

UNIVERSIDAD DE GRANADA

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología



MODIFICACIÓN DE LA RESPUESTA BIOLÓGICA POR
MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS EN MODELOS DE ANIMALES
INMUNOCOMPETENTES E INMUNOCOMPROMETIDOS

M^a del Carmen Bujalance Martínez-Cañavate

Tesis Doctoral

Granada, 2006

INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Conceptos.....	2
1.1.1. Concepto de probiótico.....	2
1.1.2. Conceptos de prebiótico y simbiótico.....	7
1.2. Microorganismos probióticos: situación taxonómica.....	9
1.2.1. Probióticos eucariotas.....	9
1.2.2. Probióticos procariotas: el género <i>Lactobacillus</i>	11
1.2.3. Probióticos procariotas: bifidobacterias.....	14
1.2.4. Otros probióticos procariotas.....	15
1.3. Características de las cepas probióticas.....	17
1.4. Ecosistema intestinal y probióticos.....	21
1.4.1. Tracto digestivo e inmunidad mucosal.....	21
1.4.2. Microbiota del tracto digestivo.....	26
1.4.3. Interacciones entre microbiota intestinal y hospedador.....	34
1.4.4. Colonización por bacterias exógenas: enteropatógenos y probióticos.....	44
1.5. Alimentos que contienen probióticos.....	46
1.5.1. El yogur.....	48
1.5.2. El kéfir.....	52
1.6. Efectos beneficiosos de los probióticos.....	54
1.6.1. Interfaz metabólica en el intestino.....	56
1.6.2. Protección frente a diarreas e infecciones gastrointestinales.....	65
1.6.3. Modificación de la respuesta biológica.....	71
1.6.4. Respuesta intracelular.....	82

1.6.5. Estructuras bioactivas.....	85
1.6.6. Perspectivas.....	88
2. OBJETIVOS.....	92
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	95
3.1. Bacterias y condiciones de crecimiento.....	96
3.1.1. Cepas de <i>Lactobacillus</i>	96
3.1.2. Bacterias enteropatógenas y enterobacterias.....	97
3.1.3. Bacterias de la microbiota intestinal murina.....	99
3.2. Sistema de identificación API 50 CH.....	100
3.3. Resistencia al pH ácido y sales biliares.....	101
3.3.1. Resistencia al pH ácido.....	101
3.3.2. Crecimiento en un medio de cultivo suplementado con sales biliares.....	102
3.3.3. Supervivencia en presencia de bilis.....	103
3.4. Medida de la adherencia a células de epitelio intestinal.....	104
3.4.1. Obtención y cultivo de las células.....	104
3.4.2. Ensayo de adherencia.....	105
3.5. Ensayos de antibiosis <i>in vitro</i>	106
3.5.1. Antibiosis en placa.....	106
3.5.2. Determinación de la actividad inhibidora del crecimiento en sobrenadantes de cultivos de <i>L. plantarum</i>	107
3.6. Animales.....	109
3.7. Tratamiento de los animales con bacterias probióticas.....	109
3.7.1. Experimentos de colonización.....	109
3.7.2. Ensayos de bioseguridad.....	110

3.8. Infección experimental.....	111
3.9. Cultivos de homogeneizados de órganos.....	112
3.10. Coprocultivos.....	112
3.10.1. Evaluación de la colonización por <i>L. plantarum</i>	112
3.10.2. Evaluación de la infección experimental por <i>Y. enterocolitica</i>	113
3.10.3. Evaluación del tratamiento con ciprofloxacino.....	113
3.11. Proliferación de esplenocitos en respuesta a mitógenos.....	114
3.11.1. Medio de cultivo de células.....	114
3.11.2. Obtención de suspensiones de esplenocitos.....	115
3.11.3. Recuento de células viables y ajuste de las suspensiones.....	116
3.11.4. Cultivo de esplenocitos.....	117
3.11.5. Medida de la proliferación celular.....	118
3.12. Producción de citoquinas.....	119
3.12.1. Cultivo de esplenocitos.....	119
3.12.2. Shock séptico.....	119
3.12.3. Medida de citocinas.....	120
3.13. Tratamiento inmunosupresor.....	121
3.14. Análisis estadístico.....	121
4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE PRODUCTOS	
COMERCIALES.....	122
4.1. Aislamiento e identificación de cepas de productos comerciales.....	123
4.2. Identificación de cepas de colección.....	133

5. POTENCIAL PROBIÓTICO DE LAS CEPAS	
AISLADAS.....	138
5.1. Resistencia al pH ácido.....	139
5.2. Resistencia a sales biliares.....	141
5.2.1. Crecimiento en un medio de cultivo suplementado con sales biliares.....	141
5.2.2. Supervivencia en presencia de bilis.....	142
6. COLONIZACIÓN INTESTINAL.....	143
6.1. Adherencia <i>in vitro</i> a células de epitelio intestinal.....	144
6.2. Colonización intestinal <i>in vivo</i> por <i>L. plantarum</i>	146
6.2.1. Diseño de un medio de cultivo selectivo y diferencial para <i>L. plantarum</i>	146
6.2.2. Ensayos de colonización con una dosis única de <i>L. plantarum</i>	152
6.2.3. Ensayos de colonización con varias dosis sucesivas de <i>L. plantarum</i>	152
6.2.4. Ensayos de colonización por <i>L. plantarum</i> tras tratamiento con ciprofloxacino.....	154
7. ANTIBIOSIS IN VITRO E IN VIVO.....	161
7.1. Antibiosis en placa.....	162
7.2. Antibiosis con sobrenadantes.....	164
8. RESISTENCIA A INFECCIONES INTESTINALES.....	169
8.1. Infección experimental con <i>Y. enterocolitica</i> O9.....	170
8.2. Modelo de infección experimental con <i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> y con <i>L. monocytogenes</i>	176

9. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INMUNE.....	180
9.1.Efectos en el número de leucocitos periféricos y de esplenocitos.....	182
9.1.1. Efectos de <i>L. casei</i> C1.....	182
9.1.2. Efectos de <i>L. plantarum</i> C4.....	184
9.2. Efectos en la proliferación de esplenocitos en respuesta a mitógenos.....	184
9.3. Efecto en la producción de citokinas <i>ex vivo</i>	186
9.4. Efectos en la producción <i>in vivo</i> de citokinas en un modelo de <i>shock</i> endotóxico.....	186
10. BIOSEGURIDAD.....	187
11. DISCUSIÓN.....	191
11.1. Potencial probiótico de las cepas estudiadas.....	192
11.2. Colonización intestinal por <i>L. plantarum</i> C4.....	194
11.2.1. Desarrollo y aplicaciones del LPSM.....	194
11.2.2. ¿Coloniza la cepa C4?.....	195
12. CONCLUSIONES.....	197
13. BIBLIOGRAFÍA.....	201

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONCEPTOS

1.1.1. Concepto de probiótico

En el origen del concepto de probiótico es obligada la referencia a Ellie Metchnikoff, el científico ruso padre de la teoría celular de la inmunidad, y a su obra titulada “La prolongación de la vida: estudios optimistas”, aparecida en 1908, el mismo año en el que su autor recibió el Premio Nobel [Podolsky, 1998]. Metchnikoff atribuyó a los procesos de putrefacción debidos a bacterias intestinales la producción de sustancias tóxicas (indol, aminos, amonio) que pasarían al medio interno, causando un proceso de autointoxicación responsable del acortamiento de la vida. Sin embargo, y junto a soluciones más drásticas (como la eliminación quirúrgica del intestino grueso), Metchnikoff propuso la posibilidad de modificar el equilibrio entre poblaciones bacterianas putrefactivas (nocivas) y fermentativas (beneficiosas), a favor de estas últimas, inspirado por la observación de la notable longevidad de poblaciones búlgaras en cuya dieta habitual figuraba el yogur [Podolsky, 1998; Tannock, 2004]. Las ideas de

Metchnikoff fueron discutidas, tanto en su planteamiento fundamental de la existencia de una falta de armonía en el organismo, que es necesario equilibrar si se desea alcanzar la “longevidad sin envejecimiento”, como en su elección del “*Bacillus bulgaricus*” (*Lactobacillus bulgaricus*) para alcanzar la salud y el equilibrio [Podolsky, 1998].

La propuesta de Metchnikoff sobre las cualidades beneficiosas de las bacterias del yogur coincide con el concepto actual de probiótico, que, etimológicamente, procede del griego “pro bios”, para la vida. Sin embargo, este término se utilizó inicialmente con un significado diferente: Lilly y Stillwell [1965] lo aplicaron a factores producidos por protozoos y capaces de estimular el crecimiento de dichos microorganismos. Aunque el término “probiótico” aparece ya en algunas referencias recogidas por la base PubMed a mediados de los años 50 (con resúmenes inaccesibles), los diversos autores que se han ocupado de la evolución histórica de este concepto coinciden en señalar el trabajo de Parker [1974] como el primero en proporcionar una definición congruente con su sentido actual: textualmente, “organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano en el intestino” [ver las revisiones de Schrezenmeir y De Vrese, 2001; Amores *et al.*, 2004; Tannock, 2004]. La siguiente contribución importante al concepto pertenece a Fuller [1989], quien acertadamente señala que la definición de Parker es imprecisa, ya que incluso podría aplicarse a algunos antibióticos. Según Fuller, un probiótico es “un microorganismo vivo, dado como suplemento dietético, que afecta beneficiosamente al hospedador porque mejora el balance intestinal”. A destacar la afirmación de que se trata de microorganismos vivos, y la insistencia en que el mecanismo de acción pasa por la modificación del equilibrio entre las poblaciones microbianas indígenas intestinales.

La definición de Fuller fue ampliada por Havenaar y Huis In't Veld [1992], quienes aceptan como probiótico “un monocultivo o cultivo mixto de microorganismos vivos que, aplicado al hombre o a animales, afecta beneficiosamente al hospedador porque mejora las propiedades de la microbiota indígena”, lo que incluye preparados administrados por otras vías, como la intravaginal.

El concepto fue nuevamente redefinido por Salminen [1996], como “un cultivo microbiano vivo o producto lácteo cultivado que influye beneficiosamente en la salud y nutrición del hospedador”. Como acertadamente señalan Schrezenmeir y De Vrese [2001], la propuesta de Salminen añadió confusión, más que claridad, ya que se confunden los efectos nutricionales con los beneficios para la salud, y se limita la definición a los productos derivados de la leche, siendo así que otros diversos alimentos pueden contener microorganismos probióticos.

Más interesante es el concepto de Schaafsma [1996], según el cual los probióticos son “microorganismos vivos que, una vez ingeridos en cierto número, ejercen efectos saludables más allá de los inherentes a la nutrición básica”: se desmarcan los efectos típicamente probióticos de los puramente nutricionales (hay que tener presente que los estados de malnutrición son causa de inmunodeficiencia, por lo que es importante resaltar que el remedio de tales estados no corre a cargo de probióticos, sino de una nutrición correcta), y se añade un factor crucial para la acción probiótica, como es las dosis, es decir, el número de bacterias ingeridas.

Pese a las discusiones sobre la realidad del concepto de probiótico, que prosiguen en la actualidad, ya en 1998 se consideraba que se habían acumulado

evidencias suficientes para justificar el uso del término, en lugar de la propuesta menos comprometida de “combióticos” [Berg, 1998].

Dunne *et al.* [1999] introdujeron otro aspecto de interés, al definir los probióticos como “microorganismos no patógenos que, cuando se ingieren, ejercen un efecto positivo sobre la salud o la fisiología del hospedador”; ciertamente, un requisito para que un microorganismo se considere probiótico debe ser su ausencia de patogenicidad, lo que ha dado lugar a los correspondientes estudios sobre bioseguridad y al establecimiento de normas al respecto. Por su parte, Schrezenmeir y De Vrese [2001] también elaboran su propia aportación, según la cual un probiótico es “una preparación o producto que contiene microorganismos viables, definidos, en suficiente número, los cuales alteran la microbiota (por implantación o colonización) en un compartimento del hospedador y por lo que ejercen efectos beneficiosos en la salud de este hospedador”. Aunque minuciosamente justificada por sus autores, esta definición parece excesivamente prolija, incluyendo al menos un detalle confuso como es el mecanismo por el que se modifica la microbiota (¿cuáles son los sentidos exactos de los términos “implantación” y “colonización?”); sin embargo, se insiste en la importancia de la dosis de microorganismos administrados y se mantiene la amplitud del concepto expuesto por Havenaar y Huis In’t Veld nueve años antes.

Las propuestas más recientes coinciden en simplificar la definición, reteniendo como factores decisivos la viabilidad y la dosis, y eliminando otros aspectos como la vía de administración, el compartimento del cuerpo donde actúan y los posibles mecanismos por los que ocurra esta acción: los probióticos “son microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso para

el hospedador”, precisando que ese beneficio puede ser “fisiológico” [Reid *et al.*, 2003] o para “la salud” [FAO/WHO, 2002] del hospedador.

La insistencia en que los microorganismos utilizados como probióticos deben ser viables (es decir, capaces de reproducirse) sustenta un debate sobre si esta viabilidad debe considerarse un requisito insoslayable. Según algunos autores, los microorganismos probióticos no viables retienen algún grado de propiedades beneficiosas para quien los ingiere, lo que justificaría el uso de productos alimenticios (generalmente, derivados lácteos) pasteurizados después de la fermentación; esta es la opinión, entre otros, de Salminen *et al.* [1999], rectificando la definición que el propio Salminen elaboró años antes, y que ya ha sido comentada. Sin embargo, de acuerdo con los criterios expresados por un comité conjunto FAO/WHO en 2001, el concepto de probiótico debiera reservarse exclusivamente para microorganismos vivos, aconsejándose la elección de otro término distinto para aquellas preparaciones de microorganismos no viables que puedan reportar beneficios para la salud [Sanders, 2003]. Otras consideraciones interesantes se refieren a no incluir en la definición el posible mecanismo de acción: esta puede ocurrir a través de la modificación del equilibrio en la microbiota intestinal o por otras vías, como las interacciones con células implicadas en la inmunidad [Marteau *et al.*, 2002]; de hecho, ni siquiera debiera exigirse la supervivencia del microorganismo probiótico en el tracto gastrointestinal, siempre que su presencia reporte beneficios [Sanders, 2003], aunque parece que esta amplitud de criterio contrasta con la exigencia de que el microorganismo esté vivo en el momento de su administración. Asimismo, es importante precisar que el término probiótico se aplica solo a microorganismos exógenos, que son administrados, y no a los componentes habituales de la microbiota intestinal; por tanto, lactobacilos, bifidobacterias o

bacteroides indígenas (autóctonos) no deben designarse como probióticos, por muy beneficiosos que resulten para la salud [Sanders, 2003]. En cuanto a las matizaciones sobre los efectos beneficiosos “fisiológicos” o “sobre la salud”, pueden entenderse en el sentido de que los probióticos deben ser considerados como “alimentos funcionales” o “nutracéuticos” [Mollet y Rowland, 2002; Hugenholtz y Smid, 2002; Lin, 2003]¹, y no como medicamentos o agentes terapéuticos [Reid *et al.*, 2003], lo cual resulta asimismo cuestionable, ya que la administración de microorganismos probióticos se ha propuesto para la prevención y el tratamiento de patologías gastrointestinales [Bergogne-Bérézin, 2000]. Esto parece justificar el uso de términos como “agentes bioterapéuticos” [Mercenier *et al.*, 2003], preferido incluso por algunos al de probiótico para enfatizar la administración deliberada de microorganismos con propiedades terapéuticas concretas [Elmer *et al.*, 1996]; o el de “bacterioterapia” [Borody *et al.*, 2004]. En este caso, Sanders [2003] recomienda un criterio amplio, que no excluya del concepto de probiótico aquellos que se utilicen en preparaciones farmacéuticas.

1.1.2. Conceptos de prebiótico y simbiótico

Dos conceptos relacionados con el de probiótico son los de prebiótico y simbiótico.

¹Un alimento se considera como funcional “si se ha demostrado satisfactoriamente que afecta beneficiosamente una o más funciones diana en el cuerpo, más allá de los adecuados efectos nutricionales, de manera relevante para mejorar el estado de salud y bienestar o para reducir el riesgo de enfermedad” [definición elaborada en una Acción Concertada de la Unión Europea, coordinada por el “International Life Sciences Institute Europe” y recogida por Mollet y Rowland, 2002].

Un prebiótico se define como un ingrediente no digerible de un alimento que afecta beneficiosamente al hospedador al estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de una o de un número limitado de bacterias en el colon [Gibson y Roberfroid 1995]. Los prebióticos mejor conocidos son fructooligosacáridos, inulina, oligosacáridos transgalactosilados y oligosacáridos de soja [Schrezenmeir y De Vrese, 2001]. Las sustancias prebióticas no son hidrolizadas ni absorbidas a través de la mucosa del intestino delgado, pero son utilizables como sustratos por poblaciones de bacterias indígenas del intestino grueso [Berg, 1998]. El uso de prebióticos no presenta las limitaciones propias de los microorganismos probióticos, que no pertenecen a la microbiota intestinal y deben adaptarse a colonizar un ambiente hostil, si no que promueve el desarrollo de poblaciones microbianas autóctonas preexistentes cuya actividad se considera beneficiosa.

El término “simbiótico” se ha propuesto para productos que contienen a la vez probióticos y prebióticos. La finalidad de esta combinación se basa en la utilización de prebióticos que favorezcan selectivamente el desarrollo del probiótico exógeno acompañante [Schrezenmeir y De Vrese, 2001]. Sin duda la denominación no es muy afortunada, ya que este término es clásico en biología pero con una significación muy distinta, que como es sabido se refiere a una interacción entre distintos seres vivos que genera unos beneficios mutuos. Investigaciones realizadas en algunos modelos experimentales han mostrado que las asociaciones de prebiótico y probiótico pueden actuar con mayor eficacia que cualquiera de los dos componentes por separado [Femia *et al.*, 2002; Le Leu *et al.*, 2005].

1.2. MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS: SITUACIÓN TAXONÓMICA

El concepto de probiótico incluye una amplia biodiversidad microbiana (**Tabla 1.1**). Microorganismos muy distintos, tanto procariotas como eucariotas, pueden poseer actividad probiótica [Ramos-Cormenzana *et al.*, 2005], bien entendido que ésta es una propiedad a nivel de cepa: dentro de una misma especie, cepas concretas pueden ser probióticas, mientras que otras no lo son [Reid, 1999., Reid *et al.*, 2003., Schrezenmeir y De Vrese, 2001], con la curiosa excepción de *Lactobacillus reuteri*, que parece ser el único caso en la que la especie entera muestra actividad probiótica [Casas y Dobrogosz, 2000].

1.2.1. Probióticos eucariotas

Entre los microorganismos eucariotas con potencial probiótico, figuran cepas de levaduras, siendo *Saccharomyces boulardii* la especie más referenciada al respecto [Ouwehand *et al.*, 2002; Amores *et al.*, 2004], si bien su situación taxonómica ha sido discutida: actualmente, se acepta que las cepas de *S. boulardii* forman un subtipo dentro de la especie *Saccharomyces cerevisiae* [Posteraro *et al.*, 2005]. Otras levaduras a las que se ha atribuido potencial probiótico son *Candida pintolopesli*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* y *Debaryomyces occidentalis* [Amores *et al.*, 2004; Kumura *et al.*, 2004].

Tabla 1.1. Microorganismos con actividad probiótica.

Tipo de célula	Especie	Cepa
Eucariota	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>	<i>S. boulardii</i>
	<i>Candida pintolopesli</i>	
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	
	<i>Yarrowia lipolytica</i>	
	<i>Debaryomyces occidentalis</i>	
Procariota	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	La5 NCFM NCFB1748 HN017
	<i>Lactobacillus crispatus</i>	
	<i>Lactobacillus gasseri</i>	ADH
	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	La1
	<i>Lactobacillus casei</i>	Shirota YIT9018 CRL431 Immunitas DN014001
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	GG GR-1 HN001 LC-705
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	MM53 SD2112 SD2222
	<i>Lactobacillus fermentum</i>	RC-14 KLD
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	299v NCIMB8826
	<i>Lactobacillus salivarius</i>	
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	
	<i>Bifidobacterium breve</i>	Yakult
	<i>Bifidobacterium longum</i>	BB536
	<i>Bifidobacterium lactis</i>	BB12 HN019
	<i>Propionibacterium freudenreichii</i>	JS
	<i>Bacillus subtilis</i>	
	<i>Bacillus cereus</i>	Toyoi
	<i>Escherichia coli</i>	Nissle1917

Información recogida de Salminen *et al.* [1996], Klein *et al.* [1998], Reid [1999], Ouwehand *et al.* [2002], Tuohy *et al.* [2003], Sanders [2003] y Reid *et al.* [2003].

1.2.2. Probióticos procariotas: el género *Lactobacillus*

Como se observa en la **Tabla 1.1**, la mayoría de las cepas bacterianas consideradas como probióticas pertenecen al grupo de “bacterias del ácido láctico”, que comparten la propiedad de generar esta molécula como principal producto de su metabolismo fermentativo. Miembros de este grupo son bacterias de los géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Carnobacterium*, *Tetragenococcus* y *Bifidobacterium* [Klein *et al.*, 1998].

Un miembro característico del grupo de bacterias del ácido láctico es el género *Lactobacillus* Beijerinck 1901. La ubicación actual de este género dentro de los grandes taxones procariotas se presenta en la **Figura 1.1**. Los lactobacilos son bacilos o cocobacilos Gram-positivos no esporulados, que, como miembros del *Phylum* Firmicutes, tienen un contenido en G + C inferior al 50%; aerotolerantes o anaerobios, su metabolismo es estrictamente fermentativo, distinguiéndose especies homofermentadoras (el ácido láctico supera el 85% de los productos de fermentación de la glucosa) y heterofermentadoras (producen láctico, CO₂, etanol y/o acético en proporciones equimoleculares), y sus complejos requerimientos nutritivos reflejan sus nichos ecológicos, ricos en carbohidratos: plantas y residuos vegetales, alimentos fermentados y como componentes de la microbiota de compartimentos del cuerpo de animales (especialmente el intestino) [Tannock, 2004]. La taxonomía del género es complicada: la revisión de Abril del 2006 del listado de nombres de procariotas reconoce un total de 136 nombres de especies de *Lactobacillus* [Euzéby, 2006]. La especie tipo es *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Leichmann 1896) Beijerinck 1901. Tomando como criterios fenotípicos como el tipo de peptidoglicano de

la pared celular y la vía de fermentación de pentosas y hexosas, junto con técnicas genotípicas, se reconocen varios grupos de especies, como el grupo de *Lactobacillus acidophilus* (donde figuran, además de *L. acidophilus sensu stricto*, *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus amylovorus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus johnsonii*), el de *Lactobacillus casei* (acompañado por *Lactobacillus zae* y *Lactobacillus rhamnosus*, en espera de que se resuelva la situación de las cepas clasificadas como *Lactobacillus paracasei*, que se recomienda sean rechazadas e incluidas en *L. casei*) y el grupo *L. reuteri/Lactobacillus fermentum* [Klein *et al.*, 1998].

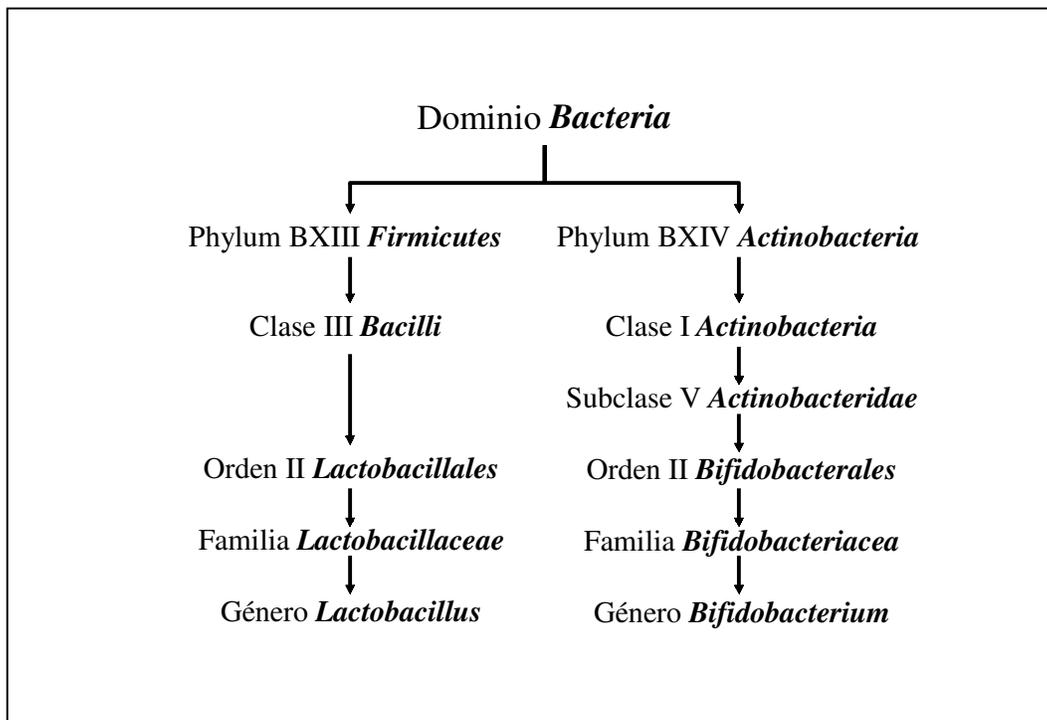


FIGURA 1.1. Ubicación de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en los taxones superiores del dominio *Bacteria* [cita del Bergey].

De los 343 genomas procariotas cuya secuenciación se había completado y publicado hasta el 21 de Abril de 2006 (base de datos de genomas accesible desde PubMed), cinco corresponden a lactobacilos: *L. acidophilus*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus salivarius*. El genoma de *L. plantarum* destaca por su tamaño de 3.35 Mb, frente a un promedio de 2 Mb para las otras cuatro especies. Esto se ha interpretado en el sentido de que *L. plantarum* es una bacteria muy versátil que ocupa diferentes nichos ecológicos (incluyendo el tracto gastrointestinal humano). Mediante técnicas IVET (“*in vivo* expresión technology”) se han podido identificar 72 genes que se derreprimen durante la estancia de *L. plantarum* en el tracto gastrointestinal: estos genes están implicados en la adquisición de nutrientes, la biosíntesis de intermediarios metabólicos de cofactores y la respuesta al estrés y producción de proteínas de la superficie bacteriana; curiosamente, un gran número de las funciones correspondientes a estos genes han sido previamente identificadas por IVET en bacterias enteropatógenas como *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* o *Listeria monocytogenes* sugiriendo que la supervivencia es un motivo más importante que la virulencia para la expresión de estos genes durante la estancia de las bacterias en los tejidos del hospedador [de Vos *et al.*, 2004].

La complejidad de la taxonomía del género *Lactobacillus*, ya señalada por Klein *et al.* [1998], hace que la identificación de cepas basada en perfiles de fermentación de azúcares y otros criterios fenotípicos [Wijtzes *et al.*, 1997] sea, en muchos casos, aproximativa, requiriéndose combinaciones de métodos fenotípicos y genotípicos [Yeung *et al.*, 2004].

1.2.3. Probióticos procariotas: bifidobacterias

Las bifidobacterias fueron inicialmente reconocidas en 1900 como miembros dominantes en la microbiota fecal de niños sanos por Tissier, con la denominación de *Bacillus bifidus*; este autor propuso su administración como forma de combatir infecciones intestinales [Tissier, 1906]. El género *Bifidobacterium* fue propuesto por Orla-Jensen en 1924, pero posteriormente las bifidobacterias se reclasificaron como *Lactobacillus*, hasta que las diferencias en el metabolismo de las hexosas y los resultados de las pruebas de hibridación de DNA lo hicieron resurgir, siendo incluido como tal en la 8ª edición del Manual de Bergey aparecida en 1974. Las bifidobacterias forman parte de las bacterias anaerobias que se instalan en primer lugar en el intestino de los recién nacidos; factores exógenos como los oligosacáridos presentes en la leche materna contribuyen a la colonización intestinal por estas poblaciones bacterianas concretas [Moreau y Gaboriau-Routhiau, 2000]. Las bifidobacterias son bacilos Gram-positivos con alto contenido G + C, con una peculiar morfología bacilar que suele ramificarse en los extremos, anaerobios, no esporulados e inmóviles, que habitan en el tracto intestinal de animales y en aguas residuales [Prescott *et al.*, 2005; Sakata *et al.*, 2006]. El género *Bifidobacterium* Orla-Jensen 1924, cuya inclusión en taxones superiores se muestra en la **Figura 1.1**, comprende 33 especies reconocidas [Euzéby, 2006], 10 de las cuales (*Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium angulatum*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium catenulatum*, *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium gallicum* y *Bifidobacterium dentium*) se han identificado como componentes de la microbiota intestinal humana [Kováč *et al.*, 2006]. La secuencia del genoma de *B. longum*, de 2.26 Mb, figura en la base de datos genómicos accesible

desde PubMed, como la única secuencia completa de bifidobacterias disponible hasta el 21 de Abril de 2006. La diferenciación de especies se realiza de acuerdo con la hibridación DNA-DNA, las secuencias correspondientes al gen rRNA 16S y las secuencias del gen que codifica la proteína de choque térmico HSP60 [Zhu *et al.*, 2003; Sakata *et al.*, 2006].

