

*Revista Electrónica Nova Scientia*

Efecto *in vitro* de una bacteria  
inmunoestimulante en la morfología de  
monocitos de bovino  
*in vitro* effect of an immunostimulant bacteria  
on the morphology of bovine monocytes

**C.R. Bautista-Garfias<sup>1</sup>, A. Rodríguez-Lozano<sup>1</sup>, J. A.  
Álvarez-Martínez<sup>1</sup>, C. Rojas-Martínez<sup>1</sup> y J.V. Figueroa-  
Millán<sup>1</sup>**

---

<sup>1</sup>Centro de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria, INIFAP,  
Jiutepec, Morelos

---

México

Carlos Ramón Bautista Garfias. E-mail: [bautista.carlos@inifap.gob.mx](mailto:bautista.carlos@inifap.gob.mx)

## Resumen

Con objeto de evaluar cambios en la morfología celular como signo de activación, se obtuvieron monocitos de sangre periférica de cuatro bovinos adultos y se cultivaron *in vitro* en presencia o no de *Lactobacillus casei*. A las 48 y 72 horas después de la exposición a la bacteria, las células se tiñeron y en el microscopio óptico se determinó la circunferencia de la membrana plasmática (CMP) y la máxima longitud del citoplasma (MLC). Los promedios obtenidos ( $\pm$  EEM) de la CMP y MLC (n=20/bovino) para las células testigo (T) y tratadas con *L. casei* (LC), fueron para CMP: 41.54 ( $\pm$  2.08)  $\mu\text{m}$  para T y 61.53 ( $\pm$  2.30)  $\mu\text{m}$  para LC a las 48 horas (P<0.05) y de 35.80 ( $\pm$  1.49)  $\mu\text{m}$  para T y de 68.90 ( $\pm$  8.8)  $\mu\text{m}$  para LC a las 72 horas (P<0.05). Los valores promedios de la MLC obtenidos fueron de 13.08 ( $\pm$  1.05)  $\mu\text{m}$  para T y 19.34 ( $\pm$  0.86)  $\mu\text{m}$  para LC a las 48 horas (P<0.05) y de 11.46 ( $\pm$  0.67)  $\mu\text{m}$  para T y 21.55 ( $\pm$  3.3)  $\mu\text{m}$  para LC a las 72 horas (P<0.05). Los resultados obtenidos sugieren que *L. casei* activó a los monocitos para que se transformaran más rápidamente en macrófagos, células fundamentales en la respuesta inmunitaria.

