

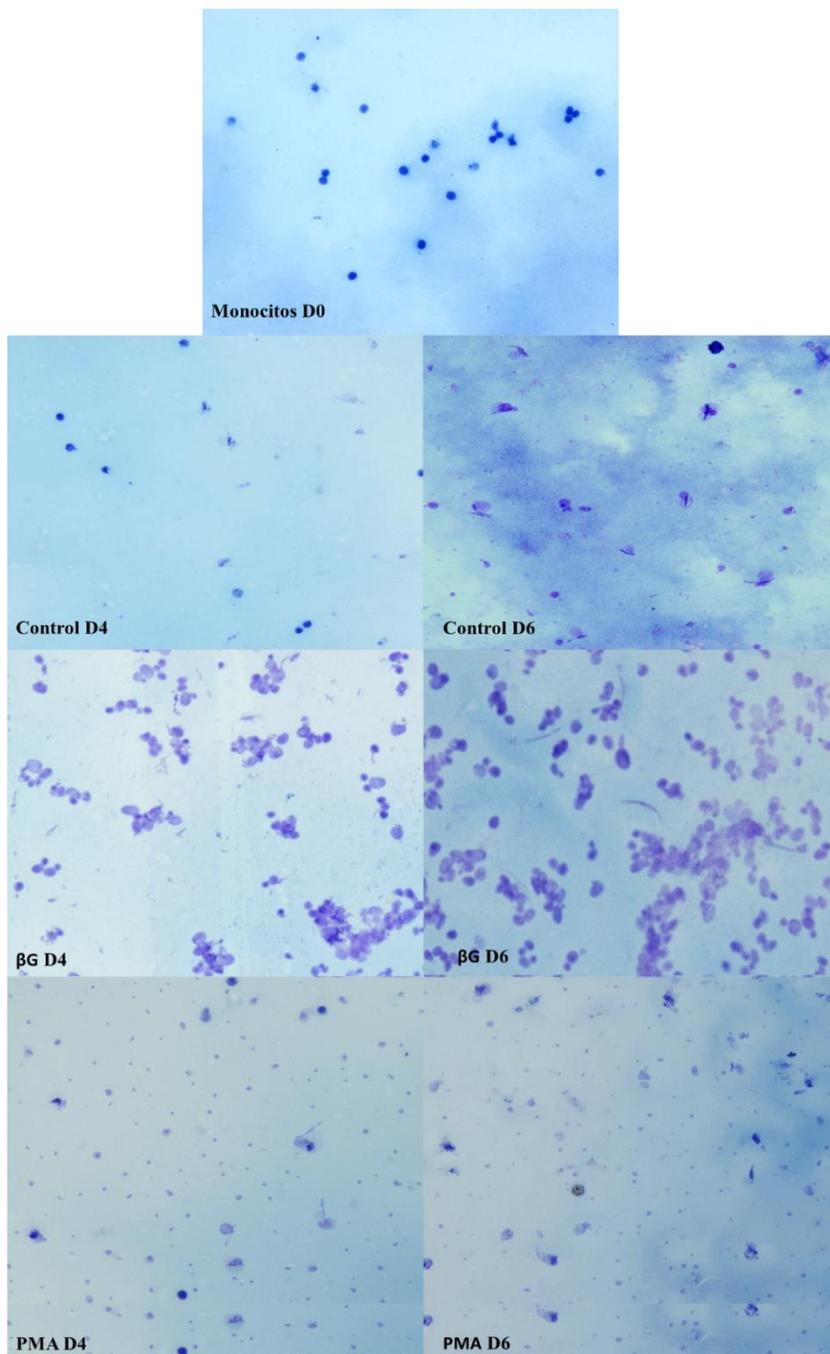
Para evaluar si el  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* ( $\beta$ -Dh) inducen inmunidad entrenada en monocitos caprinos, las células se estimularon durante 24 h. Después de este periodo, los monocitos estuvieron en un periodo de diferenciación celular de 5 días. Al día 0, se observaron monocitos con la morfología típica redonda y se diferenciaron a células de mayor tamaño, y algunas alargaron su morfología como se observa en la Fig. 33 en todos los grupos. A pesar que las diferencias en la morfología entre grupos no fueron tan notables, se observó que las células estimuladas con  $\beta$ -Dh tendieron a aglomerarse y se observó una mayor cantidad de células en comparación con los otros grupos.

#### **7.6.1.2 Viabilidad de células entrenadas**

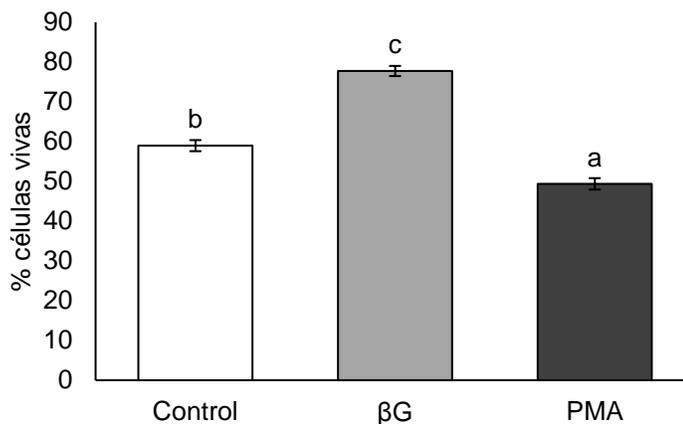
La estimulación de monocitos caprinos con  $\beta$ -Dh mostraron una mayor proporción ( $p < 0.05$ ) (77.7%) de células vivas en comparación con los grupos control (58.9%) y PMA, el cual obtuvo el menor porcentaje de células viables después de los 6 días (49.3%) (Fig. 34).

#### **7.6.1.3 Fagocitosis de células entrenadas**

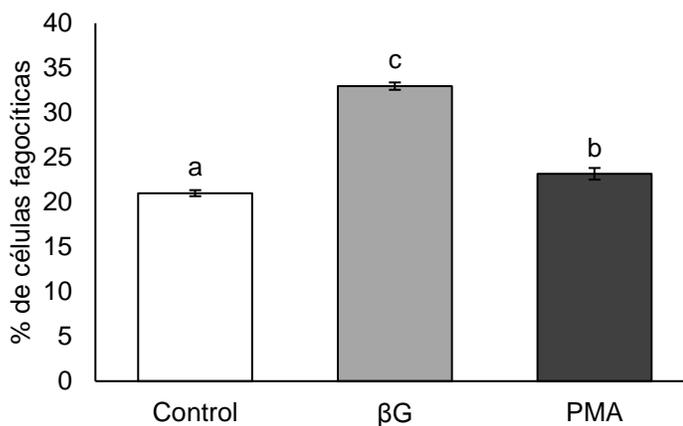
El entrenamiento de monocitos y macrófagos caprinos con  $\beta$ -Dh mostró un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la habilidad fagocítica (32.9%) respecto al grupo estimulado con PMA (23.1%) y el grupo control (21%) después de un reto con LPS (Fig. 35).



**Figura 33.** Diferenciación celular *in vitro* de monocitos caprinos. Se muestran imágenes de monocitos capturadas al día 0 (D0), monocitos con los tres grupos: control,  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* ( $\beta$ G) y PMA al día 4 (D4) y 6 (D6) por microscopía de campo claro en un objetivo de aumento 40x (aumento final 400x).



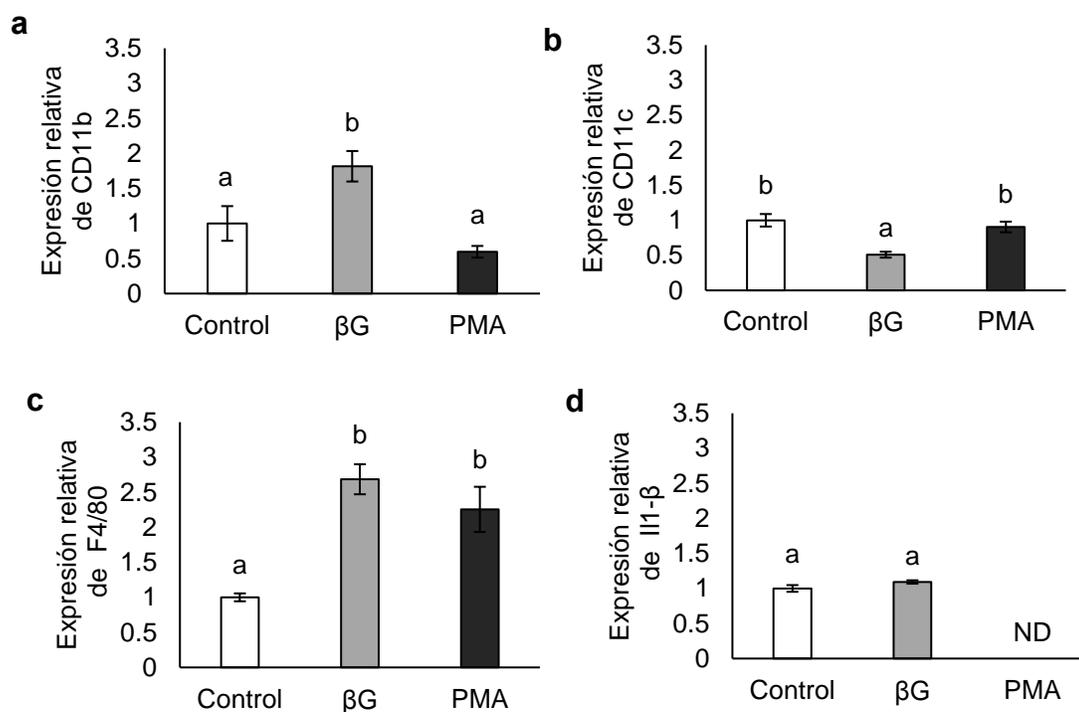
**Figura 34.** Viabilidad de monocitos caprinos al día 6 estimulados con  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* ( $\beta$ G) y PMA, retados con LPS (tinción con Ioduro de Propidio). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.



**Figura 35.** Habilidad fagocítica de monocitos y macrófagos caprinos al día 6 estimulados con  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* ( $\beta$ G) y PMA, retados con LPS. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

### 7.6.1.4 Expresión génica de marcadores de superficie de monocitos y macrófagos

En la Fig. 36 se muestran las gráficas del análisis expresión de dichos genes. Se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en los niveles de expresión del gen CD11b en las células entrenadas con  $\beta$ -Dh después de la diferenciación celular y el reto con LPS respecto al grupo control. Mientras que la expresión relativa del gen F4/80 aumentó ( $p < 0.05$ ) en las células estimuladas con  $\beta$ -Dh y PMA comparadas con el grupo control. Los niveles de transcripción del gen CD11b disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ) en las células entrenadas con el  $\beta$ -glucano respecto al grupo control y PMA. Por último, no se encontraron cambios significativos ( $p > 0.05$ ) en los niveles de expresión del gen de la citoquina proinflamatoria IL-1 $\beta$ .

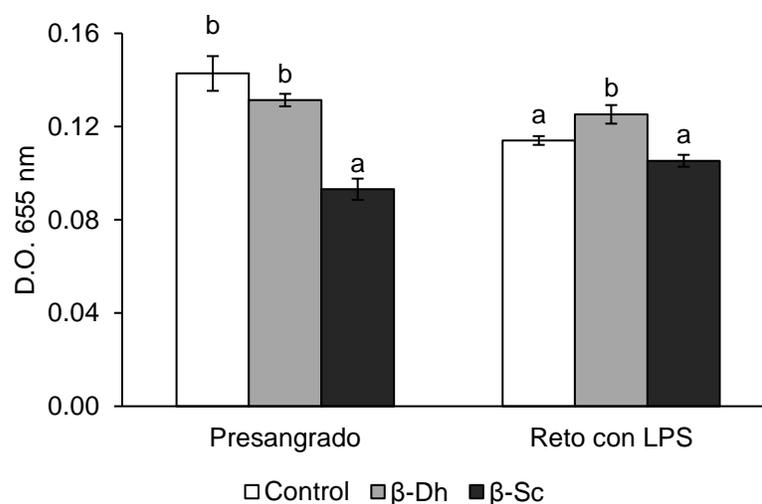


**Figura 36.** Expresión génica de los receptores (a) CD11b, (b) CD11c, (c) F4/80 y (d) la citoquina IL-1 $\beta$  en monocitos de sangre periférica de caprinos entrenados con  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* ( $\beta$ G) (7 días) y retados con LPS. Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

## 7.6.2 Evaluación de inmunidad innata entrenada *in vivo*

### 7.6.2.1 Explosión respiratoria en células sanguíneas

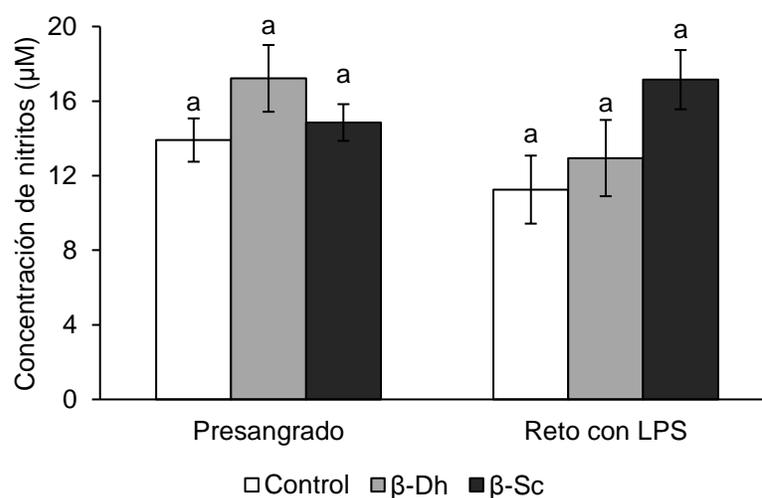
El día del presangrado (un día antes del reto con LPS), la actividad de explosión respiratoria no tuvo cambios significativos en la sangre de los cabritos estimulados con el  $\beta$ -Dh y el grupo control; mientras que esta actividad disminuyó ( $p < 0.05$ ) en sangre de cabritos estimulados con el  $\beta$ -glucano de *Saccharomyces cerevisiae* ( $\beta$ -Sc) comparado a los otros dos grupos. Después del reto con LPS, se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de la actividad de la explosión respiratoria en sangre de cabritos estimulados con el  $\beta$ -Dh respecto a los grupos control y el  $\beta$ -Sc (Fig. 37).



