

ACCIÓN DE LAS ENDOSPORAS DE *BACILLUS SUBTILIS* EN EL SISTEMA INMUNOLÓGICO DE LAS AVES.

Dra. C. Grethel Milián Florido ¹, Dra. C. Ana Julia Rondón Castillo¹, Dr. C. Manuel Lázaro Pérez Quintana ¹ y Dr. C. Ramón Bocourt Salabarría².

*1 Centro de Estudios Biotecnológicos. Facultad de Agronomía.
Universidad de Matanzas “Camilo Cienfuegos”, Vía Blanca
Km.3, Matanzas, Cuba.*

*2. Instituto de Ciencia Animal. Apartado Postal 24. San José de las
Lajas, La Habana, Cuba.*

Resumen.

El empleo de endosporas de *Bacillus* spp. como probiótico constituye una alternativa al uso de aditivos promotores del crecimiento en la producción animal. El presente trabajo tuvo como objetivo señalar algunos elementos de cómo los probióticos son capaces de ejercer su acción de tipo inmunomoduladora e inmunoestimulante en los animales, considerando que algunos de estos no están completamente esclarecidos. El trabajo abarca una amplia revisión de la incidencia de los biopreparados probióticos de *Bacillus subtilis* y sus endosporas sobre algunos de los mecanismos de respuesta inmunológica.

Palabras claves: probióticos, inmunología, aves, *Bacillus* spp .

Introducción.

Los avances de la inmunología en los últimos años se dirigen al estudio y lucha contra las principales enfermedades infecciosas que azotan a humanos y animales. Sin embargo, todavía existe un alto desafío para la inmunología en el campo de las enfermedades infecciosas, tal es el caso del Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) en el hombre y de varias enfermedades en los animales productivos (Iañez 2001). Hoy se plantea la necesidad de que el hombre y los animales tengan un adecuado funcionamiento del sistema inmunológico para responder con fuerza a los desafíos estresantes de la vida moderna y las prácticas de crianza intensiva animal (Ericsson y Hubbard 2000). El objetivo de este trabajo es señalar algunos elementos los cuales los probióticos son capaces de ejercer su acción de tipo inmunomoduladora e inmunoestimulante en los animales, considerando que algunos de estos no están completamente esclarecidos.

Desarrollo.

El término inmunidad tiene su origen en un vocablo romano que significa privilegio de exención o estar libre. Este término se utilizó por primera vez en las ciencias médicas en el siglo XIX y hace referencia a la capacidad que poseen los seres vivos de no sufrir continuamente las enfermedades que ocasiona la agresión de los microorganismos. El sistema inmunitario protege al organismo de una amplia variedad de agentes infecciosos (bacterias, hongos, parásitos y virus) que pueden ocasionar diferentes enfermedades con peligro incluso para la vida del organismo (Iañez 2001).

Una de las funciones más reconocidas de los probióticos es su función como activadores del sistema inmune por lo cual estos productos adquieren cada día una mayor demanda en su uso en la producción animal Milián (2009).

Se plantea que estas bacterias (probióticas) pueden actuar como adyuvantes orales, producir una mayor resistencia a infecciones entéricas, proporcionar una respuesta inmune aumentada y sostenida frente a organismos infecciosos, acelerar el desarrollo y la maduración del sistema inmune, incrementar la diversificación de linfocitos y disminuir las consecuencias catabólicas de las infecciones que causan inmunosupresión (Rahmani y Speer 2005).

Las bacterias probióticas prevén la colonización de patógenos mediante la adhesión y bloqueo a la superficie intestinal, saturando los receptores en el epitelio y previniendo que los patógenos se unan a estos sitios. Producen ácido láctico y otros ácidos grasos de cadena corta (AGCC) los que disminuyen el pH intestinal del tracto gastrointestinal, inhibiendo o manteniendo el crecimiento y proliferación de las bacterias patógenas en bajos niveles, no dañinos para el hospedero (Revolledo et al. 2006).

Producen sustancias de acción bacteriostática conocidas como bacteriocinas las que son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, todas estas funciones les confiere a los probióticos su carácter de productos con actividad inmunológica.

La parte dominante del sistema inmunológico en las aves se encuentra en el intestino grueso, donde la flora microbiana, las células mucosas y el tejido linfóide, son inmunológicamente activos. En este sitio se producen citoquinas moduladoras, que a su vez se unen a los procesos fermentativos de la biota comensal, para producir localmente los nutrientes inmunorreguladores (Hoa et al. 2000 y Granato et al. 2004).