1.2.4. Otros probióticos procariotas

La **Tabla 1.1** presenta, además de especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, otras especies procariotas en las que se han estudiado cepas con actividad probiótica. Es el caso del bacilo anaerobio Gram-positivo *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii*, que se utiliza como bacteria probiótica, generalmente en combinación con otros microorganismos [Kajander *et al.*, 2005; El-Nezami *et al.*, 2006]. Curiosamente, el lactosuero en el que ha crecido *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* contiene sustancias (posiblemente ácidos grasos de cadena corta) que favorecen el desarrollo de la población intestinal de bifidobacterias, por lo que se pueden considerar como sustancias prebióticas [Uchida y Mogami, 2005]. Otro ejemplo lo constituyen las preparaciones de esporas de *Bacillus subtilis* y otras especies del mismo género, que se han descrito como probióticos, de aplicación en ganadería [Alexopoulos *et al.*, 2004]. Se observa que, en ambos casos, se trata de bacterias Gram-positivas, taxonómica y filogenéticamente relacionadas con los géneros anteriormente mencionados: así, las propionibacterias pertenecen a la misma subclase que las bifidobacterias (*Actinobacteridae*) y el género *Bacillus* comparte clase (*Bacilli*) con los lactobacilos.

Mención aparte merece la única enterobacteria descrita hasta el presente como probiótica: la cepa Nissle 1917 de *Escherichia coli*. Esta cepa fue aislada por el médico militar Alfred Nissle en 1917, a partir de las heces de un soldado que no había desarrollado diarrea durante un brote de sigelosis [referido por Ukena *et al.*, 2005]. Nissle estaba interesado en el estudio de los antagonismos entre las cepas de *E. coli* autóctonas del intestino y bacterias enteropatógenas; fijó su atención en esta cepa y la utilizó para fabricar un preparado de administración oral patentado como “Mutaflo” [Irrgang y Sonnenborn, 1988], actualmente comercializado por Ardeypharm GMBH (Herdecke, Alemania). La cepa Nissle 1917 pertenece al serotipo O6:K5:H1 y su análisis genómico ha demostrado, sobre un fondo génico similar al de cepas uropatógenas del serotipo O6, la ausencia de factores de virulencia definidos, como α -hemolisina, adhesinas tipo fimbrias P y otros, junto con la presencia de factores de adaptación al ecosistema intestinal, tales como microcinas, sistemas de incorporación de hierro, adhesinas y proteasas, codificados por islas genómicas, y que seguramente contribuyen a su capacidad probiótica [Grozdanov *et al.*, 2004].

Recientemente se ha publicado que los ratones colonizados por cepas de *E. coli* resistentes al fago lisogénico que codifica la toxina de Shiga (Stx) producida por *E. coli* O157:H7, presentan mayor resistencia a la infección por esta cepa que los ratones colonizados por cepas de *E. coli* susceptibles al fago [Gamage *et al.*, 2006]. Los autores especulan que a partir de las cepas de *E. coli* resistentes al fago Stx, se podría desarrollar un probiótico que previniese la patología causada por *E. coli* O157:H7.

1.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS

Las diversas definiciones propuestas para el término “probiótico” configuran las características que debe reunir una cepa microbiana para ser incluida en dicho término. Estas características debieran ser consideradas al elaborar los criterios para la selección de nuevas cepas con potencial probiótico [Sanders, 2003]. A continuación se enumeran tales requisitos de acuerdo con las aportaciones de diversos autores [Salminen *et al.*, 1996; Dunne *et al.*, 1999; Casas y Dobrogosz, 2000; Reid *et al.*, 2003; Salminen *et al.*, 2005]:

- a) Identificación de la cepa: se considera imprescindible una correcta identificación de la cepa utilizando para ello técnicas fenotípicas y genotípicas. Entre estas últimas se recomienda recurrir a la hibridación DNA-DNA y a la secuenciación del DNA que codifica para el rRNA 16S para la caracterización a nivel de género y especie, y la electroforesis de campo pulsado para la caracterización de la cepa. Como ya se ha indicado, las propiedades probióticas dependen de la cepa, por lo que sólo cepas bien definidas deben utilizarse en este tipo de estudios, siendo inaceptables la extrapolación de datos a otras cepas de la misma especie, por muy relacionadas que estén.

- b) Origen humano: obviamente, esta condición se basa en que las cepas aisladas de seres humanos sanos probablemente carecen de patogenicidad y presentan mayor facilidad para colonizar el intestino humano. Sin embargo, ninguno de estos supuestos es taxativo, y, de hecho, se utilizan como probióticos cepas de otros orígenes.

- c) Bioseguridad: la ausencia de patogenicidad si que constituye un requisito evidente, y debe investigarse en sentido amplio, lo que incluye comprobar la ausencia de producción de toxinas, de actividad hemolítica y de infectividad en modelos exigentes como pueden ser animales experimentalmente inmunocomprometidos.

- d) Tolerancia a las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal: si los microorganismos probióticos deben llegar viables al intestino, es preciso que resistan el pH gástrico (francamente ácido en adultos antes de la ingesta), las enzimas digestivas, y la acción detergente e inhibidora de las sales biliares. Esta resistencia no tiene que entenderse en términos absolutos: la ingestión de inóculos con un alto número de microorganismos probióticos permite que una cantidad suficiente de ellos permanezca viable al llegar al intestino, aunque su número se haya reducido drásticamente (incluso en varias unidades logarítmicas) por inactivación en el estómago.

- e) Adherencia al epitelio intestinal: aunque los probióticos se ingieren como microorganismos exógenos, es decir, alóctonos, idealmente debieran colonizar el intestino de forma persistente, para lo cual es necesario que posean la capacidad de adherirse a los enterocitos. Sin embargo, si esta condición se mantuviera como un requisito imprescindible el número de probióticos reales sería muy escaso. Cabe esperar que microorganismos alóctonos puedan tener efecto probiótico, a pesar de ser transeúntes.

- f) Producción de antibiosis: la producción de sustancias antimicrobianas se considera uno de los mecanismos por los que los microorganismos probióticos suministran protección frente a los enteropatógenos. Esta antibiosis puede ser ejercida a través de mecanismos metabólicos generales como la producción de ácidos orgánicos o de radicales oxidantes o bien por la producción de antibióticos.
- g) Capacidad para actuar como interfaz metabólico: uno de los mecanismos reconocidos de acción probiótica reside en la capacidad para actuar como un escudo metabólico que impida la llegada de agentes nocivos a los enterocitos. Así, algunos microorganismos probióticos, interfieren con la asimilación del colesterol, hidrolizan la lactosa, o inactivan agentes cancerígenos. Obviamente, esta propiedad no puede extenderse como un requisito a todos los microorganismos con potencial probiótico.
- h) Modificación de la respuesta biológica: varios de los efectos más importantes atribuidos a los probióticos se ejercen a través de su actividad inmunomoduladora: es el caso de la protección frente a infecciones intestinales o extraintestinales, la inhibición de tumores ya establecidos, efectos antiinflamatorios y antialérgicos. La inmunomodulación puede deberse a estructuras microbianas o a metabolitos bioactivos producidos incluso previamente a su ingestión (por ejemplo péptidos bioactivos procedentes de la digestión microbiana de proteínas lácteas). A pesar de su importancia, tampoco esta característica debe considerarse una condición absoluta, ya que es concebible que un microorganismo ejerza efectos probióticos por otras vías.

- i) Las condiciones anteriores deben documentarse mediante ensayos de laboratorio y clínicos publicados difundidos en publicaciones científicas rigurosas y confirmados por grupos de investigación independientes. Esta condición es especialmente relevante en un tema con fuertes implicaciones comerciales donde la publicidad no debidamente asentada en bases científicas puede difundir información sesgada y errónea.

- j) Viabilidad de la fabricación a escala comercial de productos conteniendo la o las cepas probióticas: una cepa que no resista los procesos tecnológicos de producción o no mantenga su actividad en vehículos apropiados, no podrá tener aplicación como probiótico por excelentes que sean sus propiedades en los ensayos biológicos.

Algunas de las condiciones expuestas pueden utilizarse para elaborar unos criterios previos, que se puedan determinar por ensayos sencillos *in vitro* y que, por tanto, son útiles en los estudios de muestreo de nuevas cepas con potencial probiótico. Una batería de ensayos de este tipo incluiría la resistencia a pH ácido, la capacidad de sobrevivir y crecer en presencia de bilis, la adherencia a líneas celulares de epitelio intestinal humano (como las líneas HT-29 y Caco-2) y la actividad antimicrobiana (especialmente frente a enteropatógenos) [Dunne *et al.*, 1999]. Obviamente, la interpretación de estos ensayos no es definitiva dada la influencia que pueden tener las condiciones ambientales: así, las enzimas digestivas, aún cuando no inactiven a un determinado microorganismo, pueden eliminar de su superficie las adhesinas por las que se une a células epiteliales en los ensayos *in vitro* [Salminen *et al.*, 2005].

A pesar de las numerosas contribuciones de diversos autores, se aprecia la falta de estudios sistemáticos para validar los criterios de selección de cepas, por ejemplo mediante la evaluación simultánea del potencial probiótico de cepas originales y de mutantes específicos defectivos en una determinada condición [Sanders, 2003]. Así mismo, para objetivar un efecto beneficioso en ensayos clínicos es necesario incluir sistemáticamente grupos tratados con un placebo apropiado y con terapia estándar [Reid *et al.*, 2003].

1.4. ECOSISTEMA INTESTINAL Y PROBIÓTICOS

1.4.1. Tracto digestivo e inmunidad mucosal

El tubo digestivo está formado por cavidad oral, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y ano. Su organización histológica general comprende, desde la luz del tubo, el epitelio mucosal, la lámina propia, la submucosa, una túnica muscular y una túnica adventicia (faringe, esófago y recto) o serosa. La mucosa digestiva, especialmente la intestinal, constituye una frontera crítica entre un medio externo especial (el espacio luminal) y el medio interno: a través de ella pasan nutrientes, electrolitos y agua, pero también pueden hacerlo toxinas de diverso origen y está en contacto con un enorme número de microorganismos [Turner, 2003]. En correspondencia con esta situación, la mucosa intestinal, que es la mayor superficie del cuerpo en contacto con un ambiente externo (de 200 a 300 m²), está relacionada con células y tejidos inmunitarios, formando una línea defensiva que ofrece, a la vez, nichos ecológicos óptimos para numerosos microorganismos y eficaces mecanismos

antimicrobianos: el resultado es un ecosistema complejo y dinámico [Liévin-Le Moal y Servin, 2006].

La **Figura 1.2** esquematiza un corte histológico del intestino delgado. Son características las vellosidades intestinales y las criptas de Lieberkühn, ambas recubiertas de un epitelio de células con microvellosidades en la superficie apical. Estas células, en continua renovación, proceden de células madre pluripotenciales, localizadas en el cuello de las criptas; las células madre se diferencian en 4 tipos celulares: células absorbentes, células caliciformes (secretoras de mucus), células enteroendocrinas y células de Paneth (secretoras de sustancias antimicrobianas). Bajo este epitelio se encuentra la lámina propia, que rellena el interior de las vellosidades, por donde discurren los conductos quilíferos que drenan en plexos linfáticos.

En una mucosa intestinal intacta, las uniones entre los enterocitos constituyen una excelente barrera que excluye el paso de macromoléculas y patógenos [Dotan y Mayer, 2003]. Además, las células de Paneth, abundantes en el fondo de las criptas de Lieberkühn, protagonizan importantes funciones defensivas inespecíficas: en respuesta a estímulos diversos, ya sean productos bacterianos (lipopolisacárido, peptidoglicano y ácidos lipoteicoicos), neurotransmisores (acetilcolina) o citocinas producidas por linfocitos, producen una diversidad de agentes antimicrobianos (lisozima, defensinas, fosfolipasa A₂), citocinas proinflamatorias y estimuladoras (*tumor necrosis factor α* o TNF- α , *colony stimulating factor 1* o CSF-1, *epithelial growth factor* o EGF), enzimas y otras moléculas que participan en la defensa frente a microorganismos, la respuesta inflamatoria, el crecimiento de células epiteliales y otras funciones metabólicas [Keshav, 2004].

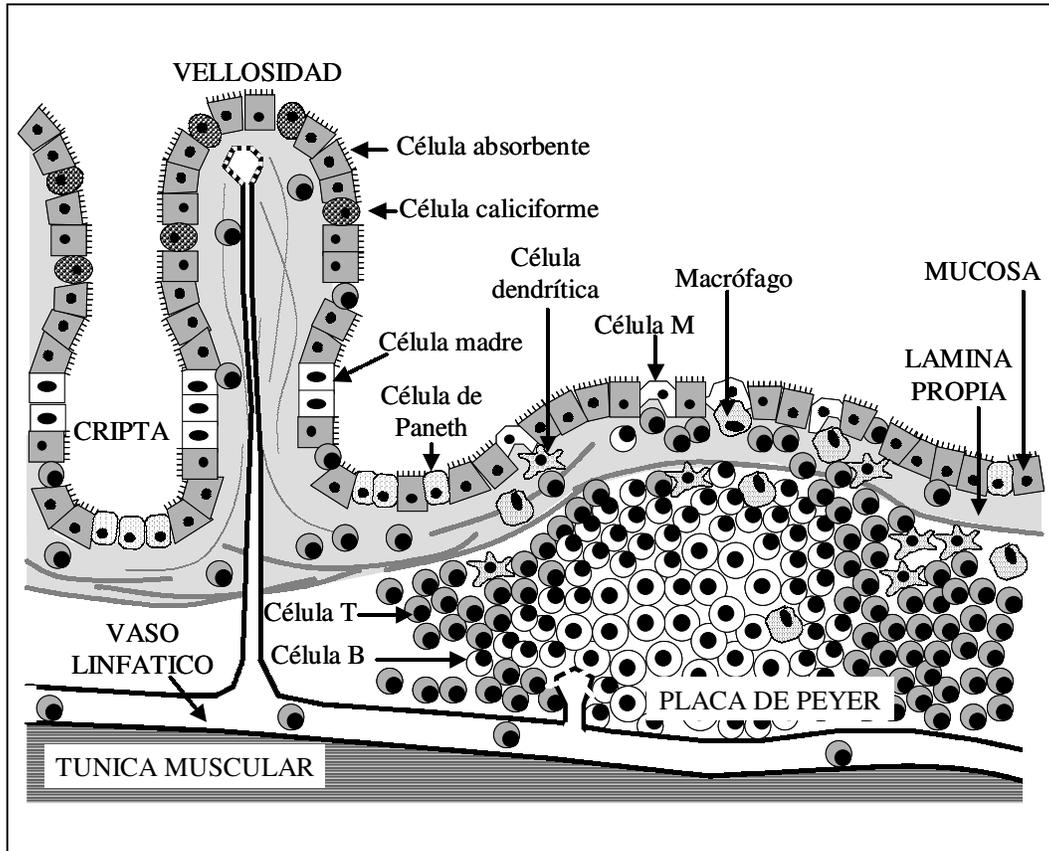


FIGURA 1.2. Esquema de la organización histológica en el intestino delgado. Se muestran vellosidades, criptas de Lieberkühn y una placa de Peyer con un centro germinal. Se observa la distribución de los linfocitos en áreas T y B dentro de la placa de Peyer, la presencia de linfocitos en la lámina propia y de linfocitos intraepiteliales, y el drenaje linfático de las vellosidades y de la placa de Peyer. El dibujo no está realizado a escala y el tamaño de las células se ha exagerado por razones de claridad.

Finalmente, la mucosa intestinal está protegida por dos capas de glicoconjugados: unidas a la superficie celular, las glicoproteínas y glicolípidos del glicocálix; y, por encima de éstas, la secreción mucosa de las células caliciformes [Freitas y Cayuela, 2000]. Esta secreción es un gel formado por mucinas, proteínas que poseen cadenas de oligosacáridos unidos a serinas, prolinas y treoninas, pudiendo representar la parte glucídica hasta el 80% de la masa molecular [Liévin-Le Moal y Servin, 2006]. Además de proteger y lubricar la superficie de la mucosa, el gel

constituye una barrera para ciertos enteropatógenos como *Yersinia enterocolitica* o *Shigella flexneri*, así como para los rotavirus [Liévin-Le Moal y Servin, 2006]. Las mucinas son degradadas por glicosidasas y estererasas de bacterias de la microbiota [Freitas y Cayuela, 2000], lo que suministra nutrientes para el crecimiento bacteriano, de lo que se pueden aprovechar también algunos microorganismos patógenos que se adhieren al mucus [Macfarlane *et al.*, 2000].

Como otras mucosas del cuerpo, la del tracto digestivo se encuentra asociada a elementos de tejido linfoide (MALT, de *mucosa-associated lymphoid tissue*) que defienden estas críticas zonas fronterizas. El MALT del tracto digestivo incluye tejido linfoide estructurado (amígdalas, placas de Peyer, apéndice y placas de Peyer), y tejido linfoide difuso (linfocitos intraepiteliales, linfocitos de la lámina propia). El MALT del intestino se denomina GALT (*gut-associated lymphoid tissue*). En el ser humano adulto, el GALT llega a ser el principal órgano linfopoyético, donde se producen tanto células B como T [Sell, 2001]. La mayoría de los linfocitos intraepiteliales son células T CD8⁺, con el receptor específico (TCR, de *T-cell receptor*) α/β o γ/δ , encontrándose también fenotipos que son infrecuentes en las células T circulantes, como el “doble negativo” CD4⁻ CD8⁻ TCR γ/δ [Dotan y Mayer, 2003]. Los linfocitos de la lámina propia constituyen una población heterogénea, con proporciones de células B y T, y, dentro de estas, T CD4⁺ CD8⁻ y T CD4⁻ CD8⁺, similares a las encontradas en otros órganos linfoides [Dotan y Mayer, 2003].

Las placas de Peyer funcionan como un “sitio inductivo”, donde se inician las respuestas a muchos antígenos [Simpson y Wetzler, 2004], pero también el principal sitio donde se establece la tolerancia o ausencia de respuesta a antígenos administrados

por vía oral, a dosis altas o bajas (en relación a las dosis óptimas para inducir respuesta) [Dotan y Mayer, 2003]. La llegada de antígenos desde la luz intestinal se realiza preferentemente a través de las células M (inicial de *microfolds*, en alusión a los pliegues que muestra la superficie de estas células), localizadas en el epitelio que recubre la parte luminal de las placas de Peyer. Las células M están especializadas en la endocitosis de macromoléculas y partículas desde la luz intestinal y su posterior exocitosis, a través de su membrana basal, hacia la lámina propia: por tanto, es una vía para la translocación de antígenos a través de la mucosa. La cara basal de las células M muestra grandes invaginaciones, donde se sitúan macrófagos y células dendríticas que endocitan los antígenos translocados, los procesan y presentan los correspondientes oligopéptidos con valor de epítomos a las células T [Simpson y Wetzler, 2004]. Pero, además de las células M, los propios enterocitos pueden capturar antígenos lumbinales, procesarlos y presentarlos a linfocitos T; a este respecto, los enterocitos (como otras células del cuerpo) expresan constitutivamente moléculas codificadas por genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, de *major histocompatibility complex*) de clase I, lo que les capacita para la presentación de antígenos procesados por vía endógena a células T CD8⁺ (CTL, de *cytotoxic T lymphocytes*), pero también, en respuesta a estímulos, expresan moléculas MHC-II, por lo que pueden procesar antígenos por la vía exógena y presentar los correspondientes oligopéptidos a células T CD4⁺ (T_H o *T helper*) [Dotan y Mayer, 2003]. La presentación a través de una célula “no profesional”, como el enterocito, podría formar parte de las vías de inducción de “tolerancia oral” inducida por dosis altas de antígeno, ya que una presentación inadecuada (por ejemplo, en ausencia de señales coestimuladoras) puede provocar anergia en las células T [Dotan y Mayer, 2003]. En la tolerancia oral inducida por dosis bajas de antígeno, juega un papel crucial la producción de citocinas supresoras como interleukina (IL) 10,

producida por células T_{H2} , y TGF- β (*transforming growth factor β*), producido por células T_{H3} ; por tanto, esta tolerancia afecta a la inmunidad celular proinflamatoria (inhibición de las células T_{H1}), pero no a la cooperación de células T_{H2} con los linfocitos B, con lo que se acompaña de una respuesta de anticuerpos secretores (inmunoglobulina A, IgA) [Dotan y Mayer, 2003].

A pesar del fenómeno de tolerancia oral, que debe tener un papel crucial en la inhibición de respuestas indeseables frente a antígenos incorporados con la dieta o presentes en la microbiota habitual, es sabido que determinados antígenos administrados por vía oral pueden inducir una vigorosa respuesta inmune, sin que se conozcan bien los mecanismos que determinan un resultado u otro [Simpson y Wetzler, 2004]. Como ya se ha indicado, las placas de Peyer constituyen una de las localizaciones donde se inician las respuestas a estos antígenos, presentados por macrófagos o células dendríticas; parte de los linfocitos T y B activados en las placas de Peyer pasan a la circulación linfática y de ella a la sanguínea, para retornar a los sitios efectores del GALT (lámina propia), donde tiene lugar la producción de anticuerpos (IgA secretora) [Simpson y Wetzler, 2004], como se muestra en la **Figura 1.3**.

1.4.2. Microbiota del tracto digestivo

Dado que el claustro materno, en condiciones normales, es un ambiente estéril, los mamíferos nacen sin microorganismos comensales, pero la colonización de los distintos nichos biológicos que ofrece el organismo comienza al atravesar el canal del parto y prosigue hasta el establecimiento de comunidades microbianas estables.

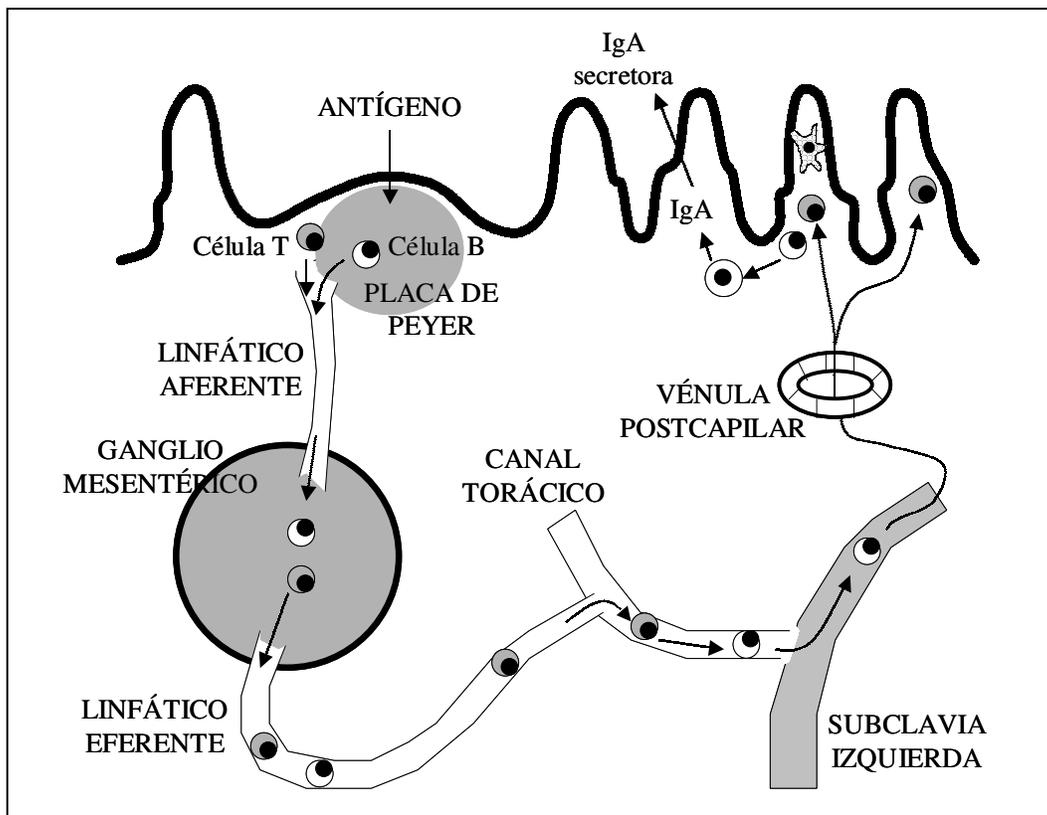


FIGURA 1.3. Recirculación de linfocitos tras la activación en placas de Peyer. Los linfocitos activados son llevados por el drenaje linfático a los ganglios mesentéricos, de donde salen por los vasos eferentes, que finalmente desembocan en el gran canal torácico y pasan a la circulación sanguínea. Los linfocitos activados abandonan el compartimento vascular a nivel de organizaciones endoteliales especiales en las vénulas postcapilares, tanto en las mucosas como en otras localizaciones. Sin embargo, los linfocitos activados en el GALT tienden a ubicarse en la lámina propia intestinal, donde las células B se transforman en células plasmáticas que producen anticuerpos, especialmente IgA, la cual finalmente es transportada por los enterocitos, en forma de dímero secretor, hasta la luz intestinal. El dibujo no está realizado a escala y se ha inspirado en un esquema de Simpson y Wetzler [2004].

Se calcula que la microbiota del tracto digestivo de un adulto contiene hasta 10^{14} bacterias viables [Liévin-Le Moal y Servin, 2006]. Esto significa que el conjunto de seres humanos sobre la Tierra constituye un reservorio que se aproxima a 10^{24} células microbianas, cinco unidades logarítmicas por debajo de la masa microbiana presente en toda el agua marina del mundo, lo que le da una evidente relevancia dentro de la biosfera [Ley *et al.*, 2006].

El tracto digestivo ofrece varias localizaciones con condiciones ambientales muy distintas (**Figura 1.4**). Así, en la cavidad oral, existen varios nichos distintos: surco gingival, superficie dental, mucosa bucal y lengua [Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2004]. El surco gingival ofrece nutrientes a un potencial redox bajo y, en consecuencia, es colonizado por anaerobios estrictos como *Prevotella*, *Veilonella*, *Fusobacterium* y *Porphyromonas*; mientras que la placa dental está compuesta principalmente por bacterias Gram-positivas anaerobias facultativas (*Streptococcus* spp.). Aunque las bacterias no crecen en la saliva, pueden alcanzarse recuentos de hasta 10^8 microorganismos viables por ml. La mayoría de las bacterias ingeridas con la saliva o los alimentos no son capaces de sobrevivir mucho tiempo en el estómago, dada la acidez del pH gástrico, que sólo permite la supervivencia de especies ácido-tolerantes como algunos estreptococos, lactobacilos y *Helicobacter pylori*; en el estómago, estas bacterias no superan en total la cifra de 10^3 microorganismos viables por ml. En el intestino delgado el pH se neutraliza, pero otros factores como la secreción de bilis y de enzimas pancreáticas, y el corto tiempo de tránsito limitan la colonización en los primeros tramos a un total de 10^4 a 10^5 microorganismos viables por ml aunque este número puede elevarse hasta 10^9 en el íleon; las especies presentes pertenecen a los géneros *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Veilonella*, *Actinomyces*, y *Bacteroides* así como a miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. En el intestino grueso existen entre 10^{10} y 10^{12} bacterias viables por ml, fundamentalmente anaerobios estrictos (géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*) y en menor cantidad anaerobios facultativos como las enterobacterias [Los datos anteriores sobre colonización de las diversas localizaciones digestivas se han tomado de Kleessen *et al.*, 2000 y Moreau y Gaboriau-Routhiau, 2000].