**Palabras clave:** Bovinos, monocitos, lactobacilos, cultivo

Recepción: 29-11-2014

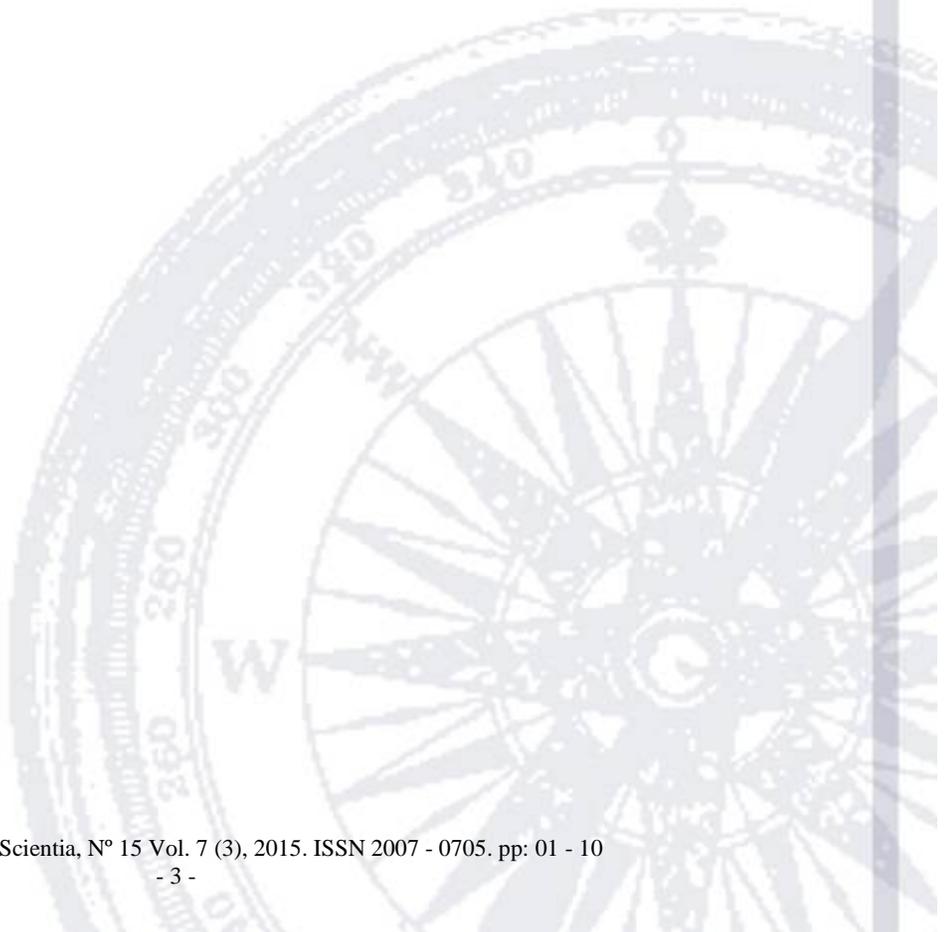
Aceptación: 22-05-2015

## Abstract

To assess changes in cell morphology as sign of activation, peripheral blood monocytes from four adult cattle were obtained and cultured *in vitro* in the presence or not of *Lactobacillus casei*. At 48 and 72 hours after exposure to the bacteria, cells were stained and then, under the optical microscope, the circumference of the plasma membrane (CPM) and the maximum length of the cytoplasm (MLC) was determined. Data obtained ( $\pm$  SEM) of the CPM and MLC (n=20/bovine) for control cells (T) and treated with *L. casei* (LC), were for CPM: 41.54 ( $\pm$  2.08)  $\mu\text{m}$  for T and 61.53 ( $\pm$  2.30)  $\mu\text{m}$  for LC at 48 hours (P <0.05) and 35.80 ( $\pm$  1.49)  $\mu\text{m}$  for T and 68.90 ( $\pm$  8.8)  $\mu\text{m}$  for LC at 72 hours (P <0.05). The average values of MLC obtained were 13.08 ( $\pm$  1.05)  $\mu\text{m}$  for T and 19.34 ( $\pm$  0.86)  $\mu\text{m}$  for LC at 48 hours (P <0.05) and 11.46 ( $\pm$  0.67)  $\mu\text{m}$  for T and 21.55

( $\pm 3.3$ )  $\mu\text{m}$  for LC at 72 hours ( $P < 0.05$ ). The results obtained suggest that *L. casei* activated monocytes to be transformed into macrophages, which are key cells in the immune response.

**Keywords:** cattle, monocytes, lactobacilli, culture



## Introducción

En los mamíferos la inmunidad innata es de suma importancia para detectar la presencia de patógenos invasores y su activación apropiada es fundamental para la generación de una adecuada respuesta inmunitaria adquirida (Adams, 1979). Por otro lado, los lactobacilos son bacterias gram-positivas, no esporuladas y anaeróbicas que normalmente habitan la cavidad oral y el tracto digestivo de humanos (Pelletier *et al.*, 1997). Recientemente se ha demostrado que la bacteria ácido-láctica *Lactobacillus casei* incrementa la resistencia innata de animales contra parásitos (Bautista-Garfias *et al.*, 2005). En este sentido, se ha demostrado que *L. casei* estimula el sistema inmunitario innato por medio de la activación de los receptores tipo Toll presentes en células como los macrófagos y células dendríticas (Maldonado y Perdigón 2006; Kim *et al.*, 2006; Plantinga *et al.*, 2011). En apoyo a lo anterior, se ha señalado que ciertas moléculas y componentes microbianos, pueden mejorar la cantidad y calidad de respuestas de células T antígeno-específicas (Bautista-Garfias y Mosqueda-Gualito 2005, Kwissa *et al.*, 2007; Wille-Reece *et al.*, 2006). En bovinos, la bacteria inmunoestimulante *L. casei* aplicada junto con la vacuna mixta contra Babesiosis bovina, incrementa la eficiencia de la vacuna (Bautista-Garfias *et al.*, 2012). Poco se sabe sobre la estimulación de los mecanismos inmunitarios innatos de los bovinos, como aquellos desempeñados por los monocitos y los macrófagos. En este sentido, el presente estudio se realizó para determinar si los monocitos de sangre periférica de los bovinos (que forman parte de la primera línea de defensa del sistema inmunitario) son activados por *L. casei in vitro* mediante la evaluación morfológica de dichas células, información de la que no se tienen antecedentes.

