

Trabajos

Expresión de Inmunoglobulina A y proliferación celular en intestino de ratones alimentados con leche SanCor Bio

RECIBIDO: 29/5/08

ACEPTADO: 18/9/08

Costamagna, A.¹ • Fuentes, M.¹ • Fabro, A.¹ • Reus, V.¹ • Benmelej, A.¹ • Giugni, M.C.¹ • Ortega, H.² • Minella, K.¹ • Pasantes: Dezar, G. • Illesca, P.
Técnico Histológico: Gallo, J.E.

¹ Cátedra de Morfología Normal. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas.

² Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Nacional del Litoral (U.N.L.). Paraje El Pozo C.C. 242. Santa Fe (3000). Tel.: 54-342-4575216. Int.: 150. Email: kminella@fbc.unl.edu.ar

RESUMEN: Se administra leche SanCor Bio a ratones, para analizar la variación de IgA y PCNA (proliferation cell nuclear antigen) en células del corion de intestino delgado, con diferentes esquemas de alimentación: a) Dos días con suplemento: (Leche SanCor Bio al lote experimental: LE, y leche común al lote control: LC); b) Cinco días con suplemento; c) Nueve días: Cinco días con suplemento, dos días sin suplemento y dos días con suplemento nuevamente; y d) Treinta y seis días, repitiendo durante cuatro semanas el esquema c. Para IgA se obtiene diferencia significativa a favor de LE para los ensayos: a) $p=0,026$; b) $p=0,018$; c) $p=0,009$. Para d) la diferencia no resulta significativa ($p=0,312$). Para PCNA se estudiaron los ensayos c) y d) obteniéndose diferencia significativa a favor de LE para el ensayo c) $p=0,019$. Para d) la diferencia no resulta significativa ($p=0,612$)

PALABRAS CLAVES: Leche probiótica, inmunomodulación, IgA, proliferación celular.

SUMMARY: *Immunoglobulin A expression and cell proliferation in gut of rats fed with Bio probiotic milk.*

Bio probiotic milk is administered to mice, to analyze the variation of IgA and PCNA (proliferation cell nuclear antigen) in the chorion cells of gut, with different feeding schemes: a) Two days with supplement: (Bio milk to experimental lot: LE and common milk to control lot: LC); b) Five days with supplement; c) Nine days: Five days with supplement, two days without supplement, and two days to supplement again; and d) Thirty-six days, repeating the pattern c for four weeks. For IgA, is obtained significant difference in favour of LE for the tests: a) $p=0,026$; b) $p=0,018$; c) $p=0,009$. In the case d) the difference was not significant

($p=0,312$). For PCNA we studied the trials c) and d) obtaining significant difference in favor of LE for testing c) $p=0,019$. For d) the

difference was not significant ($p=0,612$).

KEYWORDS: Probiotic milk, immunomodulation, IgA, cell proliferation.

Introducción

La leche SanCor BIO es un producto bioterapéutico desarrollado en el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET, San Miguel de Tucumán, Argentina) que contiene las cepas *Lactobacillus casei* CRL431 y *Lactobacillus acidophilus* CRL 730, que cumplen con la totalidad de los criterios internacionales fijados por FAO – OMS para ser considerados probióticos (Guidelines for the evaluation of probiotics in food London Ontario, Canadá) (1).

Cuenta además con el Certificado de Identificación otorgado por: BCCM/LMG, University Gent, Belgium. Belgian Coordinated Collections of Microorganisms, Laboratory of Microbiology – University of Gent, Belgium (1996).

El grupo de investigadores del CERELA viene trabajando desde hace más de dos décadas, utilizando las mismas cepas de probióticos en animales de experimentación, y ha publicado numerosos trabajos que demuestran la estimulación del sistema inmunológico. Entre otras pruebas funcionales, pudieron comprobar un incremento de la actividad inmune de mucosas en ratones tratados con estos dos probióticos (2); un aumento en la secreción de inmunoglobulinas en respuesta a enteropatógenos por administración oral de *L. Casei* CRL431 (3); como así también un estímulo del ciclo de la inmunoglobulina A (IgA), incrementando no solo las células que la expresan en intestino, sino también en bronquios y tejido de glándulas mamarias (4).