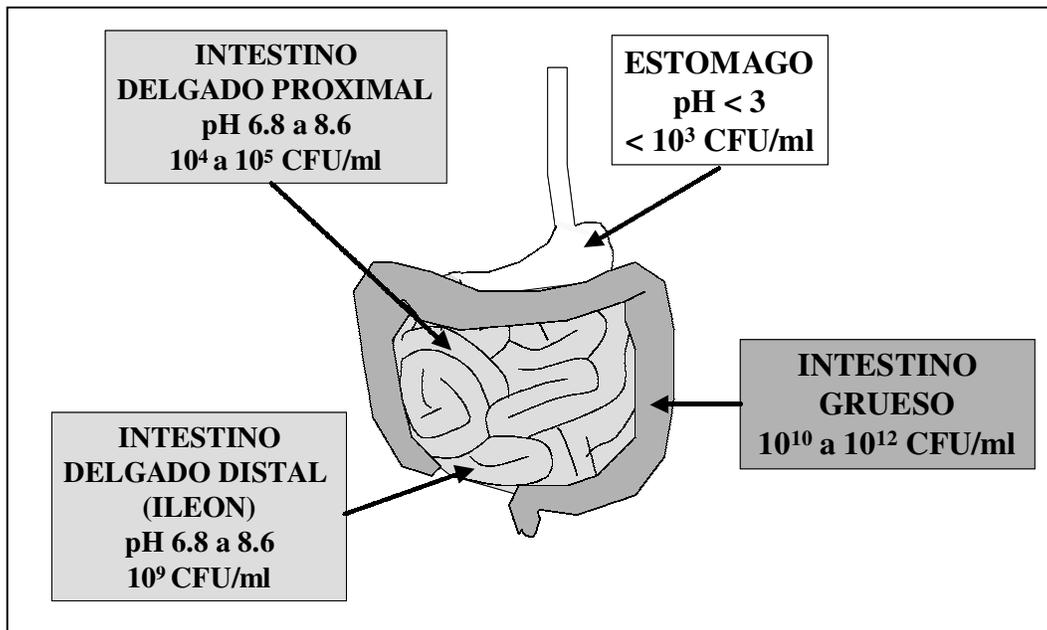


FIGURA 1.4. Microorganismos en el tracto gastrointestinal. El tracto digestivo ofrece distintos ecosistemas con unas condiciones ambientales muy distintas, que determinan niveles muy diferentes de microorganismos viables. La mayor acumulación microbiana se encuentra en el intestino grueso.

Clásicamente, se ha considerado que la microbiota intestinal presenta una notable biodiversidad, si bien predominan solo algunas de las numerosas especies bacterianas autóctonas (entre 400 y 500) [Kleessen *et al.*, 2000]. La aplicación de las metodologías modernas de estudio en ecología bacteriana ha permitido conocer mejor la estructura de esta biodiversidad, no solo por la alta resolución de las técnicas de biología molecular y sus posibilidades taxonómicas, sino también por el hecho de que entre el 60 y el 80% de las especies intestinales no son cultivables, ya sea por el desconocimiento de sus requerimientos nutritivos y sus relaciones precisas con el oxígeno, ya sea porque su crecimiento depende de un alto nivel de mutualismo con otros componentes de la microbiota [Liévin-Le Moal y Servin, 2006]. A este respecto, Ley *et al.* [2006] se refieren a un estudio realizado en tres adultos humanos sanos, de

cada uno de los cuales se analizaron seis biopsias de colon y una muestra de heces: se identificaron 13,335 secuencias distintas para el gen que codifica rRNA 16S; sin embargo, las relaciones de identidad de secuencias a nivel de especie definieron solo 395 especies; y, en cuanto a los grandes taxones, estuvieron representados siete *Phyla*, pocos en comparación con otros hábitats (en el suelo se reconocen al menos 20 *Phyla* de microorganismos procariotas). Otros estudios, en humanos y en ratones, coincidieron en la misma distribución: gran diversidad a nivel de cepa, pero baja a nivel de especie y de taxones superiores [Ley *et al.*, 2006].

El examen de la microbiota fecal, reflejo de la existente en el intestino grueso, revela que las poblaciones más frecuentes son anaerobias estrictas o facultativas: en primer lugar, especies de *Bacteroides*, de las que la más común es *Bacteroides thetaiotaomicron* (promedio, $10^{10.7}$ bacterias/g), junto con *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides fragilis* y *Bacteroides ovatus*; con un promedio similar, otro anaerobio Gram-positivo, el género *Eubacterium*, con las especies *Eubacterium aeriformes*, *Eubacterium contortum* y *Eubacterium lentum*; siguen las especies facultativas de *Lactobacillus*, especialmente *L. acidophilus* (reclasificado como *L. gasseri*), con un promedio de $10^{9.6}$ bacterias/g; a continuación, las bifidobacterias (*B. adolescentis*, *B. infantis*, *B. longum*); cocos anaerobios, de los géneros *Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Veillonella* y *Acidaminococcus*; y anaerobios estrictos esporulados como *Clostridium ramosum* y *Clostridium perfringens* [Kleessen *et al.*, 2000]. Con promedios muy inferiores, figuran anaerobios facultativos de la familia *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, que en el intestino tienden a asociarse a la superficie epitelial, para aprovechar el oxígeno que difunde desde los tejidos [Liévin-Le Moal y Servin, 2006]. Un estudio con sondas que reconocen secuencias consenso en el rRNA

16S encontró frecuencias del 37% para *Bacteroides*, 30% para *Clostridium*, 2% para *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y menos del 1% para enterobacterias [Sghir *et al.*, 2000].

Los factores que influyen en la composición de la microbiota intestinal son complejos, como muestra la **Figura 1.5**.

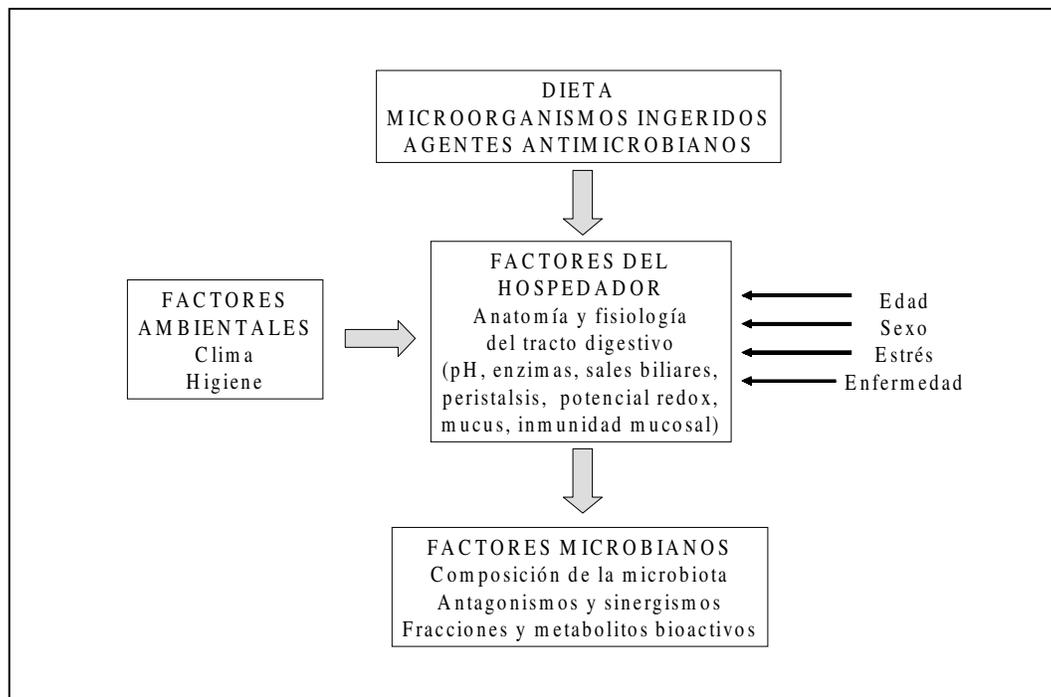


FIGURA 1.5. Factores que influyen en la microbiota intestinal (modificado de un esquema de Kleessen *et al.* [2000]).

Tras el nacimiento en condiciones normales, la microbiota materna debe constituir la primera fuente de contaminación microbiana [Moreau y Gaboriau-Routhiau, 2000] pero se desconocen los factores que seleccionan un número limitado de especies para colonizar el intestino del recién nacido [Kleessen *et al.*, 2000]. En efecto,

a las pocas horas del nacimiento aparecen en las heces los primeros anaerobios facultativos como *E. coli*, estafilococos y estreptococos. Estos primeros colonizadores reducen el potencial redox creando nichos donde pueden instalarse anaerobios estrictos (*Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Clostridium*), que son detectables en las heces entre dos y cuatro días después del nacimiento [Kleessen *et al.*, 2000]. En los niños nacidos por cesárea la colonización por anaerobios se ve generalmente retrasada y la microbiota inicial deriva, al menos en parte, del ambiente hospitalario [Kleessen *et al.*, 2000]. En las primeras semanas de vida, la naturaleza de la dieta parece tener importancia crucial: en las heces de niños alimentados con lactancia materna predominan las bifidobacterias, mientras que en los niños alimentados con fórmulas artificiales hay una mayor diversidad de anaerobios y anaerobios facultativos [Kleessen *et al.*, 2000; Moreau y Gaboriau-Routhiau, 2000]. Esta es una de las razones que hacen aconsejable la lactancia materna, como señalan Rinne *et al.* [2005]. El estudio de estos autores documenta que los factores ambientales, que incluyen la dieta y los microorganismos ingeridos, tienen sin duda mayor peso en los primeros meses de vida [Rinne *et al.*, 2005].

Entre los factores que influyen en el desarrollo de la microbiota los derivados de los propios microorganismos incluyen una compleja red de interacciones mutualistas y antagonistas. Un ejemplo de las primeras es el ya citado caso de la colonización temprana por microorganismos anaerobios facultativos o aerotolerantes, cuya actividad metabólica crea microambientes propicios al desarrollo de los anaerobios estrictos. En cuanto a los antagonismos, se explican por cuatro mecanismos: competición por sustratos esenciales; competición por receptores a los que unirse; creación de un ambiente restrictivo, por modificación del pH o del potencial redox; y producción de sustancias antibióticas [Fons *et al.*, 2000]. Otros aspectos importantes de las

interacciones entre microorganismos en el tracto digestivo son la transferencia horizontal de genes [Mullany, 2000] y la comunicación entre células microbianas mediante moléculas señal según el modelo denominado *quorum sensing* [Swift *et al.*, 2000]. Los sistemas *quorum sensing* en el ecosistema intestinal están poco estudiados, pero se han descrito en la producción de bacteriocinas por *L. plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Ruminococcus gnavus* [Swift *et al.*, 2000].

Otro factor microbiano a considerar es la presencia de adhesinas que permitan a las bacterias autóctonas unirse a las células de la mucosa. Se supone que este factor debe tener menos importancia en las bacterias ubicadas en el colon, dado que el peristaltismo aquí es más suave que en el intestino delgado [Adlerberth *et al.*, 2000]. Por otra parte, muchas bacterias autóctonas, se replican activamente en la capa de mucus que recubre a la mucosa; por tanto, habrá que distinguir entre las bacterias que se adhieren al mucus y las que se unen al cáliz de las células epiteliales, a las que habría que añadir las que se asocian con partículas en la luz intestinal. En cada uno de estos casos, las bacterias pueden estar individualmente, formando microcolonias y formando biofilms [Macfarlane *et al.*, 2000]. Sin embargo, algunos estudios no han encontrado diferencias en la composición de las comunidades microbianas de la luz intestinal y de la superficie de la mucosa, por lo que, según la opinión de un grupo de expertos, no hay todavía evidencias concluyentes de que las bacterias comensales en el intestino de individuos sanos se adhieran al epitelio o se encuentren exclusivamente en la luz intestinal y en la capa de mucus [Walker y Buckley, 2006]. Es admisible que la presencia de adhesinas sea útil para las bacterias autóctonas; esto es coherente con la capacidad de especies de lactobacilos, bifidobacterias y bacteroides para adherirse a líneas celulares de epitelio intestinal [Adlerberth *et al.*, 2000], y con la observación de

que las cepas de *E. coli* capaces de colonizar el intestino por largos periodos de tiempo son portadoras de genes para adhesinas en una proporción superior a la de cepas transeúntes de la misma especie [Walker y Buckley, 2006].

La configuración definitiva de la microbiota intestinal es el resultado de dos tipos de presiones selectivas: “desde arriba”, las presiones impuestas por el hospedador, lo que incluye las características de los nichos ecológicos ofrecidos y los mecanismos inmunitarios, y que seleccionan una diversidad de linajes microbianos cuyos genomas contienen conjuntos similares de genes (redundancia funcional); y “desde abajo”, las presiones debidas a la competición entre microorganismos, lo que promueve la selección de genomas especializados, con conjuntos de genes funcionalmente distintos [Ley *et al.*, 2006]. Una vez establecidas, las poblaciones que constituyen la microbiota intestinal son estables, aunque algunos estudios longitudinales muestran variaciones en los recuentos de determinadas especies, como *B. thetaiotaomicron* o *C. perfringens* [Kleessen *et al.*, 2000]. Incluso después de las perturbaciones inducidas por tratamientos antimicrobianos, las poblaciones originales retornan [De La Cochetière *et al.*, 2005]. Es interesante reseñar que, en opinión de expertos, la administración de prebióticos puede tener un impacto mayor sobre la microbiota que la de probióticos [Walker y Buckley, 2006]; es el caso de la administración de inulina, que incrementa el número de bifidobacterias indígenas [Gibson *et al.*, 1995].

1.4.3. Interacciones entre microbiota intestinal y hospedador

Desde un enfoque actual el ecosistema intestinal se basa en una alianza estable entre microbiota, barrera epitelial e inmunidad mucosal: los tres componentes

interaccionan entre sí y co-evolucionan hasta alcanzar la madurez de desarrollo del ecosistema [McCracken y Lorenz, 2001]. La barrera epitelial, reforzada por la inmunidad mucosal, protege al medio interno de los posibles efectos nocivos de los componentes de la microbiota; pero a su vez estos ejercen una serie de funciones importantes para la salud del hospedador, especialmente en lo que se refiere al desarrollo del GALT durante el inicio de la vida postnatal. Entre las funciones atribuidas a la microbiota intestinal se pueden citar las siguientes: modificación del contenido intestinal (pH, potencial redox, producción de metabolitos como vitaminas y enzimas digestivos), modificaciones anatómico-funcionales del tracto digestivo (disminución del volumen fecal por acción mucolítica, tasa de renovación de enterocitos, diferenciación de las células de la mucosa, aceleración del tránsito intestinal), resistencia a infecciones intestinales (por mecanismos directos como la competencia por nutrientes o la producción de sustancias antibióticas, e indirectos a través de la potenciación de la inmunidad mucosal), desarrollo del GALT y regulación de los mecanismos inmunitarios [Moreau y Gaboriau-Routhiau, 2000; Liévin-Le Moal y Servin, 2006]. Los estudios sobre estas funciones de la microbiota utilizan un modelo experimental basado en la comparación de animales convencionales, colonizados por microorganismos indígenas, y animales axénicos (*germ-free*) carentes de ellos; un recurso adicional muy valioso consiste en la administración de un determinado componente de la microbiota intestinal a animales axénicos, con lo que estos pasan a ser gnotobióticos (animales cuya microbiota intestinal consiste en una población, sencilla o mixta, perfectamente conocida de microorganismos), lo que permite evaluar el papel de dicha población bien definida [McCracken y Lorenz, 2001; Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2004] (**Figura 1.6**).

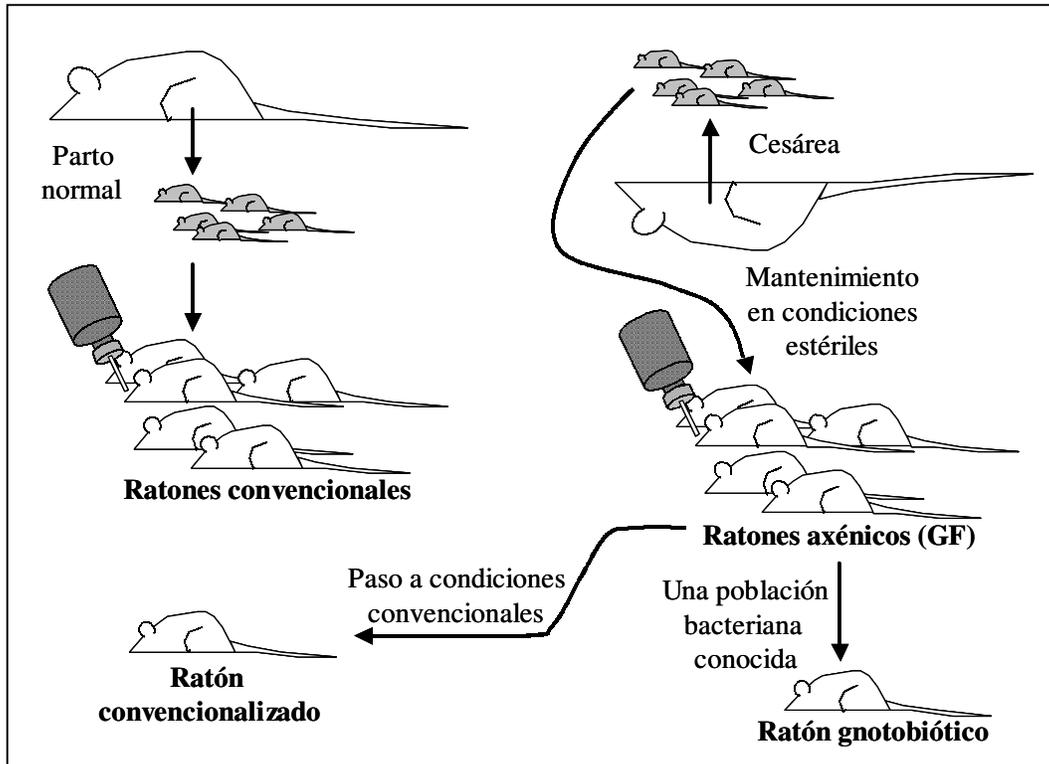


FIGURA 1.6. Ratones axénicos y gnotobióticos. Los ratones axénicos, libres de gérmenes, obtenidos por cesárea y mantenidos en condiciones de esterilidad, constituyen un modelo experimental apropiado para estudiar las funciones de la microbiota intestinal. Estos ratones pueden “convencionalizarse”, pasándolos a condiciones convencionales o administrándoles los microorganismos habituales de la microbiota. Pero, si se quiere examinar el papel de una población microbiana determinada, se puede administrar a ratones axénicos, que pasan entonces a denominarse gnotobióticos (con una microbiota perfectamente conocida).

Una función importante de la microbiota es su contribución al desarrollo de la mucosa. Se ha calculado que la superficie mucosal en animales axénicos es un 30% menor que en sus contrapartidas convencionales [Freitas y Cayuela, 2000]. Los glicoconjugados que constituyen el glicocálix de las células de la mucosa intestinal tienen una gran importancia ya que están implicados en mecanismos de reconocimiento molecular que incluyen procesos de adhesión y diferenciación celular, regulación, comunicación y transducción de señales e infección por bacterias y virus [Freitas y Cayuela, 2000]. Los patrones de glicosilación se encuentran alterados en animales

axénicos, pero se recuperan cuando se inoculan con microbiota intestinal [Freitas y Cayuela, 2000]. Experimentos con animales gnotobióticos han mostrado que *B. thetaiotaomicron*, miembro dominante de la microbiota anaerobia intestinal, es capaz de restaurar el programa de fucosilación normalmente orquestado por una microbiota intacta [Freitas y Cayuela, 2000], además de modular la expresión de genes relacionados con la absorción de nutrientes, el metabolismo de xenobióticos y la maduración intestinal post-natal [Liévin-Le Moal y Servin, 2006]. Esta bacteria es capaz de modificar la expresión de genes en las células intestinales, en beneficio tanto del hospedador como del microorganismo [Liévin-Le Moal y Servin, 2006]. En efecto, el fucosil axialo-GM1 cuya producción es inducida por *B. thetaiotaomicron* constituye un nutriente específico para esta bacteria [Bry *et al.*, 1996]. Una interesante población de bacterias no cultivables, dominantes en el ileon de ratones jóvenes y denominadas bacterias segmentadas filamentosas (SFB de *segmented filamentous bacteria*) tienen también capacidad para inducir la producción de glicolípidos con restos fucosil en el intestino delgado de ratones axénicos [Freitas y Cayuela, 2000]. Las SFB parecen jugar un papel importante en la maduración del GALT; son bacterias Gram-positivas, anaerobias, filogenéticamente relacionadas con el género *Clostridium* [Jiang *et al.*, 2001].

La microbiota intestinal ejerce influencia en los mecanismos defensivos inespecíficos de la mucosa intestinal. Experimentos con ratones axénicos y gnotobióticos reconstituídos con *B. thetaiotaomicron* han demostrado que microorganismos comensales regulan la expresión de genes en las células de Paneth, por mecanismos no bien conocidos, que tal vez impliquen a los linfocitos T intraepiteliales [Keshav, 2004].

Un gran número de estudios han demostrado la importancia de la microbiota intestinal en el desarrollo y funcionamiento del GALT. Algunos aspectos de estas interacciones merecen ser comentados. Es el caso de la expresión de moléculas codificadas por genes MHC-II en las células del epitelio intestinal, que las capacita para actuar como presentadoras de antígenos exógenos. En animales convencionales, los enterocitos expresan estas moléculas, lo que no ocurre en animales axénicos; sin embargo, los enterocitos de los animales axénicos convencionalizados (es decir reconstituidos con microbiota normal) o animales gnotobióticos con SFB recuperan la expresión de estas moléculas [Umesaki y Setoyama, 2000].

En los recién nacidos, el intestino delgado presenta placas de Peyer con áreas bien diferenciadas de linfocitos T y B pero, al no haber existido estímulos antigénicos en la vida fetal, no se observan folículos secundarios con centros germinales hasta pasado algún tiempo después del nacimiento, excepto en los animales axénicos [Moreau y Gaboriau-Routhiau, 2000]. La ausencia de centros germinativos es la causa del menor tamaño de las placas de Peyer y los ganglios linfáticos mesentéricos de los animales axénicos, así como la menor proporción de células M en el epitelio asociado a las placas [McCracken y Lorenz, 2001].

La lámina propia contiene tejido linfoide efector en el que se ubican las células B productoras de IgA, que en los ratones axénicos representan menos del 10% de la población existente en ratones convencionales, pero que se elevan hasta niveles comparables algunas semanas después de la convencionalización [Moreau y Gaboriau-Routhiau, 2000]. Según datos recogidos por Moreau y Gaboriau-Routhiau [2000] los animales gnotobióticos repoblados con bacterias Gram-positivas (*Micrococcus*,

Streptococcus, *Corynebacterium*, *Eubacterium*, *Lactobacillus*) no incrementan sensiblemente la proporción de plasmocitos productores de IgA por vellosidad; en cambio la colonización por una sola especie Gram-negativa como *E. coli* o *B. thetaiotaomicron* si tiene un importante efecto estimulador sobre este parámetro, lo que ha hecho suponer que el lipopolisacárido (LPS) de la pared celular de las bacterias Gram-negativas podría ser responsable de este efecto. Sin embargo, otras investigaciones indican que las SFB son también potentes estimuladoras de la proporción de plasmocitos productores de IgA [Umesaki y Setoyama, 2000]. Se ha especulado que la IgA secretora natural (es decir, los anticuerpos diméricos de clase IgA que están presentes en secreciones sin una inmunización específica previa) podría, a su vez, jugar un papel en el establecimiento de la microbiota [Walker y Buckley, 2006]. Sin embargo, la microbiota ileal de ratones *knock-out* para el receptor de la inmunoglobulina polimérica, que son incapaces de formar y secretar dímeros de IgA, es similar a la de ratones convencionales [Sait *et al.*, 2003]. Es posible que la IgA secretora natural, además de constituir una barrera protectora frente a las bacterias comensales (algunas de las cuales se comportarían como patógenos oportunistas si accedieran al medio interno), tenga capacidad para proteger la superficie de la mucosa frente a enteropatógenos como *S. enterica* serovar *Typhimurium* (a cuyos antígenos se une por reacción cruzada) y de prevenir la diseminación de éstos a través de la población [Wijburg *et al.*, 2006].

Los linfocitos intraepiteliales se encuentran en el intestino delgado y colon de ratones y humanos y son células T que utilizan como TCR heterodímeros $\alpha\beta$ o $\gamma\delta$. Curiosamente, la población de linfocitos intraepiteliales TCR $\gamma\delta^+$ es cuantitativa y funcionalmente similar en ratones convencionales y ratones axénicos; sin embargo la

subpoblación TCR $\alpha\beta^+$ puede verse reducida a la mitad en los animales axénicos respecto de los convencionales [Moreau y Gaboriau-Routhiau 2000], pero se incrementa espectacularmente tras la convencionalización o la gnotobiotización con SFB [Umesaki y Setoyama, 2000].

Con los alimentos ingerimos una gran cantidad de antígenos de origen animal o vegetal, parte de los cuales se absorben a través de la mucosa y alcanzan la circulación sanguínea conservando intacta su inmunogenicidad [Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2004]. La inmunización sistémica frente a estos antígenos podría dar lugar a reacciones adversas de hipersensibilidad en los subsiguientes contactos con ellos, situación indeseable que es evitada por el fenómeno ya mencionado de la tolerancia oral [Moreau y Gaboriau-Routhiau 2000]. Como ya se ha indicado, la tolerancia oral no siempre es total, ya que puede verse inhibida la inmunidad celular (conducida por células T_H1) en presencia de la respuesta de anticuerpos (que implica a células T_H2). Incluso puede ser un fenómeno muy selectivo, que afecte a la clase de inmunoglobulina: la tolerancia puede suprimir la respuesta de IgE (que media la hipersensibilidad inmediata) y no la de IgG [Moreau y Gaboriau-Routhiau 2000]. Según Tlaskalová-Hogenová *et al.* [2004], la tolerancia oral a los antígenos alimentarios se instaura durante las primeras semanas después del nacimiento, pero este concepto no está nada claro, ya que parece que la tolerancia requiere madurez en la inmunidad mucosal [Moreau y Gaboriau-Routhiau 2000]. De hecho, la activación completa de células T reguladoras (productoras de citocinas supresoras como IL-10 y TGF- β) requiere tiempo después del nacimiento (hasta dos años en humanos) [Walker y Buckley, 2006]. Existen numerosas evidencias de que la microbiota intestinal juega un papel importante en la inducción de la tolerancia oral. Los ratones axénicos producen anticuerpos como la IgE, en respuestas

dependientes de células T_H2 frente a antígenos introducidos por vía oral [Tanaka e Ishikawa, 2004]. La introducción de bacterias como *E. coli* o *B. infantis* restaura en estos animales gnotobióticos la capacidad de adquirir tolerancia oral [Tanaka e Ishikawa, 2004]. Otras observaciones en este mismo sentido, demostrando la necesidad de la microbiota intestinal para el mantenimiento de la tolerancia oral han sido recogidas por Moreau y Gaboriau-Routhiau [2000].

Los efectos de la microbiota intestinal sobre la inmunidad mucosal están mediados por componentes y metabolitos microbianos. Además de un mosaico de antígenos, las bacterias poseen diversos componentes capaces de ejercer efectos sobre las células y los mecanismos de la inmunidad, tanto innata como específica. Estos componentes bioactivos son comunes a grandes grupos microbianos y han sido denominados PAMPs (*pathogen-associated molecular patterns*) [Medzhitov y Janeway, 2000], aunque el hecho de que muchas de ellos estén presentes igualmente en bacterias no patógenas sugiere que una denominación más precisa sería la de MAMPs (*microbe-associated molecular patterns*) [Tlaskalová-Hogenová *et al.*, 2004]. Estas estructuras son reconocidas por receptores denominados PRRs (*pattern recognition receptors*), presentes como proteínas plasmáticas o en la superficie de diversos tipos celulares (macrófagos, células dendríticas, mastocitos, enterocitos), con distribución no clonal (a diferencia de los receptores específicos de linfocitos). Especial interés tienen los PRR celulares conocidos como receptores tipo Toll o TLRs (*toll-like receptors*) [Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera, 2005]. En la **Tabla 1.2** se muestran los TLRs conocidos y algunos de sus ligandos.

