

## MOLECOLE VEGETALI NELLA STIMOLAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ DI CELLULE DENDRITICHE AVIARIE

Ghiselli F.<sup>1</sup>, Rossi B.<sup>2</sup>, Piva A.<sup>1,2</sup>, Grilli E.<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> DIMEVET – Via Tolara di Sopra, 43, 40064 Ozzano dell'Emilia (BO) – Università degli studi di Bologna (BO), Italia;

<sup>2</sup> Vetagro S.p.A. - Via Ignazio Porro, 2, 42124 Reggio Emilia (RE), Italia;

<sup>3</sup> Vetagro, Inc. - 17 E. Monroe St., Suite #179, 60604 Chicago (IL), USA.

### Summary

Botanicals are commonly used in animal production for their antimicrobial, anti-inflammatory and immune-boosting properties. Dendritic cells (DC) are specialized antigen-presenting cells and sentinel cells that regulate the immune response. In this study avian DC were generated from bone marrow precursors cultured in media containing both GM-CSF and IL4, then the immature DC were stimulated with *E. coli* O55:B5 lipopolysaccharide (LPS) to induce maturation. The effect of different molecules on DC maturation were analyzed. Thymol and grape seed extract were found to interfere with the maturation and differentiation of immature DC in the presence of LPS. These preliminary findings may address specific formulation of feed additives able to modulate the immune-system by promoting immune-tolerance, with the aim to ameliorate or prevent inflammatory events in poultry.

### INTRODUZIONE

L'utilizzo di molecole di origine vegetale è molto comune nel trattamento e nella prevenzione di patologie aviarie. Queste molecole sono da tempo studiate per le loro proprietà antimicrobiche e negli ultimi anni sono sempre più discusse, in letteratura, anche le loro potenzialità immuno-modulatorie [1–3]. Tante problematiche nell'allevamento di specie aviarie derivano da patologie sub-cliniche spesso correlate a stati infiammatori difficilmente diagnosticabili [4–6]. La modulazione del sistema immunitario potrebbe pertanto risultare un approccio chiave nel prevenire l'insorgenza di queste patologie o nel ridurne gli effetti.

Tra le cellule coinvolte nella risposta immunitaria ritroviamo le cellule dendritiche (DC), le quali sono uno dei tre tipi di cellule fagocitiche mononucleate ed hanno un importante ruolo sia nell'immunità che nella tolleranza immunologica. Esse si dividono in sottopopolazioni distinte, le DC immature (imDC) e le DC mature (mDC). Le imDC si trovano nei tessuti periferici dove lavorano come sentinelle e facilitano la tolleranza immunitaria [7]. Dopo l'incontro con l'antigene, le imDC subiscono un processo di attivazione diventando così mDC. Le mDC sono necessarie, in modo critico, per l'innesco dei linfociti T naïve. Dopo l'attivazione, le cellule T naïve iniziano a proliferare e differenziarsi in cellule effettrici, necessarie per la promozione della risposta immunitaria adattativa contro i patogeni [8]. Di contro l'induzione di un fenotipo tollerogenico nelle DC, tramite la modulazione della maturazione, permette di ridurre o sopprimere l'innesco della risposta immunitaria, prevenendo stati infiammatori clinici o sub-clinici. Quando una imDC

diventa mDC attivata subisce diversi cambiamenti fenotipici e funzionali. Uno dei principali cambiamenti porta all'aumento o alla diminuzione dei marcatori di maturazione, tra cui CD40, CD80, CD83 e CD86. Inoltre, le mDC si caratterizzano per la produzione di citochine e capacità di attivare le cellule T CD4<sup>+</sup>. La riduzione o la mancata espressione del CD86 dopo l'esposizione ad un agente infiammatorio è correlata invece ad un fenotipo tollerogenico delle DC [9] quindi immunotollerante.

La modulazione delle DC, da parte di molecole vegetali è stata già documentata in alcuni studi su cellule di uomo [10,11] e topo [12]. In generale, tali composti vegetali e i loro costituenti possono migliorare la differenziazione delle mDC dai precursori [1] o modulare le funzioni delle mDC stesse per indurre o sopprimere la risposta immunitaria, generando un fenotipo attivato o tollerogenico [13].