Los cultivos de *Bacillus* spp. esporulados con actividad probiótica promueven la estimulación del sistema inmune en el TGI, con un efecto directo en las Placas de Peyer. Ellos son importantes en la producción de IgA e IgG y son estimuladores de la síntesis de linfocitos T y citoquinas para favorecer la destrucción intracelular de patógenos tales como *Salmonella* spp., *E. coli* y otros (Hosoi et al. 2000, Hong et al. 2004 y Khaksefidi et al. 2006).

La ingestión de probióticos específicos puede estimular la fagocitosis y las células inmunocompetentes del intestino asociadas al tejido linfóide, además de presentar propiedades adyuvantes (Meydani 2000 y Luengo 2004).

Se comprobó que no siempre los mecanismos, a nivel de la primera barrera de respuesta inmune, son todo lo efectivos para impedir que los antígenos traspasen la mucosa intestinal y penetren en el organismo a través de la sangre o la linfa. Si las bacterias probióticas logran traspasar los mecanismos de la primera barrera defensiva del organismo, activarán la segunda y tercera barrera a favor de la respuesta inmune (Granato et al. 2004).

Algunos microorganismos probióticos, no relacionados a la microbiota intestinal autóctona (*Bacillus* y sus endosporas), pueden actuar como antígenos a través de tres mecanismos, expuestos en la figura 1: Endocitosis, transcitosis y reconocimiento directo del antígeno por los linfocitos intraepiteliales (Revolledo et al. 2006 y Rondón 2008).

La acción de estos microorganismos desencadena reacciones inmunitarias que se traducen en una mayor producción de inmunoglobulinas, principalmente, IgA a nivel intestinal (Rahmani y Speer 2005 y Revolledo et al. 2006).

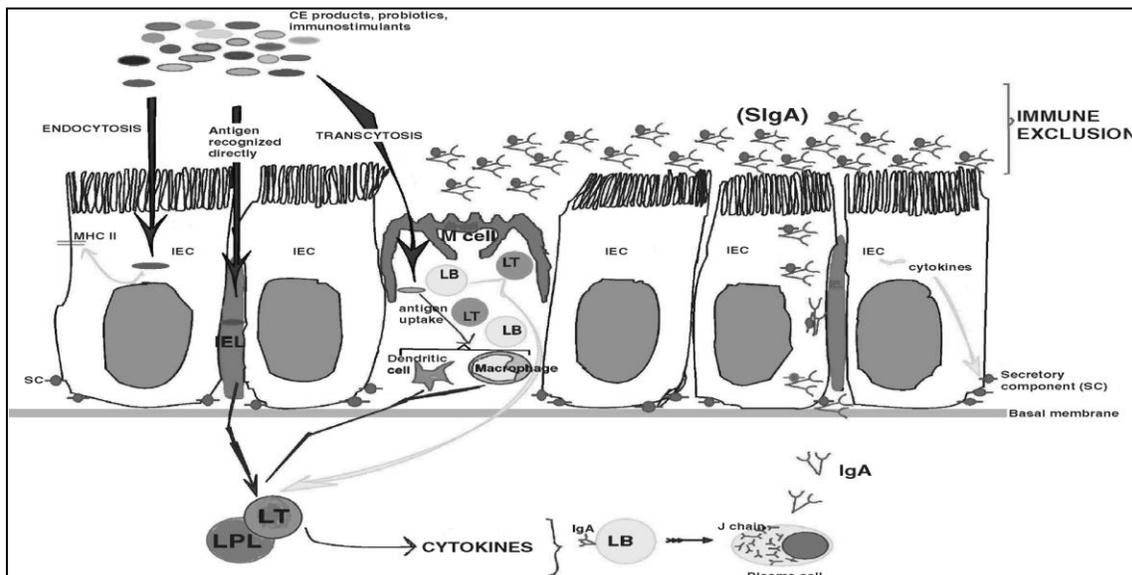


Figura 1. Propuesta de interacciones entre los productos de exclusión competitiva, probióticos o inmunostimulantes en la inmunidad intestinal de pollos. SIgA= IgA secretada; CE= exclusión competitiva; IEC= célula intraepitelial; IEL= linfocito intraepitelial intestinal; LPL= linfocito de la lámina propia (linfocito T activado); célula dendrítica o macrófago= células antígeno presentes (APC); LB = linfocito B; LT= linfocito T; células M= células para el transporte de antígenos desde el lumen intestinal hacia el tejido linfático asociado al intestino; SC= el componente secretor; endocytosis= proceso en el cual una sustancia logra pasar al interior de la célula sin atravesar la membrana celular; transcytosis= proceso de transporte de sustancias a través de una capa de epitelio, que se realiza por un lado de la célula epitelial, dentro de una vesícula revestida, que puede entonces ser dirigida a través de la red trans-Golgi y transportada al lado opuesto de la célula.