Tabla 1.2. Receptores tipo Toll (TLRs) y sus ligandos

Receptor	Ligando
TLR-1	Lipopéptidos bacterianos (bacterias G-)
TLR-2	Peptidoglicano o mureína (bacterias G+ y G-) Acidos lipoteicoicos (bacterias G+) Lipoarabinomamanos (micobacterias) Lipoproteínas (bacterias G-) Lipopolisacárido atípico (<i>P. gingivalis</i>)
TLR-3	RNA bicatenario (virus)
TLR-4	Lipopolisacárido (bacterias G-) HSP60 (<i>Chlamydia pneumoniae</i>)
TLR-5	Flagelina
TLR-6	Diacil-lipopéptido (micoplasmas)
TLR-7	¿Antivirales y antitumorales sintéticos?
TLR-8	¿?
TLR-9	Secuencias CpG no metiladas (DNA bacteriano)
TLR-10	¿?

Información tomada de Takeda *et al.* [2003].

Como señalan Dotan y Mayer [2003], la presencia de células del MALT en la lámina propia intestinal, con acumulación de linfocitos y macrófagos, corresponde a la imagen histológica de un tejido en el que se asienta un proceso de inflamación crónica. Se ha propuesto el término ‘inflamación fisiológica’ para definir esta situación habitual de infiltración por células, muchas de las cuales expresan marcadores de activación (como el receptor para IL-2) y producen citokinas [Dotan y Mayer 2003]. La inflamación fisiológica es el resultado de la compleja interacción de la mucosa con los

componentes de la microbiota intestinal. Los enterocitos producen quimiocinas, que atraen células inflamatorias, y citocinas, que pueden actuar sobre ellos de forma autocrina: es el caso del TGF- α (mitogénico) y TGF- β (antiproliferativo), que regulan la diferenciación celular en el epitelio de vellosidades y criptas, además de la acción antiinflamatoria de TGF- β ; IL-6, con acción proinflamatoria, además de intervenir en la incorporación de glucosa por las células; TNF- α con acción proinflamatoria; IL-10 con acción antiinflamatoria [Colgan *et al.*, 2003]. La unión de bacterias, productos bacterianos, virus o citocinas a receptores presentes en la superficie del enterocito, genera señales bioquímicas de activación que son transferidas, a través de vías de señalización, hasta el núcleo celular, desde donde se inician las correspondientes respuestas. Actualmente se considera que las más importantes vías de señalización proinflamatoria conducen a la activación de NF- κ B; esta es la denominación genérica de proteínas de la familia Rel de factores de transcripción. El sistema NF- κ B se encuentra normalmente en el citoplasma, inactivado por su inhibidor I κ B; la activación de las vías de señalización libera a NF- κ B de su inhibidor; la forma activa de NF- κ B penetra entonces en el núcleo donde se une al DNA para promover la transcripción de una diversidad de genes implicados en funciones inflamatorias, inmunitarias y antiapoptóticas [Neisch, 2003] (**Figura 1.7**). La presencia de microorganismos enteropatógenos determina la aparición de reacciones intensas de inflamación (“inflamación patológica”), que usualmente se autolimitan restaurándose el estado de inflamación fisiológica [Dotan y Mayer 2003]. Posiblemente, la atenuación de la vía proinflamatoria de NF- κ B sea un mecanismo de comensalismo [Neisch, 2003].

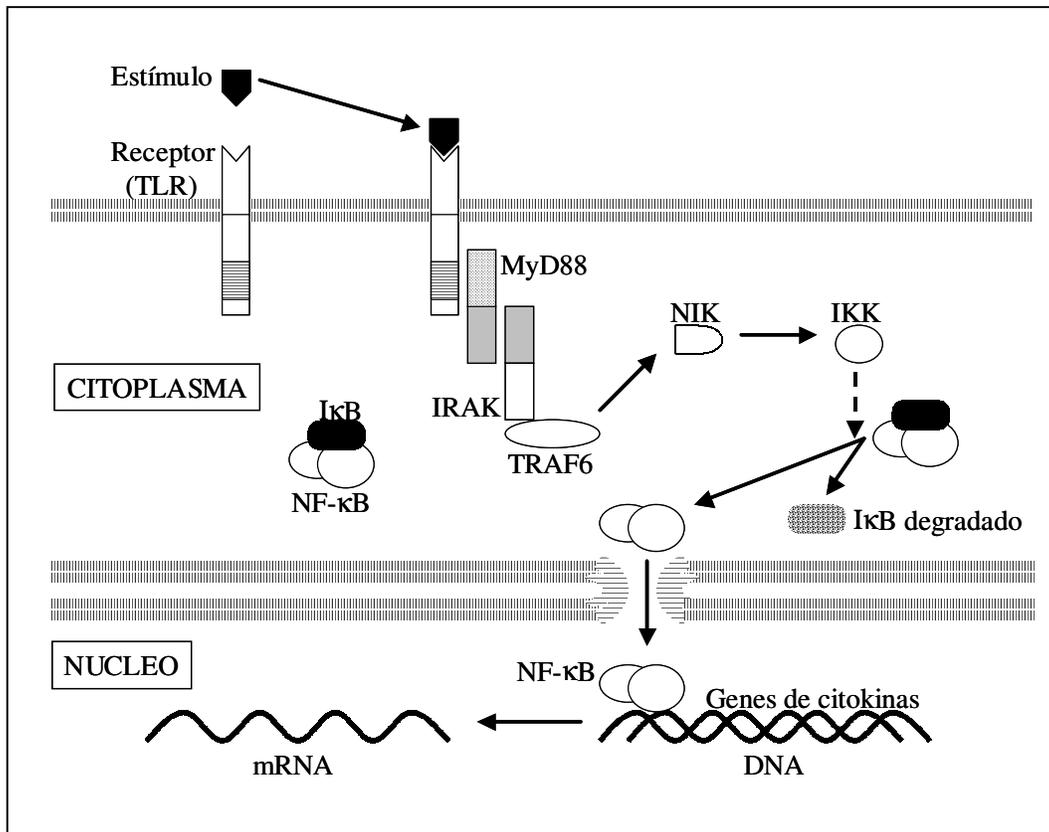


FIGURA 1.7. Activación celular a través de una vía de señalización que activa NF-κB. La señal de activación generada a nivel de receptores de la superficie celular se transmite a través de una secuencia de proteínas, como IRAK (*interleukin-1 receptor-associated kinase*), NIK (*NF-κB-inducing kinase*) e IKK (*inhibitor of κB kinase*), que finalmente degradan IκB (*inhibitor of κB*), lo que permite a NF-κB entrar en el núcleo y actuar como factor de transcripción de genes de citocinas u otros mediadores de inflamación.

1.4.4. Colonización por bacterias exógenas: enteropatógenos y probióticos

La adhesión a la mucosa intestinal es la primera etapa de la infección por bacterias enteropatógenas y, por ello, las adhesinas se consideran importantes factores de virulencia [Brumell y Finlay, 2000]. Sin embargo, también bacterias comensales, como cepas intestinales de *E. coli* y de especies de *Lactobacillus*, poseen adhesinas que les permiten colonizar la mucosa [Adlerberth *et al.*, 2000].

Las adhesinas son proteínas que reconocen estructuras de la superficie de las células del hospedador, generalmente secuencias concretas de azúcares presentes en glicoproteínas o glicolípidos (interacción péptido-carbohidrato), y con menos frecuencia secuencias de aminoácidos (interacción péptido-péptido) [Adlerberth *et al.*, 2000]. En las bacterias Gram-negativas, las adhesinas suelen ser fimbrias, mientras en las Gram-positivas son proteínas de la superficie celular [Adlerberth *et al.*, 2000]. La capacidad de colonización o invasión de la mucosa por bacterias enteropatógenas reside en una diversidad de factores de virulencia, que determinan distintas estrategias de infección: la colonización sin invasión, pero con producción de exotoxinas, que caracteriza a *Vibrio cholerae* y a las cepas enterotoxigénicas de *E. coli*; la colonización sin invasión, pero con eliminación de las microvellosidades de los enterocitos debida a las cepas enteropatógenas de *E. coli*; la adherencia y translocación al otro lado de la mucosa a través de células M por las cepas virulentas de *Y. enterocolitica*, que bloquean la fagocitosis por macrófagos mediante la microinyección de proteínas antifagocitarias integradas en un sistema de secreción tipo III; la entrada en células M, seguida de escape de la vacuola endocítica para pasar al citoplasma y de ahí a las células vecinas siguiendo los filamentos de actina del citoesqueleto, como hacen *S. flexneri* y *L. monocytogenes*; y la invasión y destrucción de enterocitos por serovars tifoideos de *S. enterica* [Brumell y Finlay, 2000; Salyers y Whitt, 2002].

Como ya se ha comentado, las pruebas de selección de cepas candidatas para ser consideradas probióticas incluyen ensayos de adherencia a células de epitelio intestinal. Sin embargo, hay evidencias en el sentido de que la adherencia no garantiza la posterior capacidad de colonización: estudios con cepas de *E. coli* han mostrado que hay pares adhesina/receptor que confieren capacidad de colonización, mientras otros no

[Adlerberth *et al.*, 2000]. Según Reuter [2001], los lactobacilos de especies diferentes de *L. gasseri* y *L. reuteri* son meros transeúntes en el ecosistema intestinal humano. De la misma manera que no está claro si las bacterias autóctonas de la microbiota intestinal necesitan o no adherirse a la mucosa [Walker y Buckley, 2006], también queda abierta la cuestión de si la colonización por bacterias probióticas es necesaria para que puedan ejercer sus efectos beneficiosos sobre la salud del hospedador.

1.5. ALIMENTOS QUE CONTIENEN PROBIÓTICOS

Los alimentos que contienen microorganismos probióticos suelen denominarse “alimentos probióticos” y pueden contener una sola o una mezcla de cepas probióticas diferentes [Fuller, 1989]. La mayoría de los alimentos probióticos se elaboran a partir de la leche [Hilliam, 1996]. Se trata de productos fermentados, como el yogur, a los que se añaden bacterias probióticas. Hasta el último tercio del pasado siglo, la producción y el consumo de yogur estaban restringidos a zonas geográficas como los Balcanes, India, Oriente Medio y Europa del Este. Sin embargo factores como la tecnología de refrigeración (que prolonga la conservación de productos perecederos), la introducción de nuevas generaciones de yogures (con aromas de frutas, azucarados, etc.), y la incorporación de bacterias probióticas (con la publicidad correspondiente a sus supuestos beneficios sobre la salud) determinaron un cambio de actitud en el consumidor y un incremento progresivo y espectacular de su consumo en los países desarrollados [Tamime, 2002]. Según Hilliam [1996], el primer yogur conteniendo bifidobacterias apareció en Francia a mediados de los años 80; en la década siguiente se introdujeron yogures y otros productos (como la leche fermentada japonesa Yakult)

conteniendo cepas probióticas como *L. casei* Shirota, *L. casei* GG, *L. acidophilus* LC1, *L. reuteri*, *Streptococcus faecium* y otras.

La adición de microorganismos probióticos a un alimento fermentado supone, obviamente, un valor añadido. Sin embargo, no todos los productos comercializados como alimentos probióticos cumplen los requisitos para esperar de ellos beneficios en la salud del consumidor. Reuter [2001] ha señalado algunos aspectos críticos que deben ser considerados al respecto: la descripción de las cepas usadas como probióticos es, a menudo, incompleta o errónea; por ejemplo es frecuente utilizar la denominación *L. acidophilus*, olvidando que este nombre caracteriza a un grupo compuesto por 6 especies distintas (como se indicó en el apartado 1.2.3), incluyendo *L. acidophilus sensu stricto*. A veces, se utilizan denominaciones inválidas desde el punto de vista taxonómico como en el caso de *Bifidobacterium lactis*. Otro aspecto criticable es la inclusión de *B. bifidum* como componente de alimentos probióticos, sin tener en cuenta que esta bifidobacteria es la más exigente en cuanto a sus condiciones de estricta anaerobiosis, y que su viabilidad no es posible durante el periodo en que el alimento puede ser consumido. Precisamente los menores requisitos de anaerobiosis hacen que se prefieran cepas de *B. longum*; sin embargo, basar la elección de una cepa para un alimento probiótico en motivos puramente técnicos no es apropiado, aunque éste sea el criterio utilizado en algunos alimentos e incluso preparaciones farmacéuticas. Algunos trabajos experimentales de comprobación de la identidad de cepas han confirmado la existencia de errores taxonómicos: por ejemplo, dos preparaciones comerciales afirman contener sendas cepas de *B. subtilis* que parecen ser, realmente, *Bacillus pumilus* y *Bacillus alcalophilus* [Green *et al.*, 1999].

1.5.1. El yogur

Según la *International Dairy Federation* [IDF, 1992], se definen como leches fermentadas las preparadas por la acción de microorganismos específicos sobre leche o productos lácteos (incluyendo leche entera, parcial o totalmente desnatada, concentrada, en polvo, lactosuero, lactosuero concentrado o en polvo, proteínas de la leche, nata y otros) que han sido pasteurizados previamente a la acción microbiana, la cual tiene como resultado acidificación y coagulación. El yogur es una leche fermentada, en cuya fermentación intervienen las bacterias *L. bulgaricus* y *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*. La legislación española define el yogur, de acuerdo con los criterios establecidos por la FAO/OMS, como un producto de leche coagulada obtenida por la fermentación láctica, mediante la acción de *L. bulgaricus* y *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, a partir de leche pasteurizada, leche concentrada pasteurizada, leche total o parcialmente desnatada pasteurizada, leche concentrada pasteurizada total o parcialmente desnatada, con o sin adición de nata pasteurizada, leche en polvo entera, semidesnatada o desnatada, suero en polvo o proteínas de leche u otros productos procedentes del fraccionamiento de la leche [Real Decreto 179/2003, 2003].

El proceso de fabricación del yogur consta de varias fases bien diferenciadas. En primer lugar se selecciona la base láctea y se prepara para su utilización de modo que el contenido en materia grasa esté entre 0.5 y 5 gramos por cada 100 gramos de base y el contenido en otros sólidos no grasos se encuentre en torno a 14 gramos por cada 100 gramos de base (en algunos yogures especiales, como el “yogur griego”, el contenido en grasa rebasa el 8%). En esta primera etapa, la base láctea se puede fortificar mediante la adición de leche en polvo (se recomienda que este proceso se realice a 40°C y se

acompañe de una filtración y, posteriormente se elimine el aire que se pueda haber incorporado) aumentando así su viscosidad. También se puede concentrar mediante un proceso de evaporación. Una vez preparada la base, se procede a su homogeneización de modo que el tamaño de los glóbulos de grasa se reduzca hasta estar por debajo de los 2 μm de diámetro lo que reduce el riesgo de coalescencia. Además, se modifica el color de la base (pasa a ser más blanca) y se aumenta su viscosidad. Cuando la base se ha homogeneizado, se somete a un tratamiento térmico pudiendo utilizarse diferentes combinaciones de tiempo y temperatura. De este modo, se eliminan los microorganismos patógenos que puede contener la leche obteniéndose un medio adecuado para el crecimiento de los microorganismos que se van a emplear para la fermentación.

Con el tratamiento térmico se modifican también las propiedades físico-químicas de la leche y se obtienen diversos productos que actúan estimulando el crecimiento de los microorganismos fermentadores. Para la adición de estos microorganismos es necesario enfriar la leche hasta alcanzar la temperatura adecuada para la incubación. En los yogures tradicionales el enfriamiento se realiza hasta alcanzar los 40-45°C y esta temperatura debe mantenerse durante el periodo de fermentación (aproximadamente 3 h). Otra opción es enfriar hasta 30°C y mantener la temperatura durante un periodo de fermentación más largo (unas 18 h). En el caso de yogures a los que se van a añadir microorganismos probióticos, la temperatura adecuada es de 37°C y debe mantenerse estable varias horas e incluso varios días en función del microorganismo empleado. Estos microorganismos se comercializan en forma de liófilos y constituyen lo que se denomina “cultivo *starter*” (inóculo). Deben añadirse en una proporción del 2% y de forma continua. Una vez alcanzada la acidez y las

características físico-químicas y organolépticas deseadas, es necesario detener la fermentación para lo cual se realiza un enfriamiento del producto hasta los 5°C. Este enfriamiento puede realizarse en una o en dos fases (el proceso en dos fases se realiza en yogures que van a incorporar saborizantes, frutas... de modo que éstos se añaden tras el primer enfriamiento en el que se alcanzan temperaturas en torno a los 20°C) [Tamime, 2002]. Según el RD 179/2003 el pH del producto final debe ser de 4.6 o inferior y el número de bacterias será, como mínimo de 10^7 bacterias viables por ml.

En la fabricación del yogur es fundamental que exista un equilibrio entre las cepas empleadas para la fermentación de la leche. Esto es debido a que la D-glucosa que es el azúcar que se obtiene al hidrolizar la lactosa, es transformada en ácido L (+) láctico, producido por el estreptococo y ácido L (-) láctico producido por el lactobacilo. Ambos metabolitos son los responsables del sabor ácido característico del yogur, y se ha establecido que la proporción más adecuada es: 55% de ácido L (+) láctico y 45% de ácido L (-) láctico.

Aunque *L. bulgaricus* y *S. salivarius* subsp. *thermophilus* son los microorganismos que tradicionalmente se han empleado para la transformación de la leche en yogur, actualmente se fabrican yogures en los que se emplean estos microorganismos junto con otros que son considerados probióticos [Tamime, 2002]. Sin embargo, hay autores como Guarner *et al.* [2005] que consideran a estos microorganismos clásicos como probióticos ya que ambos presentan una actividad lactasa muy elevada por lo que el consumo de yogures tradicionales mejoraría considerablemente la digestión de la lactosa, lo que supone un efecto beneficioso en individuos con intolerancia a este azúcar.

En cualquier caso, no debe olvidarse que el yogur natural consumido originalmente por los miembros de las tribus de las zonas montañosas de Europa oriental era un producto muy diferente al que hoy en día se encuentra en los mercados, ya que la microbiota de tal producto era extremadamente variable. Mientras que el yogur actual se elabora casi exclusivamente por fermentación por *S. salivarius* subsp. *thermophilus* y *L. bulgaricus*, el tradicional contenía probablemente una mezcla de varias especies de bacterias ácido lácticas, como por ejemplo *L. acidophilus*, *Lactobacillus jugurtii*, *Lactobacillus helveticus* y *B. bifidum* [Tamime, 2002].

Finalmente, hay que abordar una cuestión de interés, como es la de los yogures pasteurizados después de la fermentación. Este proceso tiene como objeto inactivar las bacterias fermentadoras y, en su caso, las cepas probióticas añadidas, de forma que se aumenta notablemente la estabilidad del producto y se simplifica su conservación. En opinión de Tamime [2002], los productos pasteurizados después de la fermentación no responden a los criterios establecidos para leches fermentadas. Sin embargo, las directrices de la Unión Europea y de acuerdo con las mismas la normativa legal española [RD 179/2003] acepta el uso de la denominación “yogur pasteurizado después de la fermentación”. En el caso de yogures tradicionales, no suplementados con microorganismos probióticos, la incapacidad de las cepas utilizadas de *L. bulgaricus* y *S. salivarius* subsp. *thermophilus* para colonizar el intestino hace que no se encuentren diferencias significativas, ni por técnicas clásicas de cuantificación de bacterias viables, ni por técnicas de identificación molecular (PCR e hibridación DNA/DNA), entre la detección de dichas cepas en heces de individuos que ingieren yogur fresco y de otros que ingieren yogur pasteurizado [Del Campo *et al.*, 2005]. En el caso de yogures a los que se atribuyen efectos probióticos, la discusión se centra en que la mayoría de las

definiciones de microorganismo probiótico incluyen la consideración de que son microorganismos que se ingieren viables, como ya se ha visto en el apartado 1.1.1. Pero, como se indica en el mismo apartado, los microorganismos no viables pueden retener propiedades inmunomoduladoras en sus estructuras celulares o, alternativamente, producir en el curso de la fermentación metabolitos bioactivos que podrían aportar beneficios a la salud del hospedador (ver también el apartado 1.6.6). Desde este punto de vista, podría justificarse la decisión legal de mantener la denominación de yogur para los productos pasteurizados después de la fermentación.

1.5.2. El kéfir

El kéfir es una bebida viscosa ligeramente carbonatada que contiene una pequeña cantidad de alcohol y que se obtiene a partir de la leche por fermentación. Tradicionalmente se ha empleado la leche de vaca para su obtención y, en menor medida, la de oveja, cabra y búfala. Actualmente se fabrica también a partir de leche de soja. Se cree que tiene su origen en las regiones montañosas del Cáucaso, aunque hoy día se fabrica a nivel mundial [Farnworth, 2005]

En la preparación del kéfir se emplean unos gránulos (gránulos del kéfir) formados por una masa de proteínas, polisacáridos y diversos microorganismos que se encuentran en simbiosis y entre los que figuran estreptococos ácido lácticos homo y heterofermentadores, lactobacilos meso y termofílicos, bacterias del ácido acético y levaduras. Farnworth [2005], recogiendo datos de diversos autores, ha elaborado un censo de microorganismos presentes en los granos del kéfir, que incluye, entre las bacterias, 16 especies de *Lactobacillus*, dos subespecies de *Lactococcus lactis*, un

estreptococo termófilo, un enterococo, una especie de *Leuconostoc*, dos de *Acetobacter*, y especies de los géneros *Bacillus*, *Micrococcus* y *Escherichia*; y entre las levaduras, seis especies de *Saccharomyces*, 10 de *Candida*, una de *Kluyveromyces* y una de *Picchia*. Los gránulos de kéfir deben añadirse a la leche fresca y se dejan crecer durante unas 24 h y, en función del tamaño que presenten, las propiedades del producto final serán distintas. Durante el proceso de fermentación cambian las condiciones de pH lo que favorece el crecimiento de algunos microorganismos respecto de otros: inicialmente crecen rápidamente los estreptococos homofermentadores; hacia el final del proceso el crecimiento de los lactobacilos se ve favorecido respecto del de las levaduras y bacterias del ácido acético. En consecuencia, el perfil microbiológico del producto fermentado difiere del que presentan los gránulos del kéfir, y por tanto no se puede utilizar el producto final para inocular una nueva base láctica. Para mantener la viabilidad de los gránulos es fundamental transferirlos diariamente a leche fresca y, en caso de querer conservarlos durante periodos de tiempo prolongados, es necesario el almacenamiento a bajas temperaturas [Farnworth, 2005].

El kéfir se considera un alimento funcional, que ofrece beneficios para la salud, como inmunoestimulación, inhibición del crecimiento tumoral, protección frente a la intolerancia a la lactosa, resistencia frente a infecciones por enteropatógenos y disminución de los niveles de colesterol. Estos beneficios se atribuyen a dos tipos de componentes: péptidos bioactivos y un exopolisacárido de D-glucosa y D-galactosa denominado kefirano [Farnworth, 2005].

1.6. EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS PROBIÓTICOS

La bibliografía sobre los efectos beneficiosos de los microorganismos probióticos se ha incrementado exponencialmente en los últimos años [Ramos-Cormenzana *et al.*, 2005], como se muestra en la **Figura 1.8**. Este interés deriva en buena parte de la expansión del mercado de alimentos funcionales que contienen probióticos, debida a las preferencias de los consumidores por medios naturales para conservar la salud y a las expectativas de que los alimentos constituyan una fuente de salud y bienestar [Mercenier *et al.*, 2003]. En la **Tabla 1.3** se presentan el total de referencias bibliográficas halladas en la base PubMed, combinando el término “*probiotic*” con otros que definen los diferentes efectos beneficiosos para la salud atribuídos a estos microorganismos.

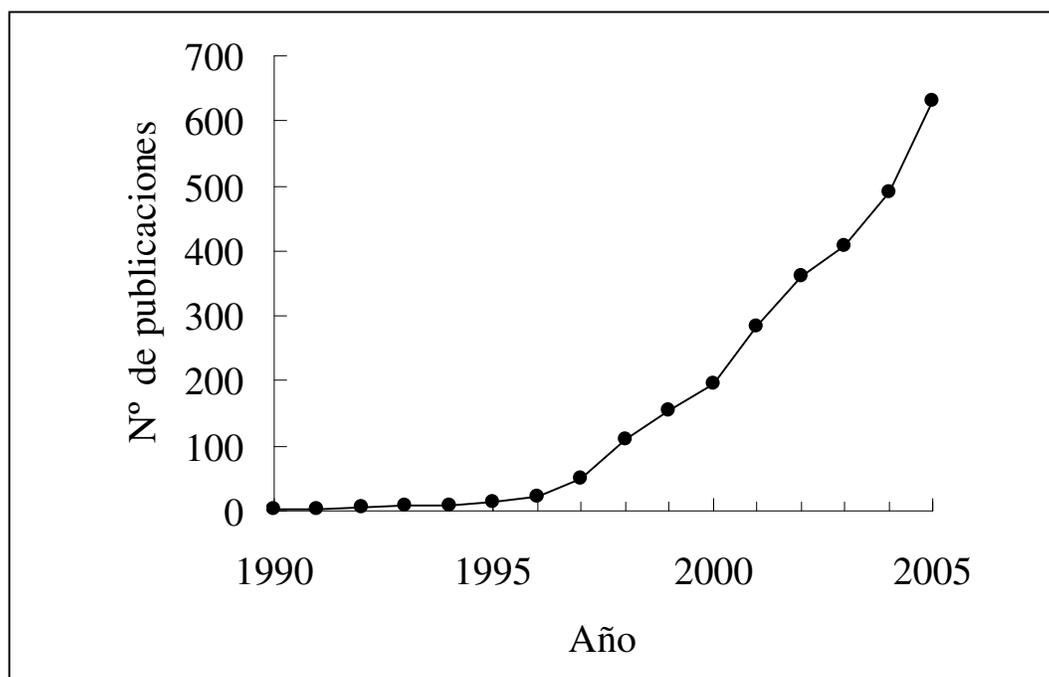


FIGURA 1.8. Evolución temporal de las publicaciones en revistas científicas que incluyen el término *probiotic*, según la base de datos PubMed.

Tabla 1.3. Referencias encontradas en PubMed sobre microorganismos probióticos y sus efectos

Palabras combinadas con <i>probiotic</i>	Publicaciones		
	Primarias	Revisiones	Totales
<i>Lactose intolerance</i>	13	32	45
<i>Carcinogens</i>	29	11	40
<i>Cholesterol</i>	66	15	81
<i>Infections</i>	382	187	569
<i>Intestinal infections</i>	140	80	220
<i>Tumors</i>	147	76	223
<i>Immunity</i>	234	99	333
<i>Immunomodulation</i>	19	17	36
<i>Cytokine</i>	181	49	230
<i>Lymphocyte</i>	91	23	114
<i>Allergy</i>	90	96	186
<i>Inflammation</i>	121	57	178

Datos recogidos el 28 de junio de 2006.

En la **Figura 1.9** se presenta un esquema de los principales efectos beneficiosos para la salud que se asocian a la administración de microorganismos probióticos, junto a algunos de los posibles mecanismos de acción. El resto de esta sección 1.6 se destina a revisar los conocimientos, conceptos e hipótesis actuales sobre estos efectos y mecanismos.

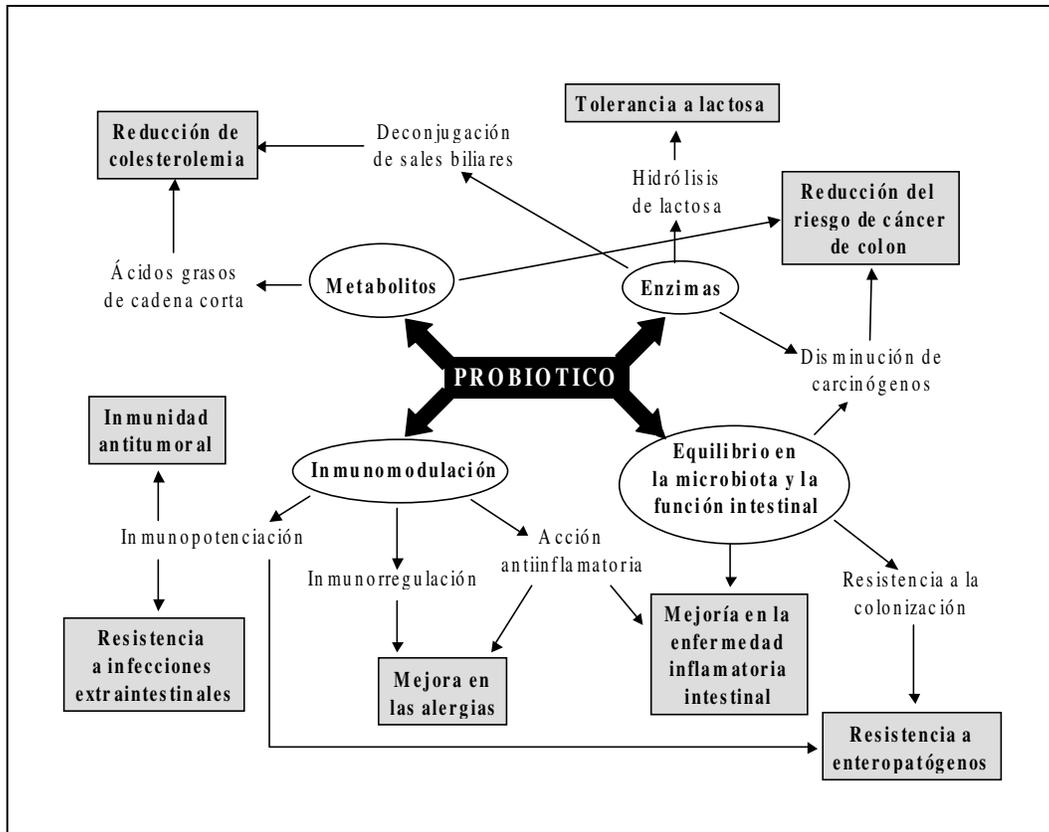


FIGURA 1.9. Efectos beneficiosos atribuidos a los microorganismos probióticos y sus posibles mecanismos. Esquema inspirado en la Fig. 1 de la publicación de Parvez *et al.* [2006], con modificaciones.