## Método

### *Animales experimentales.*

Cuatro bovinos sanos de raza Holstein de 12 meses de edad, machos, con un peso promedio de 260 Kg, libres de brucelosis, tuberculosis, anaplasmosis y babesiosis, se utilizaron como donadores de sangre periférica para la obtención células mononucleares (monocitos). Para el cultivo *in vitro*, los animales se mantuvieron en corrales adecuados y se les proporcionó una alimentación consistente en paja de avena, alfalfa achicalada, concentrado comercial y agua *ad libitum*. Es importante precisar que los animales provenían de Amecameca, Estado de México y no tenían antecedentes de ningún tipo de vacunación.

### *Diseño experimental.*

Con los monocitos de cada uno de los cuatro bovinos se establecieron tres réplicas para cada tratamiento (*Lactobacillus casei* y testigo) y fecha de evaluación (48 y 72 horas) como se indica.

### *Obtención de monocitos a partir de sangre periférica.*

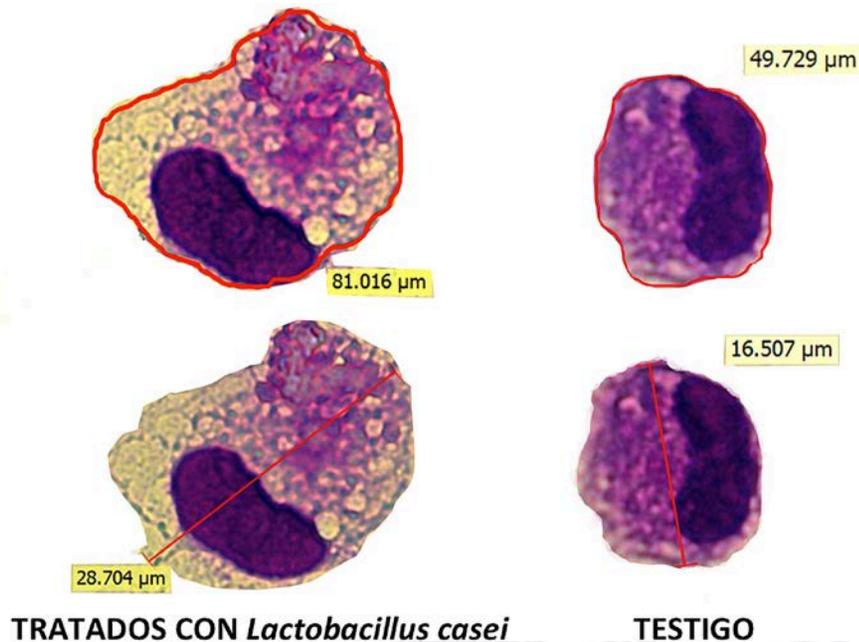
De cada bovino donador se tomó una muestra de 10 a 25 mL de sangre periférica por punción de la vena yugular en tubos Vacutainer con heparina como anticoagulante, previa asepsia con torundas de algodón y benzal al 70%.

Se utilizó el procedimiento descrito por Birminham y Jesk (1980) modificado por este equipo de trabajo. La sangre obtenida se centrifugó a 450 X g durante 15 minutos, en condiciones de esterilidad se retiró la capa flogística y se suspendió en solución balanceada de Hanks´ (HBSS) en una proporción 1:1; posteriormente se preparó un gradiente de densidad (tres volúmenes del gradiente y cuatro volúmenes de la suspensión de los glóbulos blancos en la solución HBSS). La fracción de células obtenidas fue suspendida en medio de cultivo (medio F12 con 30 mM N-Tris (hydroxymethyl)-methyl-2-aminoethanesulfonic acid (TES) y 26 mM NaHCO<sub>3</sub>). De la población de células obtenidas se determinó el rendimiento y la viabilidad celular utilizando una tinción con azul de tripán y conteo en la cámara de Neubauer.