Las especies aviares presentan tres órganos primarios donde tiene lugar la maduración linfocitaria independiente de antígenos: La médula ósea, la bolsa de Fabricio y el timo. Además, existen órganos linfoides secundarios donde se crea el medio ambiente en el que los linfocitos pueden interactuar entre sí y con los antígenos. También es donde se expande la respuesta inmunitaria (Piad 2006).

En la bolsa de Fabricio los linfocitos B, cuando son expuestos ante un antígeno, se dividen para formar células plasmáticas que secretan anticuerpos (γ - globulina) y forman células de memoria. Los anticuerpos neutralizan al antígeno, mientras que las células de memoria retienen un código de reconocimiento para éste y forma posteriormente más células plasmáticas ante subsecuentes exposiciones con el mismo antígeno, de ahí la importancia del tamaño de la bolsa de Fabricio y su adecuado estado fisiológico, para conocer su inmunocompetencia (Giambrone 1996).

Entre estos órganos linfoides secundarios se encuentran el bazo, la glándula de Harder (situada en la conjuntiva del párpado inferior), el tejido linfoide asociado a los bronquios (BALT) y el tejido asociado al intestino (GALT). Este último se puede encontrar organizado como las placas de Peyer y las tonsilas cecales o como agregados de células epiteliales a lo largo del tracto digestivo (Piad 2006).

Los biopreparados probióticos con cepas de *B. subtilis* son agentes inmuno estimuladores contra una variedad de enfermedades “in vitro” y estimuladores “in vivo” de secreción de inmunoglobulina A (IgA) (Nava y Dávila 2004 y Kanaminogawa y Nanno 2004).

Dentro del TGI, el intestino grueso es un importante órgano inmunológico que abarca entre 70-80 % del sistema inmunológico total del cuerpo. Este órgano posee una alta capacidad para modular la función de barrera y prevenir la translocación microbiana (Havenaar y Huis 1994).

Otro de los indicadores que se reportan para definir una adecuada respuesta inmunológica en las aves son los títulos de HI para la respuesta vacunal medida a través de la vacuna de Newcastle Milián (2008). Se conoce que la hemoaglutinina es parte de la glicoproteína viral involucrada en la absorción del virus de Newcastle en las células dianas, por lo que los anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación limitan la infección por este virus. Se comprobó que en pollos existe una alta relación entre el título de estos anticuerpos y la protección del sistema inmune del animal, por lo que se considera como un indicador viable que relaciona la eficacia de la vacuna con la inmunidad general (Edbauer et al. 1990 citado por Pérez 2000).

El uso de probióticos esporulados como inmunoestimulantes puede contribuir a cubrir las necesidades inmunológicas, elevar el bienestar y las expectativas de vida de los seres humanos, así como la salud y capacidad probiótica en los animales (Duc et al. 2004 y Milián 2006).

Algunos resultados obtenidos con la aplicación de biopreparados probióticos de *Bacillus subtilis* y sus endosporas en aves.

Después de la introducción de microorganismos, con efecto probiótico, se comprobó “in vivo” el efecto de macrófagos sobre la actividad fagocitaria inespecífica con resultados favorables (Braat et al. 2004 y Veckman et al. 2004).

Underdahl (1983) y Mehrazar et al. (1993) obtuvieron un aumento de la actividad del sistema inmune en animales libres de gérmenes, con cepas de *Bacillus* spp.

Mientras Takahashi et al. (1997) observaron que la administración de endosporas de *Bacillus* mejoró los resultados productivos en pollos de ceba cuando se criaron en condiciones de elevado desafío microbiano y estrés inmunitario, al disminuir los niveles plasmáticos de IL-1. Hay resultados en favor de que estas bacterias pueden actuar como adyuvantes orales y producir una mayor resistencia a infecciones entéricas.

Las endosporas pueden estimular la respuesta inmune cuando se usan como inmunomoduladoras. Un cultivo de *B. firmus*, en forma esporulada, aumentó la resistencia a una infección experimental por *Listeria monocytogenes* en ratones de laboratorio (Mazza 1994).

Nakano et al. (1999) obtuvieron una respuesta positiva de especies de *Bacillus* en el incremento del peso de la bolsa de Fabricio, el bazo y los títulos de HI para la vacuna de Newcastle.