1.6.1. Interfaz metabólica en el intestino

La presencia de microorganismos probióticos viables y metabólicamente activos en el tracto intestinal, hace posible la biotransformación de determinadas moléculas ingeridas o formadas en la luz intestinal que podrían ser nocivas para el organismo y que son detoxificadas. De esta forma, los microorganismos probióticos actuarían como un escudo metabólico que impide la acción deletérea de moléculas perjudiciales. Hay evidencias experimentales de que ésto ocurre en al menos tres situaciones de interés

clínico: intolerancia a la lactosa, hipercolesterolemia y carcinogénesis en la mucosa intestinal.

La intolerancia a la lactosa es una condición bastante común, que proviene de la deficiente absorción de este disacárido, debida a su vez a una hipolactasia o deficiente expresión del enzima lactasa en los enterocitos. La lactasa es una disacaridasa que hidroliza la lactosa originando glucosa y galactosa. Durante la lactancia, el ser humano como otros mamíferos expresa altos niveles de lactasa en las microvellosidades de los enterocitos, pero, a partir del destete, la expresión de lactasa decae de forma irreversible en la mayor parte de la población [Montalto *et al.*, 2006]. Existe una variedad de fenotipos respecto a los niveles de expresión de lactasa, desde los que conservan un alto nivel de expresión durante la vida adulta (persistencia de lactasa) hasta los que tienen niveles mínimos [Swallow, 2003]. La presencia de lactosa no digerida en la luz intestinal puede asociarse con manifestaciones clínicas como diarrea (debida a la secreción de fluidos por el incremento de la carga osmótica), dolor abdominal y flatulencia lo que constituye el síndrome de intolerancia a la lactosa [Montalto *et al.*, 2006]. En la bibliografía existe una cierta confusión respecto a los términos utilizados, ya que no todos los individuos con deficiencia en lactasa expresan una sintomatología clínica; por ello, términos como mala digestión (*maldigestion*) o mala absorción (*malabsorption*) no son sinónimos de intolerancia a la lactosa.

La ingestión de yogur u otra forma de leche fermentada es bien tolerada por las personas con intolerancia a la lactosa, lo que se debe a la presencia de β -galactosidasa en las bacterias fermentadoras de leche [Ouweland *et al.*, 2002; Tuohy *et al.*, 2003; Gill y Guarner, 2004]. Dado que las bacterias usadas en la fermentación del yogur

tradicional (*S. salivarius* subsp. *termophilus* y *L. bulgaricus*) poseen β -galactosidasa y mejoran la digestión de la lactosa [Kolars *et al.*, 1984], algunos autores han propuesto que este producto debe considerarse un alimento probiótico *per se* [Guarner *et al.*, 2005], como ya se ha indicado en el apartado 1.5.1.

La capacidad de algunos microorganismos probióticos para reducir la colesterolemia fue señalada por Fuller [1989] en su ya clásico trabajo de revisión. Desde entonces, se han acumulado algunas evidencias experimentales al respecto. Un modelo útil lo constituyen animales en los que se induce hipercolesterolemia mediante la ingesta de una dieta apropiada: así se ha demostrado el efecto hipocolesterolemiante de mezclas complejas de probióticos, como la de *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridium*, *Saccharomyces* y *Candida* (en total, 14 cepas microbianas) estudiada en gallos por Endo *et al.* [1999], y de microorganismos aislados, como *L. reuteri* en ratones [Taranto *et al.*, 1998] y en cerdos [De Smet *et al.*, 1998], *L. gasseri* en ratas [Usman y Hosono, 2001]. Hay también algunos ensayos en humanos, demostrando la reducción de colesterol-LDL por *E. faecium* en individuos con sobrepeso [Agerholm-Larsen *et al.*, 2000] o la mejora de la relación de colesterol-LDL/colesterol-HDL en mujeres que ingieren *L. acidophilus* 145 y *B. longum* 913 [Kiessling *et al.*, 2002]. Como consecuencia de estos efectos, la administración de probióticos como *L. plantarum* 299v reduce los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular en fumadores [Naruszewicz *et al.*, 2002].

Ya en la revisión de Fuller [1989] se sugieren dos posibles mecanismos para el efecto hipocolesterolemiante de los microorganismos probióticos: acción directa sobre el colesterol, reduciendo su absorción intestinal, y acción mediada por metabolitos

bacterianos que se absorben e inhiben la síntesis de colesterol endógeno. Actualmente sabemos que la acción directa está mediada por la hidrolasa de sales biliares (BSH, de *bile salt hydrolase*), enzima presente en *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Clostridium* y *Bacteroides* [Begley *et al.*, 2006]. En el hígado se sintetizan, a partir del colesterol, ácidos biliares, que antes de su secreción son conjugados con glicina o taurina. Una vez excretadas a la luz intestinal, las sales biliares conjugadas participan en la solubilización, hidrólisis enzimática y absorción intestinal de lípidos; la mayor parte de la propia bilis es también reabsorbida. La deconjugación de sales biliares, catalizada por BSH, reduce la absorción de lípidos y de bilis, ya que los ácidos biliares deconjugados poseen menor capacidad de solubilización de lípidos y son reacios a la reabsorción intestinal; paralelamente, se incrementa el consumo hepático de colesterol, para sintetizar más bilis que compense su reabsorción disminuída; ambos efectos tendrían como consecuencia una reducción de los niveles plasmáticos de colesterol [Casas y Dobrogosz, 2000; Begley *et al.*, 2006]. En cuanto a la acción mediada por metabolitos bacterianos, se acepta que está protagonizada por los ácidos grasos de cadena corta, acetato, propionato y butirato, producidos en la fermentación de poli- y oligosacáridos en el colon y absorbidos fácilmente por la mucosa [Wong *et al.*, 2006]. El acetato es precursor de la síntesis hepática de colesterol, pero el propionato la inhibe; el resultado final parece depender de la proporción entre las concentraciones de ambos ácidos [Wong *et al.*, 2006]. Adicionalmente se ha sugerido que el descenso del pH debido a la acumulación de ácidos grasos de cadena corta en el colon debe disminuir la solubilidad de los ácidos biliares y, por tanto, su absorción [Wong *et al.*, 2006]. En el ensayo de Endo *et al.* [1999], la administración de la mezcla de probióticos incrementó significativamente el contenido cecal de ácidos grasos de cadena corta y disminuyó la relación de concentraciones acético: propiónico en los animales hipercolesterolémicos.

En conclusión, tanto la producción de ácidos grasos de cadena corta (especialmente la proporción molar de propionato) y la deconjugación de sales biliares se consideran los principales mecanismos implicados en la capacidad hipocolesterolemiantes de los microorganismos probióticos [Pereira *et al.*, 2003]. Un esquema de estos mecanismos se muestra en la **Figura 1.10**.

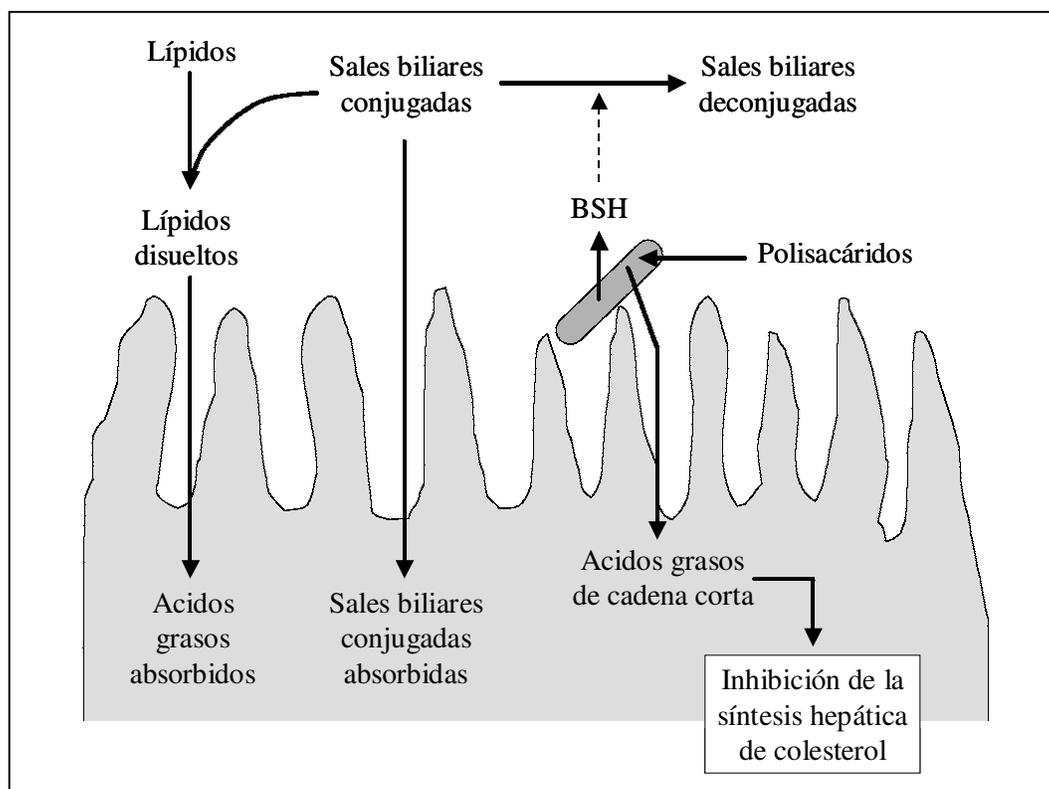


FIGURA 1.10. Mecanismos propuestos para el efecto hipocolesterolemiantes de algunos microorganismos probióticos. El mecanismo directo se debe a la deconjugación de sales biliares por la enzima bacteriana BSH (*bile salt hydrolase*). El indirecto, a la producción de ácidos grasos de cadena corta, especialmente el propiónico, que es absorbido e inhibe la síntesis de colesterol en el hígado.

Hay que dejar constancia de que la reducción de colesterolemia demostrada en los estudios citados se observó sólo en individuos con hipercolesterolemia, lo que

explica que la reconstitución de ratones libres de lactobacilos con cepas que expresan BSH no tenga efectos en los niveles plasmáticos de colesterol [Tannock y McConnell, 1994] y que los ensayos en voluntarios sanos no hayan revelado actividad hipocolesterolémica [Lin *et al.*, 1989].

La última de las situaciones clínicas reseñadas como susceptibles de ser mejoradas por la ingestión de probióticos es la aparición de carcinoma de colon. En general, este tumor se inicia por acción de carcinógenos químicos mutágenos, y se le reconoce un desarrollo gradual, por etapas que abarcan desde lesiones pretumorales (epitelio hiperplásico), pasando por varias formas de adenomas, hasta llegar al carcinoma invasor y metastásico, estando cada etapa definida por la activación de oncogenes o la inactivación de diversos genes supresores [Ruiz-Bravo *et al.*, 1992]. En su revisión sobre la prevención de cáncer de colon por probióticos, Brady *et al.* [2000] recogen un total de 24 observaciones sobre probióticos y tumores de colon, incluyendo sendas datadas a principios de los 80, que describen la reducción por derivados lácteos fermentados por bacterias del ácido láctico, de la tumorigénesis experimentalmente inducida en ratas. Brady *et al.* [2000] concluyen que existen una serie de estudios, en modelos animales, probando una relación inversa entre el consumo de probióticos y la aparición de criptas aberrantes o el desarrollo de tumores en el colon, así como evidencias sobre el sinergismo antitumoral del consumo de probióticos y prebióticos (fructooligosacáridos). En años recientes, los investigadores han intentado establecer los mecanismos por los que ocurren estos efectos antitumorales. Basándose en trabajos previos *in vitro* mostrando las propiedades anti-mutagénicas de numerosas cepas probióticas de lactobacilos y bifidobacterias, Matsumoto y Benno [2004] realizaron un estudio con voluntarios humanos, demostrando que el consumo de yogur conteniendo *B.*

lactis LKM512 incrementa el contenido fecal en espermidina y disminuye la mutagenicidad de las heces; los autores especulan que la espermidina producida por estas bacterias podría jugar un papel como estabilizador del DNA celular, al que protegerían de los efectos genotóxicos de los carcinógenos. Los ya citados ácidos grasos de cadena corta son también candidatos, en especial el butírico, por sus efectos protectores sobre los enterocitos [Wong *et al.*, 2006]. Femia *et al.* [2002] encontraron que el aporte de prebióticos (inulina y oligofruktosa) tiene un efecto inhibitor de la carcinogénesis en colon de ratas, posiblemente por inducción de ácidos grasos de cadena corta; por el contrario, la ingestión de probióticos como *L. rhamnosus* y *B. lactis* no aportó ningún efecto adicional en este estudio. Le Leu *et al.* [2005], utilizando un modelo experimental de carcinogénesis de colon con azoximetano, en el que midieron la respuesta apoptótica aguda de los enterocitos, evaluaron la combinación de un prebiótico, el almidón resistente, y un probiótico, *B. lactis* L AFTI B94; el prebiótico causó descenso del pH colónico e incrementó la producción de ácidos grasos de cadena corta, sin modificar la respuesta apoptótica aguda al agente genotóxico usado; la bacteria probiótica no acidificó ni produjo ácidos grasos de cadena corta, pero la combinación de ambos (constituyendo, por tanto, un preparado simbiótico) tuvo un significativo efecto proapoptótico. Diversos autores han fijado su atención en las posibilidades de modificar el equilibrio entre apoptosis y mitosis y sus repercusiones sobre la tumorigénesis. Rachid *et al.* [2002] comunicaron que el yogur tradicional (sin otras cepas que *S. salivarius* subsp. *termophilus* y *L. bulgaricus*) ejerce un efecto proapoptótico que se asocia a la inhibición en el desarrollo de cáncer de colon en ratones. Según de Moreno de LeBlanc y Perdigon [2004], la administración de yogur tradicional a ratones inhibe, no la carcinogénesis, sino la promoción y progresión de tumores de colon, a través de la potenciación de la inmunidad; en concreto, atribuyen un papel al

incremento de apoptosis en enterocitos por acción, no de ácidos grasos de cadena corta, sino de citocinas como TNF- α , a través de la estimulación de mecanismos inmunitarios, lo cual caería fuera de los mecanismos incluidos en el denominado interfaz metabólico; en el mismo sentido, Yamazaki *et al.* [2000] han sugerido que la inhibición de la carcinogénesis en colon de ratas por *L. casei* Shirota se debe a la estimulación de linfocitos T CD8⁺. En su reciente e interesante trabajo de revisión, Parvez *et al.* [2006] hacen una recapitulación de los posibles mecanismos implicados en la inhibición de la carcinogénesis por agentes químicos en el colon: (a) detoxificación de carcinógenos ingeridos; (b) modificación de la microbiota intestinal, disminuyendo aquellas poblaciones cuyas actividades metabólicas puede generar compuestos carcinógenos; (c) producción de metabolitos como el ácido butírico, que promueven la apoptosis (en lugar de la proliferación) en aquellas células que han sufrido daños génicos; (d) producción de compuestos que inhiben la proliferación de células tumorales; y (e) estimulación de los mecanismos inmunitarios. Aún pueden añadirse otros mecanismos, como la unión de agentes carcinógenos a bacterias probióticas, limitando su absorción, y la depresión de poblaciones microbianas productoras de enzimas (β -glucuronidasa, azorreductasa, ureasa, nitrorreductasa, glicocolatorreductasa) capaces de convertir procarcinógenos en carcinógenos [Ouwehand *et al.*, 2002; Parvez *et al.*, 2006]. Un esquema de estos mecanismos se presenta en la **Figura 1.11**. La importancia del butirato, producido como metabolito en la fermentación bacteriana de polisacáridos no digeribles, ha sido resaltada por Wollowski *et al.* [2001]; como ya se ha indicado, el butirato ejerce diversos efectos sobre los colonocitos, que lo utilizan como fuente de energía, y en los que induce la expresión de la proteína p21, que bloquea la progresión en el ciclo celular a nivel del punto de control (*checkpoint*) en G1 cuando existen daños en el DNA, facilitando la reparación de los mismos o llevando a la célula alterada a la apoptosis, en

vez de a la proliferación [Wong *et al.*, 2006]. Obviamente, estos mecanismos pueden extenderse a efectos sobre tumores no intestinales: la disminución de agentes cancerígenos en la luz intestinal (por el mecanismo que sea) limitará, no solo su acción *in situ*, sino también su absorción y subsiguiente diseminación por vía hemática.

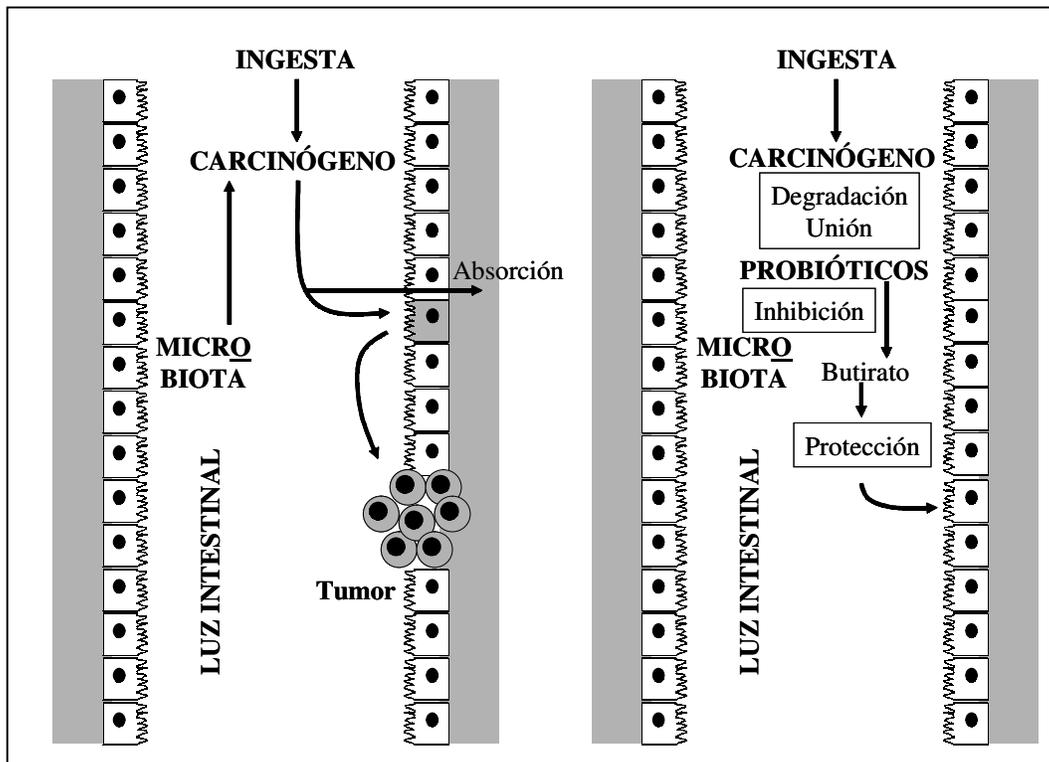


FIGURA 1.11. Mecanismos directos de acción antitumoral atribuidos a microorganismos probióticos. La degradación enzimática, la unión de carcinógenos ingeridos, y el desplazamiento de poblaciones de microorganismos indígenas capaces de producir carcinógenos o de convertir procarcinógenos de la dieta en carcinógenos, limitan la acción de estos agentes sobre las células de la mucosa, previniendo el desarrollo de carcinoma de colon, y, al limitar asimismo la absorción, reduciendo también la incidencia de tumores extraintestinales, como el hepatocarcinoma.. Adicionalmente, la producción de metabolitos como el butirato ejerce efectos protectores sobre los colonocitos y los predispone a la apoptosis en el caso de que sufran alteraciones génicas. En la Figura no se representan los mecanismos mediados a través de la inmunopotenciación por probióticos, que serán efectivos tanto frente a tumores intestinales como extraintestinales.

Del mismo modo, la estimulación de mecanismos inmunitarios puede cooperar al control de tumores extraintestinales. De Roos y Katan [2000], en su revisión de la

bibliografía sobre distintos efectos de los probióticos, incluyendo el antitumoral, publicada entre 1988 y 1998, resaltan sendos estudios pioneros, de Aso y colaboradores, comunicando que la ingestión de *L. casei* puede incrementar significativamente el periodo libre de recidivas en enfermos a los que se ha extirpado previamente un carcinoma de la vejiga urinaria. Recientemente, El-Nezami *et al.* [2006] han publicado resultados obtenidos en humanos, demostrando que la ingestión de una mezcla de *L. rhamnosus* LC705 y *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* reduce significativamente la excreción urinaria de aflatoxina, lo que se correlaciona con una disminución de la absorción intestinal de este agente carcinógeno y debiera resultar en una disminución del riesgo de desarrollar carcinoma hepático.

1.6.2. Protección frente a diarreas e infecciones gastrointestinales

La diarrea, definida por el Diccionario Terminológico de Ciencias Médicas (Ediciones Científicas y Técnicas, S.A., Masson/Salvat) como un aumento en el número de deposiciones, con evacuación de heces de consistencia disminuía, es uno de los síntomas más frecuentes de las patologías digestivas, incluyendo las de origen infeccioso [Mims *et al.*, 1993]. La diarrea es el resultado del paso incrementado de fluido y electrolitos desde la mucosa hacia la luz intestinal [Mims *et al.*, 1993]. Los procesos diarreicos asociados a la acción de microorganismos pueden ocurrir por distintos mecanismos (**Figura 1.12**).

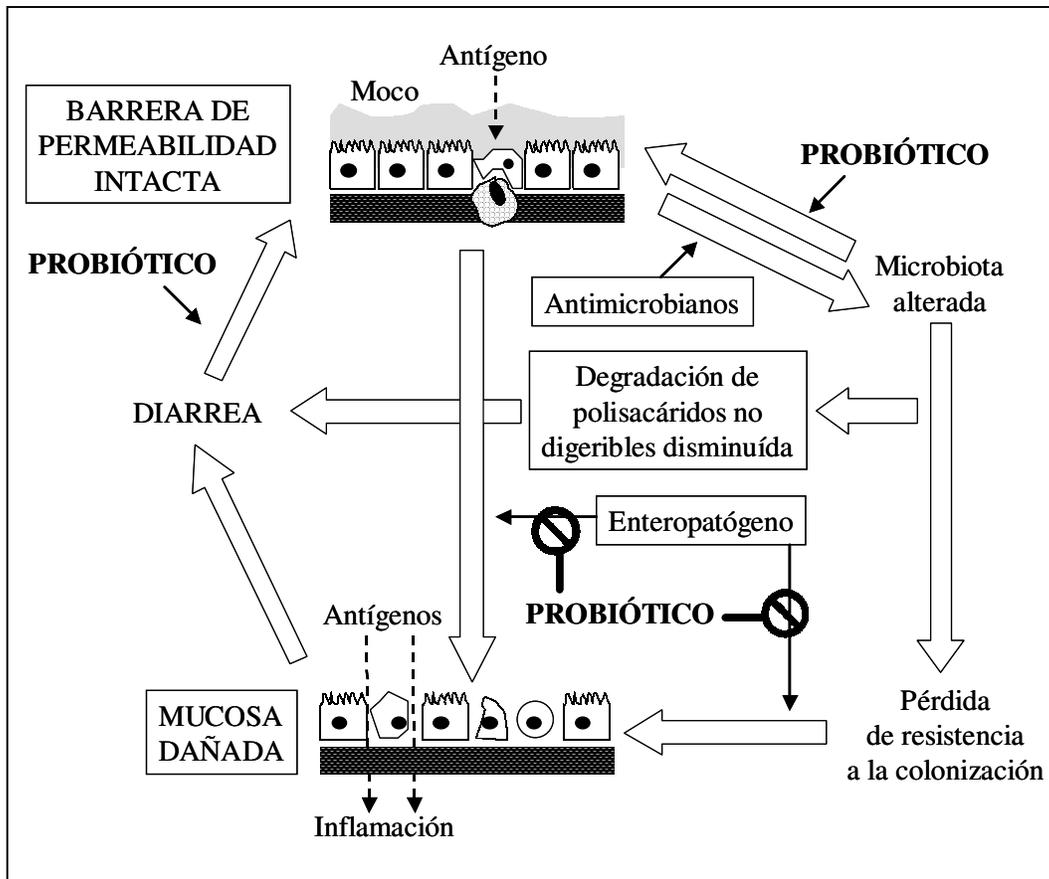


FIGURA 1.12. Patogénesis de procesos diarreicos asociados a la acción microbiana y efectos beneficiosos de los probióticos. Factores como el tratamiento con agentes antimicrobianos de amplio espectro determinan alteraciones en la microbiota intestinal, disminuyendo la resistencia a la colonización por enteropatógenos. La acción de exotoxinas o la invasión por bacterias afecta o destruye a los enterocitos, destruyendo la barrera de permeabilidad. Una consecuencia es la pérdida de fluido y electrolitos, lo que disminuye la consistencia de las heces. Otra es que, mientras en la mucosa intacta la traslocación de antígenos se hace preferentemente a través de las células M, aunque los enterocitos pueden presentar antígenos de forma restringida, en la mucosa alterada la traslocación de antígenos y toxinas se incrementa de forma indiscriminada, lo que puede causar respuestas inflamatorias patológicas en la lámina propia y la submucosa. La acumulación de macromoléculas no digeridas en la luz intestinal, como consecuencia de la eliminación de los microorganismos autóctonos que podrían usarlas como sustrato en sus fermentaciones, también contribuye a la pérdida de agua y fluidificación de las heces. Los microorganismos probióticos pueden mejorar este cuadro patológico, actuando a distintos niveles: recuperación del equilibrio de la microbiota y de la resistencia a la colonización por enteropatógenos, inhibición de los enteropatógenos, y recuperación de la función intestinal. Adicionalmente (no mostrado), la inmunopotenciación por los probióticos puede facilitar la eliminación de enteropatógenos y neutralización de sus toxinas. Este esquema está inspirado en las Figs. 1 y 2 de Salminen *et al.* [1996] y 1 de Bergogne-Bérézín [2000].

Un factor importante es la alteración de la microbiota, como consecuencia colateral en muchos casos de algunos tratamientos antimicrobianos. La eliminación de

poblaciones autóctonas de bacterias comensales puede tener como resultado la acumulación en la luz intestinal de polisacáridos no digeribles, que normalmente serían degradados por aquellas; en consecuencia hay un incremento en la secreción osmótica de agua; paralelamente la alteración de la microbiota puede acarrear una disminución en la producción de ácidos grasos de cadena corta, lo que afecta a los colonocitos disminuyendo su capacidad de absorción de agua y electrolitos; ambos procesos conducen a una diarrea de etiología no infecciosa pero asociada a la alteración de acciones microbianas [Bergogne-Bérézin, 2000].

Además, la eliminación de poblaciones microbianas autóctonas debilita la resistencia a la colonización, lo que facilita la instauración de enteropatógenos o el sobrecrecimiento de patógenos oportunistas, de lo que es ejemplo típico la colitis pseudomembranosa causada por *C. difficile* y, con menor frecuencia por *Klebsiella oxytoca*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus* y *C. albicans* [Bergogne-Bérézin, 2000].