### *Cultivo de células.*

Los monocitos aislados de la sangre periférica tuvieron una viabilidad mayor al 95% y fueron incubados durante 120 minutos a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> en cajas de Petri (6 cm de diámetro) de polietireno, estériles (1 x 10<sup>6</sup> monocitos/caja de Petri). Para el ensayo de inmunoestimulación en todas las placas se realizó un lavado con solución de Vega y Murguía – VYM- (Vega *et al.*, 1985), con el fin de retirar las células no adherentes de tal forma que solamente los monocitos adheridos fueran incubados (Birminham y Jesk, 1980) en el medio de MF12 en presencia de *L. casei* (1x10<sup>8</sup> ufc/placa), obtenido de acuerdo con Bautista-Garfias *et al.*, (2001) y del tratamiento testigo (solución salina fisiológica –SSF). Cada tratamiento se realizó por triplicado, manteniendo los cultivos *in vitro* dentro de una incubadora a 37°C con una atmósfera CO<sub>2</sub> por 72 horas, realizando cambios de medio cada 24 horas y la evaluación de la morfología a las 48 y 72 horas. Dicha morfología no se evaluó a las 24 horas porque en observaciones preliminares por este mismo equipo de trabajo no se observaron cambios

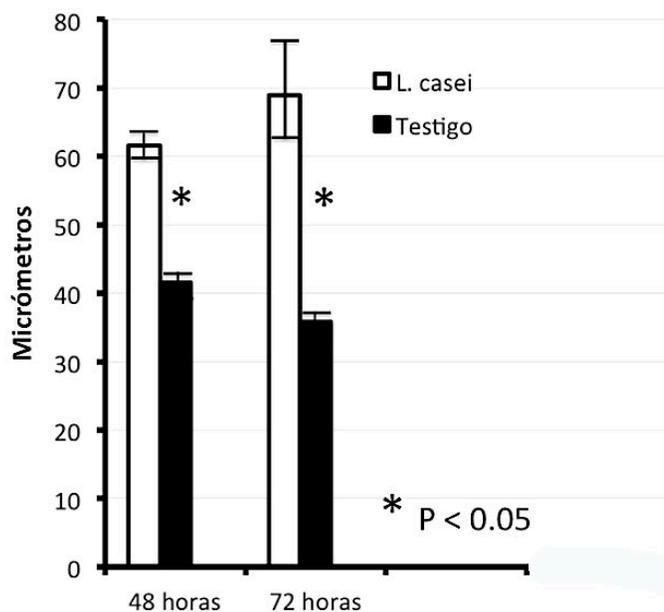
significativos entre las células tratadas o no. Finalmente, las placas fueron lavadas con solución VYM, luego fueron fijadas con metanol y teñidas con colorante de Giemsa para ser evaluadas por medio de microscopía óptica (objetivo de inmersión 100X). La extensión de la circunferencia de la membrana citoplasmática (CMP) y la máxima longitud del citoplasma (MLC) en  $\mu\text{m}$  se determinaron utilizando el programa Leica Application Suite V4.0 con un microscopio LEICA DM5000B (Figura 1). Similarmente los parámetros obtenidos (imágenes) se registraron con la cámara fotográfica DFC310FX-577514511. Los datos obtenidos se analizaron (bloques al azar) con el paquete de diseños experimentales de la FAUNL, v.2.5 (Olivares, 1994). Las diferencias se consideraron significativas cuando los valores de  $P$  fueron  $< 0.05$ .



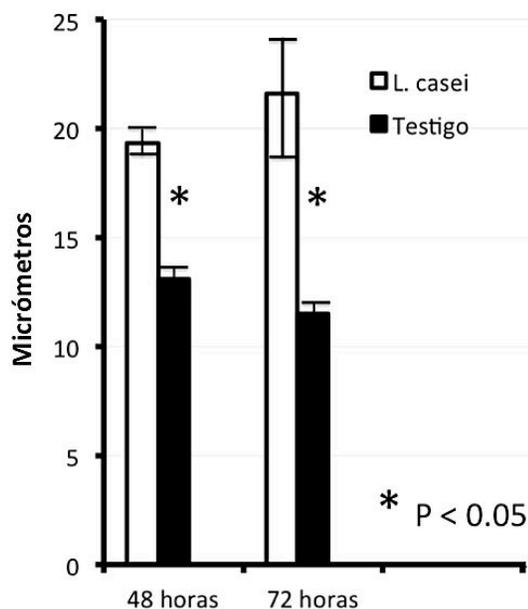
**Figura 1.** Ejemplo de la determinación de la circunferencia (líneas curvas rojas) y la longitud (líneas rectas rojas) en *Lactobacillus casei* después de 48 horas en cultivo.