**Figura 37.** Explosión respiratoria en sangre periférica de cabritos recién nacidos estimulados con el  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* ( $\beta$ -Dh) y el  $\beta$ -glucano de *S. cerevisiae* ( $\beta$ -Sc) en el día -1 (presangrado) y el día 0 (retados con LPS). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

### 7.6.2.2 Producción óxido nítrico en plasma

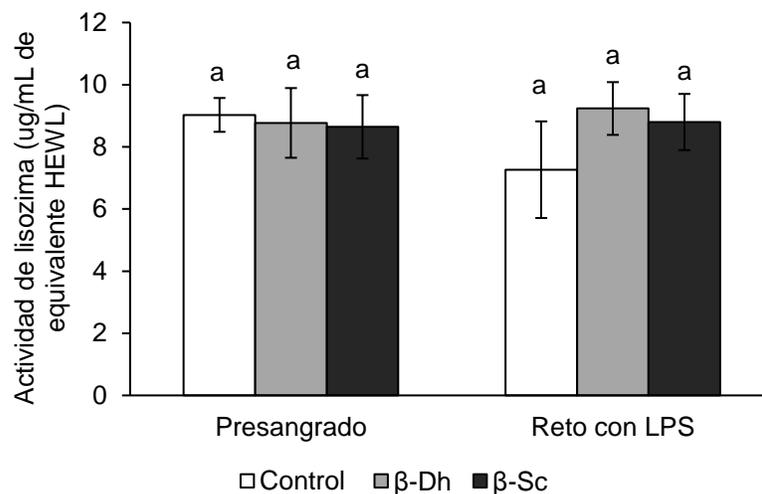
En la Fig. 38 se muestra que la producción de óxido nítrico no se vio afectada ( $p > 0.05$ ) en el plasma de cabritos de todos los grupos en los dos muestreos (presangrado y después del reto con LPS).



**Figura 38.** Concentración de nitritos como metabolito estable de la producción de óxido nítrico en plasma de cabritos recién nacidos estimulados con el β-glucano de *D. hansenii* (β-Dh) y el β-glucano de *S. cerevisiae* (β-Sc) en el día -1 (presangrado) y el día 0 (retados con LPS). Las barras representan la media ± error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

### 7.6.2.3 Actividad de lisozima en plasma

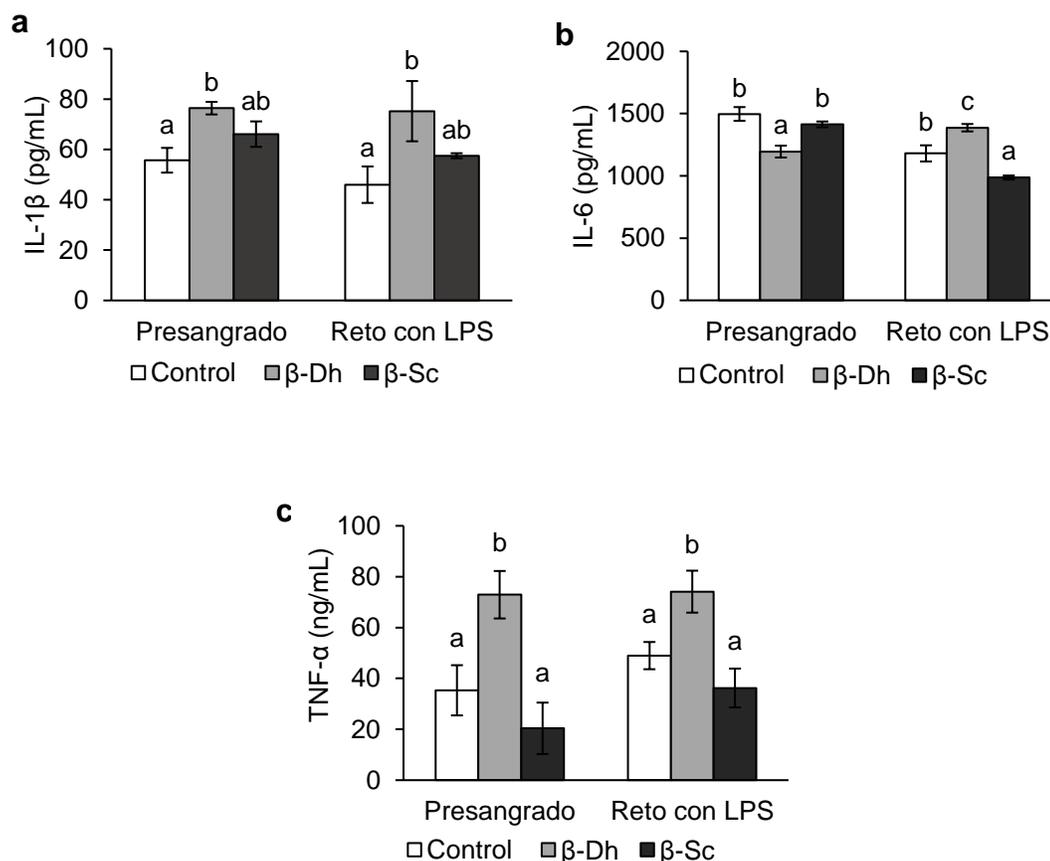
Los resultados del ensayo de actividad de lisozima no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) entre grupos en los dos muestreos (Fig. 39).



**Figura 39.** Actividad de lisozima en plasma de cabritos recién nacidos estimulados con el  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* ( $\beta$ -Dh) y el  $\beta$ -glucano de *S. cerevisiae* ( $\beta$ -Sc) en el día -1 (presangrado) y el día 0 (retados con LPS). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

#### 7.6.2.4 Producción de citocinas en plasma

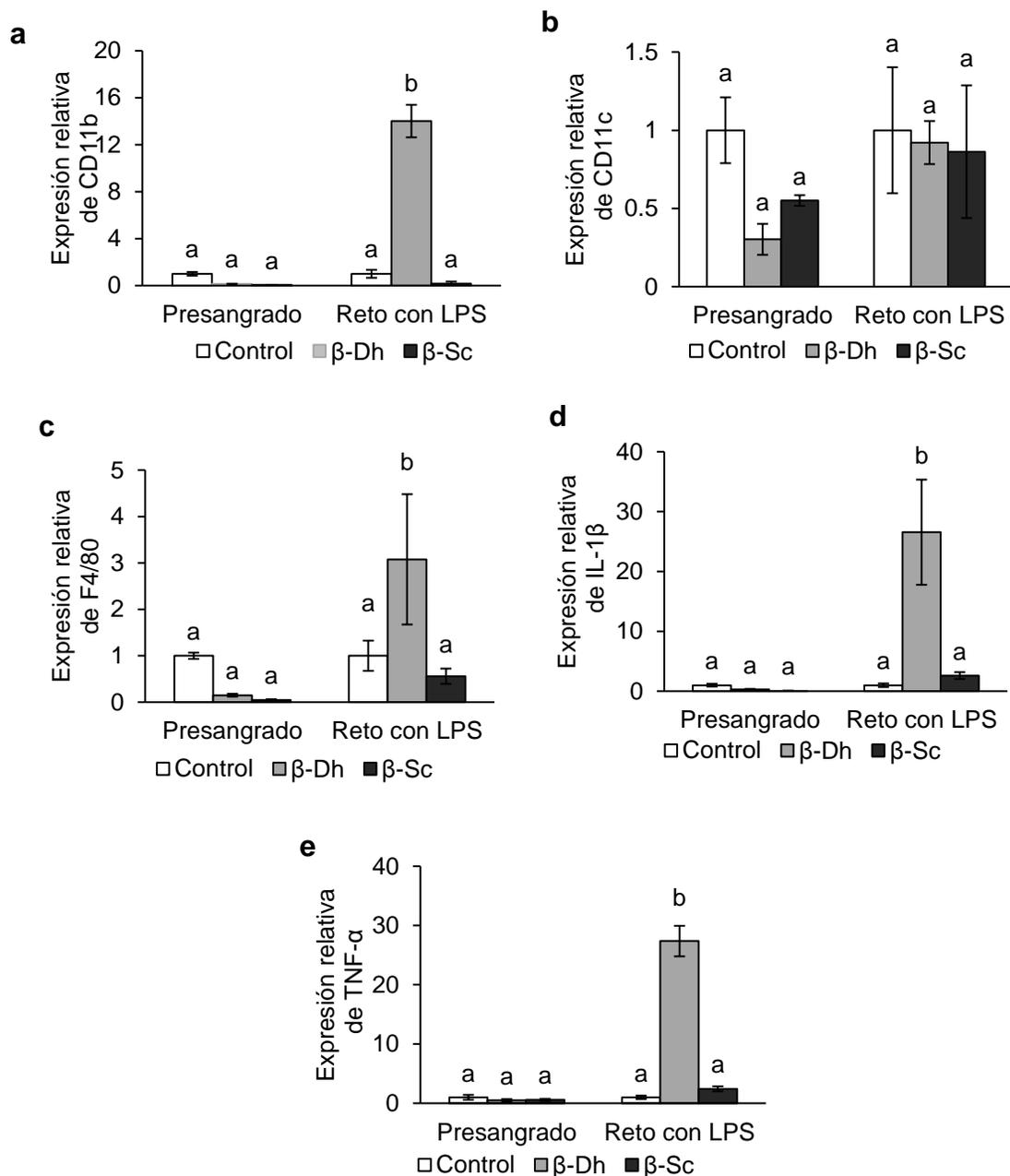
Se analizaron las concentraciones de citocinas proinflamatorias IL-1 $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ . Los patrones de concentración de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  tuvieron un comportamiento similar en los tres grupos y los dos muestreos (pre-sangrado y después del reto con LPS; Fig. 40a y 40c). Se encontraron concentraciones más altas de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  ( $p < 0.05$ ) en el plasma de cabritos a los que se les administró  $\beta$ -Dh por vía oral en comparación con otros grupos. La concentración de IL-6 en el sangrado previo disminuyó significativamente en los cabritos recién nacidos entrenados con  $\beta$ -Dh en comparación con  $\beta$ -Sc y grupos de control (Fig. 40b). Sin embargo, después del reto con LPS, la concentración de IL-6 fue mayor ( $p < 0.05$ ) en los cabritos del grupo  $\beta$ -Dh con respecto a los grupos  $\beta$ -Sc y control. Además, la concentración de IL-6 disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en los cabritos del grupo  $\beta$ -Sc después de la exposición con LPS en comparación con los otros grupos.



**Figura 40.** Producción de citocinas a) IL-1 $\beta$ , b) IL-6 y c) TNF- $\alpha$  en plasma de cabritos recién nacidos estimulados con el  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* ( $\beta$ -Dh) y el  $\beta$ -glucano de *S. cerevisiae* ( $\beta$ -Sc) en el día -1 (presangrado) y el día 0 (retados con LPS). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

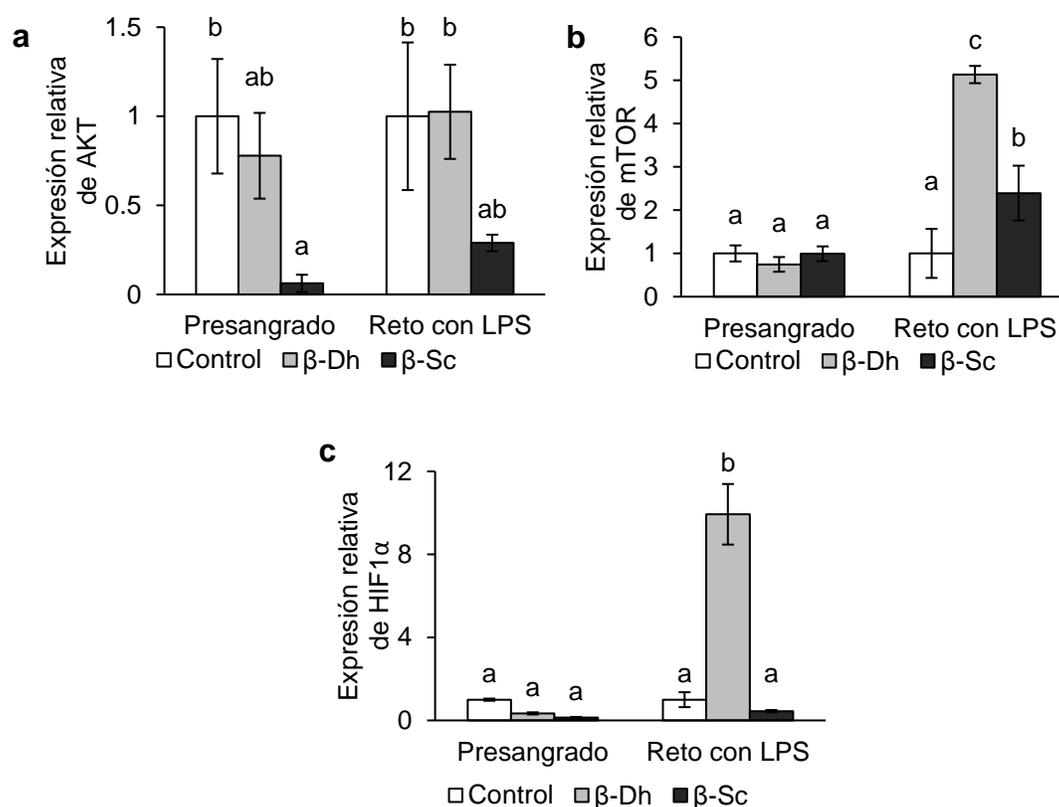
#### 7.6.2.5 Expresión de genes de marcadores de superficie celular, citocinas y moduladores en células de sangre periférica de cabritos recién nacidos

Los niveles de transcripción de CD11b, F4/80, IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en las muestras de cabritos estimulados con el  $\beta$ -Dh respecto a los otros grupos, únicamente después del reto con LPS. En contraste, los niveles de transcripción de CD11c no se vieron afectados significativamente ( $p > 0.05$ ) por los grupos (Fig. 41).