Por otro lado, algunas bacterias enteropatógenas pueden poseer un nivel de virulencia que les permite iniciar el proceso de infección sin necesidad de alteraciones previas en la microbiota, y sin que la resistencia a la colonización les suponga un obstáculo importante. La resistencia a la colonización debida a una microbiota intacta se pone de manifiesto en modelos de infección experimentales, en los que se precisa un tratamiento previo con antibiótico, como es el caso de la infección de ratones con cepas humanas de *E. coli*, que requiere pretratamiento con estreptomicina y el uso de inóculos bacterianos altos [Myhal *et al.*, 1982]. En cambio, en una epidemia de cólera, la elevada morbilidad nos indica que *V. cholerae* puede infectar al ser humano en presencia de una

microbiota normal; en este caso, la necesidad de un inóculo elevado (alrededor de 10^8 bacterias) se debe a la sensibilidad de la bacteria al pH gástrico, cuya neutralización previa permite disminuir el inóculo a 10^4 [Mims *et al.*, 1993]. Hay bacterias, como *Shigella sonnei*, tan bien capacitadas como enteropatógenos, que su dosis infectiva en humanos sanos se sitúa entre 10 y 100 bacterias [Prescott *et al.*, 2005].

El esquema presentado en la **Figura 1.12** sugiere varias dianas para una posible acción protectora de microorganismos probióticos, que pueden restaurar el equilibrio de la microbiota alterada, impedir la colonización por enteropatógenos y restaurar la barrera de permeabilidad y el normal funcionamiento intestinal [Salminen *et al.*, 1996]. Hay una abundante bibliografía que corrobora la utilidad de cepas probióticas de diversas especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Streptococcus* y *Saccharomyces* en la prevención y el tratamiento de la diarrea asociada a antibióticos (ampicilina, clindamicina, eritromicina y otros), diarrea infantil por rotavirus y diarrea del viajero [Tuohy *et al.*, 2003]. De hecho, el acortamiento del periodo de diarrea acuosa en niños infectados con rotavirus se considera uno de los efectos paradigmáticos y mejor sustentados de la bioterapia con probióticos [Walker y Buckley, 2006.]. Sin embargo, diversos intentos de meta-análisis de los estudios publicados revelan que son muy pocos los ensayos clínicos rigurosos a tener en consideración [Cremonini *et al.*, 2002; Dendukuri *et al.*, 2005], si bien sugieren la eficacia de al menos algunos probióticos solos o en asociación [Cremonini *et al.*, 2002; D'Souza *et al.*, 2002]. Algunas aplicaciones concretas, como la administración de *L. plantarum* 299v a enfermos candidatos a cirugía abdominal, con el objeto de disminuir el riesgo de traslocación bacteriana a través de la mucosa intestinal, han quedado desaconsejadas tras mostrar su ineficacia [McNaught *et al.*, 2002].

Como ya es habitual en el trabajo con probióticos, se han propuesto distintos mecanismos para explicar la protección frente a enteropatógenos: (a) inducción de una producción incrementada de mucina, que dificulta la adhesión de bacterias y virus patógenos; (b) producción de metabolitos microbicidas, como ácidos que disminuyen el pH intestinal o peróxido de hidrógeno; (c) producción de bacteriocinas y de otras sustancias antimicrobianas; (d) competición por nutrientes con bacterias patógenas; (e) bloqueo de los sitios de adhesión de los enteropatógenos; y (f) estimulación de los mecanismos de la inmunidad, tanto innata como específica [Lorca *et al.*, 2001; Gibson *et al.*, 2005; Parvez *et al.*, 2006]. Adicionalmente, los probióticos pueden poner en juego otros mecanismos anti-diarreicos, como la producción de enzimas que hidrolizan los polisacáridos no digeribles acumulados en la luz intestinal, o la restauración de las funciones intestinales mediada por la producción de sustratos y biorreguladores de los enterocitos, como el butirato.

La selección de cepas probióticas con capacidad protectora frente a infecciones, la investigación sobre mecanismos de acción y, en general, el establecimiento de bases racionales para su posterior aplicación en humanos, se realiza a partir de modelos en animales de experimentación, que sugieren determinados mecanismos de acción. La asociación de *B. breve* (cepa Yakult) y oligosacáridos prebióticos previene la supresión que el tratamiento con estreptomycin causa en la resistencia a la colonización por *S. enterica* serovar *Typhimurium* en el ratón, proponiéndose que el mecanismo crucial es la producción de ácidos orgánicos que descienden el pH intestinal [Asahara *et al.*, 2001]. La cepa *L. casei* GG, utilizada en el tratamiento de diarreas infantiles y de la infección por *C. difficile* (asociada a antibióticos), induce la expresión del gen *muc-2* en células Caco-2, estimulando la producción de mucina que, *in vivo*, debe inhibir la

traslocación bacteriana a través de la mucosa [Mattar *et al.*, 2002]. La estimulación de las respuestas específicas de anticuerpos y de inmunidad celular parece ser la base de la protección suministrada por *L. rhamnosus* HN001 frente a la infección experimental del ratón con *S. enterica* serovar *Typhimurium* [Gill *et al.*, 2001] y con *E. coli* O157:H7 (cepa enterohemorrágica, productora de Vero-toxina) [Shu y Gill, 2002]. La infección experimental de ratones con *S. enterica* serovar *Typhimurium* ha suministrado resultados interesantes, como la capacidad de *B. longum* para reducir la mortalidad de los animales infectados, no por inhibición del enteropatógeno, sino por reducción de la respuesta inflamatoria, con depresión de la producción de interferón gamma (IFN- γ) [Silva *et al.*, 2004].

Es interesante mencionar que los efectos protectores de los probióticos no se limitan a las infecciones intestinales; basados en estudios que muestran la capacidad de algunos lactobacilos o sus metabolitos para inhibir *in vitro* a *H. pylori*, se han acumulado evidencias que sugieren la capacidad de microorganismos probióticos para prevenir y para coadyuvar en el tratamiento de la infección gástrica por este patógeno, que ha sido asociado a diversas patologías gástricas, como gastritis, úlcera péptica y carcinoma. [Hamilton-Miller, 2003]. Los mecanismos implicados podrían ser similares a algunos de los propuestos para la protección frente a infecciones entéricas [Hamilton-Miller, 2003].

1.6.3. Modificación de la respuesta biológica

El sistema inmune integra una diversidad de células, con receptores específicos (con distribución clonal) en el caso de los linfocitos, y no específicos (con distribución

no clonal) en otras células, comunicadas entre sí por señales intercelulares (contacto célula/célula y citokinas); con capacidad para responder a los estímulos recibidos a través de sus receptores, conectados a vías de señalización que convergen en la activación de factores de transcripción responsables de la expresión de genes implicados en mecanismos efectores, que incluyen, en su caso, la proliferación de linfocitos y su diferenciación en células efectoras y memoria. La complejidad de los conocimientos actuales sobre el sistema inmune y su funcionamiento queda patente en los textos de inmunología más recientes [Sell, 2001; Goldsby *et al.*, 2004]. El sistema inmune funciona reconociendo y destruyendo o eliminando estructuras extrañas al organismo, incluyendo las de microorganismos patógenos. Las estructuras reconocidas específicamente son los epítomos, presentes en antígenos; las estructuras microbianas reconocidas por receptores no clonales son los PAMPs, ya mencionados en el apartado 1.4.3 [Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera, 2005].

Una diversidad de agentes exógenos pueden influir sobre la funcionalidad inmunitaria, ya sea potenciando o deprimiendo los mecanismos de respuesta: a estos agentes se les denomina “modificadores de la respuesta biológica” o BRMs (*biological response modifiers*) [Ruiz-Bravo y Jiménez-Valera, 2005]. Numerosos PAMPs, a través de su interacción con células productoras de citokinas inmunorreguladoras, ejercen actividad como BRMs (**Figura 1.13**): son ejemplos el LPS, fracciones de mureína (muramil-dipéptido), el dimicolato de trehalosa, la bestatina y algunos exopolisacáridos [Ruiz-Bravo et al., 1998].

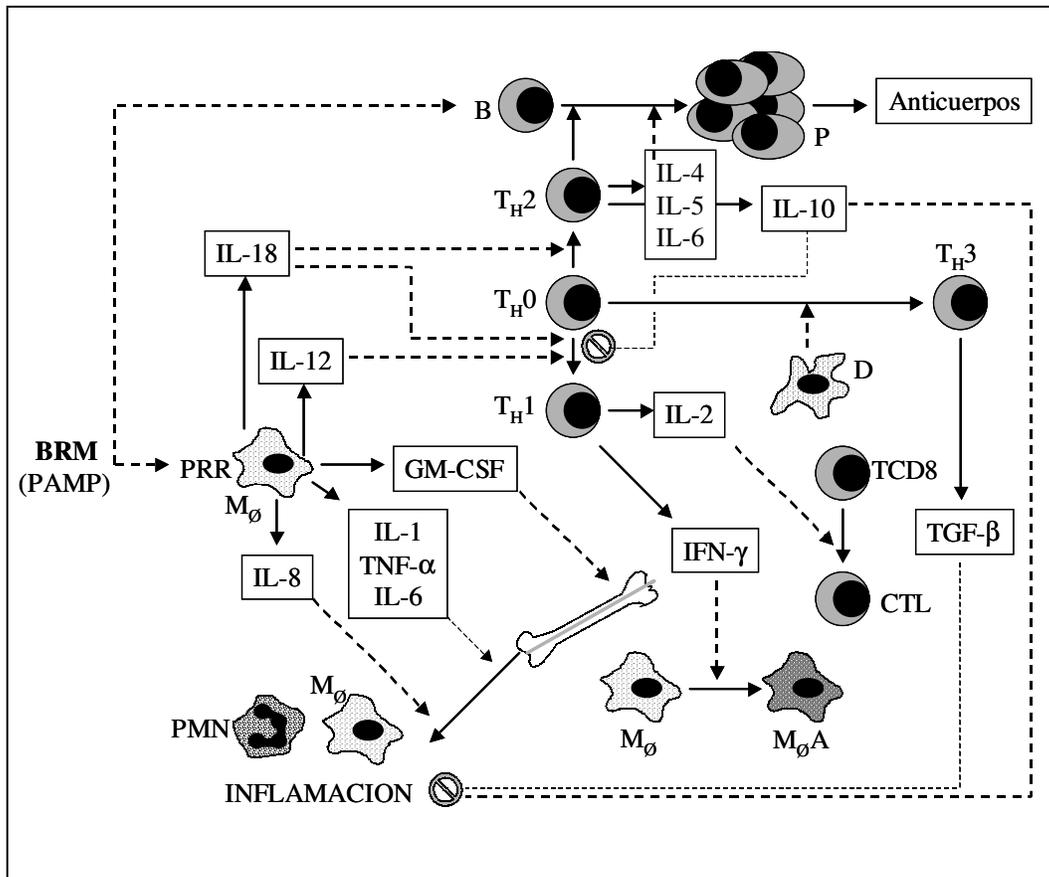


FIGURA 1.13. Mecanismos de acción de BRMs de origen microbiano. A través de la interacción entre PAMPs y PRRs, ubicados en la superficie de células no específicas, como macrófagos o células dendríticas, los BRMs modulan la producción de citocinas inmunorreguladoras. En consecuencia, se ven modificadas la respuesta inflamatoria, la fagocitosis, la producción de anticuerpos y la inmunidad celular. Un mismo BRM puede potenciar determinadas respuestas y suprimir otras. M_{ϕ} , macrófago; $M_{\phi}A$, macrófago activado; PMN, polimorfonuclear neutrófilo; B, linfocito B; P, plasmocito; T_H , T *helper*; TCD8, linfocito T CD8⁺; CTL, linfocito T citotóxico; D, célula dendrítica tolerógena. Se señalan acciones de los BRMs sobre macrófagos y sobre linfocitos B y sus repercusiones a través de la red de citocinas, pero no se excluyen otras posibles acciones directas (no mostradas) sobre otras células, como linfocitos T y células tolerógenas.

Un gran número de publicaciones documentan los efectos inmunomoduladores de microorganismos probióticos, que de hecho se consideran responsables, al menos parcialmente, de otros efectos como la resistencia a infecciones, especialmente en el caso de protección frente a infecciones extraintestinales [Alvarez *et al.*, 2001; Villena *et al.*, 2006]. En términos generales, los trabajos de revisión coinciden en que la

inmunomodulación por probióticos se manifiesta en la potenciación de la inmunidad mucosal, medida por la producción de IgA; depresión de la producción local de citocinas proinflamatorias y, por tanto, efectos anti-inflamatorios; disminución de las respuestas de hipersensibilidad; y potenciación de la actividad fagocítica [Yasui *et al.*, 1999; Erickson y Hubbard, 2000; Maassen *et al.*, 2000; Perdigon y Pesce de Ruiz Holgado, 2000; Isolauri *et al.*, 2001]. En algunos casos, se demostró que la actividad BRM puede conseguirse con preparaciones de lactobacilos muertos [Erickson y Hubbard, 2000]. A continuación, se examinan algunas aportaciones experimentales recientes sobre inmunomodulación por probióticos.

En lo que se refiere a la inmunidad intestinal, hay reiteradas evidencias de que la producción de anticuerpos secretores, de la clase IgA, se ve potenciada por la ingestión de probióticos como *L. plantarum* 299v en ratas gnotobióticas [Herias *et al.*, 1999], *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1023 y *B. longum* 6001 en ratones [Nagafuchi *et al.*, 1999], la mezcla de *L. acidophilus*, *B. bifidum* y *B. infantis* también en ratones [Tejada-Simon *et al.*, 1999], *S. boulardii* en ratones gnotobióticos [Rodrigues *et al.*, 2000], *L. rhamnosus* HN001 en ratones [Gill y Rutherford, 2001], *E. faecium* SF68 en perros [Benyacoub *et al.*, 2003] y la combinación simbiótica del prebiótico inulina y los probióticos *L. rhamnosus* y *B. lactis* en íleon de rata [Roller *et al.*, 2004]. Esta inmunoestimulación local se ha asociado al incremento en la resistencia frente a microorganismos potencialmente enteropatógenos [Herias *et al.*, 1999]. Otros parámetros de inmunidad mucosal han recibido menos atención, por su mayor dificultad técnica, pero Valeur *et al.* [2004] han descrito un incremento significativo en los linfocitos T CD4⁺ en la lámina propia ileal de voluntarios humanos tras la ingestión diaria de 4×10^8 células viables de *L. reuteri* ATCC 55730 durante 28 días.

La fagocitosis es uno de los parámetros de inmunidad sistémica, no específica, que parece ser más fácilmente estimulado por los probióticos, como demuestran una serie de estudios *ex vivo* sobre la actividad fagocítica en leucocitos de sangre periférica de voluntarios humanos a los que se administró *L. acidophilus* La1 [Schiffirin *et al.*, 1995], *B. bifidum* Bb12 [Schiffirin *et al.*, 1997], *B. lactis* [Chiang *et al.*, 2000] y *L. rhamnosus* HN001 [Sheih *et al.*, 2001]. Especial interés tiene la demostración de que la fagocitosis por leucocitos circulantes en individuos ancianos (promedio de 69 años) puede ser estimulada por un probiótico como *B. lactis* HN019 [Gill *et al.*, 2001]. Otro parámetro incrementado son los mecanismos microbicidas oxidativos en monocitos, tras ingestión de *L. casei* DN114001 [Parra *et al.*, 2004]. En estos efectos, como en otros, la dosis de probiótico tiene una importancia crucial: en ensayos realizados con ratones, Gill y Rutherford [2001] encontraron un incremento dependiente de la dosis (10^7 , 10^9 y 10^9) de *L. rhamnosus* HN001 en la fagocitosis por leucocitos de sangre periférica y una dosis mínima (10^9) necesaria para potenciar la fagocitosis por leucocitos peritoneales; en la misma línea, Donnet-Hughes *et al.* [1999] demostraron que la fagocitosis por leucocitos de sangre periférica en humanos se vió potenciada por la ingestión diaria de 10^7 células viables de *L. johnsonii* La1 durante tres semanas, pero no con dosis de 10^6 de la misma bacteria, durante el mismo periodo.

Otro parámetro de inmunidad sistémica no específica que puede ser estimulado por probióticos es la citotoxicidad natural, mediada por células NK (*natural killer*), lo que se ha observado en algunos de los estudios anteriores en seres humanos [Chiang *et al.*, 2000; Sheih *et al.*, 2001; Gill *et al.*, 2001; Parra *et al.*, 2004].

En cuanto a la inmunidad sistémica específica, la capacidad de proliferación y de producción de citocinas de los linfocitos esplénicos, en respuesta a mitógenos de células B y de células T, es un parámetro comúnmente medido en ensayos *ex vivo*. Sendos estudios de Kirjavainen *et al.* [1999^{a,b}] han mostrado que la administración a ratones de *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* JS, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705, *L. acidophilus* LA y *L. gasseri* LG, modifica en distintos sentidos la proliferación basal (en ausencia de estímulo) y en respuesta a LPS (mitógeno B) y concanavalina A (Con A, mitógeno T). Gill *et al.* [2000^b], estudiando los efectos sistémicos de la administración separada de *L. rhamnosus* HN001, *L. acidophilus* HN017 o *B. lactis* HN019 a ratones, han encontrado, junto al estímulo de la fagocitosis por leucocitos circulantes o por macrófagos peritoneales, incrementos en la proliferación de esplenocitos en respuesta a LPS o Con A y en la producción de IFN- γ (pero no de IL-4) en respuesta a Con A; al discutir estos resultados, los autores interpretan que hay un estímulo de las células T_{H1}, productoras de IFN- γ y mediadoras de la inmunidad celular (eficaz frente a patógenos intracelulares), en detrimento de las células T_{H2}, que producen IL-4, citokina implicada en la producción de IgE por células B, por lo que los probióticos estudiados deberían tener acción anti-alérgica. A conclusiones similares llegaron Matsuzaki y Chin [2000], al observar que *L. casei* Shirota estimula la respuesta T_{H1} en el ratón. Un trabajo posterior aportó evidencias de que la cepa HN001 de *L. rhamnosus* es capaz de estimular simultáneamente ambas subpoblaciones T_H, potenciando tanto la respuesta de anticuerpos como la inmunidad celular [Cross *et al.*, 2002]. Un estudio interesante, realizado por Vinderola *et al.* [2004], ha mostrado que se pueden conseguir efectos inmunomoduladores, tanto intestinales como sistémicos, en ratones mediante administración oral de bifidobacterias y lactobacilos, tanto endógenos como exógenos, pero para los endógenos se requieren dosis menores (10^4 bacterias por día) que para los

exógenos (10^7 bacterias por día). Otros parámetros también han sido investigados. Es el caso de los niveles séricos de citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-12, incrementados en ratones gnotobióticos reconstituídos con *S. boulardii* [Rodrigues *et al.*, 2000]; de la memoria inmunológica de una respuesta específica de inmunidad celular (hipersensibilidad retardada), potenciada por la administración oral de *L. casei* Shirota YIT9029 [De Waard *et al.*, 2003]; y de la respuesta de anticuerpos frente a una proteína administrada a ratones por vía oral junto con una mezcla simbiótica de dextrano y *L. casei* Lcc [Ogawa *et al.*, 2005], lo que contradice los resultados de Matsuzaki y Chin [2000], mostrando supresión de la respuesta de anticuerpos en ratones a los que se administró *L. casei* Shirota antes de inmunizarlos por vía oral con ovoalbúmina.

Las posibilidades de aplicación clínica de la inmunomodulación por probióticos, especialmente de sus propiedades anti-inflamatorias, han sido exploradas en modelos experimentales, como se recoge en los correspondientes trabajos de revisión [Dunne *et al.*, 1999; Marteau *et al.*, 2002; Parvez *et al.*, 2006]. Kano *et al.* [2002] describieron la prevención de la artritis inducida por colágeno en ratones, mediante la ingestión de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1. Utilizando un modelo de artritis inducida en ratas, Baharav *et al.* [2004] han demostrado significativos efectos positivos, tanto en la prevención como en el tratamiento, conseguidos con la administración intragástrica de *L. rhamnosus* GG, tanto vivo como muerto por calor.

Otra línea de posible aplicación de los probióticos es la patología inflamatoria intestinal. Aunque la etiología de la enfermedad de Crohn no está dilucidada, se ha propuesto que falla la tolerancia frente antígenos de componentes de la microbiota intestinal, lo que causa una respuesta inmune continuada y da lugar a una reacción

inflamatoria crónica; de hecho, el tratamiento con la mezcla ciprofloxacino/metronidazol, apropiada para descontaminar el intestino, reduce la patología inflamatoria en un modelo experimental de ileítis en ratón y, paralelamente, disminuye el número de linfocitos activados presentes en ganglios mesentéricos y en lámina propia [Bamias *et al.*, 2002]. Admitiendo el papel de componentes de la microbiota intestinal en la inducción de una respuesta inmune agresiva, como mecanismos patogénico de la enfermedad de Crohn, la colitis ulcerativa y la pouchitis, se ha sugerido que las bacterias probióticas podrían ser beneficiosas y restaurar el equilibrio inmunitario [Sartor, 2004]. Se han realizado ensayos clínicos prometedores, como el publicado por Kruis *et al.* [2004], mostrando que la administración de la cepa probiótica *E. coli* Nissle 1917, componente de Mutaflor, puede ser tan efectiva como el tratamiento convencional con mesalazina en la duración de la ausencia sintomatológica en enfermos con colitis ulcerativa en remisión. Investigaciones recientes tratan de dilucidar los posibles mecanismos de acción y de sentar unas bases racionales para la aplicación de algunos probióticos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales. Pathmakanthan *et al.* [2004], trabajando con modelos *in vitro*, han comunicado que cepas comensales y enteropatógenas de *E. coli* incrementan la producción de citocinas proinflamatorias por leucocitos mononucleares de mucosa colónica, ya sea de intestino normal o con colitis ulcerativa, mientras que *L. plantarum* 299 no tuvo este efecto proinflamatorio, sino que, al contrario, indujo producción de la citokina anti-inflamatoria IL-10 por células T y macrófagos de la mucosa de colon con colitis ulcerativa. Una compleja mezcla de probióticos, denominada VSL-3 y que contiene *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. salivarius* subsp. *thermophilus*, mejoró la colitis experimental en ratones, efecto que se asoció a la inducción de IL-10 y de células T

reguladoras, productoras de TGF- β [Di Giacinto *et al.*, 2005]. Se ha demostrado que la interacción de algunas especies de lactobacilos, como *L. reuteri* y *L. casei*, con células dendríticas, es capaz de inducir *in vitro* la generación de células T reguladoras productoras de IL-10; curiosamente, *L. plantarum* no es efectivo en esta interacción [Smits *et al.*, 2005], lo que no concuerda con los resultados mencionados de Pathmakanthan *et al.* [2004]. Además de la inducción de citocinas supresoras y anti-inflamatorias, otros mecanismos pueden participar en los efectos beneficiosos de los probióticos frente a patologías intestinales, como la enfermedad de Crohn: Carol *et al.* [2006] han descubierto que *L. casei* DN114001 disminuye el número de células T activadas en la lámina propia de la mucosa intestinal de enfermos con esta dolencia, al parecer a través de la reducción de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, lo que facilita la eliminación por apoptosis de las linfocitos anormalmente activados.

La aplicación de probióticos en el tratamiento y prevención de reacciones de hipersensibilidad frente a alérgenos alimentarios es un tema controvertido. Aunque se han propuesto diversos mecanismos (**Figura 1.14**) [Isolauri *et al.*, 2001], algunos de los cuales se encuadran en la interfaz metabólica (degradación de alérgenos por enzimas proteolíticas), mientras que otros son propios de la actividad BRM, se ha aducido que, hasta hace poco y excepto algún ensayo clínico prometedor [Kalliomäki *et al.*, 2003], las evidencias a favor del uso de probióticos en la prevención de alergia a los alimentos son escasas y no se asientan en medidas objetivas, como la cuantificación de IgE específica frente al alérgeno [Zuercher *et al.*, 2006].

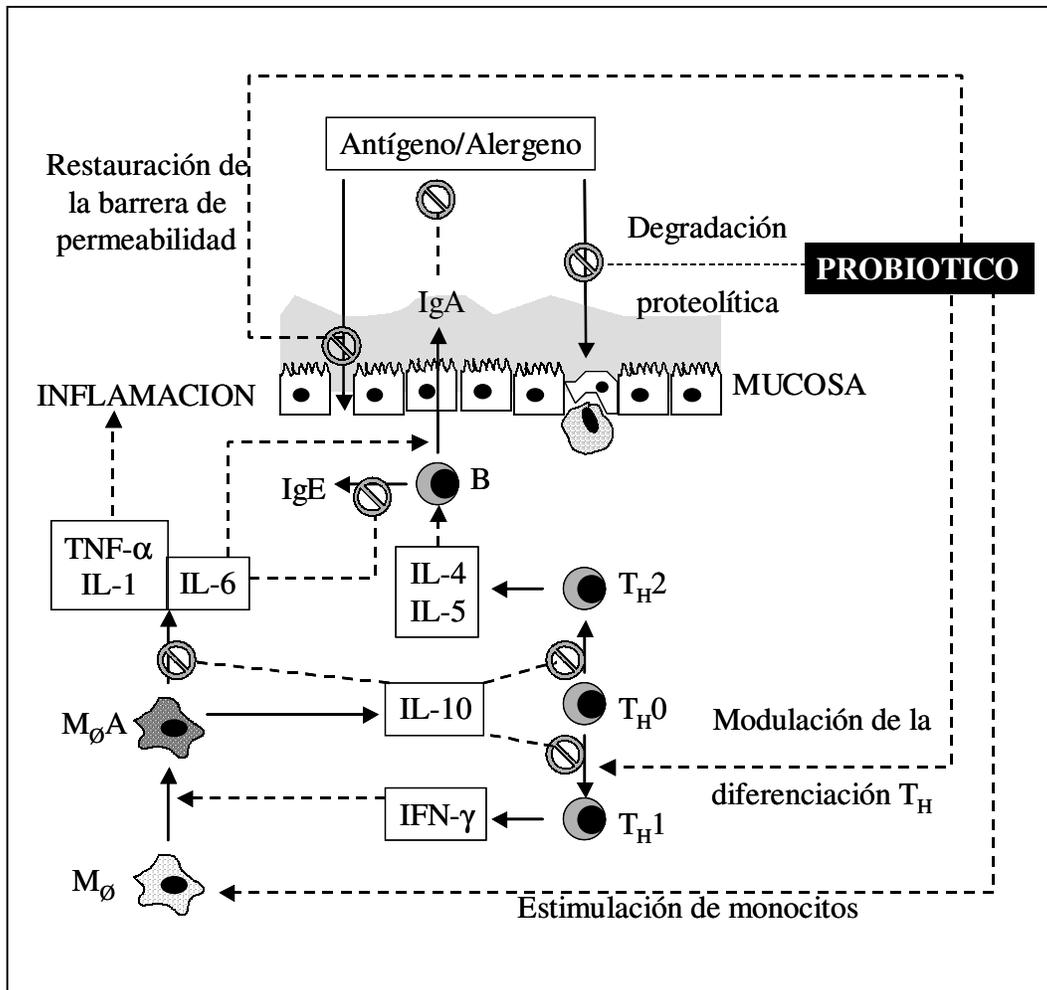


FIGURA 1.14. Posibles mecanismos de supresión de la respuesta frente a alérgenos orales por probióticos. Actuando como interfaz metabólica, los probióticos pueden degradar con sus proteasas a los alérgenos, disminuyendo o eliminando su inmunogenicidad. Al mejorar la función intestinal, disminuyen la entrada indiscriminada de alérgenos por permeabilidad. Como inmunomoduladores, hay un abanico de posibles mecanismos, algunos contradictorios: incremento de la respuesta de IgA, a expensas de la de IgE, mediada por IL-6; inhibición de las respuestas de anticuerpos, incluyendo IgE e IgA, consecuencia de la desviación de la diferenciación de células TH0 hacia TH1 (respuesta inflamatoria) a expensas de TH2; supresión de ambas respuestas, TH1 y TH2, mediada por IL-10 (producida por monocitos); e inhibición de la producción de monokinas pro-inflamatorias, a través de la producción de IL-10. Esquema basado en la Fig. 2 de Isolauri *et al.*, [2001], con diversas modificaciones y adiciones.