**Resultados:** Los promedios obtenidos ( $\pm$  EEM) de la CMP y MLC para las células testigo (T) y tratadas con *L. casei* (LC), fueron para CMP:  $41.54 (\pm 2.08) \mu\text{m}$  para T y  $61.53 (\pm 2.30) \mu\text{m}$  para LC a las 48 horas ( $P < 0.05$ ) y de  $35.80 (\pm 1.49) \mu\text{m}$  para T y  $68.90 (\pm 8.8) \mu\text{m}$  para LC a las 72 horas ( $P < 0.05$ ). Los valores promedios de la MLC obtenidos fueron de  $13.08 (\pm 1.05) \mu\text{m}$  para T

y  $19.34 (\pm 0.86) \mu\text{m}$  para LC a las 48 horas ( $P < 0.05$ ) y de  $11.46 (\pm 0.67) \mu\text{m}$  para T y  $21.55 (\pm 3.3) \mu\text{m}$  para LC a las 72 horas ( $P < 0.05$ ) (Figuras 2 y 3).



**Figura 2.** Circunferencia del citoplasma en  $\mu\text{m}$  de monocitos de sangre periférica de bovino a las 48 y 72 horas post-exposición o no a *Lactobacillus casei*. Cada punto representa el promedio en  $\text{mm} \pm \text{EEM}$  de las células de cuatro bovinos adultos (20 células/bovino, 12 repeticiones por tratamiento).



**Figura 3.** Longitud del citoplasma en  $\mu\text{m}$  de monocitos de sangre periférica de bovino a las 48 y 72 horas post-exposición o no a *Lactobacillus casei*. Cada punto representa el promedio en  $\text{mm} \pm \text{EEM}$  de las células de cuatro bovinos adultos (20 células/bovino, 12 repeticiones por tratamiento).

## Discusión

Las medidas de las células, tratadas o no, fueron evaluadas a las 48 y 72 horas porque a las 24 horas de cultivo *in vitro* no se observaron diferencias. Los resultados indican que la extensión de la circunferencia de la membrana citoplasmática y la máxima longitud promedio del citoplasma fueron significativamente más grandes ( $P < 0.05$ ) en las células con *L. casei* que en las células que recibieron el tratamiento testigo, lo cual indica activación de las primeras que mostraron una morfología compatible con la de los macrófagos en tan solo 72 horas, tiempo significativamente más corto al requerido en otros estudios para obtener macrófagos *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica, que es de 120 a 192 horas (Jungi *et al.*, 1996; Saldarriaga *et al.*, 2003, Werling *et al.*, 2004) . En este sentido, los resultados obtenidos sugieren que las bacterias inmunoestimulantes (*L. casei*) utilizadas activan a los monocitos a través de la estimulación de receptores tipo Toll en su superficie y posterior desencadenamiento de vías de señalización para que se transformen más rápidamente en macrófagos y desempeñen funciones protectoras contra agentes patógenos. En este contexto, se sabe que los monocitos normalmente desempeñan funciones similares a las de los macrófagos, pero en menor escala (Ross y Auger, 2002). Con base en los cambios morfológicos observados, se concluye que los monocitos de bovino expuestos *in vitro* a *L. casei* se activan y se transforman rápidamente en macrófagos. En este sentido, los resultados obtenidos con la metodología utilizada permitirán llevar a cabo más estudios para determinar la producción de citocinas y otros productos (óxido nítrico) en monocitos de bovino estimulados con *L. casei*.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado con recursos del proyecto 1-1.6-9512932008-P-P.1-1 del INIFAP

## Referencias

Adams D.O. (1979). Macrophages. En: Method and Enzymology LVIII Academic Press Inc. pp 494-506.