**Figura 41.** Expresión relativa de los genes de los marcadores de superficie celular (a) CD11b, (b) CD11c y (c) F4/80 y las citocinas (d) IL-1 $\beta$  y (e) TNF- $\alpha$  en células de sangre periférica de caprinos entrenados con  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* ( $\beta$ -Dh) y  $\beta$ -glucanos de *S. cerevisiae* ( $\beta$ -Sc) en el día -1 (presangrado) y el día 0 (retados con LPS). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

Por otra parte, se evaluaron los niveles de transcripción de reguladores relacionados al metabolismo de la glucosa: AKT, mTOR; y el factor de transcripción H1F1 $\alpha$ . La expresión del gen del regulador AKT disminuyó ( $p < 0.05$ ) antes del reto en el grupo  $\beta$ -Sc en comparación a los otros grupos. Tras la exposición con LPS, los niveles de expresión del gen mTOR aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en los grupos  $\beta$ -Dh y  $\beta$ -Sc comparado con el control; mientras que los niveles de ARNm de H1F1 $\alpha$  aumentaron ( $p < 0.05$ ) solamente en el grupo  $\beta$ -Dh.



**Figura 42.** Expresión génica de los reguladores (a) AKT, (b) mTOR y (c) H1F1 $\alpha$  en células de sangre periférica de caprinos entrenados con  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* ( $\beta$ -Dh) y  $\beta$ -glucanos de *S. cerevisiae* ( $\beta$ -Sc) en el día -1 (presangrado) y el día 0 (retados con LPS). Las barras representan la media  $\pm$  error estándar de la media (EMM) ( $n=3$  por grupo). Las diferentes literales indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre grupos.

## 8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se evaluó mediante un ensayo *in vitro* el potencial probiótico de levaduras de ambientes marinos: *D. hansenii* CBS8339, *Y. lipolytica* N6 y *S. halophilus* 4N16; así como el potencial inmunoestimulante de sus  $\beta$ -glucanos; posteriormente se seleccionó la cepa y el  $\beta$ -glucano con los mejores efectos probióticos e inmunoestimulantes y fueron evaluados mediante un ensayo *in vivo* en cabritos recién nacidos.

Como objetivo primario, se analizaron algunas características microbiológicas como el crecimiento y la actividad antimicrobiana de las levaduras. Se observaron curvas de crecimiento similar en las tres cepas, iniciando su fase exponencial aproximadamente a las 6 h. Por otro lado, se observó que el sobrenadante de la levadura *D. hansenii* presentó un mayor porcentaje de inhibición contra *E. coli*, bacteria que fue utilizada para retar a los leucocitos caprinos. Se ha reportado que cepas de *D. hansenii* producen proteínas tóxicas, llamadas toxinas asesinas. Estas sustancias antimicrobianas pueden desempeñar un papel importante en el crecimiento inhibitorio de diferentes géneros de levaduras (Al-Qaysi *et al.*, 2017). Sin embargo, los estudios de la actividad antibacteriana de *D. hansenii* contra bacterias Gram positivas y negativas son muy escasos; a excepción de un estudio demostró que *D. hansenii* inhibió el crecimiento de *Clostridium tyrobutyricum* y *C. butyricum* (Fatichenti *et al.*, 1983).

Dentro de las características que debe poseer un probiótico simultáneamente se encuentran: resistencia a sales biliares, resistencia a diferentes pHs, y capacidad de adhesión al intestino. Estos parámetros fueron analizados en las tres cepas de levaduras estudiadas en este trabajo. El crecimiento de *D. hansenii* disminuyó en presencia a las sales biliares de caprino, sin embargo, solo disminuyó en una tercera parte. Inesperadamente, se observó un mayor crecimiento en *Y. lipolytica* y *S. halophilus* cuando fueron cultivadas con sales biliares de caprino en comparación con el control. Aunque solo fue estadísticamente significativo en la cepa *S.*

*halophilus*. Por otro lado, se observó que el crecimiento de la cepa *D. hansenii* no se vio afectado por pH's ácidos; mientras que el crecimiento de *Y. lipolytica* disminuyó con un efecto pH dependiente. El crecimiento de *S. halophilus* también se vio afectado por la disminución del pH. No obstante, a pesar de la disminución del crecimiento de *Y. lipolytica* y *S. halophilus*, el número menor de UFC de estas levaduras es similar al número de *D. hansenii* ( $1 \times 10^6$  UFC/mL) en los medios a todos los pH's. Adicionalmente, las tres cepas de levaduras mostraron capacidad de adherencia a secciones de duodeno y yeyuno de caprinos. Los criterios de selección de probióticos son muy importantes, ya que estos microorganismos deben sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal como a sales biliares, pH y además debe tener la capacidad de adherirse al intestino (Klaenhammer *et al.*, 1999; Reyes-Becerril *et al.*, 2008; Caruffo *et al.*, 2015). En este estudio, se observó que las tres cepas de levaduras cumplieron dichos criterios de selección.

Asimismo, los  $\beta$ -glucanos extraídos de las levaduras fueron caracterizados. El rendimiento del aislamiento de  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* fue 14.82% de masa seca de la levadura. En otros estudios, se encontraron rendimientos similares de  $\beta$ -glucanos de dos cepas de *D. hansenii* (12,9 y 13,7%), siendo *Candida tropicalis* la cepa que obtuvo mayor rendimiento (16.8%) (Sukumaran *et al.*, 2010).

Por otra parte, se obtuvieron los espectros  $^1\text{H}$  de resonancia magnética nuclear (RMN) de los  $\beta$ -glucanos de cada levadura. La estructura química de los glucanos se relaciona con sus efectos inmunoestimulantes. Estos efectos se observan especialmente cuando los animales se tratan con  $\beta$ -glucanos con un mayor nivel de complejidad estructural como grado de enlaces (1,6) (Cleary *et al.*, 1999). El espectro  $^1\text{H}$  RMN de los  $\beta$ -glucanos mostraron un desplazamiento químico alrededor de 3.0-5.0 ppm indicando la presencia de grupos -CH-OH, -CH<sub>2</sub>OH (Kardono *et al.*, 2013) y confirmando la presencia de glucanos. Los picos entre 4.3-4.59 ppm son característicos de  $\beta$ -D-glucanos; mientras que los picos entre 4.59-5.1 ppm indican la presencia de  $\alpha$ -glucanos (Synytsya *et al.*, 2014). Además, la presencia de picos en 4.52 y 4.27 ppm muestran enlaces (1,6) y (1,3)

respectivamente (US Pharmacopeia, 2011); así como picos en 5.14 ppm indican la presencia de enlaces (1,4) (Sugawara, 2004). En consecuencia, el espectro de glucanos aislados de *D. hansenii* CBS8339 sugiere tener presente  $\beta$ -(1,3)/(1,6)-D-glucano. Mientras que el espectro de glucanos aislados de *Y. lipolytica* indica la presencia de tanto  $\beta$ -(1,3)/(1,6)-D-glucano como  $\alpha$ -(1,3)/(1,6)-D-glucano. Por otra parte, el espectro de glucanos extraídos de *S. halophilus* sugiere que se aislaron  $\beta$ -(1,4)-D-glucano y  $\alpha$ -(1,4)-D-glucano. Los datos espectrales concuerdan con otros estudios de  $\beta$ -glucanos de otras cepas de *D. hansenii* (Sukumaran *et al.*, 2010; Medina-Córdova *et al.*, 2018). Siguiendo con estos hallazgos, el peso molecular de los glucanos también está relacionado con el potencial inmunoestimulante de éstos. El rango de peso molecular de  $\beta$ -glucanos es muy amplio y fluctuante (dependiendo del origen) desde 10 a miles de kDa (Rop *et al.*, 2009). En este estudio, se observó que los glucanos de *D. hansenii* y *Y. lipolytica* mostraron pesos moleculares arriba de 100 kDa y menores a 5,000 kDa. Los  $\beta$ -glucanos de gran peso molecular tienen efectos estimulantes sobre los leucocitos que incluyen la inducción de actividades fagocíticas, citotóxicas y antimicrobianas (>100 kDa) (Meena *et al.*, 2013). Mientras que, los  $\beta$ -glucanos de 5-10 kDa son generalmente inactivos (Zhang *et al.*, 2005). Los glucanos  $\beta$ -(1,4)-D-glucano y  $\alpha$ -(1,4)-D-glucano de *S. halophilus* mostraron ser los de mayor tamaño (24,823.459 kDa). De la misma manera, Aman *et al.* (2012) observaron que el dextrano, un  $\alpha$ -glucano, aislado de *Leuconostoc mesenteroides* tiene un peso molecular promedio que varía de 10,000 a 40,000 kDa.

Tanto un probiótico como un inmunoestimulante, deben ser inocuos para las células. La viabilidad celular es la proporción de células que sobreviven a una situación particular como la exposición a un estímulo o microorganismos. En este trabajo, los leucocitos de sangre periférica de caprinos fueron expuestos a las levaduras *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *S. halophilus*, a sus  $\beta$ -glucanos y a la bacteria *E. coli*. Las cepas de *Y. lipolytica* y *S. halophilus* disminuyeron sutilmente la viabilidad de leucocitos a 80 y 85%, respectivamente. *D. hansenii* no redujo significativamente la viabilidad celular. Por otro lado, varias cepas de *E. coli* patógenas tuvieron fuertes

efectos citotóxicos en otras células hospederas. Estos efectos se pueden deber a la producción de factores de virulencia y adhesión, toxinas (enterotoxina lábil al calor (LT), enterotoxina termoestable (ST), citolisina A (ClyA), entre otros (Clements *et al.*, 2012). Cuando los leucocitos de sangre periférica de caprinos fueron retados con *E. coli* se observó una notable disminución de la viabilidad celular. No obstante, únicamente la levadura *D. hansenii* demostró una protección de los leucocitos frente a un reto infeccioso. Mientras que la viabilidad de leucocitos del grupo control retado fue de 19%, la del grupo *D. hansenii* fue de 50.85%. La viabilidad de los leucocitos estimulados con las otras dos cepas fue similar al grupo control retado. En este mismo contexto, los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii*, *Y. lipolytica*, *S. halophilus* y Curdlan redujeron ligeramente la viabilidad de los leucocitos entre 75 y 81%. Diversos estudios han observado que la viabilidad de las células expuestas a diferentes  $\beta$ -glucanos oscila entre 75 y 90% (Cárdenas-Reyna *et al.*, 2017; de Oliveira Silva *et al.*, 2017). Curiosamente, los leucocitos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* y *Y. lipolytica* aumentaron la viabilidad celular significativamente después de la exposición a *E. coli* en comparación con el grupo control. En cambio, la viabilidad de leucocitos estimulados con  $\beta$ -glucano de *S. halophilus* fue similar al control. Reyes-Becerril *et al.* (2017) observaron que  $\beta$ -glucano derivado de levadura *S. halophilus* aumentó la viabilidad de los leucocitos de peces después de un reto con *A. hydrophila* (50%) en comparación con el grupo control (21%). Además, en estudios *in vivo*, por ejemplo, la suplementación oral de  $\beta$ -glucanos de las cepas de *D. hansenii*, *D. fabryi* y *D. nepalensis* aumentó la supervivencia del 23 al 54% en comparación con el control (0%) en camarones retados con el virus del síndrome de la mancha blanca (WSSV) (Sukumaran *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2015).

Para estudiar los efectos inmunoestimuladores de las levaduras y sus  $\beta$ -glucanos en leucocitos, se analizó la habilidad fagocítica y las respuestas descendentes, como producción de óxido nítrico y ERO. Es bien sabido que la mejora de estos parámetros puede asociarse con una inmunoestimulación adecuada (Akramiené *et al.*, 2007). La fagocitosis es un proceso clave de inmunidad innata en el cual los

macrófagos, monocitos y neutrófilos engullen y digieren patógenos o moléculas extrañas. Las células fagocíticas pueden destruir microorganismos a través del mecanismo dependiente del oxígeno que implica la producción de ERO (anión superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno) y radicales libres de nitrógeno (óxido nítrico). En este trabajo, únicamente la estimulación de leucocitos con la levadura *Y. lipolytica* mostró un aumento significativo en la habilidad fagocítica (porcentaje de células fagocíticas). Después del reto patogénico, la habilidad fagocítica fue similar entre los grupos. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre grupos en la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno. Por otra parte, después de la exposición a *E. coli*, la habilidad fagocítica fue mayor en los leucocitos estimulados con  $\beta$ -glucanos de las tres levaduras en comparación con los grupos Curdlan y control (no estimulados). Asimismo, los niveles de producción de óxido nítrico fueron mayores en leucocitos estimulados con los  $\beta$ -glucanos de *D. hansenii* y *S. halophilus* en comparación con los grupos control y Curdlan. Después de la exposición bacteriana, los niveles de nitritos fueron mayores significativamente en los leucocitos estimulados previamente con los  $\beta$ -glucanos de las tres cepas y Curdlan respecto al grupo control. Por el contrario, antes y después del reto la explosión respiratoria no se vio afectada o incluso se redujo en los grupos tratados con los  $\beta$ -glucanos en comparación con el grupo de control. Por lo tanto, los resultados han demostrado que los  $\beta$ -glucanos de estas levaduras promueven principalmente la fagocitosis y la eliminación de *E. coli* a través del mecanismo de producción de óxido nítrico en los leucocitos estimulados. Curiosamente, también se observó un aumento de la habilidad fagocítica en monocitos y neutrófilos de sangre periférica de cerdo estimulados con  $\beta$ -glucano de *S. cerevisiae* (Vetvicka y Oliveira, 2014). Chen *et al.* (2008) observaron que en macrófagos de aves de corral tratados con  $\beta$ -glucano de *Schizophyllum commune* y luego expuestos a *Salmonella enterica serovar Enteritidis*, la capacidad fagocítica aumentó 34-37% con respecto al grupo control (macrófagos no estimulados y retados). En otro estudio, los  $\beta$ -glucanos de hongos fueron capaces de estimular la fagocitosis y producción de óxido nítrico después del

reto bacteriano en leucocitos de peces (Cárdenas-Reyna *et al.*, 2017). Curiosamente, Kim *et al.* (2004) informaron que polisacáridos derivados de hongos estimularon la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos peritoneales, pero no la producción de ERO.

En este trabajo se analizó la regulación transcripcional de los genes asociados a la respuesta de  $\beta$ -glucanos que conforman parte de la pared celular de levaduras, como los genes de: receptores (Dectin-1 y TLR2), moduladores de las vías de señalización reguladoras y factores de transcripción (Raf-1, Syk, MyD88, NF $\kappa$ B y AP-1), así como los genes de citocinas efectoras (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-10). Los resultados de la expresión génica demuestran que la estimulación de leucocitos con las levaduras *D. hansenii* y *Y. lipolytica* modulan los niveles de ARNm principalmente antes del reto; al igual que la estimulación con el  $\beta$ -glucano de *D. hansenii*. Mientras que, la modulación génica se observa después del reto en leucocitos estimulados con el  $\beta$ -glucano de *Y. lipolytica*.