Nuestro grupo de trabajo ha realizado numerosas experiencias con la finalidad de aportar sustento morfológico que permita dilucidar mecanismos para explicar la influencia de esta leche probiótica sobre la estimulación del sistema inmune, el incremento de la respuesta inmunológica, tanto específica como inespecífica y su consecuente repercusión en la salud (5).

La mucosa intestinal, que ocupa una importante superficie de la interfase entre el ambiente interno y externo, constituye a ese nivel, la primera barrera de defensa contra agentes infecciosos. Las distintas estirpes de células que la integran participan en esta función mediante diferentes mecanismos, que les permiten discernir entre la flora simbiótica y los patógenos exógenos.

El tejido linfático asociado a intestino (GALT: gut associated lymphoid tissue) parece estar regulado por numerosos mecanismos y esto está reflejado en un fenómeno específico: tolerancia oral, controlada o inflamación fisiológica; así como en poblaciones linfoides particulares, los linfocitos intraepiteliales (LIE) que responden a la vía alternativa de activación (6). Estos fenómenos, aparejados a la existencia de células presentadoras de antígenos (células del epitelio intestinal), sientan las bases para distintas respuestas inmunes (7).

Estudios de nuestro grupo mostraron un incremento progresivo en la cantidad de linfocitos en lámina propia y la presencia de extensas placas de Peyer, con profusa irrigación e importante cantidad de macrófa-

gos y células dendríticas, en ratones tratados con leche Bio. Los LIE se encontraron en cantidad significativamente mayor en el epitelio de las vellosidades, a siete días de tratamiento (5). En esas extensas placas de Peyer, que presentaron un incremento en su capilarización, se observó la presencia tanto de células polimorfonucleares como monomorfonucleares con aparente capacidad de fagocitosis, evidenciada por la PA.S. positividad. Esta observación dio un soporte morfológico a los anteriores hallazgos funcionales relacionados con el incremento de la actividad fagocítica *in vitro* (8).

La inmunoglobulina A secretoria (IgAs) puede unirse de forma específica a moléculas presentes en la superficie de bacterias patógenas, inhibiendo su adherencia a la célula epitelial y aumentando la afinidad de este complejo a la mucina, lo cual facilita la inmovilización del microorganismo a la capa mucosa con la consiguiente eliminación (9). De esta forma la IgAs puede interferir en interacciones adhesinas / receptores celulares de patógenos. Independientemente, la microflora intestinal induce respuestas específicas en el GALT, por ello, se ha postulado la existencia de un tipo distintivo de IgA, frente a antígenos de bacterias autóctonas, lo que podría explicar la persistencia de la microflora en el intestino (10).

El PCNA (antígeno nuclear de proliferación celular) es una proteína auxiliar de la polimerasa delta que desempeña un papel fundamental en el ciclo de la proliferación celular, siendo detectable inmuno histoquímicamente desde la mitad de la fase G1 hasta el final de la fase S (11).

Se lo ha considerado un parámetro fiable de proliferación celular (12) y signo de activación transcripcional (13) en distintas situaciones normales y patológicas.

Nos propusimos estudiar la mucosa intestinal analizando el efecto de la administración oral de leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* en ratones, en diferentes períodos de tiempo.

Específicamente, el objetivo del presente trabajo consistió en estudiar la modificación de la expresión de IgA en células inmunocompetentes presentes en el corion de las vellosidades intestinales; y su posible correlación con procesos de activación y de proliferación celular, detectables mediante expresión de PCNA, en distintos tiempos de alimentación.

Materiales y métodos

Animales: Ratones hembras de la cepa BALB/c, provenientes de la Academia de Medicina, y reproducidos por endocría en nuestro bioterio, fueron separados de sus progenitores a los 21 días de vida.

Los animales fueron alojados en cajas de poliuretano y mantenidos en condiciones convencionales en número de cinco por cada jaula.