Conceicao et al. (2002) demostraron que el probiótico CenBiot elaborado con cepas de *Bacillus cereus*, estimuló la respuesta humoral frente a *Escherichia coli* en ratones. Beliavskaia (2001) y Coppola et al. (2004) comprobaron que *B. subtilis* recombinante evitó la inmunosupresión que causa la vacuna replicante contra Parvovirus canino. La aplicación de *Bacillus* aceleró la formación de clones de memoria y aumentó la respuesta inmune específica, debido a la acción del interferón, el cual se secreta en el interior del lumen intestinal por la actividad de la bacteria.

Duc et al. (2004) al suministrar por vía oral a aves 10⁹ endosporas de *Bacillus subtilis* (PY79).g-1 en el alimento demostraron que estos cultivos brindaban respuestas positivas ante los órganos inmunológicos bolsa de Fabricio y bazo, además de estimular las Placas de Peyer, las células M y la producción de IgA e IgG.

Por su parte Khaksefidi y Ghoorchi (2006) encontraron resultados similares al aplicar, en la dieta de pollos de ceba, un cultivo de *Bacillus subtilis* (50 mg.kg⁻¹) con una respuesta positiva ($P < 0,05$) en los ciclos de 1-21 días y de 22-42 días.

Milián (2009) observó un evidente efecto inmunoestimulante debido a la aplicación de este tipo de cultivo probiótico (*Bacillus subtilis* y sus endosporas) sobre los títulos de HI para la respuesta vacunal medida a través de la vacuna de Newcastle.

Conclusiones.

Se puede afirmar a partir de lo expuesto anteriormente, que existe una respuesta de mejora en el sistema inmune en las aves cuando se emplean cultivos de *Bacillus subtilis* y sus endosporas donde se refuerza una actividad probiótica a nivel sistémico.

Bibliografía.

- Beliavskaia, V. A. 2001. Adjuvant properties of subalin, a recombinant interferon-producing probiotic. *Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii i Immunobiologii*. 6(78): 77-82
- Braat, H., Jong, E. C., Brande, J. M., Kapsenberg, M. L., Peppelenbosch, M. P., Van Tol, E. A. & Van Deventer, S. J. 2004. Dichotomy between *Lactobacillus rhamnosus* and *Klebsiella pneumoniae*. 82:197-205
- Conceicao, F. R., Zani, J. L. & Gil-Turnes, C. 2002. Effect of probiotic CenBiot on the humoral response to an *E. coli* bacterin. *Rev. Food and Agricultural Immunology*. 2(14): 135-140
- Coppola, M. M., Conceicao, F. R. & Gil-Turnes, C. 2004. Effect of *Saccharomyces boulardii* and *Bacillus cereus var. toyoi* on the humoral and cellular response of mice to vaccines. *Rev. Food Agricultural Immunology*. 16
- Duc le H., Hong, H.A., Barbosa, T. M., Henriquez, A. O. & Cutting S. M. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl. Environ. Microbiol*, 70, 2161-2171
- Edbahuer, C., Weinberg, R., Taylor, J., Senelonge, A. R. & Bouquet, J. F. 1990. Protection of chickens with a recombinant fowlpoxvirus expressing the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuroaminidase gen. *Virology*. 179:901-904
- Ercison, K. L. & Hubbard, N. E. 2000. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J.Nutric* .2 (130): 403-409
- Giambrone, J. 1996. Inmunosupresión en las aves. Causas y prevención. *Avicultura Profesional*. 14 (5): 42-45
- Granato, D., Bergonzelli, G. E., Pridmore, D. R., Marvin, L., Rouvet, M. & Theulaz, I. E. C. 2004. Cell surface-associated elongation factor tu mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal Cells and mucinis. *Infect Immun*. 4 (72): 2160-2169
- Havenaar, R. & Huis, I. V. 1994. In the *Lactic Acid Bacteria in Health and disease* (Wood B. J. ed.): 151-170
- Ho, H.T., Baccigalupi, I., Huxham, A., Smertenko, A., Van, S. & Ammendola, E. 2000. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *Appl Environ Microbiol*. 66:5241-5247
- Hong, H. A., Duc, L. H., Barbosa, T. M., Henriquez, A. O. & Cutting, S. M. 2004. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl. Environ. Microbiol*. 70:2161-2171