Tenendo presente l'importante ruolo e le funzioni delle DC nel sistema immunitario, l'obiettivo di questo studio è stato quello di valutare l'impatto di timolo e estratto di semi d'uva (ESU) sulla differenziazione e maturazione di DC aviarie derivate dal midollo osseo, inducendole ad un fenotipo tollerogenico. Tali molecole sono state messe a confronto con gli effetti del desametasone, un noto antinfiammatorio steroideo, e della colistina, un antibiotico della classe delle polimixine, efficace contro i coliformi (es. *Salmonella spp.* e *Escherichia coli*). La colistina, a differenza di altri composti, che agiscono sulla sintesi proteica batterica, come la bacitracina, ha un'azione diretta contro la struttura dell'LPS, rendendola quindi un candidato interessante, per valutare una eventuale inibizione, da parte di un antibiotico, della maturazione delle cellule dendritiche stimolata dal solo LPS e non dalla presenza di un patogeno. Per raggiungere questo scopo, è stato ottimizzato un protocollo per la generazione di DC dai precursori del midollo osseo di pollo. In secondo luogo, tali DC sono state utilizzate come strumento di screening di molecole ad azione antinfiammatoria.

## **MATERIALI E METODI**

### *Estrazione dei precursori dal midollo osseo di pollo*

Uova SPF sono state acquistate da ValoBiomedica (Osterholz-Scharmbeck, Germania) e incubate in un'incubatrice semiautomatica per 19 giorni. Al 19° giorno di incubazione gli embrioni di pollo sono stati soppressi mediante congelamento a -80°C per 25 minuti e successiva dislocazione cervicale. Tutte le procedure sono state eseguite in conformità con il D.lgs. 26/2014, attuazione della direttiva 2010/63/UE sulla protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.

Dagli embrioni sono state recuperate le tibie e da esse è stato rimosso il tessuto muscolare circostante, utilizzando strumenti sterili. Le tibie sono state quindi lavate in una piastra Petri contenente una soluzione salina tampone fosfato (PBS, senza Ca<sup>2+</sup> Mg<sup>2+</sup>; Sigma-Aldrich) e addizionata di penicillina (1 U/mL; Sigma-Aldrich), streptomycina (1 µg/mL; Sigma-Aldrich) e anfotericina (1 µg/mL - Sigma-Aldrich). Le ossa sono state poi processate sotto cappa biologica BSL-2 in condizioni di sterilità. Il midollo è stato recuperato con PBS a temperatura ambiente utilizzando una siringa. Le cellule in PBS sono state separate per gradiente di densità con Histopaque (Sigma-Aldrich) e centrifugate a 700g per 30 minuti a 25°C. Le cellule all'interfaccia sono state raccolte, lavate con PBS antibiotato e, infine, 10 µl di sospensione cellulare sono stati miscelati 1:1 con una soluzione trypan blue 0.4%

(Sigma-Aldrich) e contaminate in una camera di Bürker. Quelle risultate negative alla colorazione sono state contaminate come vitali.

#### *Generazione e maturazione di cellule dendritiche derivate dal midollo osseo di pollo (chBM-DC)*

Le cellule ottenute dalle tibie sono state coltivate a una concentrazione finale di  $5 \times 10^5$  cellule/ml in flask a bassa adesione cellulare (Sarstedt) per 7 giorni a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Il terreno di coltura è composto da RPMI-1640 (Corning) contenente 10% di siero fetale bovino (FBS - Sigma-Aldrich), 1% amminoacidi non essenziali (Sigma-Aldrich), 2mM L-glutamina (Sigma-Aldrich), 1 U/ml penicillina e 1 µg/ml streptomicina. Per favorire la maturazione delle cellule dendritiche (chBM-DC), al terreno di coltura sono stati aggiunti 50 ng/mL Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor (GM-CSF) e 10 ng/mL IL-4 di pollo.

Dopo 7 giorni di coltura, le cellule in sospensione o blandamente adese sono state recuperate con una digestione di 5 minuti con accutasi (Corning). Per indurre la maturazione, al giorno 7 le cellule in coltura sono state divise in due gruppi. Un gruppo è stato mantenuto in terreno di coltura come controllo negativo (CTR), mentre un secondo gruppo è stato stimolato con 500 ng/ml di LPS di *E. coli* O55:B5 (Sigma-Aldrich) per 24 ore. All'ottavo giorno di coltura è stata osservata la morfologia cellulare e poi le cellule sono state raccolte per la successiva estrazione dell'RNA utile per le analisi di espressione genica.