A las diez semanas de edad, con 25 gramos de peso promedio, fueron distribuidos aleatoriamente en diferentes lotes de dos categorías: controles (LC) y experimentales (LE).

Procedimiento de alimentación: Todos los animales recibieron comida y bebida *ad libitum*, siendo esta última renovada diariamente.

Los LC recibieron alimento balanceado comercial (23% de proteínas, 6% de fibra cruda, 10% total de minerales, 1.3% Ca, 0.8% P, 12% de humedad y vitaminas) más leche entera SanCor en reemplazo del agua de bebida.

Los LE recibieron el mismo alimento balanceado comercial más leche SanCor Bio en reemplazo del agua de bebida, la que

contiene un número total de $6,66 \times 10^7$ UFC/ml de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei* (cuantificado por cultivo en medio MRS – Britania).

Se omitió el control de bioterio con agua solamente como bebida (LCa), ya que estudios preliminares realizados con estos animales de endocría, arrojaron repetidamente mayores diferencias en la expresión de IgA y la proliferación celular, entre LCa y LE (14), que entre LC (leche entera SanCor en reemplazo del agua de bebida) y LE; proponiéndonos diferenciar en esta experiencia fundamentalmente el efecto atribuible a los probióticos, frente al de microorganismos presentes en la leche entera común, así como a otros componentes de la misma con potencial acción antigénica.

Se plantearon cuatro esquemas, variando los tiempos de administración del alimento suplementado con leche entera (LC) o leche Bio (LE):

- a) Duración total: 2 días de suplementación.
- b) Duración total: 5 días de suplementación.
- c) Duración total: 9 días, con 7 días de suplementación interrumpidos de la siguiente manera:
 - 5 días: con suplemento
 - 2 días: sin suplemento
 - 2 días: con suplemento
- d) Duración total: 36 días, con repetición cada 4 semanas de suplementación, interrumpida de la siguiente manera:
 - 5 días: con suplemento
 - 2 días: sin suplemento
 - 2 días: con suplemento

Este último esquema se propuso para analizar los parámetros de interés a largo plazo, y verificar un posible efecto de acostumbramiento detectado en otras experiencias (14), pero administrando el suplemento probiótico en forma discontinua.

Técnica histológica

Al término de los diferentes períodos de tiempo todos los animales fueron sacrificados, previa anestesia, a fin de disecar el intestino delgado en su totalidad. A trozos de 1 cm de longitud del intestino de todos los animales se les aplicó la técnica de Saint Marie con el propósito de identificar la expresión de inmunoglobulina IgA. Los trozos se fijaron en alcohol 96° a 4° C durante toda la noche, luego fueron deshidratados mediante pasajes de alcohol absoluto y clarificados en xilol. Luego de la inclusión en parafina se realizaron los tacos y cortes de 5 μ m obtenidos con micrótopo fueron montados en portaobjetos tratados con xilane. Se desparafinaron con xilol, se procedió a la hidratación por pasajes en alcoholes, finalmente se lavaron con buffer PBS y sobre ellos se le aplicó una dilución 1/100 del anticuerpo anti Mouse IgA de Sigma-Aldrich marcado con fluoresceína, que se dejó a temperatura ambiente 24 horas en cámara húmeda. A continuación se realizó la lectura empleando un microscopio de inmunofluorescencia, utilizando para el montaje una solución de 1 parte de glicerina por 9 partes de PBS.

A trozos de intestino proveniente de los LC y LE que recibieron alimentación según los esquemas c) y d) se les aplicó además la técnica inmunohistoquímica, inmunoenzimática (streptavidina-peroxidasa con diaminobencidina como cromógeno) para detectar PCNA (proliferation cell nuclear antigen). Se fijaron en formol bufferado durante 12 horas y se procedió a la deshidratación en igual forma a la descrita anteriormente. Cortes 5 μ m fueron desparafinados, rehidratados y lavados con PBS.