En general y derivado a que la levadura *D. hansenii* y su  $\beta$ -glucano redujeron los efectos citotóxicos de *E. coli* sobre leucocitos de sangre periférica de cabra a través de un aumento en la actividad fagocítica, una mejora en la producción de óxido nítrico y una estimulación temprana de la expresión génica, esta cepa fue seleccionada para realizar los ensayos experimentales en cabritos recién nacidos.

Para evaluar la protección contra un reto *ex vivo* en leucocitos de cabritos recién nacidos de los grupos *Dh* (suplementados con levadura) y control, se evaluó la viabilidad celular. En ambos muestreos, después del reto con *E. coli ex vivo*, la viabilidad de los leucocitos de cabritos del grupo *Dh* fue más alta que en los cabritos del grupo control, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas. Este hallazgo podría estar relacionado con una protección contra el patógeno de *E. coli* en leucocitos de cabritos que se suplementaron con la levadura *D. hansenii*. Martins *et al.* (2011) observaron que la administración oral de la cepa de *S. cerevisiae*

UFMG 905 a ratones aumentó la tasa de supervivencia después de un reto con *Salmonella*.

En este trabajo, durante el primer muestreo, la explosión respiratoria aumentó significativamente en los leucocitos de los cabritos recién nacidos del grupo *Dh* en comparación con los leucocitos del grupo control. Sin embargo, después del reto *ex vivo*, la explosión respiratoria disminuyó en los leucocitos del grupo *Dh* respecto al grupo de control. De forma similar, en otro estudio, la explosión respiratoria aumentó significativamente en peces alimentados con *S. cerevisiae* después de cuatro y cinco semanas, pero a las seis semanas fue similar entre los grupos (Iwashita *et al.*, 2015). Curiosamente, en otro estudio se observó un aumento de la explosión respiratoria en heterófilos de pavos que se alimentaron con extracto de *S. cerevisiae* (grupo YE), pero después de la exposición a *E. coli* la explosión respiratoria disminuyó en las células del grupo YE en comparación con grupo de control (Huff *et al.*, 2011). También, en este estudio se evaluó la producción de óxido nítrico. Los niveles de nitrito aumentaron significativamente en leucocitos de ambos grupos después del reto *ex vivo* con *E. coli* en el día 15 comparados con los leucocitos no retados. Además, en el día 30 y después del reto, la concentración de nitritos fue más alto en los leucocitos del grupo *Dh* que en el grupo control. Similarmente, en otro estudio, la administración oral de *S. cerevisiae* durante dos meses en peces mejora significativa la producción de especies reactivas de nitrógeno en los neutrófilos y macrófagos (Abu-Elala *et al.*, 2013). En un estudio *in vitro*, la estimulación de leucocitos con la cepa *D. hansenii* BCS004 y el reto con *V. parahaemolyticus* mostraron un aumento en los niveles de nitrito en comparación con el grupo control (Angulo *et al.*, 2017).

Adicionalmente, se evaluó el nivel de transcripción de receptores, moduladores, factores de transcripción y citocinas. Las levaduras contienen quitinas, mananos y glucanos presentes en su pared celular, que pueden ser reconocidos por diferentes receptores que se encuentran en varias células del sistema inmune (Janeway y Medzhitov, 2002). El receptor principal de  $\beta$ -glucanos es Dectina-1; sin embargo,

también pueden ser reconocidos por TLR2, 4 y 6. Además, los mananos pueden ser reconocidos por Dectina-2, TLR2 y TLR4. Por ejemplo, TLR2 puede reconocer fosfolipomananos (Jouault *et al.*, 2003), mientras que TLR4 es capaz de reconocer tanto O-mananos como N-mananos (Netea *et al.*, 2006; Kawai y Akira, 2011). En este estudio, en los dos muestreos, la expresión relativa de ARNm de Dectina-1 se redujo en leucocitos de los grupos *Dh*/no retados, control/retados y *Dh*/retados en comparación con el grupo de control (no retado). Además, la expresión génica de TLR2, 4 y 6 tuvo un comportamiento similar. En el día 15 y antes del reto *ex vivo*, la expresión relativa de estos receptores aumentó significativamente en los leucocitos del grupo *Dh* con respecto al grupo control. Curiosamente, en el segundo muestreo, la expresión del gen TLR4 aumentó en los leucocitos del grupo control/retado, pero no fue estadísticamente diferente. *E. coli* es una bacteria gram negativa, que en su pared celular contiene lipopolisacáridos (LPS) que son reconocidos por TLR4 (Lu *et al.*, 2008). De forma similar, la administración oral de un probiótico comercial (FASTtrak), que contiene *S. cerevisiae*, *Aspergillus oryza* y bacterias; mostraron un aumento en la expresión génica de los TLR2 y 4 en sangre de caprinos (Ekwemalor *et al.*, 2017). En contraste con nuestros resultados, Bonfim *et al.* (2009) encontraron un aumento significativo de la expresión del gen Dectina-1 en monocitos y neutrófilos humanos estimulados con levadura *Paracoccidioides brasiliensis*. Sin embargo, en el mismo trabajo, *P. brasiliensis* condujo a una disminución significativa en la expresión de Dectina-1 por citometría de flujo. Además, en el presente estudio se analizó la expresión génica de los moduladores Raf-1, Syk y MyD88. El nivel de transcripción de los tres moduladores fue mayor en leucocitos del grupo *Dh* no retados en comparación con el grupo control. Después del reto *ex vivo*, la expresión no se vio afectada. También, se evaluó la expresión relativa de ARNm de los factores de transcripción NFκB y AP-1. Curiosamente, la expresión del gen NFκB se redujo significativamente en leucocitos del grupo *Dh* respecto al grupo de control en los dos muestreos, antes y después del reto. Mientras que, en el día 15, la expresión del gen AP-1 aumentó en leucocitos del grupo *Dh* en comparación con el grupo control. Por lo tanto, la estimulación con la levadura *D. hansenii* puede

desencadenar la ruta TLR (2,4,6)/MyD88/AP1. Sougioultzis *et al.*, (2006) encontraron que la levadura *S. boulardii* produce una molécula de peso molecular pequeño (factor antiinflamatorio de *Saccharomyces*) que inhibe la activación de NFκB. Además, la estimulación con *D. hansenii* también sugiere la vía Syk (que es dependiente de Dectina-1), a pesar de que la expresión del gen Dectina-1 no fue aumentada. Sin embargo, los mananos de la pared celular de las levaduras también pueden ser reconocidos por el receptor Dectina-2, cuya unión a la levadura activa la vía de señalización Syk (Robinson *et al.*, 2009). Entonces, probablemente otra vía de señalización sea Dectina-2/Syk/AP-1. Sin embargo, es necesario seguir trabajando en ello para determinar esta hipótesis. Además, en este trabajo, se evaluó el nivel de transcripción de los genes de las citocinas IL-1β y TNF-α. En la primera toma de muestras (día 15), el nivel de expresión de las citocinas pro-inflamatorias fue significativamente mayor en los leucocitos del grupo *Dh* en comparación con el grupo control. En el segundo muestreo, la expresión de los genes de las citocinas se redujo ( $p < 0.05$ ). De manera similar, la administración de la cepa *D. hansenii* L2 en peces aumentó la expresión relativa de ARNm de IL-1β y TNF-α a las dos semanas (15 días); sin embargo, a las cuatro semanas, la expresión del gen de TNF-α se redujo (Reyes-Becerril *et al.*, 2012). En general, los parámetros analizados son relacionados a la respuesta inmune innata por lo cual como era de esperarse, los parámetros inmunes y la expresión de genes se potenciaron en el primer muestreo.

Adicionalmente, en este estudio se evaluaron los efectos *in vitro* de la estimulación con β-glucanos de *D. hansenii* de monocitos y macrófagos caprinos en contexto a un nuevo concepto: inmunidad innata entrenada. Actualmente, la inmunidad innata entrenada se ha descrito ampliamente en mamíferos, como ratones y humanos. Las dosis intraperitoneales de β-glucanos han demostrado inducir inmunidad entrenada después de la re-estimulación con patógenos o PAMPs; sin embargo, se desconocen los efectos del entrenamiento de las dosis orales de β-glucano. Además, como se mencionó anteriormente, los caprinos recién nacidos son

susceptibles a infecciones en la etapa neonatal, lo que contribuye sustancialmente a las pérdidas para los ganaderos (Singh et al., 2018); así, la inducción de la inmunidad entrenada puede mejorar la supervivencia animal. Primero, se evaluó la diferenciación de monocitos a macrófagos durante 6 días cultivados con  $\beta$ -glucano, PMA como control de diferenciación celular y un grupo sin ningún estímulo (grupo control). *In vitro*, los monocitos pueden diferenciarse morfológicamente a macrófagos/células dendríticas en cinco días. El estado inmunológico (inmunidad o tolerancia entrenada) puede determinar el destino funcional de los monocitos y macrófagos después de la infección o la vacunación (Saeed et al., 2014). La forma redonda pequeña típica de los monocitos en el día 0 cambió durante los días posteriores de diferenciación a células más alargadas, como las morfologías típicas de los macrófagos y células dendríticas. Esta diferenciación se observó en todos los grupos ( $\beta$ -*Dh*, PMA y control). Además, las células entrenadas con  $\beta$ -glucano conducen a la reprogramación epigenética de monocitos, asociada con la forma celular y las modificaciones de los marcadores de la superficie celular (Ifrim et al., 2014). Para complementar el análisis de diferenciación celular, se analizaron los niveles de transcripción de genes de marcadores de superficie celular. Los cambios en la expresión de estos marcadores pueden contribuir a un aumento o disminución de las respuestas inmunes innatas durante el entrenamiento celular (Ifrim et al., 2014). Después del reto con LPS, los niveles de expresión del gen CD11b aumentaron significativamente en células entrenadas con el  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* en comparación con los grupos control y PMA. Este resultado sugirió un mayor número de monocitos indiferenciados en el grupo  $\beta$ -*Dh*; sin embargo, algunos monocitos podrían diferenciarse porque el marcador CD11b se expresa, aunque en menor medida, en macrófagos (Hickstein et al., 1992). Del mismo modo, el nivel de expresión relativo del gen F4/80 incrementó significativamente en los grupos  $\beta$ -*Dh* y PMA con respecto al grupo control. Estos resultados demuestran que tanto el  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* y el control de diferenciación positivo (PMA) podrían estimular la diferenciación de monocitos a macrófagos. Asimismo, Ifrim et al. (2014) demostraron que monocitos humanos entrenados con el  $\beta$ -glucano de *Candida*

*albicans* expresaron marcadores de macrófagos en la superficie celular (es decir, CD11b) después del reto con LPS. Por el contrario, Garcia-Valtanen et al. (2017) observaron que los niveles de los marcadores de superficie celular F4/80 y CD11b disminuyeron con respecto al grupo de control en monocitos murinos entrenados con el  $\beta$ -glucano de *C. albicans*. En contraste, en este estudio, la expresión relativa del gen CD11c disminuyó significativamente en células del grupo  $\beta$ -Dh en comparación con otros grupos, lo que sugiere que los monocitos no se diferenciaron a células dendríticas, acorde con los resultados en monocitos murinos entrenados con  $\beta$ -glucanos de *C. albicans* (García-Valtanen et al., 2017).

Además, durante el entrenamiento celular con el  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* se evaluó la viabilidad de los monocitos después del reto con LPS. El porcentaje de células vivas fue mayor en el grupo  $\beta$ -Dh comparado con el grupo control, incluso del grupo estimulado con PMA, lo que sugirió la protección celular inducida frente a un reto con LPS. Se ha demostrado que macrófagos THP-1 diferenciados en altas concentraciones de PMA (50-200 ng/mL) mueren rápidamente después de una infección, mientras que los diferenciados en bajas concentraciones de PMA (20 ng/mL) sobreviven en un mayor porcentaje (Starr et al., 2018). En comparación, el número de macrófagos murinos muertos que fueron entrenados con  $\beta$ -glucano de *S. cerevisiae* fue menor después del reto con LPS que en el grupo de control (Walachowski et al., 2017). Además, Garcia-Valtanen et al., (2017) detectó que la estimulación con  $\beta$ -glucano derivado de *C. albicans* ayudó a la supervivencia de los monocitos humanos y murinos después del reto con LPS. En experimentos *in vivo*, la inmunidad entrenada en ratones con dosis no letales de *C. albicans* aumentó la supervivencia después del reto con dosis letales del mismo patógeno (Saeed et al., 2014). Consistentemente, nuestros resultados revelaron que el  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* podría ayudar en la supervivencia de los monocitos de caprinos durante el período de diferenciación y después del reto con LPS.

Para evaluar la influencia de la inmunidad entrenada en los mecanismos efectores de la inmunidad innata, se evaluó la habilidad fagocítica. Los resultados mostraron

que el entrenamiento con el  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* en monocitos caprinos después del reto con LPS aumentó la habilidad fagocítica en comparación con el PMA y los grupos de control. Igualmente, Rizzetto et al., (2016) demostraron que células humanas entrenadas con quitina de *S. cerevisiae* aumentaron el porcentaje de monocitos que contienen *E. coli* y *C. albicans* (fagolisosomas) con respecto a los monocitos de control (no entrenados). Nuestros hallazgos evidenciaron una mayor habilidad de los monocitos caprinos entrenados con  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* para fagocitar, lo que podría conducir a la protección contra los patógenos.