#### *Valutazione dell'effetto di molecole vegetali sulla maturazione di chBM-DC*

Dopo 7 giorni di coltura in terreno addizionato con fattori di crescita, le imDC sono state utilizzate per valutare gli effetti di diverse molecole sulla loro maturazione. Le imDC venivano divise in 4 gruppi (n=6): 1) un gruppo di controllo negativo (CTR-) tenuto in terreno completo; 2) un gruppo trattato con solo LPS, per indurre la stimolazione, usato come controllo positivo (LPS); 3) un gruppo trattato con la molecola d'interesse (TRT); 4) un gruppo trattato con LPS e la molecola d'interesse (LPS+TRT). In particolare, sono state testate timolo 10 ppm e 100 ppm di estratto di semi d'uva (ESU). L'antinfiammatorio desametasone 1 µM è stato utilizzato come controllo di inibizione della maturazione, mentre colistina 4ppm è stato utilizzato con controllo degli effetti di un antibiotico sulla maturazione delle cellule dendritiche.

#### *Caratterizzazione e valutazione dell'espressione genica di marcatori della maturazione mediante qPCR*

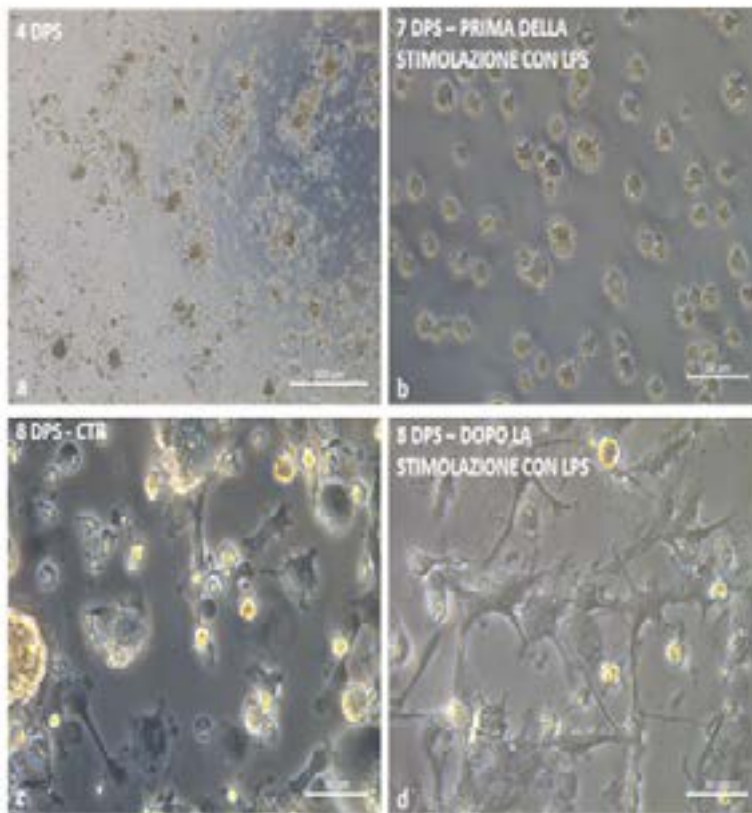
L'RNA totale è stato estratto utilizzando il kit Nucleospin® RNA (Macherey-Nagel) come descritto dal produttore. Dopodiché l'RNA estratto è stato quantificato tramite spettrofotometria (µDrop™ Varioskan Lux, Thermo-Scientific) e 500 ng sono stati poi retro-trascritti a cDNA utilizzando il kit iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories), come da specifiche del produttore. La qPCR è stata eseguita utilizzando iTaq Universal SYBR Green Supermix (Bio-Rad Laboratories) e i primers dei vari geni sono stati utilizzati ad una concentrazione di 500 nM. Il ciclo di amplificazione prevedeva 5 minuti a 95°C, poi 40 cicli composti da 5 secondi a 95°C e 30 secondi a 60°C. L'elenco dei primers utilizzati è riportato in tabella 1 (Tab 1). I risultati sono stati espressi utilizzando il metodo del  $\Delta\Delta Ct$  [14].

	<i>Gene</i>	<i>Sequenze primers (5'-&gt; 3')</i>	<i>Lunghezza prodotto (bp)</i>	<i>Accession N.</i>
Molecole co- stimolatorie	CD40	F: AGACCTGCGTGGAGAACGAG R: GTGAGGTCATCCGGGCTCA	78	NM_204665.2
	CD83	F: CGAAACAAGCCAGCCAAGCA R: GCCTCCTTGTCACAGCCTGA	100	XM_418929.7
	CD86	F: ACCTTGCCAGGAAAAACACG R: TGCCCTCATCCACAATCCC	115	NM_001037839.1
	MHC-II	F: GGGCGGTCTGTGCTCTTCTA R: TCGACTCTCTCCACCACTCCT	139	NM_001044679.2
Citochine	IL1 $\beta$	F: TGCCTGCAGAAGAAGCCTCG R: CTCGCAGCAGTTTGTCAT	137	NM_204524.1
	IL6	F: GCAGGACGAGATGTGCAAGA R: ACCTTGGGCAGGTTGAGGTT	84	NM_204628.1
	INF $\gamma$	F: ACAACCTTCCTGATGGCGTG R: AGTTCATTGCGGGCTTTGCG	100	NM_205149.1