Las secciones se incubaron con el anticuerpo primario: anticuerpo monoclonal clon PC-10 (Novocastra Laboratorios, IK clon PC-10) en dilución 1/50 durante toda

la noche a 4°C en cámara húmeda. Seguidamente se lavaron con PBS para luego ser incubadas con el segundo anticuerpo biotinilado (cabra anti Mouse) en dilución 1/50 (origen: Laboratorio de Endocrinología y Tumores Hormonodependientes - LETH - de la Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, U.N.L.) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente los cortes fueron lavados nuevamente con PBS y cubiertos con H₂O₂ al 0,3% en alcohol metílico, para eliminar la peroxidasa endógena, para ser luego incubados con complejo streptavidina-peroxidasa (LSAB2 CODE NO: K1016). Las secciones se revelaron con DAB (diaminobencidina Dako) utilizando H₂O₂ como sustrato y por último fueron deshidratadas y montadas en bálsamo de Canadá.

Para contar con un control de la estructura tisular, un corte de cada lote fue teñido además con la coloración habitual de Hematoxilina – Eosina.

Observaciones al microscopio

Los preparados fueron analizados cuali y cuantitativamente, según la técnica de doble ciego.

Para Ig A se contaron las células con fluorescencia positiva, presentes en el corion de veinte vellosidades intestinales, en cortes longitudinales de dimensiones equivalentes, teniendo en cuenta la estabilización del coeficiente de variación.

Para PCNA se analizaron células con núcleo inmunomarcado en la lámina propia de vellosidades intestinales longitudinales, evaluándose un total de mil núcleos por corte en cada lote.

No se tuvo en cuenta la proliferación a nivel del epitelio superficial. La misma se expresa normalmente con una disminución progresiva de la positividad desde el fondo de las glándulas hasta los extremos de las

vellosidades (15). En este estudio se enfocó el análisis de las células del tejido linfático asociado al corion de la mucosa.

La proliferación celular fue cuantificada evaluando el porcentaje de núcleos inmunomarcados para PCNA utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de núcleos marcados} \times 100 / \text{n}^{\circ} \text{ total de núcleos (marcados + no marcados)}$$

El número de células contado para cada ensayo fue sometido a tratamiento estadístico realizando test de comparaciones múltiples de Scheffé, utilizando el software SPSS 10.0

Resultados y discusión

La expresión de Ig A en el citoplasma de células del corion de las vellosidades intestinales, permitió cuantificar y comparar los linfocitos B activos en los cortes histológicos de los animales pertenecientes a los LC y LE de los cuatro esquemas diferentes.

Sometidos los datos obtenidos a tratamiento estadístico, se observó diferencia significativa a favor de los LE para los ensayos: a) $p=0,026$; b) $p=0,018$ y c) $p=0,009$. En el caso d) con tratamiento prolongado en el tiempo y con interrupciones, la diferencia no resultó significativa ($p=0,312$).

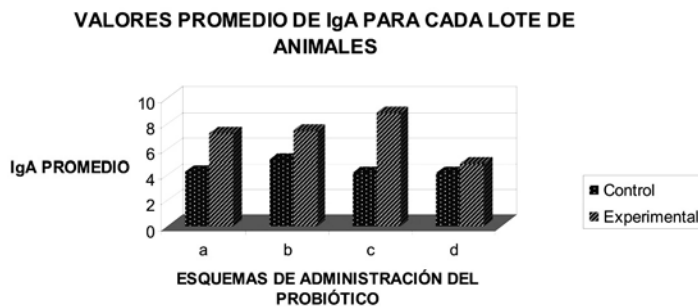
El test de Scheffé no mostró diferencia significativa entre los lotes controles para los cuatro esquemas de alimentación y en el lote experimental solo hay diferencia con el lote d).

La Tabla 1 y Figura 1 muestran los resultados promedios obtenidos en los diferentes tiempos, en forma comparativa. La diferencia de los valores promedios de linfocitos positivos para IgA entre los LE y LC fue mayor en el esquema de alimentación c) que consistió en 7 días de suplementación con probióticos.

El procesamiento de los datos obteni-

Tabla 1: Valores promedios de linfocitos positivos para IgA en cada lote de animales.