Además, para determinar si el  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* inducía inmunidad entrenada en cabritos recién nacidos, se realizó un experimento *in vivo*. La actividad de explosión respiratoria (producción de ERO) y la producción de óxido nítrico son respuestas antimicrobianas a los patógenos, y estas respuestas son desencadenadas por la invasión de microorganismos (Marcinkiewicz, 1997). La formación de ERO conduce a la activación de factores de transcripción (como, HIF1 $\alpha$ ) involucrados en la reprogramación de las células metabólicas durante la inmunidad entrenada (Cheng et al., 2014). En este estudio, la actividad de la explosión respiratoria aumentó en las células sanguíneas de los cabritos recién nacidos del grupo  $\beta$ -*Dh* en comparación con los otros grupos. Por el contrario, un estudio *in vitro* mostró que la producción de ERO no se vio afectada en monocitos primarios humanos entrenados con  $\beta$ -glucano de *C. albicans* en un reto con LPS; sin embargo, la vacuna BCG y oxLDL (lipoproteína de baja densidad oxidada) aumentaron la producción de ERO en los monocitos entrenados (Bekkering et al., 2016). Del mismo modo, Sohrabi et al., 2018, demostraron que los monocitos humanos entrenados con oxLDL aumentaron la formación de ERO tras una reestimulación con Pam3cys. En consecuencia, las diferencias por el origen y la estructura química de los glucanos de levadura están relacionadas con los resultados biológicos de la inmunidad entrenada en monocitos humanos/murinos (Walachoswski et., 2017; Saeed et al., 2014). Por otro lado, en este estudio se observó una tendencia a aumentar la producción de óxido nítrico en plasma de

cabritos recién nacidos estimulados con  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* y  $\beta$ -glucano de *S. cerevisiae* (control comercial) tras el reto con LPS en comparación con el grupo control. Sorprendentemente, Santecchia *et al.*, (2019) observaron en un estudio *in vivo* que las células peritoneales de ratones entrenados con dosis intraperitoneales de CL429 (compuesto quimérico) aumentaron la producción de óxido nítrico después del reto *ex vivo* con leptospiras o LPS. Por lo tanto, el óxido nítrico es un potente compuesto antimicrobiano que se ha relacionado con la inmunidad entrenada. En general, la actividad de la explosión respiratoria y la producción de óxido nítrico parecen desempeñar un papel crucial en la inmunidad entrenada, que en los cabritos recién nacidos estimulados con  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* podría estar relacionada con desencadenar respuestas antimicrobianas contra los patógenos y regular las funciones entrenadas de monocitos y macrófagos, así como la respuesta inflamatoria (Forrester *et al.*, 2018).

Una de las características clave de las células innatas entrenadas es la capacidad de liberar citocinas proinflamatorias en respuesta al reto posterior con patógenos o PAMPs (Netea *et al.*, 2016). En este estudio, se evaluó la producción de tres citocinas proinflamatorias: IL1- $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$ . La concentración de IL1- $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  aumentó en el plasma de cabritos recién nacidos entrenados con dosis orales de  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* tras la exposición a LPS. Curiosamente, las concentraciones de citocinas proinflamatorias en plasma no se vieron afectadas en los cabritos recién nacidos estimulados con  $\beta$ -glucano de *S. cerevisiae*. En contraste, Walachowski *et al.*, (2017) observaron en un ensayo *in vitro* que en macrófagos de ratón entrenados con  $\beta$ -glucano de *S. cerevisiae* aumentó la producción de IL1- $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  tras una estimulación secundaria con Pam3Cys. En otro estudio, los ratones inyectados intraperitonealmente con  $\beta$ -glucano de *C. albicans* y retados con LPS resultaron en una mayor producción de las citocinas IL-6 y TNF- $\alpha$  en el suero (Garcia-Valtanen *et al.*, 2017). Además, Smith *et al.*, (2017) encontraron que la citoquina IL-6 aumentó en la sangre total de los infantes vacunados con BCG (entrenados) tras la reestimulación con Pam3Cys, *C. albicans*

con calor o un lisado de *M. tuberculosis*. Al respecto, se ha informado que la inmunidad entrenada inducida por la vacuna BCG en adultos aumenta principalmente la producción de las citocinas IL1- $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  (Kleinnijenhuis *et al.*, 2012). Además, Guerra-Maupome *et al.* (2019) observaron un incremento de la producción de citocinas IL1- $\beta$ , IL-6 y TNF- $\alpha$  con la vacuna BCG en aerosol en terneros jóvenes tras la reestimulación con LPS o Pam3CSK4. Por lo tanto, las dosis orales de  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* en cabritos recién nacidos indujeron inmunidad entrenada a través de la producción mejorada de citocinas tras la exposición con LPS, lo que coincidió con los efectos de la inmunidad entrenada observados en ratones y humanos después de la administración parenteral de  $\beta$ -glucano o vacuna BCG. Un hallazgo interesante en este estudio fue que la producción de citocinas proinflamatorias no se vio afectada en cabritos recién nacidos estimulados con  $\beta$ -glucano de *S. cerevisiae*, lo que sugiere que el  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* podría haber sido una mejor opción para inducir memoria innata en cabritos recién nacidos.

Además, se analizaron los niveles de transcripción de los mismos genes de marcadores de superficie celular utilizados en el ensayo *in vitro*. Los resultados confirmaron que los niveles de transcripción de los genes CD11b y F4/80 aumentaron en células sanguíneas de cabritos recién nacidos estimulados con  $\beta$ -glucano de *D. hansenii*, mientras que la expresión del gen CD11c no se vio afectada. Como se discutió en los resultados *in vitro*, los estudios *in vivo* también demostraron que la expresión de los marcadores de superficie celular CD11b y F4/80 aumentó en modelos humanos o murinos entrenados con BCG o CL429, respectivamente (Kleinnijenhuis *et al.*, 2012; Santecchia *et al.*, 2019).

Recientemente, se ha prestado atención a la importancia del metabolismo intracelular para dar forma a la respuesta inmune (inmunometabolismo, O'Neill *et al.*, 2016). Se ha visto que las distintas rutas metabólicas no solo siguen los requerimientos de energía, sino que también distingue y apoya fenotipos de macrófagos (Van den Bossche *et al.*, 2017). Por lo tanto, los cambios metabólicos de los macrófagos activados clásicamente son comparables con el fenotipo

adaptado inducido por el entrenamiento con  $\beta$ -glucanos (van der Heijden *et al.*, 2018). Es decir, el metabolismo celular orquesta la memoria inmune innata. Por lo que en este estudio se evaluó la expresión de genes relacionados al metabolismo celular glucolítico: AKT, mTOR y HIF1 $\alpha$ . A pesar de que después del reto con LPS, los niveles de transcripción de AKT fueron más altos en los cabritos recién nacidos del grupo  $\beta$ -Dh no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, los niveles de ARNm de los genes mTOR y HIF1 $\alpha$  aumentaron significativamente en el grupo  $\beta$ -Dh. Esto sugiere que el entrenamiento con el  $\beta$ -glucano de *D. hansenii* activó la ruta AKT/mTOR/HIF1 $\alpha$ . De manera similar, diversos trabajos han demostrado la inducción de esta vía por  $\beta$ -glucanos de levaduras, mostrando un alto consumo de glucosa, producción de lactato y una relación NAD<sup>+</sup>/NADH, lo cual genera un aumento de la glucólisis aeróbica dependiente de mTOR y una disminución de la fosforilación oxidativa (Cheng *et al.*, 2014; Bekkering *et al.*, 2016).

## 9. CONCLUSIONES

De las tres especies de levaduras aisladas de ambientes marinos, *D. hansenii* CBS8339 fue el mejor probiótico potencial para caprinos, ya que mostró resistencia a sales biliares, pH ácido, capacidad de adherencia a intestino, actividad antimicrobiana y además tanto esta levadura como sus  $\beta$ -glucanos redujeron los efectos citotóxicos de *E. coli* y estimularon parámetros de la respuesta inmune en leucocitos de caprinos *in vitro*. *In vivo*, la administración oral de *D. hansenii* CBS8339 en cabritos recién nacidos potenció la respuesta inmune innata, principalmente a los 15 días; mientras que *in vitro* y dosis orales del  $\beta$ -glucano indujo una respuesta inmune innata entrenada y protección contra LPS de *E. coli* en cabritos recién nacidos.

Este estudio demuestra por primera vez que se indujo inmunidad entrenada en mamíferos con dosis orales de  $\beta$ -glucano tras la exposición a LPS utilizando cabritos recién nacidos como modelo.

Perspectivas de estos estudios incluyen: (1) evaluar la administración de corto tiempo (15 días) de la levadura probiótica en un número mayor de cabritos neonatos; (2) estudiar frecuencias de administración; (3) profundizar en los mecanismos de reprogramación epigenética y metabólica de la inmunidad entrenada por  $\beta$ -glucanos en caprinos; y (4) determinar la duración de la protección generada por la inmunidad entrenada usando dosis orales del  $\beta$ -glucano en mamíferos.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abd El-Tawab, M. M., I. M. I. Youssef, H. A. Bakr, G. C. Fthenakis, N. D. Giadinis. 2016. Role of probiotics in nutrition and health of small ruminants. *Pol. J. Vet. Sci.* 19(4):893-906.
- Abd El-Ghani, A.A. 2004. Influence of diet supplementation with yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance of Zaraibi goats. *Small Rumin. Res.* 52:223-229.
- Abo-Shehada, M., H. Abo-Farieha. 2003. Prevalence of *Eimeria* species among goats in Northern Jordan. *Small Ruminant Res.* 49:109-113.
- Abu-Elala, N., M. Marzouk, M. Moustafa. 2013. Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. *Int. J. Vet. Sci. Med.* 1(1):21-29.
- Agazzi, A., M. Ferroni, A. Fanelli, S. Marocco, G. Invernizzi, V. Dell'Orto, G. Savoini. 2011. Evaluation of the effects of live yeast supplementation on apparent digestibility of high-fiber diet in mature horses using the acid insoluble ash marker modified method. *J. Equine Vet. Sci.* 31(1):13-18.
- Akramienė, D., A. J. Kondrotas, J. Didžiapetrienė, E. Kėvelaitis. 2007. Effects of  $\beta$ -glucans on the immune system. *Medicina.* 43(8):597-606.
- Alamillo, E., M. Reyes-Becerril, A. Cuesta, C. Angulo. 2017. Marine yeast *Yarrowia lipolytica* improves the immune responses in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes. *Fish Shellfish Immunol.* 70:48-56.
- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis. 2002. Helper T Cells and Lymphocyte Activation. Alberts B (ed.). *Molecular Biology of the Cell.* Garland Science. 4th edition. New York, United States.
- Aleem, E., 2013.  $\beta$ -Glucans and their applications in cancer therapy: focus on human studies. *Anticancer Agents Med. Chem.* 13:709-719.
- Ali, I., N. Siwarungson, H. Punnapayak, P. Lotrakul, S. Prasongsuk, W. Bankeeree, S.K. Rakshit. 2014. Screening of potential biotechnological applications from obligate halophilic fungi, isolated from a man-made solar saltern located in *Phetchaburi province*, Thailand. *Pakistan J. Bot.* 46:983-988.
- Alkan, F., V. Gulyaz, M.O. Timurkan, S. Iyisan, S. Ozdemir, N. Turan, V. Martella.. 2012. A large outbreak of enteritis in goat flocks in Marmara, Turkey, by G8P [1] group A rotaviruses. *Arch Virol.* 157(6):1183-1187.
- Al-Qaysi, S. A., H. Al-Haideri, Z. A. Thabit, W. H. A. A. Al-Kubaisy, J. A. A. R. Ibrahim. 2017. Production, Characterization, and Antimicrobial Activity of Mycocin Produced by *Debaryomyces hansenii* DSMZ70238. *Int. J. Microbiol.*
- Aman, A., N. N. Siddiqui, S. A. U. Qader. 2012. Characterization and potential applications of high molecular weight dextran produced by *Leuconostoc mesenteroides* AA1. *Carbohydr. Polym.* 87(1):910-915.
- Andersen, M. H., D. Schrama, P. thor Straten, J. C. Becker. 2006. Cytotoxic T cells. *J. Invest. Dermatol.* 126(1):32-41.

- Andlid T., Juárez R.V., Gustafsson L. 1995. Yeast colonizing the intestine of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and turbot (*Scophthalmus maximus*). *Microb. Ecol.* 30 (3):321-334.
- Angulo, C., M. Maldonado, K. Delgado, M. Reyes-Becerril. 2017. *Debaryomyces hansenii* up regulates superoxide dismutase gene expression and enhances the immune response and survival in Pacific red snapper (*Lutjanus peru*) leukocytes after *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Dev. Comp. Immunol.* 71:18-27.
- Angus, K., W. T. Appleyard, J. D. Menzies, I. Campbell, D. Sherwood. 1982. An outbreak of diarrhoea associated with *Cryptosporidiosis* in naturally reared lambs. *Vet. Record.* 110:29-130.
- Arala-Chaves, M., T. Sequeira. 2000. Is there any kind of adaptive immunity in invertebrates? *Aquaculture.* 191:247-58.
- Ata, F. A., H. S. Al Sumry, G. J. King, S. I. Ismaili, A. A. Ata. 1989. Duration of maternal immunity to peste des petits ruminants. *Vet. Rec.* 124(22):590-591.
- Ataşoğlu, C., H. Akbağ, C. Tölü, G. Daş, T. Savaş, İ. Y. Yurtman. 2010. Effects of kefir as a probiotic source on the performance of goat kids. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 40:363-370.
- Ausubel, F. M. 1999. Short protocols in molecular biology. Editorial John Wiley y Sons. Cuarta Edición. New York, New York, USA. 1104p.
- Azmi, A.S., S. H. Bhat, S. Hanif, S. M. Hadi. 2006. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: a putative mechanism for anticancer properties. *FEBS Lett.* 580:533-538.
- Bancherau, C., R. M. Steinman. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 392:245-252.
- Barth, G., C. Gaillardin. 1996. *Yarrowia lipolytica*. En: Wolf K., K. D. Breunig, G. Barth. (eds.) *Nonconventional Yeasts in Biotechnology. A Handbook.* Springer-Verlag. Berlin and Heidelberg. pp 313-358.
- Batbayar, S., D. H. Lee, H. W. Kim. 2012. Immunomodulation of fungal  $\beta$ -glucan in host defense signaling by dectin-1. *Biomol. Ther.* 20(5):433.
- Bekkering, S., B. A. Blok, L. A. Joosten, N. P. Riksen, R. van Crevel, M. G. Netea. 2016. *In vitro* experimental model of trained innate immunity in human primary monocytes. *Clin. Vaccine Immunol.* 23(12):926-933.
- Benda, V., P. Mádr. 1991. Assessment of lymphocyte and phagocytic functions in goats treated with glucan. *Zoonoses Public. Health.* 38(1-10):681-684.
- Bitencourt, L. L., J. R. M. Silva, B. M. L. D. Oliveira, G. S. Dias Júnior, F. Lopes, S. Siécola Júnior, M. N. Pereira. 2011. Diet digestibility and performance of dairy cows supplemented with live yeast. *Sci. Agric.* 68(3):301-307.
- Bobadilla, F., C. Rodriguez-Tirado, M. Imarai, M. J. Galotto, R. Andersson. 2013. Soluble  $\beta$ -1, 3/1, 6-glucan in seaweed from the southern hemisphere and its immunomodulatory effect. *Carbohydr. polym.* 92(1):241-248.
- Bonfim, C. V., R. L. Mamoni, M. H. S. Lima Blotta. 2009. TLR-2, TLR-4 and dectin-1 expression in human monocytes and neutrophils stimulated by *Paracoccidioides brasiliensis*. *Sabouraudia.* 47(7):722-733.