**Tabella 1:** Sequenze primers utilizzate per la caratterizzazione biomolecolare. CD=cluster di differenziazione; MHC-II=complesso maggiore di istocompatibilità di seconda classe; IL=interleuchina; INF $\gamma$ =interferon-gamma;

## RISULTATI

*Generazione e maturazione di cellule dendritiche derivate dal midollo osseo di pollo*  
Le cellule isolate dal midollo osseo sono state coltivate per 7 giorni in presenza dei fattori stimolatori GM-CSF e IL4. Dopo circa 4 giorni erano visibili in coltura degli aggregati cellulari (Fig 1a) tipici della proliferazione di cellule dendritiche. Dopo 7 giorni in coltura, le chBM-DC sono state recuperate mediante digestione in accutasi e sono state indotte a maturare mediante LPS (Fig 1b). Dopo 24h di esposizione ad LPS le cellule hanno assunto una morfologia più allungata e aderente, tipica delle mDC (Fig 1c).

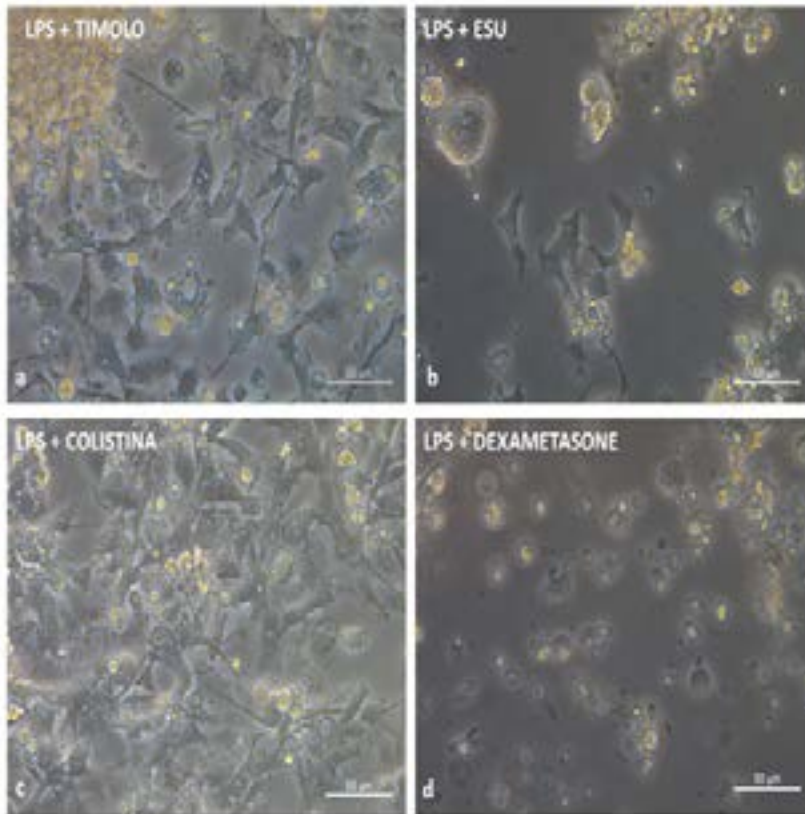


**Figura 1:** chBM-DC a diversi stadi di maturazione. DPS=days post seeding. a) 4 giorni dopo l'isolamento, in presenza di GM-CSF e IL4; b) imDC prima della stimolazione a 7 giorni di coltura; c) mDC dopo 24h di stimolazione con LPS 500 ng/mL.