Ensayos según esquema de administración	Lote control	Lote experimental
Esquema a)	$\bar{x}=4,2678$	$\bar{x}=7,2667$
Esquema b)	$\bar{x}=5,1333$	$\bar{x}=7,4667$
Esquema c)	$\bar{x}=4,1889$	$\bar{x}=8,8000$
Esquema d)	$\bar{x}=4,1667$	$\bar{x}=4,8667$

**Figura 1:** Valores promedio de linfocitos IgA positivos contados en veinte vellosidades longitudinales para cada lote de animales y para cada esquema de administración del alimento probiótico

dos del recuento de núcleos inmunomarcados para PCNA, arrojó diferencia significativa a favor del LE para el primer ensayo ($p=0,019$). Con respecto a los lotes de ratones del segundo ensayo, no se obtuvo diferencia significativa ($p=0,612$).

El test de Scheffé no mostró diferencia significativa entre los lotes controles para ambos esquemas de alimentación; siendo significativa en los lotes experimentales.

Se adjunta la Tabla 2 y la Figura 2 correspondiente.

El incremento más significativo de linfocitos que expresan Ig A ocurrió bajo el esquema de alimentación c). Estos resultados se relacionan a los obtenidos en anteriores estudios del grupo (5), que referían un aumento significativo del área linfática ocupada por nódulos aislados y confluyentes (LCa: $x=0,7550$, $\sigma=0,2583$; LE: $x=3,0675$, $\sigma=0,8891$) en un período semejante de

tiempo de administración de la misma leche probiótica, aunque sin interrupción, y frente a un LCa.

Respecto a la presencia de linfocitos en lámina propia, se observó en dicho estudio un incremento progresivo, alcanzando el máximo en el séptimo día. También se observó la presencia de extensas placas de Peyer con centros germinativos de nódulos linfáticos agrupados, expresando intensa actividad, en diferentes tramos del intestino delgado (5).

Nuestros trabajos muestran resultados coincidentes con trabajos previamente reportados que expresan un máximo en la expresión de IgA al final de la primera semana y una disminución cuando se administra el probiótico a largo plazo (16). En dicho trabajo se evaluó el efecto de la administración de leche probiótica comercial durante 98 días consecutivos, analizando

Tabla 2: Porcentajes promedio de núcleos inmunomarcados para PCNA para cada lote de animales.

Ensayos según esquema de administración	Lote control	Lote experimental
Esquema c)	$\bar{x}=19,44$	$\bar{x}=30,86$
Esquema d)	$\bar{x}=21,31$	$\bar{x}=25,42$

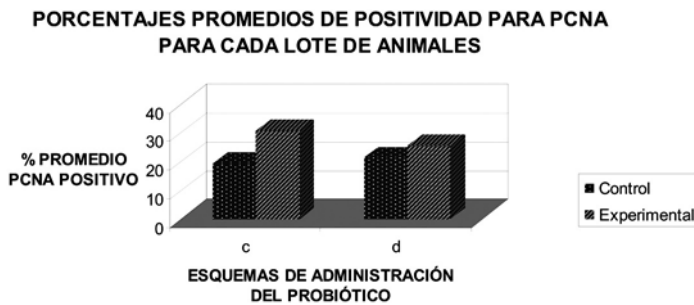


Figura 2: Porcentajes promedio de núcleos inmunomarcados para PCNA sobre un total de mil núcleos por corte para cada lote de animales y para cada esquema de administración del alimento probiótico

la respuesta inmune de mucosas en intestino mediante la determinación de IgA, CD4, CD8, distintas citoquinas y macrófagos peritoneales. Un efecto inmunomodulador y mantenimiento de la homeostasis intestinal, sin efectos secundarios, fue observado a largo plazo. En nuestro caso, la normalización de IgA a los 36 días, estaría sugiriendo la recuperación de la homeostasis, aún con administraciones interrumpidas.