- Bonilla, W. 2001. Producción de cabras lecheras: Manejo sanitario. Chile: INIA.
- Breuer, U., H. Harms. 2006. *Debaryomyces hansenii*—an extremophilic yeast with biotechnological potential. *Yeast*. 23(6):415-437.
- Bricknell, I., R. A. Dalmo. 2005. The use of immunostimulants in fish larval aquaculture. *Fish Shellfish Immunol*. 19(5):457-472.
- Brown, G. D. 2006. Dectin-1: a signalling non-TLR pattern recognition receptor. *Nature Rev. Immunol*. 6:33-43.
- Brown, G. D., S Gordon. 2001. Immune recognition: a new receptor for  $\beta$ -glucans. *Nature*. 413(6851):36.
- Buffen, K., M. Oosting, J. Quintin, J., A. Ng, J. Kleinnijenhuis, V. Kumar, A. J. Grotenhuis. 2014. Autophagy controls BCG-induced trained immunity and the response to intravesical BCG therapy for bladder cancer. *PLoS pathog*. 10(10):e1004485.
- Cárdenas-Reyna, T., C. Angulo, C. Guluarte, S. Hori-Oshima, M. Reyes-Becerril. 2017. *In vitro* immunostimulatory potential of fungal  $\beta$ -glucans in pacific red snapper (*Lutjanus Peru*) cells. *Dev. Comp. Immunol*. 77:350-358.
- Caruffo, M., N. Navarrete, O. Salgado, A. Díaz, P. López, K. García, P. Navarrete. 2015. Potential probiotic yeasts isolated from the fish gut protect zebrafish (*Danio rerio*) from a *Vibrio anguillarum* challenge. *Front. Microbiol*. 6:1093.
- Casas, I. A., W. J. Dobrogosz. 2000. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in humans and animals. *Microb. Ecol. Health Dis*. 12:247-285.
- Castelli, C., L. Rivoltini, G. Andreola, M. Carrabba, N. Renkvist, G. Parmiani. 2000. T cell recognition of melanoma-associated antigens. *J. Cell Physiol*. 182:323-331.
- Cepeda-Palacios, R., J. M. Ramírez-Orduña, R. Ramírez-Orduña, F. Ascencio, P. Dorchie, C. Angulo. 2015. Identification and characterization of *Eimeria spp.* during early natural infection in goat kids in Baja California Sur, Mexico. *Trop. Subtrop. Agroecosystems*. 18(3).
- Cesta, M. F. 2006. Normal structure, function, and histology of mucosa-associated lymphoid tissue. *Toxicol. Pathol*. 34(5):599-608.
- Chartier, C., C. Paraud. 2012. Coccidiosis due to *Eimeria* in sheep and goats, a review. *Small Ruminant Res*. 103(1):84-92.
- Chaucheyras-Durand, F., N. D. Walker, A. Bach. 2008. Effects of active dry yeasts on the rumen microbial ecosystem: past, present and future. *Anim. Feed Sci. Technol*. 145:5-26.
- Chen, Y.J., O. S. Kwon, B. J. Min, K. S. Son, J. H. Cho, J. W. Hong, I. H. Kim. 2005. The effects of dietary Biotite V supplementation as an alternative substance to antibiotics in growing pigs. *Asian-Aust. J. Anim. Sci*. 18:1642-1645.
- Chen, K. L., B. C. Weng, M. T. Chang, Y. H. Liao, T. T. Chen, C. Chu. 2008. Direct enhancement of the phagocytic and bactericidal capability of abdominal macrophage of chicks by  $\beta$ -1, 3-1, 6-glucan. *Poult. Sci*. 87(11):2242-2249.
- Cheng, S. C., J. Quintin, R. A. Cramer, K. M. Shepardson, S. Saeed, V. Kumar, G. R. Manjeri. 2014. mTOR-and HIF-1 $\alpha$ -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity. *Science*. 345(6204):1250684.

- Chethan, G. E., J. Garkhal, S. Sircar, Y. P. S. Malik, R. Mukherjee, N. R. Sahoo, U. K. De. 2017. Immunomodulatory potential of  $\beta$ -glucan as supportive treatment in porcine rotavirus enteritis. *Vet Immunol Immunopathol.* 191:36-43.
- Cid, D., R. Sanz, I. Marín, H. De Greve, J. A. Ruiz-Santa-Quiteria, R. Amils, R. De la Fuente. 1999. Characterization of Nonenterotoxigenic *Escherichia coli* Strains Producing F17 Fimbriae Isolated from Diarrheic Lambs and Goat Kids. *J. Clin. Microbiol.* 37(5):1370-1375.
- Clambey, E. T., B. Davenport, J. W. Kappler, P. Marrack, D. Homann. 2014. Molecules in medicine mini review: the  $\alpha\beta$  T cell receptor. *J. Mol. Med.* 92(7):735-741.
- Cleary, J. A., G. E. Kelly, A. J. Husband. 1999. The effect of molecular weight and  $\beta$ -1, 6-linkages on priming of macrophage function in mice by (1, 3)- $\beta$ -d-glucan. *Immunol. Cell Bio.* 77(5):395-403.
- Clements, A., J. C. Young, N. Constantinou, G. Frankel. 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microb.* 3(2):71-87.
- Constant, S. L., K. Bottomly. 1997. Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches. *Annu. Rev. Immunol.* 15(1):297-322.
- Davies, L. C., S. J. Jenkins, J. E. Allen, P. R. Taylor. 2013. Tissue-resident macrophages. *Nat. Immunol.* 14(10):986.
- DeFranco, A. L. 1993. Structure and function of the B cell antigen receptor. *Annu. Rev. Cell Biol.* 9(1):377-410.
- de Graaf, D. C., E. Vanopdenbosch, L. M. Ortega-Mora, H. Abbassi, J. E. Peeters. 1999. A review of the importance of cryptosporidiosis in farm animals. *Int. J. Parasitol.* 29(8):1269-1287.
- de Oliveira Silva, V., L. J. Pereira, R. M. Murata. 2017. Oral microbe-host interactions: influence of  $\beta$ -glucans on gene expression of inflammatory cytokines and metabolome profile. *BMC Microbiol.* 17(1):53.
- De Vuyst, L., E. J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. En: De Vuyst, L., E. J. Vandamme (eds). *Bacteriocins of lactic acid bacteria.* Blackie Academic and Professional. Glasgow, United Kingdom. pp 91-142.
- Drolet, R., J. M. Fairbrother, D. Vaillancourt. 1994. Attaching and effacing *Escherichia coli* in a goat with diarrhea. *Can. Vet. J.* 35(2):122.
- Drummond, R. A., G. D. Brown. 2011. The role of dectin-1 in the host defense against fungal infections. *Curr. Opin. Microbiol.* 14:392-399
- Ekwemalor, K., E. Asiamah, B. Osei, H. Ismail, M. Worku. 2017. Evaluation of the Effect of Probiotic Administration on Gene Expression in Goat Blood. *J. Mol. Biol. Res.* 7(1):88.
- Fang, J., Y. Wang, X. Lv, X. Shen, X. Ni, K. Ding. 2012. Structure of a  $\beta$ -glucan from *Grifola frondosa* and its antitumor effect by activating dectin-1/Syk/NF- $\kappa$ B signaling. *Glycoconj. J.* 29: 365-377.
- Faticenti, F., J. L. Bergere, P. Deiana, G. A. Farris. 1983. Antagonistic activity of *Debaryomyces hansenii* towards *Clostridium tyrobutyricum* and *C. butyricum*. *J Dairy Res.* 50(4):449-457.

- Ferwerda, G., M. G. Netea, L. A. Joosten, J. W. M. van der Meer, L. Romani, B. J. Kullberg. 2010 The role of toll-like receptors and C-type lectins for vaccination against *Candida albicans*. *Vaccine*. 28:614-622.
- Foster, J. R. 2001. The functions of cytokines and their uses in toxicology. *Int. J. Exp. Pathol.* 82(3):171-192.
- Forrester, S. J., D. S. Kikuchi, M. S. HeARNdes, Q. Xu, K. K. Griendling. 2018. Reactive oxygen species in metabolic and inflammatory signaling. *Circ. Res.* 122(6):877-902.
- Gantner, B. N., R. M. Simmons, S. J. Canavera, S. Akira, D. M. Underhill. 2003. Collaborative induction of inflammatory responses by dectin-1 and toll-like receptor 2. *J. Exp. Med.* 197:1107-1117.
- Garcia-Valtanen, P., R. M. Guzman-Genuino, D. L. Williams, J. D. Hayball, K. R. Diener. 2017. Evaluation of trained immunity by  $\beta$ -1, 3 (d)-glucan on murine monocytes *in vitro* and duration of response *in vivo*. *Immunol. Cell Biol.* 95(7):601-610.
- Gersuk, G. M., D. M. Underhill, L. Zhu, K. A. Marr. 2006. Dectin-1 and TLRs permit macrophages to distinguish between different *Aspergillus fumigatus* cellular states. *J. Immunol.* 176:3717-3724.
- Ghosh, S., M. J. May, E. B. Kopp. 1998. NF- $\kappa$ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 16:225–260.
- Goldman, A. S., B. S. Prabhakar. 1996. *Immunology Overview*. Ed: Baron, S. (eds.). Medical Microbiology. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
- Gonzalez-Hernandez, J.C., M. Jimenez-Estrada, A. Pena. 2005. Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles.* 9:7-16.
- Gormley, P. D., A. O. Powell-Richards, A. Azuara-Blanco, L. A. Donoso, H. S. Dua. 1998. Lymphocyte subsets in conjunctival mucosa-associated lymphoid-tissue after exposure to retinal-S-antigen. *Int. Ophthalmol.* 22:77–80.
- Greenblatt, M. B., A. Aliprantis, B. Hu, L. H. Glimcher. 2010. Calcineurin regulates innate antifungal immunity in neutrophils. *J. Exp. Med.* 207:923-931.
- Gringhuis, S. I., J. Den Dunnen, M. Litjens, M. Van Der Vlist, B. Wevers, S. C. Bruijns, T. B. Geijtenbeek. 2009. Dectin-1 directs T helper cell differentiation by controlling noncanonical NF- $\kappa$ B activation through Raf-1 and Syk. *Nat. Immunol.* 10(2):203-213.
- Guerra-Maupome, M., D. X. Vang, J. L. McGill. 2019. Aerosol vaccination with Bacille Calmette-Guerin induces a trained innate immune phenotype in calves. *PloS one.* 14(2):e0212751.
- Guillot, J.F. 2003. Probiotic feed additives. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 26:52-55.
- Gundogan, N., S. Citak S., N. Yucel, A. Devren. 2005. A note on the incidence and antibiotic resistance of *Staphylococcus aureus* isolated from meat and chicken samples. *Meat Sci.* 69:807-10.
- Halleraker, M., T. Landsverk, L. Nicander. 1990. Organization of ruminant Peyer's patches as seen with enzyme histochemical markers of stromal and accessory cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 26(1):93-104.

- Hammond, E.G., B. A. Glatz. 1988. Biotechnology applied to fats and oils. En: King, R. D., P. S. J. Cheetham (eds). Food Biotechnology. Elsevier Applied Science. London. pp 173-216.
- Hickstein, D. D., D. M. Baker, K. A. Gollahon, A. L. Back. 1992. Identification of the promoter of the myelomonocytic leukocyte integrin CD11b. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89(6):2105-2109.
- Hofmeyer, T., S. I. Bulani, J. Grzeschik. 2014. Protein Production in *Yarrowia lipolytica* Via Fusion to the Secreted Lipase Lip2p. Mol. Biotechnol. 56:79.
- Holland, R. E. 1990. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals. Clin. Microbiol. Rev. 3:345-375.
- Huff, G. R., V. Dutta, W. E. Huff, N. C. Rath. 2011. Effects of dietary yeast extract on turkey stress response and heterophil oxidative burst activity. Br. Poult. Sci. 52(4):446-455.
- Ifrim, D. C., J. Quintin, L. A. Joosten, C. Jacobs, T. Jansen, L. Jacobs, M. G. Netea. 2014. Trained immunity or tolerance: opposing functional programs induced in human monocytes after engagement of various pattern recognition receptors. Clin. Vaccine Immunol. 21(4):534-545.
- Iliev, I. D., V. A. Funari, K. D. Taylor, Q. Nguyen, C. N. Reyes, S. P. Strom, J. I. Rotter. 2012. Interactions between commensal fungi and the C-type lectin receptor Dectin-1 influence colitis. Science, 1221789.
- Isolauri, E., J. Joensuu, H. Soumalainen, M. Luomala, T. Vesikari. 1995. Improved immunogenicity of oral D3 RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. Vaccine. 13:310-312.
- Iwashita, M. K. P., I. B. Nakandakare, J. S. Terhune, T. Wood, M. J. T. Ranzani-Paiva. 2015. Dietary supplementation with *Bacillus subtilis*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus oryzae* enhance immunity and disease resistance against *Aeromonas hydrophila* and *Streptococcus iniae* infection in juvenile tilapia *Oreochromis niloticus*. Fish Shellfish Immunol. 43(1):60-66.
- Jakubzick, C. V., G. J. Randolph, P. M. Henson. 2017. Monocyte differentiation and antigen-presenting functions. Nat. Rev. Immunol. 17(6):349-362.
- Janeway, C. A., R. Medzhitov. 2002. Innate immune recognition. Annu. Rev. Immunol. 20:197-216.
- Jensen, K. H., B. M. Damgaard, L. O. Andresen, E. Jørgensen, L. Carstensen. 2013. Prevention of post weaning diarrhoea by a *Saccharomyces cerevisiae*-derived product based on whole yeast. Anim. Feed Sci. Technol. 183(1):29-39.
- Jouault, T., S. Iyata-Ombetta, O. Takeuchi, P. A. Trinel, P. Sacchetti, P. Lefebvre, S. Akira, D. Poulain. 2003. *Candida albicans* phospholipomannan is sensed through toll-like receptors. J. Infect. Dis. 188(1):165-172.
- Kantari, C., M. Pederzoli-Ribeil, V. Witko-Sarsat. 2008. The role of neutrophils and monocytes in innate immunity. En: Egesten, A., A. Schmidt, H. Herwald (eds.). Trends in Innate Immunity. Karger Medical and Scientific Publishers. pp 118-146.
- Kardono, L.B., I. P. Tjahja, N. Artanti, J. Manuel. 2013. Isolation, characterization and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity of crude beta glucan from silver ear mushroom (*Tremella fuciformis*). Int. J. Biol. Sci. 13(5):406-411.