*Valutazione dell'effetto di molecole vegetali sulla maturazione di chBM-DC*

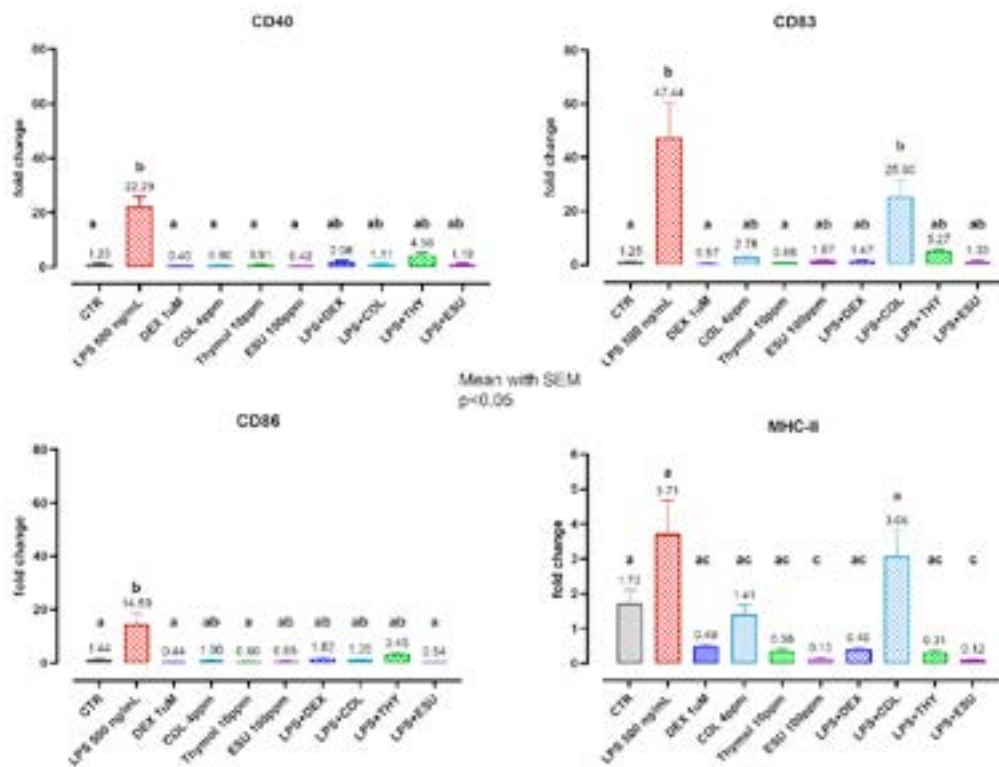
In figura 2 è possibile osservare gli effetti di molecole vegetali sulle cellule dendritiche. Dopo 24h di stimolazione con LPS in presenza di 10 ppm di timolo si è osservata una morfologia allungata (Fig 2a) simile a quella della sola stimolazione con LPS. Le cellule trattate invece con 100 ppm di ESU (Fig 2b) hanno mostrato una morfologia tondeggianta, simile a quelle non stimolate (Fig 1b), anche dopo stimolazione con LPS. La stessa morfologia si è vista in cellule trattate con desametasone 1  $\mu$ M (Fig 2c) mentre quelle trattate con colistina 4 ppm hanno invece mostrato una morfologia mista (Fig 2d).

Le singole molecole utilizzate sulle cellule, senza stimolazione con LPS, non hanno indotto cambiamenti morfologici rispetto al CTR - (dati non mostrati).



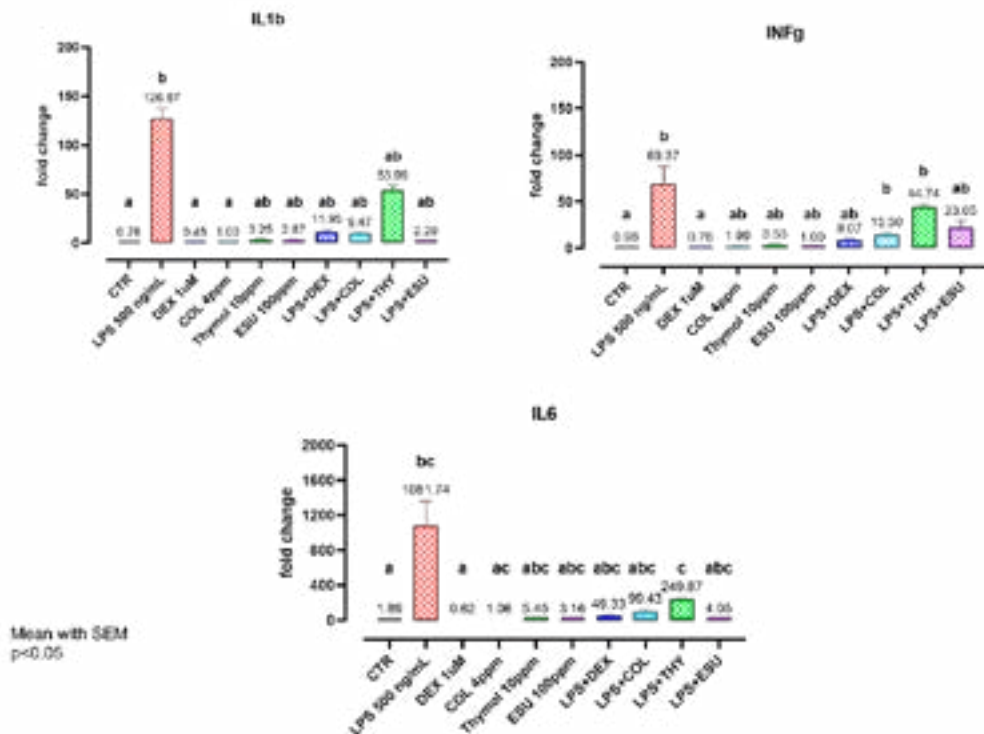
**Figura 2:** chBM-DC dopo stimolazione con LPS in presenza di altre molecole. a) LPS 500 ng/mL + Timolo 4ppm; b) LPS 500 ng/mL + NORGRAPE 100ppm; c) LPS 500 ng/mL + COLISTINA 4ppm; d) LPS 500 ng/mL + Desametasone 1uM  
*Caratterizzazione e valutazione dell'espressione genica di marcatori e citochine mediante qPCR*