Sin embargo, las investigaciones más recientes parecen afirmar los efectos beneficiosos de algunos microorganismos probióticos, no solo sobre la hipersensibilidad a alérgenos alimentarios, sino también frente a otras manifestaciones alérgicas como asma, eczemas y rinoconjuntivitis [Kim *et al.*, 2005]. Uno de los postulados previos

para la justificación teórica de estos efectos parte de la llamada “hipótesis de la higiene”, según la cual, el notable incremento en la incidencia de las enfermedades atópicas en las sociedades desarrolladas se explica, al menos en parte, por una disregulación inmunitaria, debida a la disminución de los contactos con antígenos microbianos y de helmintos (sobre todo en los primeros años de vida), como consecuencia de los programas de vacunación y las estrictas medidas de higiene [Guarner *et al.*, 2006]. Numerosos autores que investigan las aplicaciones de los probióticos en la prevención de alergias, coinciden en tomar como punto de partida la hipótesis de la higiene [Kim *et al.*, 2005; Niers *et al.*, 2005; Viljanen *et al.*, 2005]. Pero, en lo que se refiere a los mecanismos propuestos, la situación actual es compleja y se plantean algunas contradicciones. Trabajando en un modelo murino de hipersensibilidad a ovoalbúmina, Kim *et al.* [2005] encontraron que el tratamiento con *B. bifidum* BGN4 y *L. casei* 911 (iniciado antes de y mantenido durante el proceso de sensibilización) disminuyó la respuesta alérgica; los niveles séricos de IgE específica fueron significativamente menores en los animales que recibieron las bacterias probióticas, pero también disminuyeron los anticuerpos específicos de clase IgG e IgA (aunque sin afectar a los niveles de IgA total excretada en heces); los autores han atribuído estos efectos a la desviación de la respuesta de células T_{H0} hacia T_{H1}, con inhibición de las T_{H2}. Esta propuesta concuerda con las interpretaciones, previamente comentadas, de autores como Gill *et al.* [2000^b] y Matsuzaki y Chin [2000], pero no con los hallazgos de incrementos en la producción de IgA mucosal en ratones tratados con probióticos, igualmente comentados en este mismo apartado [Nagafuchi *et al.*, 1999; Tejada-Simon *et al.*, 1999; Rodrigues *et al.*, 2000; Gill y Rutherford, 2001]. Niers *et al.* [2005] han recurrido a modelos *in vitro*, incubando leucocitos mononucleares de sangre periférica humana con varias bacterias probióticas: *B. bifidus*, *B. infantis* y otras cepas de

lactobacilos y bifidobacterias indujeron la producción de grandes cantidades de IL-10 por monocitos e inhibieron la respuesta de células T_H2 y concretamente la producción de IL-5, citokina implicada en la respuesta atópica. Hay aquí un aspecto discutible, ya que IL-10 es, además de una monokina, una citokina típicamente producida por células T_H2 , capaz de inhibir la generación de células T_H1 , aunque recientemente se le atribuye la capacidad de suprimir de forma general las respuestas específicas de las células T [Tzianabos y Wetzler, 2004]. Esta actividad inmunosupresora sería responsable, por ejemplo, del efecto anti-alérgico estudiado por Prioult *et al.* [2004] en ratones: las peptidasas de *L. casei* NCC2461 hidrolizan péptidos inmunoestimuladores procedentes de la digestión de la β -lactoglobulina bovina, liberando péptidos inmunoreguladores que estimulan la producción de IL-10 por células T reguladoras, con el resultado de que se induce tolerancia, en vez de sensibilización. Viljanen *et al.* [2005] han realizado un estudio en niños con eczema atópico, y han podido establecer que la administración de *L. rhamnosus* GG, solo o asociado a *B. breve* y *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*, causó elevación de marcadores de inflamación, como la proteína C reactiva, y de las citokinas IL-6 e IL-10; los autores subrayaron el posible papel de IL-6, que actúa sobre las células B, inhibiendo la síntesis de anticuerpos de clase IgE pero estimulando la de IgA, y reconocieron los aspectos conflictivos del incremento de IL-10, que debiera promover la diferenciación de T_H0 en T_H2 , pero que realmente actúa como un mediador de tolerancia para antígenos (y alérgenos) introducidos por vía oral. En un ensayo clínico recientemente publicado, Xiao *et al.* [2006] encontraron que *B. longum* BBS36 proporcionó alivio sintomático en algunos de los síntomas de la alergia al polen del cedro japonés, lo que fue atribuido al estímulo de la respuesta T_H1 a expensas de la respuesta T_H2 . Otro reciente estudio en humanos insiste en la capacidad de la asociación

simbiótica de *L. casei* y dextrano para prevenir el desencadenamiento de síntomas de alergia al polen de cedro japonés [Ogawa *et al.*, 2006].

1.6.4. Respuesta intracelular

Ya en el apartado 1.4.3 se comentaron las vías intracelulares de señalización a través de las cuales los microorganismos intestinales y sus productos pueden afectar a la expresión de genes en las células de la mucosa. Entre los primeros estudios sobre los mecanismos intracelulares de respuesta a bacterias probióticas, figura el trabajo de Miettinen *et al.* [2000], reportando la activación del factor de transcripción NF- κ B por *L. rhamnosus* GG, como consecuencia directa de la unión de los lactobacilos vivos a macrófagos de sangre periférica humana, especulándose en dicho trabajo que la unión podría ser a través de TLR-2. Publicaciones posteriores han comunicado resultados discrepantes, si bien las diferencias entre cepas bacterianas, células que responden y modelos experimentales pueden explicar algunas de tales discrepancias. En la misma línea que el trabajo anteriormente citado, Korhonen *et al.* [2001] han descrito la activación de la enzima iNOS (*inducible nitric oxide synthase*) en líneas celulares de macrófagos y de enterocitos por *L. rhamnosus* GG, activación que fue sensible a la acción de un inhibidor de NF- κ B. Wehkamp *et al.* [2004] mostraron que la inducción de la producción de β -defensina en células Caco-2 por la cepa Nissle 1917 de *E. coli* requiere la activación previa de NF- κ B y AP-1. Todos estos autores coinciden en que la activación de NF- κ B está en la base de la inmunoestimulación mediante la cual los probióticos incrementan la resistencia a infecciones. Sin embargo, Rachmilewitz *et al.* [2004] han aportado evidencias demostrando que el DNA de la mezcla de probióticos denominada VSL-3, es capaz de unirse a TLR-9 para, finalmente, activar NF- κ B *in*

vitro (lo que se interpreta como una actividad inmunoestimuladora) pero paralelamente ejerce efectos anti-inflamatorios *in vivo*, en modelos de patología inflamatoria intestinal (incluyendo la colitis espontánea en ratones *knock out* para IL-10), posiblemente por una acción anti-apoptótica en los colonocitos.

Otros autores, por el contrario, afirman que la acción anti-inflamatoria de muchos microorganismos probióticos se basa en su capacidad para inhibir la activación de NF- κ B. Es el caso de Jijon *et al.* [2004], cuyos resultados con DNA extraído de la mezcla VSL-3 contradicen los citados de Rachmilewitz *et al.* [2004]: según Jijon *et al.* [2004], este material retrasó la activación de NF- κ B e inhibió la secreción de la quimiokina IL-8 y de citocinas pro-inflamatorias por células HT-29 estimuladas. También Petrof *et al.* [2004] demostraron que productos de las bacterias componentes de la mezcla VSL-3, presentes en el medio en que han crecido (medio condicionado), son capaces de inhibir NF- κ B y de estimular la producción de proteínas de choque térmico en colonocitos murinos. Parece claro, pues, que las bacterias probióticas contenidas en VSL-3 ejercen efectos anti-inflamatorios, pero hay discrepancias respecto de si el mecanismo intracelular pasa por la activación o la inhibición de NF- κ B.

El trabajo de Ma *et al.* [2004] replantea el tema de la exigencia de viabilidad: preparaciones viables de *L. reuteri*, que mostraron actividad anti-inflamatoria en la colitis espontánea en ratones deficientes (*knock out*) en IL-10, fueron capaces de inhibir la activación de NF- κ B y la producción de IL-8 y TNF- α en células epiteliales; pero ni las bacterias muertas, ni sus lisados, ni el medio condicionado tuvieron efecto en dichas células. Una posible solución a la controversia entre este trabajo y las publicaciones anteriormente mencionadas la aportan Zhang *et al.* [2005], apuntando que el factor dosis

puede ser crucial: en sus manos, las preparaciones de *L. rhamnosus* GG, tanto viable como muerto por calor, tuvieron actividad anti-inflamatoria y redujeron la activación de NF- κ B en células Caco-2 estimuladas con TNF- α , a través de la inhibición de la translocación de NF- κ B activado del citoplasma al núcleo, pero la actividad de los lactobacilos muertos fue sensiblemente menor que la de los vivos; estos últimos, a dosis altas, fueron capaces de estimular la producción de IL-8 y, por tanto, pasaron de inhibir la inflamación a promoverla.

Cui *et al.* [2004] pasaron al estudio *in vivo*: la administración de bifidobacterias a enfermos de colitis ulcerativa tuvo como consecuencia la atenuación de la activación de NF- κ B y, curiosamente, el incremento en la expresión de IL-10.

Finalmente, cabe comentar las perspectivas de la incorporación de las nuevas técnicas de investigación sobre expresión múltiple de genes. Ukena *et al.* [2005], utilizando micromatrices (*microarrays*) de DNA para analizar la expresión de genes en células Caco-2, han encontrado que la cepa Nissle 1917 de *E. coli* indujo la activación de 126 genes (sobre 22,000 incluidos en los *arrays*), de los cuales 44 no han podido ser asignados a ninguna clase; 21 codifican moléculas implicadas en vías de señalización (4 de ellas relacionadas con la regulación de NF- κ B), 14 participan en metabolismo y obtención de energía, 13 están implicados en transcripción y traducción de mRNA, otros tantos en el plegado de proteínas y biosíntesis, 10 en transporte, cinco en la respuesta inflamatoria, cuatro en la división celular, uno en diferenciación celular y uno en apoptosis. Los autores proponen este modelo para el estudio *in vitro* de la respuesta pro-inflamatoria inducida por *E. coli* Nissle 1917.

1.6.5. Estructuras bioactivas

En el apartado 1.6.3 se mencionan algunas de las estructuras de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas que pueden poseer actividad BRM. Una diversidad de estudios sobre microorganismos probióticos han puesto de manifiesto la existencia de esta actividad en estructuras y componentes bacterianos, así como en productos de su metabolismo.

En lo que se refiere a componentes bacterianos, las primeras aproximaciones experimentales se limitaron a detectar actividades en bacterias enteras, sin caracterizar las fracciones responsables. Vale como ejemplo el trabajo de Ko *et al.* [1999], demostrando que las células enteras de *B. bifidum* poseen propiedades de activador policlonal de linfocitos B, similares a las del LPS de bacterias Gram-negativas. Un paso más lo representa la publicación de Pessi *et al.* [1999] describiendo que los homogeneizados de *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *B. lactis* y *S. salivarius* subsp. *thermophilus* mostraron una interesante actividad antiproliferativa en cultivos de leucocitos mononucleares de sangre periférica humana, estimulados con el mitógeno de células T fitohemaglutinina; los autores afirmaban que la actividad supresora se localizaba en el citoplasma bacteriano y no en la pared. Sin embargo, es conocido que en la pared bacteriana residen componentes biológicamente activos, lo que, en el caso de microorganismos probióticos, fue confirmado por Matsuguchi *et al.* [2003], demostrando que los ácidos lipoteicoicos de *L. casei* YIT9029 y de *L. fermentum* YIT0159 se unen a TLR-2 en células Raw, activando NF- κ B y estimulando la expresión de TNF- α , lo que se traduce en un efecto proinflamatorio.

La actividad inmunoestimuladora del DNA bacteriano era conocida desde mediados de los 90, y se sabía que residía en los motivos CpG (dinucleótidos con citosina y guanina consecutivas), abundantes en el DNA procariota pero escasos y metilados en el DNA eucariota, y que, a través de su interacción con TLR-9, determinan la activación de NF- κ B en distintos tipos celulares [revisado por Krieg, 2002]. En su trabajo ya citado, Rachmilewitz *et al.* [2004] confirmaron el papel inmunoestimulador del DNA de bacterias probióticas, señalando que su aspecto diferenciador, respecto del de otras bacterias, reside posiblemente en que la capacidad de colonización intestinal de los probióticos posibilita el que su DNA sea absorbido por la mucosa intestinal en cantidades significativas. Posteriormente, Takahashi *et al.* [2006] establecieron que el DNA inmunoestimulador de *B. longum* BB536 suprimió la respuesta T_H2 y, con ello, la producción de anticuerpos específicos de la clase IgE, pero sin estimular la respuesta T_H1: se trata de una supresión aparentemente independiente de las células T_H1 y también de las citokinas IL-10 y TGF- β .

Los productos del metabolismo bacteriano también pueden tener actividades biológicas. Según Peña y Versalovic [2003], el medio de cultivo condicionado por el crecimiento de *L. rhamnosus* GG contiene una inmunomodulina, parcialmente proteica, que deprime la producción de TNF- α por macrófagos estimulados con LPS. Menard *et al.* [2004] han descrito que los cultivos de bacterias probióticas como *B. breve* BbC50 contienen metabolitos antiinflamatorios capaces de atravesar la barrera de permeabilidad de la mucosa intestinal. En la misma línea, Uchida y Mogami [2005] encontraron actividad antiinflamatoria, eficaz en el tratamiento de colitis experimental inducida en ratas, en lactosueros tras el crecimiento de *P. freudenreichii* subsp. *shermanii*. Un metabolito al que se ha prestado gran atención recientemente es el ácido

linoleico conjugado (CLA, de *conjugated linoleic acid*), al que se atribuyen numerosas propiedades beneficiosas: anticancerígeno (inhibición de papiloma cutáneo, tumores mamarios, lesiones precancerosas del colon, tumores prostáticos y metástasis del carcinoma mamario humano), antiaterógeno, inmunomodulador, limitador de sobrepeso y reducción de la grasa corporal etc. [Coakley *et al.* 2003; Xu *et al.* 2005]. Bacterias probióticas como *B. breve* y *B. dentium* son capaces de producir cantidades significativas de CLA a partir de ácido linoléico libre [Coakley *et al.* 2003]. Según Xu *et al.* [2005], *P. freudenreichii* subsp. *shermanii* y *L. rhamnosus* forman CLA cuando crecen en leche fermentada suplementada con un hidrolizado de aceite de soja como fuente de ácidos grasos. Una aportación reciente ha mostrado que las bacterias probióticas que constituyen la mezcla VSL-3 también forman CLA a partir de ácido linoleico y, lo que es más interesante, las heces de ratones a los que se administró VSL-3, incubadas con ácido linoleico, produjeron 100 veces más CLA que las heces de los mismos animales antes de recibir la mezcla probiótica [Ewaschuk *et al.*, 2006].

Mención aparte merecen los péptidos bioactivos derivados de proteínas de la leche. Gill *et al.* [2000^a] han revisado la bibliografía concerniente a estos péptidos inmunorreguladores, resultantes de la hidrólisis enzimática de caseínas (un total de 15), lactalbúmina, lactoglobulina, lactoferrina; al menos uno de ellos, derivado de para-k-caseína, es producido por proteasas de *L. rhamnosus* GG. LeBlanc *et al.* [2004] han caracterizado una fracción de oligopéptidos, presentes en la leche fermentada por *L. helveticus* R389, con actividad inmunomoduladora.

1.6.6. Perspectivas

La investigación sobre probióticos ha experimentado una notable evolución en los últimos años, incorporando métodos de estudio más sofisticados para investigar mecanismos de acción inter e intracelulares, buscando una definición más precisa y rigurosa de los efectos y un establecimiento de dosis y pautas de administración [Marteau y Shanahan, 2003]. Sin embargo, no hay que olvidar que, en opinión de no pocos autores, muchos de los efectos atribuidos a los probióticos son todavía discutibles o podrían considerarse auténticos epifenómenos. Algunos estudios, bien diseñados, no han conseguido detectar alteraciones significativas en parámetros inmunitarios que se supone debieran ser modificados por la administración de bacterias probióticas: es al caso del trabajo de Tejada-Simon *et al.* [1999], que no encontraron efectos de la administración prolongada de dosis elevadas de *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *S. salivarius* subsp. *thermophilus* a ratones en los niveles basales de TNF- α , IFN- γ , IL-6 en bazo y placas de Peyer, e inmunoglobulinas totales en suero o en la mucosa intestinal. El mismo equipo investigador ha reportado efectos muy modestos del tratamiento con probióticos en la distribución de poblaciones linfocitarias en bazo y placas de Peyer murinos [Petska *et al.*, 2001]. En humanos, destaca el estudio de Campbell *et al.* [2000], mostrando que el consumo de yogur (454g diarios) durante tres meses no afectó a diversos parámetros de inmunidad celular *ex vivo* en mujeres jóvenes premenopáusicas. Tampoco Sen *et al.* [2002] han encontrado efectos beneficiosos derivados del consumo de *L. plantarum* 299v en enfermos con colon irritable. Más ejemplos de inconsistencias en un contexto de crítica razonable sobre el uso y abuso del concepto de probiótico se encuentran en la revisión de Atlas [1999]. Aunque factores como la elección de cepas, las diferencias de acción entre ellas, las dosis usadas, los

parámetros investigados y otros factores pueden explicar muchas de las discrepancias entre las distintas publicaciones, parece razonable proponer que una de las prioridades en la investigación actual sobre probióticos sigue siendo el establecer efectos bien definidos y perfectamente reproducibles, tanto en modelos experimentales como en el ser humano.

De Vos *et al.* [2004] señalan que, en la “era post-genómica”, la investigación sobre probióticos debiera plantearse estudios basados en la comparación de genomas, entre microorganismos patógenos, comensales y probióticos, estudios de genómica funcional, apoyados en avances tecnológicos como los *microarrays*, y la expresión de genes microbianos *in vivo*, para examinar las interacciones probiótico-hospedador.

Obviamente, una de las posibilidades de mejorar las propiedades beneficiosas de los microorganismos probióticos pasa por su manipulación genética (**Figura 1.15**). Esta opción debe atenerse a las correspondientes restricciones legales para alimentos, que aseguren su inocuidad, y, desde el punto de vista comercial, pueden plantear problemas de rechazo por parte de algún sector de consumidores. En una revisión sobre las posibilidades de modificación genética de bacterias probióticas, Ahmed [2003] señala que se cuenta ya con varios sistemas genéticos útiles como herramientas para la modificación de especies de *Lactobacillus*, *Lactococcus* y otras bacterias del ácido láctico, y apunta algunos posibles objetivos de estas manipulaciones: la modificación de cepas de *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* para inóculo (*starter*) en la fabricación de yogures, de forma que sean menos eficientes en la fermentación de lactosa y se consiga un producto menos ácido, más aceptable para algunos paladares; el incremento de la actividad proteolítica, y, en consecuencia, mayor eficacia en la degradación de

alergenos alimentarios; resistencia a bacteriófagos, lo que es ventajoso, tanto en los procesos de fabricación, como en el ecosistema intestinal; o la expresión de amilasas, que confiere la capacidad de degradar eficientemente el almidón. En el desarrollo biotecnológico de este tipo de opciones, hay que tener en cuenta que el control de la transcripción de genes y de la traslación de mRNA puede diferir notablemente entre distintas especies de un mismo género, como *Lactobacillus* [Pouwels *et al.*, 1998].

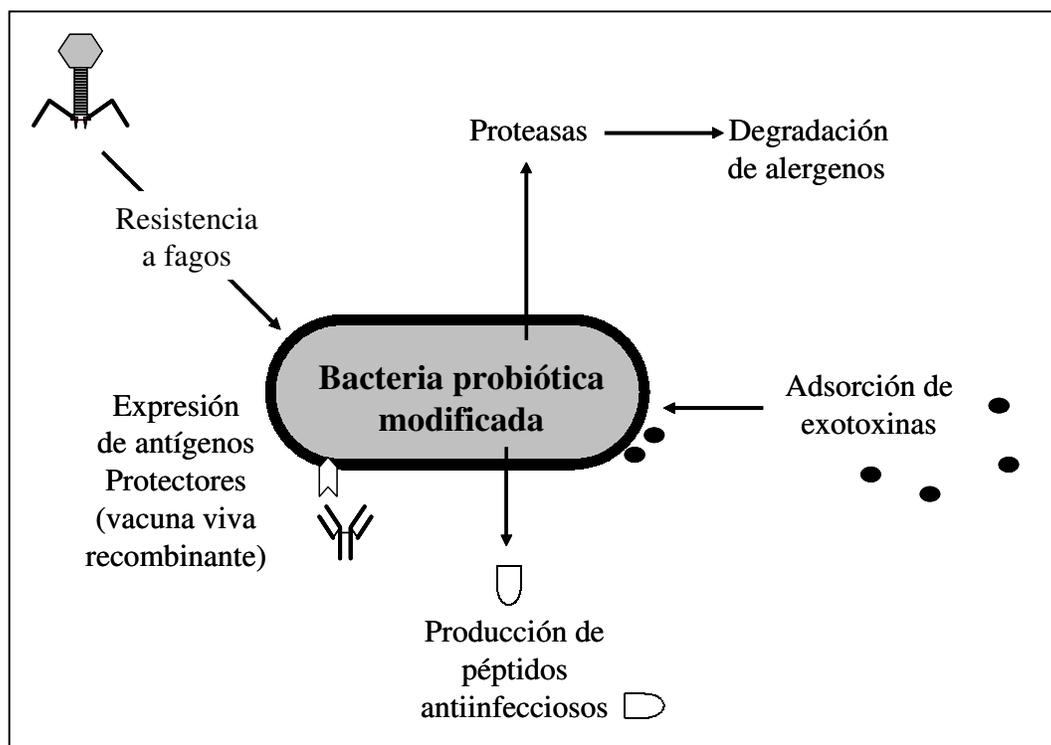


Figura 1.15. Algunas aplicaciones posibles de microorganismos probióticos modificados genéticamente.

Las posibilidades que proporciona la biotecnología aplicada a la mejora de microorganismos probióticos son realmente muy amplias, y es difícil prever cuales de ellas alcanzarán, en mayor o menor plazo, una aplicación real. A modo de ejemplo, cabe citar expresión de antígenos de virus o bacterias patógenos, en bacterias probióticas que

podrían utilizarse como vectores de vacunas recombinantes, aplicación ya mencionada por Reid *et al.* [2003], y que es objeto en la actualidad de una activa investigación [Cortés-Perez *et al.*, 2005]. Otras alternativas han sido exploradas por autores como Rao *et al.* [2005], quienes han construido una cepa modificada de *E. coli* Nissle 1917, que coloniza colon y ciego de ratón, y, en menor proporción, recto; esta cepa secreta niveles micromolares de un péptido híbrido que contiene secuencias capaces de unirse a la proteína gp41 del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), inhibiendo la fusión entre la envoltura del virión y la membrana citoplásmica de la célula diana y bloqueando, por tanto, la entrada de la nucleocápsida en la célula; esta cepa probiótica modificada tendría el valor añadido de prevenir la infección de células de la mucosa por el VIH. También con *E. coli*, Focareta *et al.* [2006] han conseguido una cepa cuyo LPS quimérico finaliza imitando el gangliósido GM(1), lo que le capacita para adsorber cantidades significativas de la exotoxina de *V. cholerae*.

La aplicación de microorganismos probióticos como vectores capaces de depositar moléculas con actividad farmacológica en determinadas zonas anatómicas es otra opción de interés. Marteau y Shanahan [2003] han apuntado la posibilidad de utilizar probióticos sensibles a la bilis, que al llegar al intestino se lisen y liberen enzimas u otros componentes bioactivos.

2. OBJETIVOS

El estudio de la bibliografía sobre probióticos realizado en la Introducción de esta Memoria revela que, pese al creciente y ya notable número de aportaciones experimentales que se realizan sobre este tema, persisten algunas controversias y cuestiones sin resolver. Por ejemplo, ¿se puede considerar que existen ya evidencias suficientes, experimentales y clínicas, que acrediten los efectos beneficiosos atribuidos (muchas veces sin una base suficientemente sólida) a estos microorganismos?. Las propiedades *in vitro* que, como la antibiosis, se consideran exigibles a los probióticos, ¿se reflejan realmente en las interacciones entre el microorganismo y el hospedador?. ¿Es necesaria la colonización persistente de la mucosa intestinal para ejercer efectos probióticos?. Los efectos de modificación de la respuesta biológica, ¿se manifiestan de forma distinta según la condición funcional previa del sistema inmune?.

La última de las cuestiones enumeradas se considera de especial interés, por dos razones: en primer lugar, el colectivo de enfermos inmunocomprometidos tiene una creciente importancia clínica, consecuencia, en buena parte, del auge de los trasplantes de órganos entre individuos alogénicos, y también de los tratamientos agresivos con

agentes quimioterápicos antitumorales con efectos colaterales mielotóxicos e inmunosupresores; en segundo lugar, existen evidencias experimentales que revelan que los efectos de los agentes inmunomoduladores pueden ser muy diferentes en organismos inmunocompetentes y en organismos cuyo sistema inmune ha sido previamente dañado.

Con estos antecedentes, se proyectó la presente Tesis Doctoral, orientada hacia el estudio de microorganismos probióticos, en cuanto agentes modificadores de la respuesta biológica, y planteando los siguientes objetivos concretos:

1°. Evaluar el potencial probiótico *in vitro* de lactobacilos aislados de alimentos funcionales, cuya publicidad comercial afirma que contienen cepas probióticas.

2°. Estudiar las correlaciones entre los ensayos de potencial probiótico *in vitro* y la actividad probiótica en modelos experimentales *in vivo* y *ex vivo*.

3°. Investigar la actividad inmunomoduladora de las cepas seleccionadas como potencialmente probióticas, sobre ratones con el sistema inmune normal y con el sistema inmune comprometido por un tratamiento inmunosupresor.

4°. Examinar la bioseguridad de las cepas seleccionadas en modelos exigentes de ratones inmunosuprimidos.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. BACTERIAS Y CONDICIONES DE CRECIMIENTO

3.1.1. Cepas de *Lactobacillus*.

Las cepas aisladas de productos comerciales y que son objeto de estudio en el presente trabajo, se describen en el capítulo 4 de esta Memoria.

Adicionalmente, se utilizaron cepas de colección, pertenecientes a distintas especies de *Lactobacillus*, para validar el procedimiento de identificación y compararlas con las cepas probióticas aisladas de productos comerciales, asegurando así una correcta identificación de éstas últimas. Las cepas procedían de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT) o de la American Type Culture Collection (ATCC), y se relacionan a continuación.

L. plantarum CECT749 (correspondiente a ATCC10241).

L. plantarum CECT221 (correspondiente a ATCC14431).

L. plantarum CECT220 (correspondiente a ATCC8014).

L. casei ATCC393.

Todas estas cepas venían como liófilos que, de acuerdo con las instrucciones de los proveedores, se reconstituyeron con Tryptic Soy Broth (TSB), siendo incubadas las suspensiones obtenidas durante 24 h a 37°C. De estas suspensiones se hizo un aislamiento en placas de Tryptic Soy Agar (TSA) para comprobar la ausencia de contaminantes. Una vez evaluada la pureza del cultivo se sembraron, a partir de una colonia aislada, placas de Lactobacilli MRS agar (agar LMRS), medio selectivo para cepas del género *Lactobacillus*. Estas placas se incubaron en las condiciones antes indicadas, comprobándose tras el periodo de incubación que todos los cultivos eran puros. De los cultivos obtenidos se sembraron tubos de agar LMRS inclinados y tras crecimiento a 37°C durante 24 h fueron conservados en frío (4°C). Todos los medios empleados fueron suministrados por Difco Laboratories (Difco Laboratories, Francisco Soria Melguizo, Madrid)

3.1.2. Bacterias enteropatógenas y enterobacterias

S. enterica serovar *Typhimurium* CECT4156: Esta cepa se empleó para ensayos de patogenia experimental en ratón. Se obtuvo como un liófilo que se procesó igual que las cepas probióticas ya descritas. Tras aislamiento en placas de TSA se obtuvo un cultivo puro en agar Hektoen (Difco), medio selectivo y diferencial para cepas del

género *Salmonella*. Este medio se preparó de acuerdo con las instrucciones del fabricante fundiéndolo a 100°C (no se debe autoclavar) y se repartió en placas Petri estériles. En este medio las cepas de *Salmonella* crecen formando colonias de color negro por la producción de sulfuro ferroso. Una vez comprobada la ausencia de contaminantes se sembró la bacteria en tubos de TSA inclinados que tras ser incubados durante 24 h a 37°C se conservaron en frío. Se realizaron resiembras periódicas del cultivo para su mantenimiento.