- Karumuthil-Melethil, S., R. Gudi, B. M. Johnson, N. Perez, C. Vasu. 2014. Fungal  $\beta$ -glucan, a Dectin-1 ligand, promotes protection from type 1 diabetes by inducing regulatory innate immune response. *J. Immunol.* 140:186.
- Karin, M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogenactivated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 270:16483-16486.
- Kawai, T., S. Akira. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity.* 34(5):637-650.
- Kelly, K. U. Siebenlist. 1995. Immediate early genes induced by antigen receptor stimulation. *Curr. Opin. Immunol.* 7:327-32.
- Kemenade, B. M. L. V., A. Groeneveld, B. T. T. M. Rens, J. H. W. M. Rombout. 1994. Characterization of macrophages and neutrophilic granulocytes from the pronephros of carp (*Cyprinus carpio*). *J. Exp. Biol.* 187:143-158
- Kerrigan, A. M., G. D. Brown. 2010. Syk-coupled C-type lectin receptors that mediate cellular activation via single tyrosine based activation motifs. *Immunol. Rev.* 234:335-352.
- Khalkhane, A. S., K. Abbasi, F. S. Zadeh, A. H. Arian. 2013. Effect of dietary beta-glucan supplementation on humoral and cellular immunologic factors in lambs. *Glob. Vet.* 11(1):38-43.
- Kim, G. Y., G. S. Choi, S. H. Lee, Y. M. Park, 2004. Acidic polysaccharide isolated from *Phellinus linteus* enhances through the upregulation of nitric oxide and tumor necrosis factor-alpha from peritoneal macrophages. *J. Ethnopharmacol.* 95:69-76.
- Kim, S.H., C. I. Wei, Y. M. Tzou. 2005. An H. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from farm environments and retail products in Oklahoma. *J. Food Prot.* 68:2022-9.
- Klaenhammer, T.R., M. J. Kullen. 1999. Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 50:45-57.
- Kleinnijenhuis, J., J. Quintin, F. Preijers, L. A. Joosten, D. C. Iffrim, S. Saeed, R. J. Xavier. 2012. Bacille Calmette-Guerin induces NOD2-dependent nonspecific protection from reinfection via epigenetic reprogramming of monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109(43):17537-17542.
- Koop-Hoolihan, L. 2001. Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: A review. *J. Am. Diet. Assoc.* 101(2):229-241.
- Krehbiel, C. R., S. R. Rust, G. Zhang, S. E. Gilliland. 2003. Bacterial direct-fed microbials in ruminant diets: Performance response and mode of action. *J. Anim. Sci.* 81(14Suppl2):120-132.
- Kruger P., M. Saffarzadeh, A. N. R. Weber, N. Rieber, M. Radsak, H. von Bernuth. 2015. Neutrophils: Between Host Defence, Immune Modulation, and Tissue Injury. *PLoS Pathog.* 11(3).
- Kuhn, I., A. Iversen, M. Finn, C. Greko, L. G. Burman, A. R. Blanch, X. Vilanova, A. Manero, H. Taylor, J. Caplin, L. Domtnguez, I. A. Herrero, M. A. Moreno, R. Mollby. 2005. Occurrence and Relatedness of Vancomycin-Resistant *Enterococci* in Animals, Humans, and the Environment in Different European Regions. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5383-5390.

- Lacy, P., J. L. Stow. 2011. Cytokine release from innate immune cells: association with diverse membrane trafficking pathways. *Blood*. 118(1):9-18.
- Landsverk, T., M. Halleraker, M. Aleksandersen, S. McClure, W. Hein, I. Nicander. 1991. The intestinal habitat for organized lymphoid tissues in ruminants; comparative aspects of structure, function and development. *Vet. Immunol. Immunophatol.* 28:1-16.
- Lee, W. L., R. E. Harrison, S. Grinstein. 2003. Phagocytosis by neutrophils. *Microbes Infect.* 5(14):1299-1306.
- Leentjen, J., J. Quintin, J. Gerretsen, M. Ko, P. Pickkers, M. G. Netea. 2014. The effects of orally administered beta-glucan on innate immune responses in humans, a randomized open-label intervention pilot-study. *PloS one.* 9(9):e108794.
- Levy, O., M. G. Netea. 2013. Innate immune memory: implications for development of pediatric immunomodulatory agents and adjuvanted vaccines. *Pediatr. Res.* 75(1-2):184-188.
- Li Q., I. M. Verma. 2002. NF- $\kappa$ B regulation in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* 2(10):725-734.
- Linzell, J. L., M. Peaker. 1971. Mechanism of milk secretion. *Physiol. Rev.* 51(3):564-597.
- Litwack, G., 1995. Photometric determination of lysozyme activity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 89 (3):401-403.
- Lu, Y. C., W. C. Yeh, P. S. Ohashi. 2008. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine.* 42(2):145-151.
- Luckheeram R. V., R. Zhou, A. D. Verma, B. Xia. 2012. CD4+ T cells: differentiation and functions. *Clin. Dev. Immunol.*
- Mahmood, A. K., M. S. Khan, M. A. Khan, M. A. Khan, M. Bilal. 2014. Prevalence of *salmonella* in diarrheic adult goats in field conditions. *J. Anim. Plant. Sci.* 24:98-102.
- Małaczewska, J., R. Wójcik, L. Jung, A. K. Siwicki. 2010. Effect of Biolex  $\beta$ -HP on selected parameters of specific and non-specific humoral and cellular immunity in rats. *Bull. Vet. Inst. Pulawy.* 54:75-80.
- Marcinkiewicz, J. 1997. Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. *Immunopharmacology.* 37(1):35-41.
- Maron, D. F., T. J. Smith, K. E. Nachman. 2013. Restrictions on antimicrobial use in food animal production: an international regulatory and economic survey. *Global. Health.* 9(1):48.
- Martins, F. S., S. D. Elia, A. T. Vieira, F. C. Tiago, A. K. Martins, F. C. Silva, C. A. Bonjardim. 2011. Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. *Int. J. Med. Microbiol.* 301(4):359-364.
- Masuda, Y., T. Togo, S. Mizuno, M. Konishi, H. Nanba. 2012. Soluble  $\beta$ -glucan from *Grifola frondosa* induces proliferation and dectin-1/Syk signaling in resident macrophages via the GM-CSF autocrine pathway. *J. Leukoc. Biol.* 91:547-556.

- Matthijnssens, J., M. Ciarlet, S. M. McDonald, H. Attoui, K. Bányai, J. R. Brister, J. Buesa, M. Iturriza-Gómara. 2011. Uniformity of rotavirus strain nomenclature proposed by the Rotavirus Classification Working Group (RCWG). *Arch. Virol.* 156(8):1397-1413.
- Mauri, C., A. Bosma. 2012. Immune Regulatory Function of B Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 30:221–41.
- McDonel, J. L. 1980. *Clostridium perfringens* toxins (type a, b, c, d, e). *Pharmacol. Ther.* 10(3):617-655.
- McGreal, E. P., J. L. Miller, S. Gordon. 2005. Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 17:18–24.
- Mebius, R. E., G. Kraal. 2005. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.* 5(8):606-616.
- Medina-Córdova, N., M. Reyes-Becerril, F. Ascencio, T. Castellanos, A. I. Campa-Córdova, C. Angulo. 2018. Immunostimulant effects and potential application of  $\beta$ -glucans derived from marine yeast *Debaryomyces hansenii* in goat peripheral blood leucocytes. *Int. J. Biol. Macromol.* 116:599–606.
- Meena, D. K., P. Das, S. Kumar, S. C. Mandal, A. K. Prusty, S. Singh, S. C. Mukherjee. 2013. Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiol. Biochem.* 39(3):431-457.
- Mohammed, R. A., O. A. Idris, E. B. Abdelsalam. 2000. The effect of coccidian infection on the gut microflora of Nubian goat kids. *Deut. Tierarztl. Woch.* 107(10): 414-416.
- Migalovich-Sheikhet, H., S. Friedman, D. Mankuta, F. Levi-Schaffer. 2012. Novel identified receptors on mast cells. *Front. Immunol.* 3:238.
- Muñoz, M., M. Alvarez, I. Lanza, P. Carmenes. 1996. Role of enteric pathogens in the aetiology of neonatal diarrhoea in lambs and goat kids in Spain. *Epidemiol. Infect.* 117(1):203-211.
- Musa, H. H., S. L. Wu, C. H. Zhu, H. I. Seri, G. Q. Zhu. 2009. The Potential benefits of Probiotics in animal production and health. *J. Anim. Vet. Adv.* 8:313-321.
- Myers, M. J., M. P. Murtaugh. 1995. Cytokines in animal health and disease. Marcel Dekker. New York
- Nagy, B., G. Nagy, V. Palfi, M. Bozso. 1983. Occurrence of *Cryptosporidia*, *rotaviruses*, coronavirus-like particles and K99+ *Escherichia coli* in goat kids and lambs. En: Proceedings of the third international symposium of the World Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians (3<sup>o</sup>, 1983, Ames, Iowa, USA). pp 525-531.
- Netea, M. G., N. A. Gow, C. A. Munro, S. Bates, C. Collins, G. Ferwerda, L. Jacobs. 2006. Immune sensing of *Candida albicans* requires cooperative recognition of mannans and glucans by lectin and Toll-like receptors. *J. Clin. Invest.* 116(6): 1642-1650.
- Netea, M. G., L. A. Joosten, E. Latz, K. H. Mills, G. Natoli, H. G. Stunnenberg, R. J. Xavier. 2016. Trained immunity: a program of innate immune memory in health and disease. *Science.* 352(6284):aaf1098.
- Neubauer, H. P., H. H. Schone. 1979. Transfer of insulin-binding antibodies from nanny goats to kids. *Am. J. Vet. Res.* 40:962-965.

- Neumann, N. F., D. Fagan, M. Belosevi. 1995. Macrophage activating factor (s) secreted by mitogen stimulated goldfish kidney leukocytes synergize with bacterial lipopolysaccharide to induce nitric oxide production in teleost macrophages. *Dev. Comp. Immunol.* 19:473-482.
- Nezlin, R. S. 1998. *The immunoglobulins: structure and function.* Academic press.
- OMS/FAO. 2006. *Probiotics in food.* Rome, Italy. ISSN 0254-4725.
- O'Neill, L. A., R. J. Kishton, J. Rathmell. 2016. A guide to immunometabolism for immunologists. *Nat. Rev. Immunol.* 16(9):553.
- Oren, A. 2010. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ. Technol.* 31:825–834.
- Osińska, I., K. Popko, U. Demkow. 2014. Perforin: an important player in immune response. *Cent. Eur. J. Immunol.* 39(1):109-115.
- Park S. C., M. H. Hwang, Y. H. Kim, J. C. Kim, J. C. Song, K. W. Lee, T. W. Kim. 2006. Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22(1):35-37.
- Peters, B. M., M. E. Shirliff, M. A. Jabra-Rizk. 2010. Antimicrobial peptides: primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* 6:e1001067.
- Petersen, K. M., L. Jespersen. 2004. Genetic diversity of the species *Debaryomyces hansenii* and the use of chromosome polymorphism for typing of strains isolated from surfaceripened cheeses. *J. Appl. Microbiol.* 97:205-213.
- Petit, J., G. F. Wiegertjes. 2016. Long-lived effects of administering  $\beta$ -glucans: indications for trained immunity in fish. *Dev. Comp. Immunol.* 64:93-102.
- Petrunov, B., P. Nenkov, R. Shekerdjiisky. 2007. The role of immunostimulants in immunotherapy and immunoprophylaxis. *Biotechnol. Equip.* 21(4): 454-462.
- Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RTPCR. *Nucleic. Acids. Res.* 29(9):45.
- Piccione, G., C. Bertolucci, C. Giannetto, E. Giudice. 2008. Clotting profiles in newborn Maltese kids during the first week of life. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20(1):114-118.
- Pisarska, A., T. Stefaniak, M. Popławski, M. Przewoźny, R. Ratajski, A. Polak, W. Nowacki. 2002. Transfer of mateARNI passive immunity to kids in goat herd. *Polish. J. Vet. Sci.* 5:251-255.
- Poli, A., G. Anzelmo, B. Nicolaus. 2010. Exopolysaccharides from Extreme Marine Habitats: Production, Characterization and Biological Activities. *Mar. Drugs.* 8:1779–1802.
- Pritchard, G.C. 1988. Throat swellings in goats. *Goat Vet. Soc. J.* 10(1): 34-7.
- Quintin, J., S. Saeed, J. H. A. Martens, E. J. Giamarellos-Bourboulis, D. C. Ifrim, C. Logie, L. Jacobs, T. Jansen, B. J. Kullberg, C. Wijmenga, L. A. B. Joosten, R. K. Xavier, J. W. M. van der Meer, H. G. Stunnenberg, M. G. Netea. 2012. *Candida albicans* infection affords protection against reinfection via functional reprogramming of monocytes. *Cell Host Microbe.* 12:223–232.
- Rao, A. 1994. NF-ATp: a transcription factor required for the co-ordinate induction of several cytokine genes. *Immunol. Today.* 15:274–81.