Dalle qPCR riportate in figura 3 è possibile vedere gli effetti di inibizione sull'espressione di molecole co-stimolatorie delle chBM-DC delle varie molecole testate.



**Figura 3:** Espressione genica di molecole co-stimolatorie. DEX=Desametasone, COL=colistina, ESU=Estratto di semi di uva. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative ( $p<0.05$  - Test di Kruskal-Wallis)

In dettaglio, il desametasone ha inibito la produzione di tutte le citochine prese in esame e ridotto la maturazione delle cellule dendritiche riducendo l'espressione del CD40, CD83, CD86 e MHC-II, provando quindi la sua efficacia come antinfiammatorio. La colistina 4ppm non è invece stata completamente efficace nel ridurre l'espressione di C83 e MHC-II. Le molecole vegetali sono state invece in grado di ridurre l'espressione di tutte le molecole co-stimolatorie testate, in maniera simile al desametasone.



**Figura 4:** Espressione genica di citochine pro-infiammatorie. DEX=Desametasone, COL=colistina, ESU=Estratto di semi di uva. Lettere differenti indicano differenze statisticamente significative ( $p < 0.05$  - Test di Kruskal-Wallis)

In figura 4 vengono invece riportati i risultati dell'espressione genica riguardante le citochine pro-infiammatorie. Qui è possibile notare che ESU, come il desametasone, è efficace nell'inibire l'espressione di tali citochine, mentre colistina e timolo hanno avuto un effetto meno marcato.

## DISCUSSIONE

Diverse patologie che colpiscono il settore dell'avicoltura sono caratterizzate da uno stato sub-clinico difficilmente individuabile che comporta gravi perdite nelle performance produttive. Tali stati sub-clinici sono spesso correlati a stati infiammatori e a risposte immunitarie non propriamente regolate. La modulazione della risposta infiammatoria è diventata uno degli strumenti più promettenti per migliorare lo stato di salute generale dell'animale, garantendo una risposta immunitaria mirata e migliore contro eventuali patogeni. Le molecole vegetali sono note per le loro proprietà antimicrobiche e antinfiammatorie. Infatti, queste possono essere utilizzate come additivi per agire direttamente contro i patogeni o per regolare il sistema immunitario dell'animale.



In questo studio si è voluto studiare l'effetto di un estratto di semi di uva ricco in polifenoli e un composto naturale-identico puro, il timolo, che rappresenta uno dei componenti principali degli oli essenziali di timo e origano [15]. Si è deciso di partire da questi due tipi di molecole per via dei loro noti effetti antinfiammatori e immunoregolatori precedentemente verificati su altre linee cellulari dal nostro gruppo di ricerca (dati non pubblicati). Gli effetti di tali molecole vegetali, sulle cellule dendritiche, sono stati confrontati con quelli determinati da un corticosteroide, il desametasone, che agisce sul pathway Nf-Kb [16] e un antibiotico ad azione diretta contro i lipopolisaccaridi batterici, la colistina. La colistina è un antibiotico appartenente alla classe delle polimixine il cui meccanismo d'azione è volto al danneggiare la struttura tridimensionale dell'LPS [17].