Se ha reportado que algunos de los lactobacilos y también bifidobacterias usados como probióticos favorecen la producción de IgA e incrementan a su vez la captación de los antígenos por parte de las placas de Peyer (17)

En la presente experiencia se observó que el incremento significativo en la expresión de PCNA en las células de la vellosidad intestinal se dio en el esquema c) de suplementación alimentaria con leche Bio. El mismo estaría indicando una activación

de los mecanismos que regulan la proliferación de células del sistema inmune.

Diversos estudios han demostrado una relación directa entre el PCNA y otros factores de proliferación (18). Otros trabajos lo relacionan a un potencial mecanismo para coordinar la replicación de DNA y demuestran que interviene además en la reparación del mismo, expresándose entonces, en algunas oportunidades, fuera del ciclo mitótico (19).

En nuestro caso, podríamos considerar la posibilidad de migración linfocitaria desde los centros germinativos activados, que como ya fueron reportados (20) se desarrollan en este tiempo de administración de la leche probiótica Bio.

El incremento de PCNA estaría más bien relacionado a la actividad de síntesis de la inmunoglobulina, por parte de los linfocitos presentes en el corion de la vellosidad.

Estos ensayos también muestran coinci-

dencias entre el aumento de PCNA, que revela la posibilidad de un incremento de actividad linfocitaria con la mayor expresión de IgA manifestada por estas células, para el mismo período de tiempo.

Un significativo aumento en la expresión de IgA provee una línea de defensa muy importante contra la invasión de agentes patógenos, que ingresando por vía digestiva, asedian constantemente al organismo. La comprensión de las funciones moduladoras del estado fisiológico del huésped podría suministrar una valiosa posibilidad para el uso de bacterias probióticas en la prevención o corrección de diferentes problemas intestinales.

Se necesita profundizar mucho más en los estudios de investigación, tanto en experimentación básica como en la aplicación práctica, para comprender distintas cuestiones todavía sin resolver. Por ejemplo, la naturaleza de la interacción de las leches fermentadas a nivel de la mucosa intestinal y los mecanismos implicados. Será también importante establecer la relación entre la respuesta inmune y los efectos beneficiosos observados en la salud. El siguiente paso consistirá en la identificación de aquellas bacterias lácticas (especie, cepas) más beneficiosas para los distintos propósitos; así como también determinar la concentración y frecuencia de consumo de las diversas modalidades de leches fermentadas, para conseguir los efectos óptimos, y la elaboración de nuevos productos con efectos positivos específicos para un determinado propósito. Será de interés, asimismo, ahondar en la utilización de los productos fermentados y las distintas bacterias lácticas para evitar ciertos síntomas desagradables, permanentes y subliminales, producidos por alergias alimentarias subclínicas.

Conclusiones

Estos resultados, obtenidos en ratones convencionales, confirman la acción de la leche SanCor Bio sobre el sistema inmune de mucosas en períodos cortos de tiempo, con interrupciones, encontrándose una homeostasis en la estimulación cuando se administra por períodos prolongados, lo que sugiere una autorregulación del sistema inmune en condiciones normales.

Nota

El presente trabajo fue desarrollado en el marco del proyecto de investigación CAI+D-2002 titulado: "Estudio morfológico y funcional de macrófagos del aparato digestivo en ratas normales y con patología tumoral, alimentadas con leche fermentada por *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus casei*", bajo la dirección de la Bioq. Kyrian Minella

Bibliografía

1. Guidelines for the evaluation of probiotics in food London Ontario, Canadá, en Desarrollo Científico Tecnológico SanCor / CONICET, RNC. 2006. "Publicación Científica sobre Nutrición Clínica". **15** (1): 4-35.
2. Perdígón, G.; Nader de Macias, M.E.; Álvarez, S.; Medici, M.; Oliver, G.; and Pesce de Ruiz Holgado, A. 1986. "Effect of mixture of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* Administered Orally on the Immune System in Mice". *Journal of Food protection*. **49**. Nº12: 986-989.
3. Perdígón, G.; Álvarez, S.; Medici, M.; and Pesce de Ruiz Holgado, A. 1993. "Influence of the use of *L. casei* as oral adjuvant on the levels of secretory Ig A during an infection with *Salmonella typhimurium*". *Food and Agricultural Immunology* **5**: 27-37.