- Hosoi, T., Ametani, A., Kiuchi, K. & Kaminogawa, S. 2000. Improved growth and viability of lactobacilli in the presence of *Bacillus subtilis* (*natto*), catalase, or subtilisina. *Can. J. Microbiol.* 46: 892-897
- Iañez, P. E. 2001. Introducción y base histológica. Consultar: <http://fai.unne.edu.ar/inmunología/inmuno.htm>
- Kaminogawa, S. & Nanno, M. 2004. Modulation of immune functions by food. *Cam* (3): 241-250
- Khaksefidi, A. & Ghoorchi, T. 2006. Effect of Probiótica on Performance and Immunocompetence in Broiler Chicks. *J. of Poultry Science*, 43: 296-300
- Luengo, L. 2004. Prácticas de Biología. Ingeniería genética. Biología en zip. <http://www.arraskis.es//luengo/inmunologia.html>
- Mazza, P. 1994. El uso del *Bacillus subtilis* como microorganismo para antidiarrhoel. La cápsula. *Chim. La Granja*.133: -18
- Mehrazar, K., Gilman, A., Knisley, K., Rodkey, L. & Kim, Y. 1993. Comparison of the immune response to Ars-BGG in germfree or conventional piglets. *Dev. Comp. Immunol.* 17 (5): 459-464
- Meydani, N. S. & Ha Woel- Kyu. 2000. Immunologic effects of yogurt. *Am. J.Clin. Nut.*71 (4):861-872
- Milián, G. 2009. Obtención de cultivos de *Bacillus* spp. y sus endosporas. Evaluación de su actividad probiótica en pollos. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de La Habana. Cuba
- Milián, G., Pérez, M. & Bocourt, R. 2008. Empleo de probióticos a base de *Bacillus sp* y sus endosporas en la producción avícola. *Rev. Cubana Cienc. Agric.*42 (2): 117- 120
- Milián, G., Pérez, M., Rondón, A.J., Asamaniego, L.M., Piad, R. & Laurencio, M. 2006. Efecto de los probióticos sobre el sistema inmune. Monografías Universidad de Matanzas, CD-ROM ISBN: 959 - 16 - 0490 - 4
- Nakano,T., Shimuzu, M., Fukushima, M. & Yumiyoshi, S. 1999. Effects of a probiotic on the lipid metabolism of pullet hen as a cholesterol-enriched diet. *Biotechnology and Biochemistry* 63: 1569-1575
- Nava, G .M. & Dávila, M. 2004. Nuevas perspectivas en la selección y evaluación de probióticos. *Rev. Chil. Nutr.* (21): 184-185
- Pérez, M. 2000. Obtención de un hidrolizado de crema de levadura de destilería y evaluación de su actividad probiótica. Tesis presentada en opción al Grado Científico de Doctor en Ciencias Veterinarias. Universidad Agraria de La Habana. Cuba

- Piñad, R., M. Pérez., Grethel Milián., Marta Laurencio., Lilián Sánchez, E. Medina., Ana Julia Rondón & Luz María Samaniego. 2006. Efecto de un hidrolizado enzimático de *Saccharomyces cerevisiae* en pollitas de reemplazo de ponedoras. Indicadores inmunológicos e hematológicos. *Revista Salud Animal*. 27 (2): 109-114
- Rahmani, H.R. & Speer. W. 2005. Natural additives influence the performance and humoral immunity of broilers. *J. Poultry Science* 4 (9): 713-717
- Revolledo, L.A., Ferreira, J.P. & Mead, G.C. 2006. Prospects in *Salmonella* Control: competitive exclusion, probiotics, and enhancement of avian intestinal immunity. *J. Appl. Poult. Research* 15:341-351
- Rondón, A. J., Samaniego, L. M., Bocourt, R., Rodríguez, S., Milián, G., Ranilla, M. J., Laurencio, M. & Pérez, M. 2008. Isolation, identification and partial characterization of the probiotic properties of *Lactobacillus* spp. strains obtained from the gastrointestinal tract of broilers. *Rev. Cienc. Tecnol. Aliment.* 6(1):56-63
- Takahashi, T. & Kanatani, K. 1997. Isolation and partial amino acid sequence of bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Rev. Biosci. Biotechnol. Biochem.* 61 (5): 884-886
- Underdahl, N. 1983. The effect of feeding *Streptococcus faecium* upon *E. coli* induced diarrhea in gnotobiotic pigs. *Rev. Food. Nutr. Sci.* 7 (3-4): 5-12
- Veckman, V., Miettinen, M., Pirhonen, J., Siren, J., Matikainen, S. & Julkunen, I. 2004. *Streptococcus pyogenes* and *Lactobacillus rhamnosus* differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocytederived dendritic cells. *J Leukoc Biol* 75:764-771