Il trattamento con desametasone è risultato molto efficace nel bloccare l'azione dell'LPS, prevenendo la maturazione delle cellule dendritiche di pollo, spingendole verso un fenotipo tollerogenico e inibendo quasi totalmente la secrezione di citochine e l'espressione di tutte le molecole co-stimolatorie. Come ulteriore controllo, è stato anche testato l'effetto della colistina. L'azione della colistina sull'LPS non è risultata sufficiente però a bloccare completamente la maturazione delle imDC. Infatti viene comunque stimolata fortemente la produzione di CD83, MHC-II e Interferon-gamma. Questo effetto di inibizione parziale è già stato studiato da Tynan et al., (2012) [18]. Nel loro lavoro, infatti, viene riportato come le polimixine non siano pienamente in grado di inibire l'azione dell'LPS su cellule dendritiche murine [18]. Inoltre, Valentini e colleghi (2004), analizzando l'effetto della polimixina B sulla maturazione di cellule dendritiche umane, riportano che le polimixine sono in grado di indurre nelle cellule dendritiche modificazioni fenotipiche e strutturali riconducibili ad un processo di maturazione [19].

Le molecole vegetali da noi testate hanno ridotto in maniera significativa la produzione di citochine e i livelli di espressione di molecole co-stimolatorie, indicando un promettente effetto immunosoppressivo. Le imDC infatti tipicamente hanno bassi livelli di molecole co-stimolatorie CD83 e CD86 mentre hanno moderati livelli di MHC-II [20]. Quando le mDC vengono stimulate con LPS, e attivate a produrre una risposta infiammatoria, queste maturano esprimendo elevati livelli di CD40, CD83 e CD86 e hanno una forte produzione di citochine pro-infiammatorie [21]. La minor espressione di CD86 viene collegata ad una ridotta capacità delle DC di attivare i linfociti T durante un evento infiammatorio [22], rendendo quindi le molecole testate ancor più promettenti [9]. La riduzione di espressione del CD86 è correlata ad un fenotipo tollerogenico delle DC [9] quindi immunotollerante. Timolo e polifenoli sono caratterizzati da una spiccata azione antinfiammatoria, infatti il timolo 10ppm ha parzialmente ridotto l'espressione di CD86 nelle cellule stimulate con LPS, indicando comunque una parziale differenziazione ad un fenotipo tollerante. Inoltre, il timolo ha avuto un effetto meno forte sull'inibizione dell'espressione di citochine pro-infiammatorie se comparato con desametasone ed ESU. I polifenoli contenuti nell'estratto d'uva, invece, hanno ridotto in maniera statisticamente significativa l'espressione dei marker associati alla maturazione, inducendo quindi un fenotipo tollerogenico.

È interessante quindi sottolineare che, rispetto alla colistina, che ha avuto un effetto parziale sulla componente immunitaria, timolo e ESU si sono rivelati molto efficaci come immuno-modulatori. Questo mette in luce le peculiarità delle molecole vege-

tali di essere in grado di svolgere sia un'azione antimicrobica che antinfiammatoria. Inoltre, tali molecole si sono anche rivelate antinfiammatori efficaci in maniera sovrapponibile a quanto visto con l'utilizzo del desametasone.

Studi futuri prevederanno studi approfonditi sul meccanismo d'azione di diverse molecole vegetali nel processo di maturazione delle imDC dal punto di vista della fagocitosi, della secrezione di citochine e della presenza di molecole co-stimolatorie sulla superficie cellulare.

## CONCLUSIONI

In questo studio sono state poste le basi per l'analisi di effetti immunoregolatori di molecole vegetali su cellule dendritiche di pollo derivate dal midollo osseo. È stato messo a punto un protocollo per la generazione di cellule dendritiche aviarie immature partendo dai precursori ematopoietici contenuti nel midollo osseo. Queste sono state indotte alla maturazione tramite stimolazione con LPS ed è stato studiato l'effetto inibitorio di alcune molecole su questo processo. Lo studio ha mostrato promettenti risultati per l'impiego di molecole vegetali come immunomodulatori della risposta infiammatoria generata da cellule dendritiche nel pollo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Kurokawa K, Ishii T, An W, Kanazawa Y, Ozawa M, Ichianagi T, et al. A Heat-Stable Extract From *Mucuna* Stimulates the Differentiation of Bone Marrow Cells Into Dendritic Cells and Induces Apoptosis in Cancer Cells. *Nutr Cancer*. Routledge; 2011;63:100–8.
2. An W-W, Kanazawa Y, Ozawa M, Nakaya K, Saito T, Tanaka A, et al. Dendritic Cell Differentiation and Tumor Cell Apoptosis Induced by Components of a Poly-phenylpropanoid Polysaccharide Complex. *Anticancer Res. International Institute of Anticancer Research*; 2010;30:613–22.
3. Nakaya K, Nabata Y, Ichianagi T, An WW. Stimulation of Dendritic Cell Maturation and Induction of Apoptosis in Leukemia Cells by a Heat-stable Extract from Azuki bean (*Vigna angularis*), a Promising Immunopotentiating Food and Dietary Supplement for Cancer Prevention. *Asian Pac J Cancer Prev. Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*; 2012;13:607–11.
4. Abreu DLC, Santos FF, José DS, Tortelly R, Nascimento ER, Pereira VLA. Pathological Aspects of a Subclinical Marek's Disease Case in Free-Range Chickens. *Braz J Poult Sci. Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas*; 2016;18:197–200.
5. Homer BL, Butcher GD, Miles RD, Rossi AF. Subclinical infectious bursal disease in an integrated broiler production operation. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc.* 1992;4:406–11.
6. McNulty MS, McIlroy SG, Bruce DW, Todd D. Economic Effects of Subclinical Chicken Anemia Agent Infection in Broiler Chickens. *Avian Dis.* [American Association of Avian Pathologists, Allen Press]; 1991;35:263–8.
7. Posch W, Lass-Flörl C, Wilflingseder D. Generation of Human Monocyte-derived Dendritic Cells from Whole Blood. *J Vis Exp JoVE.* 2016;
8. Xia D, Lou W, Fung K-M, Wolley CL, Suhail MM, Lin H-K. Cancer Chemopreventive Effects of *Boswellia sacra* Gum Resin Hydrodistillates on Invasive Urothelial Cell Carcinoma: Report of a Case. *Integr Cancer Ther.* SAGE