4. de Moreno de Leblanc, A.; Maldonado Galdeano, C.; Chaves, S.; Perdigon, G. 2005. "Oral administration of L. Casei CRL 431 increases immunity in broncheus and mammary glands". *European Journal Inflammatory*. **3**(1): 23-28.
5. Minella, K.; Costamagna, A.; Fuentes, M. 2002. "Modificaciones morfológicas en las expresiones del tejido linforeticular asociado a intestino (GALT) en ratones tratados con leche fermentada Bio". *Revista Fabricib* **6**: 97-103.
6. Shibahara, T.; Wilcox, J.N.; Couse, T.; and Madara, J.L. 2001. "Characterization of Epithelial Chemoattractants for Human Intestinal Intraepithelial Lymphocytes". *Gastroenterology*. **120**: 60-70.
7. Mayer, L.; Blumberg, R. 1999. "Antigen-Presenting Cells. Epithelial Cells". **22**: 365- 379.
8. Haller, D.; et al. 2000. "Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nonpathogenic bacteria in vitro evidence of NK cells as primary targets". *Infection and Immunity*. **68** (2): 752-759.
9. Lamm, M.; Nedrud, J.; Kaetzel, C.H.; and Mazanec, M. 1996. "New insights into epithelial cell functions in mucosal immunity. Neutralization of intracellular pathogens and excretions of antigens by IgA". Academic Press USA. **12**: 141-149.
10. Mestecky, J.; McGhee, J.; and Elson, C. 1999. "Intestinal Ig.A system". *Inmunology and Allergy Clinics of North America*. **8**: 349-368.
11. Treviño López, A.; Carbajo Pérez, E.; López Muñoz, A.; Claros Gonzalez, I.; Herrero Zapatero, A. 1994. "El antígeno de proliferación celular. Respuestas complejas a un apelativo simple". *Patología*. **27**: 343-347.
12. Linden, M.D.; Torres, F.X.; Kubus, J.; Zarbo, R. J. 1992. "Clinical application of morphology and immunocytochemical assessments of cell proliferations". *American J Clinics Patology*. Ed. 97(5).
13. Morris, G. F.; Bischoff, J. R.; Matheus, M. B. 1996. "Transcriptional activation of the human proliferating cell nuclear antigen promoter by p53". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**(2): 895-899.
14. Minella, K.; Costamagna, A.; Fuentes, M.; Moreira, M.; Fabro, A.; Benmelej, A.; Theiller, E.; Gallo, J. 2005. "Immunological effect of probiotic milk Bio on Balb/c mice intestinal mucosal". *International Journal of Morphology*. **23**(1): 45-94.
15. Lodish, H.; Berk, A.; and Matsudaira; Kaiser; Krieger; Scott; Zipursky; Darnell. *Biología Celular y Molecular*. 2006. 5ª Editorial Panamericana: 903.
16. de Moreno de LeBlanc, A.; Chaves, S.; Carmega, E.; Welli, R.; Antoine, J.; Perdigon G. 2008. "Effect of long term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity of and the activity of peritoneal macrophage". *Immunobiology*. **213**(2): 97-108.
17. Laiho, K.; Ouwehand, A.; Salminen, S.; Isolauri, E. 2002. "Inventing probiotic functional foods for patients with allergic disease". *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*. **89**(6):75-82.
18. García, R. L.; Costera, M.D.; Gown, A.M. 1989. "Análisis de proliferative grade using PCNA/CYCLIN monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues". *American Journal Pathology*. **134**(4): 733-739.
19. Warbrick, E.; Lane, D. P.; Glover, D. M.; Cox, L.S. 1997. "Homologous regions of Fen1 and p21 Cip1 complete for binding to the same site on PCNA: A potential mechanism to coordinate DNA replication and repair oncogene". *American Journal Pathology*. **14**(19): 2313-2331.
20. Costamagna, A. 2002. "Folículos linfáticos en intestinos de ratones estimulados con *Lactobacillus casei*". *Revista Chilena de Anatomía*. **20**(1): 69-110.