- Rao, A., C. Luo, P. G. Hogan. 1997. Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15(1):707-747.
- Reyes-Becerril, M., C. Guluarte, D. Ceballos-Francisco, C. Angulo, M. Á. Esteban. 2017. Dietary yeast *Sterigmatomyces halophilus* enhances mucosal immunity of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 64:165-175.
- Reyes-Becerril M., C. Angulo, N. Estrada, Y. Murillo, F. Ascencio-Valle. 2014. Dietary administration of microalgae alone or supplemented with *Lactobacillus sakei* affects immune response and intestinal morphology of Pacific red snapper (*Lutjanus peru*). *Fish Shellfish Immunol.* 40(1):208-216.
- Reyes-Becerril, M., F. Ascencio-Valle, J. Meseguer, S. T. Tapia-Paniagua, M. A. Moriñigo, M.Á. Esteban. 2012. *Debaryomyces hansenii* L2-enriched diet enhances the immunity status, gene expression and intestine functionality in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquac. Res.* 43(8):1107-1118.
- Reyes-Becerril, M., I. Salinas, A. Cuesta, J. Meseguer, D. Tovar-Ramirez, F. Ascencio-Valle, M. Á. Esteban. 2008. Oral delivery of live yeast *Debaryomyces hansenii* modulates the main innate immune parameters and the expression of immune-relevant genes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol.* 25(6):731-739.
- Reynolds, J. D., B. Morris. 1983. The evolution and involution of Peyer's patches in fetal and postnatal sheep. *Eur. J. Immunol.* 13(8):627-635.
- Reynolds, J. D., R. Pabst, G. Bordmann. 1985. Evidence for the existence of two distinct types of Peyer's patches in sheep. *Adv. Exp. Med. Biol.* 186:101-109.
- Riccardi, C., I. Nicoletti. 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. prot.* 1(3):1458.
- Riss, T. L., R. A. Moravec, A. L. Niles, S. Duellman, H. A. Benink, T. J. Worzella, L. Minor. 2016. Cell viability assays. En *Assay Guidance Manual*. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences.
- Rizzetto, L., D. C. Ifrim, S. Moretti, N. Tocci, S. C. Cheng, J. Quintin, B. A. Blok. 2016. Fungal chitin induces trained immunity in human monocytes during cross-talk of the host with *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 291(15):7961-7972.
- Robinson, J. M. 2008. Reactive oxygen species in phagocytic leukocytes. *Histochem. Cell Biol.* 130(2):281-297.
- Robinson, M. J., F. Osorio, M. Rosas, R. P. Freitas, E. Schweighoffer, O. Groß, L. F. Moita. 2009. Dectin-2 is a Syk-coupled pattern recognition receptor crucial for Th17 responses to fungal infection. *J. Exp. Med.* 206(9):2037-2051.
- Rodríguez, A., M. Esteban, J. Meseguer. 2003. Phagocytosis and peroxidase release by seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes in response to yeast cells. *Anat. Rec.* 272(1):415-423.
- Rolfe, R. D. 2000. The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J. Nutr.* 130(2S):396S-402S.
- Rop, O., J. Mlcek, T. Jurikova. 2009. Beta-glucans in higher fungi and their health effects. *Nutr rev.* 67(11):624-631.
- Rotherberg, M. E., S. P. Hoga S.P. 2006. The eosinophil. *Ann. Rev. Immunol.* 24:147-174.

- Rubin-Bejerano, I., C. Abeijon, P. Magnelli, P. Grisafi, G. R. Fink. 2007. Phagocytosis by human neutrophils is stimulated by a unique fungal cell wall component. *Cell Host Microbe*. 2(1):55-67.
- Saeed, S., J. Quintin, H. H. D. Kerstens, N. A. Rao, A. Aghajani-refah, F. Matarese, N. Sharifi. 2014. Epigenetic programming of monocyte-to-macrophage differentiation and trained innate immunity. *Science*. 345:1251086.
- Saijo, S., Y. Iwakura. 2011 Dectin-1 and dectin-2 in innate immunity against fungi. *Int. Immunol*. 23:467-472.
- Sandine, W. E. 1979. Roles of *Lactobacillus* in the intestinal tract. *J. Food Prot*. 42(3):259-262.
- Santecchia, I., F. Vernel-Pauillac, O. Rasid, J. Quintin, M. Gomes-Solecki, I. G. Boneca, C. Werts. 2019. Innate immune memory through TLR2 and NOD2 contributes to the control of *Leptospira interrogans* infection. *PLoS pathog*. 15(5):e1007811.
- Schneider, E., N. Thieblemont, M. L. De Moraes, M. Dy. 2010. Basophils: new players in the cytokine network. *Eur Cytokine Netw*. 21:142–153.
- Scothorne, R. J. 1985. The spleen: structure and function. *Histopathology*. 9(6): 663.
- Sekova, V. Y., N. N. Gessler, E. P. Isakova, A. N. Antipov, D. I. Dergacheva, Y. I. Deryabina, E. V. Trubnikova. 2015. Redox status of extremophilic yeast *Yarrowia lipolytica* during adaptation to pH-stress. *Appl. Biochem. Microbiol*. 51(6): 649-654.
- Seva, J., F. J. Pallarés, M. A. Gómez, A. BeARNbé, J. A. Navarro. 1999. Sistema inmune asociado al intestino en la cabra: distribución y evolución de las poblaciones linfocitarias. En: *Anales de Veterinaria de Murcia*. pp 42-58.
- Singh, D. D., R. V. S. Pawaiya, K. Gururaj, N. K. Gangwar, A. K. Mishra, R. Singh, A. Kumar. 2018. Detection of *Clostridium perfringens* toxinotypes, enteropathogenic *E. coli*, rota and corona viruses in the intestine of neonatal goat kids by molecular techniques. *Indian J. Anim. Sci*. 88(6):655-661.
- Sivangala, R., G. Sumanlatha. 2015. Cytokines that mediate and regulate immune responses. *Innovat. Immunol*. 1-26.
- Smith, S. G., J. Kleinnijenhuis, M. G. Netea, H. M. Dockrell. 2017. Whole blood profiling of bacillus Calmette–Guérin-induced trained innate immunity in infants identifies epidermal growth factor, IL-6, platelet-derived growth factor-AB/BB, and natural killer cell activation. *Front. Immunol*. 8:644.
- Society for Japanese Chemotherapy. 1990. Standards methods for liquid microdilution antimicrobial susceptibility test. *Chemother*. 38:103-106.
- Sohrabi, Y., S. M. Lagache, S. Lucia, R. Godfrey, F. Kahles, D. Bruemmer, H. Findeisen. 2018. mTOR-dependent oxidative stress regulates oxLDL-induced trained innate immunity in human monocytes. *Front. Immunol*. 9:3155.
- Sonck, E., E. Stuyven, B. Goddeeris, E. Cox. 2010. The effect of beta-glucans on porcine leukocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol*. 135(3-4):199-207.
- Sougioultzis, S., S. Simeonidis, K. R. Bhaskar, X. Chen, P. M. Anton, S. Keates, C. P. Kelly. 2006. *Saccharomyces boulardii* produces a soluble anti-inflammatory factor that inhibits NF- $\kappa$ B-mediated IL-8 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 343(1):69-76.

- Spika, J. S., S. H. Waterman, G. W. Hoo, M. E. Louis, R. E. Pacer, S. M. James, M. L. Bissett, L. W. Mayer, J. Y. Chiu, M. E. Potter, M. L. Cohen, P. A. Blake. 1987. Chloramphenicol-resistant *Salmonella* Newport traced through hamburger to dairy farms. A major persisting source of human salmonellosis in California. *N. Engl. J. Med.* 316:565-570.
- Starr, T., T. J. Bauler, P. Malik-Kale, O. Steele-Mortimer O. 2018. The phorbol 12-myristate-13-acetate differentiation protocol is critical to the interaction of THP-1 macrophages with *Salmonella Typhimurium*. *PloS one.* 13(3):e0193601.
- Stella, A. V., R. Paratte, L. Valnegri, G. Cigalino, G. Soncini, E. Chevaux, G. Savoini. 2007. Effect of administration of live *Saccharomyces cerevisiae* on milk production, milk composition, blood metabolites, and faecal flora in early lactating dairy goats. *Small Rumin. Res.* 67(1):7-13.
- Stuyven, E., E. Cox E., S. Vancaeneghem, S. Arnouts, P. Deprez, B. M. Goddeeris. 2009. Effect of  $\beta$ -glucans on an ETEC infection in piglets. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 128(1–3):60–66.
- Sugawara, T., S. Takahashi, M. Osumi, N. Ohno. 2004. Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 339(13):2255-2265.
- Sukumaran, V., D. W. Lowman, T. P. Sajeevan, R. Philip. 2010. Marine yeast glucans confer better protection than that of baker's yeast in *Penaeus monodon* against white spot syndrome virus infection. *Aquac. Res.* 41(12):1799-1805.
- Synytysya, A., M. Novak. 2014. Structural analysis of glucans. *Ann. Transl. Med.* 2(2).
- Tao, X., S. Constant, P. Jorritsma, K. Bottomly. 1997. Strength of TCR Signal Determines the Costimulatory Requirements for Th1 and Th2 CD4+ T Cell Differentiation. *J. Immunol.* 159(12):5956–5963.
- Thacker, E. L. 2010. Immunomodulators, immunostimulants, and immunotherapies in small animal veterinary medicine. *Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.* 40(3):473-483.
- Tilney, N. L. 1971. Patterns of lymphatic drainage in the adult laboratory rat. *J. Anat.* 109:369-83.
- Tizard, I. R. 2013. *Inmunología veterinaria*. Interamericana McGraw-hill. México.
- Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez, R. Lésel. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture.* 204(1-2):113-123
- Trinchieri, G. 1989. Biology of natural killer cells. *Adv. Immunol.* 47:187–376.
- Tourais-Esteves, I., N. BeARNrdet, S. Lacroix-Lamande, S. Ferret-BeARNrd, F. Laurent. 2008. Neonatal goats display a stronger TH1-type cytokine response to TLR ligands than adults. *Dev. Comp. Immunol.* 32:1231–1241.
- Uchiyama, H., A. Iwai, Y. Asada, D. Muramatsu, S. Aoki, K. Kawata, T. Miyazaki. 2012. A small scale study on the effects of oral administration of the  $\beta$ -glucan produced by *Aureobasidium pullulans* on milk quality and cytokine expressions of Holstein cows, and on bacterial flora in the intestines of Japanese black calves. *BMC Res. Notes.* 5(1):189.

- Unanue, E. R. 1984. Antigen-presenting function of the macrophage. *Annu. Rev. Immunol.* 2(1):395-428.
- US Pharmacopoeia. Beta glucan from bakers yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). En: Food chemicals codex seventh edition third supplement U. Pharmacopoeia. US Pharmacopoeia, 2011.
- Uzal F. A., J. G. Songer. 2008. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20(3):253-265.
- Van den Bossche, J., L. A. O'Neill, D. Menon. 2017. Macrophage immunometabolism: where are we (going)? *Trends Immunol.* 38(6):395-406.
- van der Heijden, C. D., M. P. Noz, L. A. Joosten, M. G. Netea, N. P. Riksen, S. T. Keating. 2018. Epigenetics and trained immunity. *Antioxid. Redox Signal.* 29(11):1023-1040.
- Van der Meer, J. W., L. A. Joosten, N. Riksen, M. G. Netea. 2015. Trained immunity: a smart way to enhance innate immune defence. *Mol. Immunol.* 68(1):40-44.
- Vetvicka V., B. P. Thornton, G. D. Ross. 1996. Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells. *J. Clin. Invest.* 98(1):50-61.
- Vetvicka, V., C. Oliveira. 2014.  $\beta$  (1–3)(1-6)-D-glucans modulate immune status in pigs: potential importance for efficiency of commercial farming. *Ann. Transl. Med.* 2(2).
- Vetvicka, V., J. Vetvickova, J. Frank, J. C. Yvin. 2008. Enhancing effects of new biological response modifier beta-1,3 glucan sulfate PS3 on immune reactions. *Biomed. Pharmacother.* 62:283–288.
- Vivier, E., E. Tomasello, M. Baratin, T. Walzer, S. Ugolini. 2008. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* 9(5):503-510.
- Vohra, A., P. Syal, A. Madan. 2016. Probiotic yeasts in livestock sector. *Anim- Feed Sci- Technol.* 219:31-47.
- Walachowski, S., G. Tabouret, M. Fabre, G. Foucras. 2017. Molecular analysis of a short-term model of  $\beta$ -glucans-trained immunity highlights the accessory contribution of GM-CSF in priming mouse macrophages response. *Front. Immunol.* 8:1089.
- Weiss, L. 1972. Cells and tissues of the immune system: structure, functions, interactions. *Foundations of immunology series.* Englewood Cliffs. Prentice-Hall. New Jersey. 252p.
- Weiss, A., D. R. Littman. 1994. Signal transduction by lymphocyte antigen receptors. *Cell.* 76:263-74.
- Wennberg, E. M. M. A., L. E. O. N. Weiss. 1969. The structure of the spleen and hemolysis. *Annu. Rev. Med.* 20(1):29-40.
- Willard-Mack, C. L. 2006. Normal structure, function, and histology of lymph nodes. *Toxicol. Pathol.* 34(5):409-424.
- Williams, A. E. 2012 *Immunology: Mucosal and body surface defences.* Wiley-Blackwell. Oxford, England. 472p.

- Williams, D. L., R. B. McNamee, E. L. Jones, H. A. Pretus, H. E. Ensley, I. W. Browder, N. R. Di Luzio. 1991. A method for the solubilization of a (1→3)- $\beta$ -D-glucan isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carbohydr. Res.* 219:203-213.
- Wilson, W., D. Lowman, S. P. Antony, J. Puthumana, I. B. Singh, R. Philip. 2015. Immune gene expression profile of *Penaeus monodon* in response to marine yeast glucan application and white spot syndrome virus challenge. *Fish Shellfish Immunol.* 43(2):346-356.
- Wu, Y. S., S. Y. Liao, C. T. Huang, F. H. Nan. 2016. Beta 1, 3/1, 6-glucan and vitamin C immunostimulate the non-specific immune response of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). *Fish Shellfish Immunol.* 57:269-277.
- Xu, S., J. Huo, K. G. Lee, T. Kurosak, K. P. Lam. 2009. Phospholipase Cg2 is critical for dectin-1-mediated Ca<sup>2+</sup> flux and cytokine production in dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 284:7038-7046.
- Yuan, C., J. Gao, J. Guo, L. Bai, C. Marshall, Z. Cai, M. Xiao. 2014. Dimethyl sulfoxide damages mitochondrial integrity and membrane potential in cultured astrocytes. *PloS one.* 9(9):e107447.
- Zandi, E., D. M. Rothwarf, M. Delhase, M. Hayakawa, M. Karin. 1997. The I $\kappa$ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell.* 91(2):243-252.
- Zhang, L. N., L. Chen, X. J. Xu, Y. L. Lin, P. C. K. Cheung, J. F. Kennedy. 2005. Comparison on chain stiffness of a water-insoluble (1-3)- $\alpha$ -D-glucan isolated from *Poria cocos* mycelia and its sulfated derivative. *Carbohydr. Polym.* 59:257-263.
- Zicarelli, F., L. Addi, R. Tudisco, S. Calabrò, P. Lombardi, M. I. Cutrignelli, F. Infascelli. 2016. The influence of diet supplementation with *Saccharomyces cerevisiae* or *Saccharomyces cerevisiae* plus *Aspergillus oryzae* on milk yield of *Cilentana grazing* dairy goats. *Small Rumin. Res.* 135:90-94.