- Publications Inc STM; 2017;16:605–11.
9. Zheng Y, Manzotti CN, Liu M, Burke F, Mead KI, Sansom DM. CD86 and CD80 Differentially Modulate the Suppressive Function of Human Regulatory T Cells. *J Immunol. American Association of Immunologists*; 2004;172:2778–84.
  10. Aldahlawi AM, Alzahrani AT, Elshal MF. Evaluation of immunomodulatory effects of *Boswellia sacra* essential oil on T-cells and dendritic cells. *BMC Complement Med Ther.* 2020;20:352.
  11. Aldahlawi AM. Modulation of dendritic cell immune functions by plant components. *J Microsc Ultrastruct.* 2016;4:55–62.
  12. Miller AK, Benson JM, Muanza DN, Smith JR, Shepherd DM. Anti-inflammatory effects of natural product formulations on murine dendritic cells. *J Diet Suppl.* 2011;8:19–33.
  13. Amirghofran Z, Ahmadi H, Karimi MH. Immunomodulatory activity of the water extract of *Thymus vulgaris*, *Thymus daenensis*, AND *Zataria multiflora* on dendritic cells and T cells responses. *J Immunoassay Immunochem. Taylor & Francis*; 2012;33:388–402.
  14. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* 2001;25:402–8.
  15. Rossi B, Toschi A, Piva A, Grilli E. Single components of botanicals and nature-identical compounds as a non-antibiotic strategy to ameliorate health status and improve performance in poultry and pigs. *Nutr Res Rev.* 2020;1–17.
  16. Masić R, Dietz AB, Vuk-Pavlović S. Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells. *J Leukoc Biol.* 1999;66:909–14.
  17. Andrade FF, Silva D, Rodrigues A, Pina-Vaz C. Colistin Update on Its Mechanism of Action and Resistance, Present and Future Challenges. *Microorganisms. Multidisciplinary Digital Publishing Institute*; 2020;8:1716.
  18. Tynan GA, McNaughton A, Jarnicki A, Tsuji T, Lavelle EC. Polymyxin B Inadequately Quenches the Effects of Contaminating Lipopolysaccharide on Murine Dendritic Cells. *PLOS ONE. Public Library of Science*; 2012;7:e37261.
  19. Valentinis B, Bianchi A, Zhou D, Cipponi A, Catalanotti F, Russo V, et al. Direct Effects of Polymyxin B on Human Dendritic Cells Maturation. *J Biol Chem.* 2005;280:14264–71.
  20. Wu Z, Rothwell L, Young JR, Kaufman J, Butter C, Kaiser P. Generation and characterization of chicken bone marrow-derived dendritic cells. *Immunology.* 2010;129:133–45.
  21. Tze LE, Horikawa K, Domaschenz H, Howard DR, Roots CM, Rigby RJ, et al. CD83 increases MHC II and CD86 on dendritic cells by opposing IL-10-driven MARCH1-mediated ubiquitination and degradation. *J Exp Med.* 2011;208:149–65.
  22. Kruse M, Rosorius O, Krätzer F, Stelz G, Kuhnt C, Schuler G, et al. Mature Dendritic Cells Infected with Herpes Simplex Virus Type 1 Exhibit Inhibited T-Cell Stimulatory Capacity. *J Virol. American Society for Microbiology*; 2000;74:7127–36.