Bautista-Garfias C.R., Ixta-Rodríguez O., Martínez-Gómez F., López M.G., Aguilar-B.R. (2001). Effect of viable or dead *Lactobacillus casei* organisms administered to mice on resistance against *Trichinella spiralis* infection. Parasite, 8: S226-S228.

Bautista-Garfias C.R., Gómez M.B, Aguilar B.R., Ixta O., Martínez F., Mosqueda J. (2005). The treatment of mice with *Lactobacillus casei* induces protection against *Babesia microti* infection. Parasitol. Res. 97:472-477.

Bautista-Garfias C.R., Mosqueda-Gualito J.J.(2005). Papel de los receptores Toll-like en la inmunidad innata y su implicación en medicina veterinaria. Vet. Méx., 36:453-468.

Bautista-Garfias CR, Castañeda R, Álvarez JA, Rojas C, Figueroa JV, Rodríguez A. (2012). La vacunación simultánea de bovinos con *Lactobacillus casei* y la vacuna bivalente contra babesiosis bovina genera una mayor protección contra *Babesia bovis* y *B. bigemina* transmitidas por garrapatas en condiciones extremas de campo. Vet. Méx., 43:189-200.

Birmingham JR , Jesk EL (1980) The isolation, long-term cultivation and characterization of bovine peripheral blood monocytes. Immunology 41:807-814.

Jungi TW, Thony M, Brcic M, Adler B, Pauli U, Peterhans E. (1996) Induction of nitric synthase in bovine mononuclear phagocytes is differentiation stage-dependent. Immunobiology 195:385-400.

Kim YG, Ohta T, Takahashi T, Kushiro A, Nomoto K, Yokokura T, Okada N, Danbara H. (2006). Probiotic *Lactobacillus casei* activates innate immunity via NF- $\kappa$ B and p38 MAP kinase signaling pathways. Micr. Infect. 8:994-1005.

Kwissa M., Amara R.R., Robinson H.L., Moss B., Alkan S., Jabbar A., Villinger F., Pulendran B. (2007). Adjuvanting a DNA vaccine with a TLR9 ligand plus Flt3 ligand results in enhanced cellular immunity against the simian immunodeficiency virus. J. Exp. Med.; 204:2733–2746.

Maldonado Galdeano C, Perdigon G. (2006). The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. Clin. Vacc. Immunol. 13:19-226.

Olivares S.(1994). Paquete de diseños experimentales FAUNL, Version 2.5. Facultad de Agronomía, UANL, Marín, N.L., México

Pelletier C, Bouley C, Cayuela C, Bouttier S, Bourliux P, Bellon-Fontaine MN (1997). Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. Appl. Environ. Microbiol. 63:1725-1731.

Plantinga TS, van Maren WWC, van Bergenhenegouwen MH, Nierkens S, de Jong DJ, Joosten LAB, van't Land B, Garssen J, Adema GJ, Netea MG. (2011). Differential Toll-like receptor recognition and induction of cytokine profile by *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus* strains of probiotics. Clin Vacc Immunol 18:621-628.

Ross J.A., Auger M.J. (2002) The biology of the macrophage. En: Burke B., Lewis C.E. (editors). The macrophage. 2<sup>nd</sup> Ed. Oxford University Press, New York. pp. 1-72.

Saldarriaga OA, Velásquez JI, Ossa JE, Rugeles MT. (2003). Standarization of bovine macrophage monolayers and isolation and culture of trypanosomes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 98:269-271.

Vega C. A, Buening G M, Rodríguez S D. Carson C A. McLaughlin K. (1985). Cryopreservation of *Babesia bigemina* for *in vitro* cultivation. Am.J.Vet.Res.; 46:421-423.

Werling D, Hope JC, Howard CJ, Jungi TW (2004).Differential production of cytokines, reactive oxygen and nitrogen by bovine macrophages and dendritic cells stimulated with Toll-like receptor agonists. Immunology 111:41-52.

Wille-Reece U., Flynn B.J., Loré K., Koup R.A., Miles A.P., Saul A., Kedl R.M., Mattapallil J.J., Weiss W.R., Roederer M., Seder R.A. (2006). Toll-like receptor agonists influence the magnitude and quality of memory T cell responses after prime-boost immunization in nonhuman primates. J Exp Med, 203:1249–1258.