L. monocytogenes: Procede del aislado clínico de una herida humana y fue cedida por el Dr. De la Rosa (Servicio de Microbiología, Hospital Virgen de las Nieves Granada), siendo incorporada a la colección de nuestro Departamento. Se utilizó en ensayos de patogenia experimental en ratón.

Y. enterocolitica IP383: Esta cepa de la colección del Institut Pasteur fue aislada de heces humanas e identificada como perteneciente al serotipo O9 y al biotipo 2 [Mazigh *et al.*, 1983]. Posee el plásmido de virulencia pYV, por lo que a 37°C expresa el fenotipo de virulencia que se caracteriza por autoaglutinación en medios líquidos y dependencia de calcio para crecer [Mazigh *et al.*, 1983; Ruiz-Bravo *et al.*, 1986]. Se comprobó la pureza de la cepa realizando aislamientos en Agar Yersinia (Difco). Este medio es selectivo y diferencial para el género *Yersinia*. El medio se preparó a partir de un agar base comercial, que se esterilizó a 121°C durante 15 minutos, tras lo cual se llevó a sobrefusión en baño de agua a 50°C, para añadir estérilmente el suplemento suministrado por el fabricante junto con el medio base, y que contiene los agentes inhibidores cefsulodina y novobiocina. El medio se homogenizó y se distribuyó estérilmente en placas Petri. La bacteria crece formando colonias de color rojo por

viraje del indicador rojo neutro como consecuencia de la formación de ácidos por fermentación del manitol. A partir de los cultivos puros obtenidos en este medio, se sembraron tubos de TSA inclinados para el mantenimiento de los cultivos que se mantuvieron en frigorífico realizando resiembras periódicamente. La bacteria se utilizó en ensayos de patogenia experimental.

E. coli ATCC2592: esta cepa se empleó para la validación de un nuevo medio de cultivo selectivo y diferencial para *L. plantarum* desarrollado a lo largo del trabajo. Al igual que para el resto de las cepas de colección, se reconstituyó el liófilo con TSB y se realizaron aislamientos en placas de TSA que se incubaron a 37°C durante 24h. Se observó la ausencia de contaminantes y la cepa se mantuvo en tubos de TSA a 4°C realizándose resiembras periódicamente.

3.1.3. Bacterias de la microbiota intestinal murina

Con el objeto de utilizarlas como indicadoras en los ensayos de antibiosis (descritos en el apartado 3.5), se aislaron una cepa representativas de la población de enterobacterias y dos de la población de lactobacilos existentes en la microbiota intestinal de los ratones utilizados en este trabajo.

E. coli endógeno (cepa C17): Se recogieron heces de ratones BALB/c que no habían recibido tratamiento alguno. Las heces se homogeneizaron en Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.2) (Sigma-Aldrich Química S.A., Madrid) estéril empleando una varilla de vidrio previamente flameada. Se decantaron los residuos macroscópicos y del sobrenadante obtenido se realizó un aislamiento en placas de agar

MacConkey (Difco) medio selectivo y diferencial en el que las enterobacterias fermentadoras de lactosa crecen formando colonias de color rojo. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h. A partir de las colonias aisladas se sembraron tubos de TSA inclinados que fueron incubados en las mismas condiciones y, una vez obtenido un cultivo puro, se procedió a la identificación mediante tinción de Gram, pruebas de oxidasa y catalasa y galería bioquímica API 20 (Biomérieux, Lyon, Francia) para enterobacterias, que se realizó según las instrucciones del fabricante. Se seleccionó una cepa que se identificó como *E. coli* y a la que se denominó C17.

L. acidophilus (cepa C15) endógeno y *L. fermentum* (cepa C16) endógeno: para el aislamiento de cepas endógenas de *Lactobacillus*, se procedió de forma similar a como se actuó para el aislamiento de *E. coli* endógeno, con la diferencia de que el medio empleado fue agar LMRS. El perfil bioquímico de ambas cepas se estableció mediante el sistema API 50 CH y el correspondiente *software* o programa de interpretación, tal como se describe en el apartado siguiente.

3.2. SISTEMA DE IDENTIFICACIÓN API 50 CH

El sistema API 50 CH (Biomérieux, Lyon, Francia), constituye una forma sencilla de identificar a nivel de especie las distintas cepas del género *Lactobacillus*. El sistema está constituido por una serie de pocillos dispuestos en unas tiras de plástico. Cada uno de estos pocillos contiene como sustrato un azúcar distinto que se encuentra deshidratado en el fondo.

La casa comercial, proporciona también viales que contienen un medio líquido adecuado para estudiar la fermentación de los distintos sustratos. Este medio consta, entre otros componentes, del indicador púrpura de bromocresol, que vira de púrpura a amarillo cuando el medio se acidifica como consecuencia de la fermentación de los azúcares presentes en los pocillos.

Para establecer el perfil bioquímico de las cepas, se sembraron tubos de agar LMRS que se incubaron tal y como hemos dicho anteriormente. A partir de estos cultivos se prepararon inóculos en el medio proporcionado por la casa comercial, ajustados por turbidez a 10^8 bacterias viables por ml. Con la suspensión obtenida se inocularon los pocillos de las tiras API evitando la formación de burbujas y empleando pipetas Pasteur estériles. A continuación se cubrieron las cúpulas de los pocillos con parafina estéril y se incubaron las tiras durante 48 h a 37°C. Como consecuencia de la fermentación se forman ácidos que provocan el viraje del indicador. Este viraje permitió conocer el patrón de fermentación de cada bacteria. Para la interpretación de los resultados se empleó el *software* APILAB-PLUS proporcionado por la casa comercial y que permite la identificación de cada bacteria en base a los azúcares que fermenta.

3.3. RESISTENCIA A pH GASTRICO Y SALES BILIARES

3.3.1. Resistencia al pH ácido

Para determinar la capacidad de las cepas probióticas para resistir un pH ácido similar al del estómago se trabajó con cultivos de 24 h de *L. plantarum* y de *L. casei*

obtenidos en agar LMRS. A partir de ellos se prepararon suspensiones en PBS estéril con una concentración aproximada a 10^{10} bacterias viables por ml. De cada suspensión se tomaron alícuotas de 100 μ l que se distribuyeron en tubos eppendorf estériles que contenían 400 μ l de un vehículo distinto: solución salina, solución salina acidificada, PBS, PBS acidificado, leche desnatada y leche desnatada acidificada. En todos los casos, la acidificación se realizó añadiendo a 400 μ l del vehículo, 75 μ l de ácido clorhídrico 0.15 N, y se midieron los valores finales de pH.

El contenido de los eppendorf se homogeneizó por agitación y los tubos se incubaron a 37°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se tomaron 10 μ l de cada eppendorf y se realizaron diluciones decimales en PBS. De cada una de las diluciones, así como de la suspensión original, se sembraron 10 μ l en placas de agar LMRS con el objetivo de comprobar la supervivencia de la cepa probiótica en los distintos sustratos.

3.3.2. Crecimiento en un medio de cultivo suplementado con sales biliares

Para determinar la capacidad de crecimiento de las cepas potencialmente probióticas en presencia de sales biliares, se procedió a la preparación de placas de agar LMRS suplementadas con bilis bovina o porcina (ambas de Sigma) a distintas concentraciones. Para ello se prepararon cuatro matraces que contenían 100 ml de agar LMRS estéril y mantenido a sobrefusión y se añadió a cada uno de ellos una cantidad de 0.5 ó 0.05 g de bilis bovina o porcina. El medio así preparado se distribuyó en placas Petri estériles adecuadamente identificadas.

Se prepararon inóculos de *L. plantarum* y de *L. casei* a partir de cultivos de 24 h en PBS estéril. De cada inóculo, ajustado previamente para contener alrededor de 10^8 bacterias por ml, se realizaron diluciones decimales en PBS y de cada dilución se sembraron 10 μ l en las placas del medio suplementado con bilis así como en placas control de agar LMRS sin bilis. Las placas se incubaron a 37°C durante 24 h y transcurrido este tiempo se evaluó la supervivencia de los lactobacilos en los distintos medios, realizando recuentos comparativos de colonias.

3.3.3. Supervivencia en presencia de bilis

Para reconstituir la bilis bovina a su concentración original se pesó 1 g de bilis liofilizada y se añadieron 11.5 ml de agua destilada estéril, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se tomaron 900 μ l de la bilis reconstituída y se llevaron a un eppendorf al que se añadieron 100 μ l de una suspensión de *L. casei* o de *L. plantarum*, preparada a partir de un cultivo de 24 h en PBS estéril y ajustada por turbidez a una concentración aproximada de 10^9 bacterias viables por ml. Los controles se prepararon con PBS en lugar de bilis. Los eppendorf así preparados se incubaron a 37°C durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se tomaron 10 μ l de cada uno de ellos para realizar diluciones decimales en PBS estéril y se sembraron 10 μ l de cada dilución en placas de agar LMRS. Estas placas se incubaron durante 24 h a 37°C y transcurrido este tiempo se realizó el correspondiente recuento de colonias.

3.4. MEDIDA DE LA ADHERENCIA A CELULAS DE EPITELIO INTESTINAL

3.4.1. Obtención y cultivo de las células

Se utilizaron células Caco-2, que constituyen una línea celular continua procedente de adenocarcinoma de colon humano, y que fueron amablemente cedidas por el Dr. J. M. Navarro (Servicio de Microbiología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada). Las células se descongelaron en baño de agua a 37°C y se lavaron tres veces por centrifugación a 1000 r.p.m. con medio RPMI 1640 (Sigma), suplementado como se describe en el apartado 3.10.1 pero sin 2-mercaptoetanol; estos lavados tuvieron como objeto eliminar el agente crioprotector (dimetilsulfóxido) que es tóxico para las células. Con la suspensión celular obtenida se inició el cultivo en frascos Falcon (Costar) a 37°C y con un 5% de CO₂. Las células se observaron diariamente y se cambió el medio de cultivo cuando viraba a amarillo por la acidificación. Una vez obtenida una monocapa continua se procedió a despegar las células, mediante la acción de una solución de Tripsina-EDTA (750 mg de tripsina y 200 mg de EDTA por litro de PBS, ambos productos de Sigma) esterilizada por filtración a través de membrana de 0.22 µm de diámetro de poro y calentada en un baño a 37°C. Para un cultivo de 10 ml en frasco Falcon pequeño (25 cm²), se lavó la monocapa por dos veces con un volumen de 1 ml de la solución Tripsina-EDTA (para eliminar los residuos de suero bovino fetal, que contiene inhibidores de la Tripsina) y se incubó, en posición horizontal, con 1 ml de la misma mezcla, durante menos de 5 minutos (para evitar efectos citotóxicos) a temperatura ambiente, tras lo cual se desprendió la monocapa mediante unas vigorosas sacudidas del frasco Falcon. Se añadió un volumen apropiado de medio fresco (cuyo contenido en suero bovino fetal inhibe la acción de la Tripsina). Las células así

despegadas quedaron en suspensión y se tomó un volumen suficiente de la misma para propagar el cultivo, o, en su caso, para la realización del ensayo. Todas las manipulaciones de cultivo se realizaron en una cabina de flujo laminar para asegurar la esterilidad.

3.4.2. Ensayo de adherencia

El ensayo de adherencia se realizó según el procedimiento conocido como “técnica del shell vial”, descrito para el cultivo e identificación de virus [Forman y Valsamakis, 2003] y adaptado para nuestros fines como se indica en la **Figura 3.1**. Un “shell vial” es un vial estéril de poliestireno con tapón a presión, que llevan en el fondo un cubreobjetos de vidrio estéril que cubre toda la base del vial. Cada vial recibió 1 ml de una suspensión de células Caco-2 en medio RPMI suplementado. Los viales se incubaron a 37°C y 5% CO₂ durante 24 h para obtener una monocapa continua de células sobre el cubreobjetos existente en la base del shell vial. Las monocapas se lavaron varias veces con medio RPMI 1640 suplementado pero sin mezcla antibióticos/antimicótico (para evitar interferencias con las bacterias a añadir), y finalmente se añadió 1 ml de este medio a cada shell vial.

Se prepararon cultivos de las distintas bacterias cuya adherencia a células Caco-2 iba a ser estudiada. A partir de estos cultivos se prepararon suspensiones bacterianas en medio RPMI 1640 sin antibiótico, estandarizadas a 10⁸ bacterias viables por ml. De cada una de ellas se tomó 1 ml que se añadió a los correspondientes viales. Se realizó una nueva incubación, 3 h a 37°C, tras lo cual se repitieron los lavados de las monocapas, con PBS, para eliminar las bacterias que no se hubiesen unido a la

superficie celular. Una vez lavados los viales, se fijaron las muestras con metanol y se realizó una tinción con azul de metileno. Para poder observar la muestra teñida, se extrajo el cubreobjetos del vial y se procedió a su observación al microscopio óptico.

3.5. ENSAYOS DE ANTIBIOSIS *IN VITRO*

3.5.1. Antibiosis en placa

Para evaluar la capacidad de producción de sustancias inhibitoras del crecimiento se siguió el método descrito por Jacobsen [1999] con algunas modificaciones. Se prepararon inóculos en PBS de las cepas cuya capacidad de antibiosis se quería estudiar y se ajustaron por turbidez para obtener una concentración de aproximadamente 10^{10} bacterias viables por ml. Se sembraron 10 μ l de estos inóculos en placas de agar LMRS, que se incubaron a 37°C durante 24 h, tras lo cual se desarrolló una masa localizada de crecimiento bacteriano.

A partir de cultivos de 24 h en TSA (en el caso de bacterias no pertenecientes al género *Lactobacillus*) o bien en tubos de agar LMRS (para lactobacilos), se prepararon inóculos de las bacterias indicadoras de antibiosis en PBS. Estos inóculos se ajustaron por turbidez hasta una concentración de aproximadamente 10^{10} bacterias viables por ml. Se tomaron 100 μ l de estos inóculos y se llevaron a tubos estériles que contenían 10 ml de TSA o agar LMRS (según la cepa a estudiar), mantenidos a sobrefusión. Estos tubos se homogeneizaron por rotación y rápidamente se vertieron sobre la placa de agar LMRS donde había crecido la cepa cuya capacidad de antibiosis se quería evaluar. De

esta manera se formó en las placas una doble capa: la inferior, de agar LMRS, conteniendo el crecimiento de la bacteria productora, y la superior de agar LMRS o de TSA, conteniendo el inóculo de la bacteria indicadora de antibiosis.

Una vez gelificada la capa superior, las placas se incubaron durante 24 h a 37°C. Transcurrido este tiempo se examinó la presencia de halos de inhibición del crecimiento de la bacteria indicadora en torno al crecimiento de la bacteria productora de antibiosis. Los resultados obtenidos se expresaron como la media del tamaño de los halos de inhibición (en milímetros) \pm la desviación estándar.

3.5.2. Determinación de la actividad inhibidora del crecimiento en sobrenadantes de cultivos de *L. plantarum*

Tras comprobar mediante los ensayos realizados en placa que *L. plantarum* era la cepa que poseía mayor capacidad de antibiosis, se realizaron determinaciones con sobrenadantes obtenidos tras el cultivo de esta bacteria durante distintos tiempos a 37°C en LMRS líquido. Se prepararon matraces que contenían 50 ml de LMRS líquido, de TSB, o de TSB modificado por adición de dextrosa hasta obtener una concentración final de 20 g por litro. Estos matraces se inocularon con 50 μ l de una suspensión en PBS de *L. plantarum* ajustada a una concentración de 10^8 bacterias viables por ml. Una vez transcurrido el tiempo establecido para cada ensayo, se transfirió el contenido de cada matraz a tubos estériles de poliestireno que se centrifugaron a 4000 r.p.m. durante 15 minutos. Se retiraron los sobrenadantes, se determinó su pH y se esterilizaron por filtración a través de una membrana Millipore de 0.22 μ m de diámetro de poro. Los sobrenadantes se conservaron en frío hasta su utilización. En algunos ensayos se

utilizaron sobrenadantes cuyo pH ácido se neutralizó previamente mediante la adición de volúmenes apropiados de una disolución concentrada de hidróxido sódico. Así mismo, en otras pruebas, los sobrenadantes se calentaron a 110°C durante 30 minutos antes de su utilización.

Se prepararon baterías de diluciones dobladas de estos sobrenadante en los pocillos de una placa microtiter (Costar, Cambridge, Mass.). Se dispusieron series de 8 pocillos de modo que todos, salvo el primero de cada serie, recibieron 100 µl de TSB. El primer pocillo de cada serie recibió 100 µl de sobrenadante sin diluir. A los 100 µl de TSB del segundo pocillo se añadió el mismo volumen de sobrenadante, tras lo cual el contenido del pocillo se homogeneizó y a continuación se tomaron 100 µl que se llevaron al siguiente pocillo. Esta operación se repitió hasta el séptimo pocillo de cada serie, del cual, tras homogeneizar, se retiraron 100 µl a fin de mantener el mismo volumen en todos ellos. El último pocillo (octavo) recibió 100 µl de TSB, para utilizarlo como control positivo de crecimiento.

A partir de cultivos de 24 h se prepararon inóculos de las distintas bacterias a ensayar como indicadoras de antibiosis, en TSB, con una concentración aproximada a 10^5 bacterias viables por ml y se distribuyeron 100 µl de este inóculo en los pocillos que contenían la batería de diluciones del sobrenadante y el control positivo de crecimiento. De esta manera las diluciones finales del sobrenadante fueron: 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 y 1:128.

La placa se incubó 24 h a 37°C tras lo cual se procedió a su lectura. Para ello se observó la turbidez del pocillo octavo, correspondiente al control positivo de crecimiento, y a continuación la de los restantes pocillos. Los resultados se expresaron

como la mayor dilución del sobrenadante capaz de inhibir el crecimiento de la bacteria ensayada como indicador.

3.6. ANIMALES

Se emplearon ratones BALB/c, hembras, de 8 a 12 semanas de edad y de 18 a 22 g de peso procedentes de la Unidad de Animales de Experimentación de la Universidad de Granada. Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos, con libre acceso a pienso estándar (Dieta AO4, Panlab, Barcelona) y agua estériles.

3.7. TRATAMIENTO DE LOS ANIMALES CON BACTERIAS PROBIÓTICAS

3.7.1. Experimentos de colonización

El tratamiento consistió en la administración de una dosis de aproximadamente 10^8 lactobacilos en un volumen de 100 μ l de vehículo por ratón. Como vehículo se utilizó leche comercial descremada. El tratamiento se realizó por vía intraesofágica, empleando una cánula de alimentación de acero inoxidable (Harvard Apparatus, Edenbridge, UK) conectada a una jeringa estéril de 1 ml.

Para la estandarización del inóculo en leche descremada se partió de un cultivo de 24 h de la cepa probiótica en tubos inclinados de agar LMRS, incubados a 37°C. A

partir de este cultivo se sembraron 10 tubos con 5 ml de LMRS líquido. Para que todos los tubos tuvieran una carga bacteriana similar el cultivo se realizó en unas condiciones fácilmente estandarizables y que consistían en tocar con el asa el cultivo original y a continuación descargarla en el medio líquido. Los tubos así preparados se incubaron a 37°C durante 24 h y transcurrido este tiempo se homogeneizaron por agitación transfiriéndose cuidadosamente su contenido a tubos de poliestireno de 50 ml. Estos tubos se centrifugaron a 4000 r.p.m. durante 10 minutos y a 5°C, se retiraron los sobrenadantes estérilmente y los sedimentos de los 10 tubos se recogieron juntos en un volumen total de 10 ml de leche desnatada.

Para conocer la concentración de lactobacilos viables en el inóculo, se realizaron diluciones decimales en solución salina estéril y se sembraron 10 µl de cada dilución en placas de agar LMRS, que se incubaron 48 h a 37°C, tras lo cual se procedió al recuento de colonias. El inóculo así preparado se conservó en frío (4°C). Mediante recuentos de bacterias viables en días sucesivos se demostró que los inóculos así preparados no perdieron viabilidad de forma apreciable durante una semana de conservación en el frigorífico.

3.7.2. Ensayos de bioseguridad

Para comprobar la bioseguridad de las cepas probióticas estudiadas, tanto en ratones inmunológicamente intactos como en ratones inmunocomprometidos, se inoculó por vía intravenosa (por inyección en el plexo venoso retroorbital) un volumen de 100 µl por ratón, de una suspensión en PBS estéril conteniendo aproximadamente 10^8 lactobacilos viables por ml, preparada a partir de un cultivo de 24 h en tubos de agar

LMRS inclinados. En cada experimento se midió la concentración real de lactobacilos viables, sembrando diluciones apropiadas de la suspensión a inyectar en placas conteniendo agar LMRS.

3.8. INFECCIÓN EXPERIMENTAL

En los modelos experimentales de infección por bacterias enteropatógenas se utilizó siempre la vía intragástrica. Los animales recibieron previamente una dosis de 100 µl de bicarbonato sódico al 10% en agua (p/v), por vía intraesofágica, para neutralizar la acidez gástrica, y asegurar el éxito de la infección [Czuprynski y Faith, 2002].

De cada cepa enteropatógena se preparó un inóculo en solución salina estéril, a partir de un cultivo de 24 h en tubos de TSA inclinados. La concentración del inóculo se ajustó mediante turbidimetría, a valores establecidos en función de la patogenicidad de la bacteria empleada. Cada animal recibió 100 µl de suspensión, mediante cánula intragástrica, 15 min después de la administración de bicarbonato. La concentración real de bacterias viables se determinó como siempre, realizando diluciones decimales en solución salina estéril y sembrando gotas de 10 µl en placas de TSA (en el caso de *L. monocytogenes*), de agar Hektoen (para *S. enterica* serovar *Typhimurium*) o de agar Yersinia (en el caso de *Y. enterocolitica*).

3.9. CULTIVOS DE HOMOGENEIZADOS DE ORGANOS

Los animales infectados se sacrificaron, a tiempos determinados, por dislocamiento cervical. Se procedió a la extracción del bazo, los ganglios mesentéricos y una muestra de contenido colorrectal, en condiciones de esterilidad. Las muestras de contenido colorrectal se procesaron como las heces, tal como se describe en el apartado siguiente (3.10). Los órganos extraídos se pesaron en balanza de precisión y se dispusieron en el interior de placas Petri estériles sobre una rejilla metálica estéril. Las placas contenían 10 ml de PBS estéril, para los bazos, y 5 ml para ganglios mesentéricos. Las muestras se homogeneizaron sobre las rejillas, empleando para ello el extremo ancho de una jeringa estéril de 5 ml. De la suspensión obtenida se realizaron diluciones decimales y se sembraron 10 µl de cada dilución en placas de agar Hektoen o de TSA, según que la bacteria usada en la infección fuese *S. enterica* serovar *Typhimurium* o *L. monocytogenes*. Las placas fueron incubadas a 37° C durante 24 h y a continuación se realizó el recuento de colonias, expresando los resultados como bacterias viables por g de tejido.

3.10. COPROCULTIVOS

3.10.1. Evaluación de la colonización por *L. plantarum*

Se recogieron muestras de heces en placas Petri estériles y se procedió a procesarlas de inmediato. Las heces se pesaron en balanza de precisión y se homogeneizaron en un volumen de PBS estéril 10 veces superior al peso. Se decantaron

los residuos macroscópicos y a partir del líquido resultante se realizaron diluciones decimales en PBS estéril. De cada dilución se sembraron 10 µl en placas de un medio selectivo y diferencial diseñado en el curso de este trabajo (LPSM, descrito en el apartado 6.2.1). Las placas se incubaron 48 h a 37°C tras lo cual se procedió al recuento de colonias en las diluciones apropiadas, expresando los resultados como número de microorganismos por g de heces.

3.10.2. Evaluación de la infección experimental por *Y. enterocolitica*

El procedimiento de recogida y procesamiento de heces fue el mismo que se ha descrito en el apartado anterior. Una vez realizadas las diluciones se sembraron 10 µl de las mismas en placas de agar Yersinia, que se incubaron a 37°C durante 24 h. Las colonias de *Y. enterocolitica* se contaron y el resultado se expresó como en el apartado anterior.

3.10.3. Evaluación del tratamiento con ciprofloxacino

Para examinar el impacto de tratamientos con ciprofloxacino sobre la microbiota intestinal, se recogieron las heces y se procesaron como se ha descrito. Los cultivos para recuento de colonias se realizaron en TSA (microbiota aerobia y facultativa mesófila) y, en su caso, también en agar MacConkey (enterobacterias) y agar LMRS (lactobacilos).

3.11. PROLIFERACIÓN DE ESPLENOCITOS EN RESPUESTA A MITÓGENOS

El procedimiento seguido, que se describe a continuación, ha sido optimizado en nuestro laboratorio, donde se utiliza de forma rutinaria [Ruiz-Bravo *et al.*, 2001].

3.11.1. Medio de cultivo de células

El medio base empleado para el cultivo de células fue RPMI 1640 sin glutamina y con bicarbonato sódico (Sigma). Este medio se suplementó como se indica en la **Tabla 3.1.**

El suero fetal de ternera se usó descomplementado, para lo cual se calentó en baño de agua a 56°C durante 30 minutos.

El medio así preparado se esterilizó por filtración con presión positiva (suministrada por una bomba peristáltica) a través de membranas Millipore de 0.22 µm de diámetro de poro. La esterilidad se comprobó manteniendo el medio a temperatura ambiente durante 24 horas. Transcurrido este tiempo, se observaron el color, la transparencia y la ausencia de sedimentos, así como cualquier alteración indicativa de crecimiento de bacterias u hongos, en cuyo caso el medio debe desecharse. El medio se conservó en el frigorífico siendo utilizado en un plazo de tiempo inferior a 10 días, ya que la glutamina se hidroliza de forma espontánea por lo que sufre una pérdida gradual de concentración a lo largo del tiempo. Antes de su utilización, el medio se atemperó a temperatura ambiente.

Tabla 3.1. Suplementación del medio RPMI 1640 para cultivo de esplenocitos

Componente	Concentración por litro	Volumen para 100 ml de RPMI 1640
L-glutamina (Sigma) ^a	2 mM ^d	1 ml
Piruvato sódico (Sigma) ^b	1 mM ^d	1 ml
2-mercaptoetanol (Merck)	50 µM ^d	350 µl ^e
Penicilina ^c	100000 U.I. ^d	} 1 ml
Estreptomicina ^c	100 mg ^d	
Anfotericina B ^c	250 µg ^d	
Suero bovino fetal (Sigma)	90.9 ml	10 ml

^a Adquirida como una solución 200 mM.

^b Adquirido como una solución 100 mM.

^c Penicilina, estreptomicina y anfotericina B se adquirieron como una única solución que contiene respectivamente 10⁴ U.I., 10 mg y 25 µg por ml.

^d Concentraciones antes de añadir el suero bovino fetal.

^e Volumen a tomar de una dilución 1:1000 en PBS del producto comercial.

3.11.2. Obtención de suspensiones de esplenocitos

Los animales se sacrificaron por dislocación cervical. Tras aseptizar la superficie corporal con etanol, se dispusieron sobre soportes previamente aseptizados en el interior de una cabina de flujo laminar. Utilizando material quirúrgico estéril, se practicaron sucesivas incisiones en la piel y en el peritoneo para extraer el bazo, que se dispuso

sobre una rejilla metálica estéril depositada en el interior de una placa Petri estéril conteniendo 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640, suministrado por Sigma y suplementado tal y como se ha descrito en el apartado 3.10.1. Se procedió a homogeneizar el bazo presionando sobre la rejilla con el extremo ancho de una jeringa de 5 ml, estéril. Se dejaron decantar los restos tisulares macroscópicos y se aspiró la suspensión celular con una pipeta desechable de 10 ml conectada a un dispositivo de pipeteo automático, para transferirla a un tubo de centrifuga de poliestireno de 15 ml. Las células se sedimentaron por centrifugación (10 minutos a 1000 r.p.m. y 5°C), desechando el sobrenadante. El sedimento celular obtenido se resuspendió en 5 ml de tampón de lisis de hematíes (Sigma) estéril manteniendo la suspensión 10 minutos a temperatura ambiente, tras lo cual se añadieron 5 ml de medio para proteger a las células nucleadas de daño hipotónico. A continuación se realizaron dos lavados por centrifugación en las condiciones ya descritas, resuspendiendo cada vez las células en medio de cultivo estéril.

3.11.3. Recuento de células viables y ajuste de las suspensiones

De la suspensión de esplenocitos se tomaron 100 µl que se llevaron a un tubo eppendorf conteniendo 500 µl de azul Tripán (Sigma) diluido 1:10 en solución salina y 400 µl de medio RPMI 1640. De esta dilución a 1:10, se tomó el volumen suficiente para llenar una cámara hemocitométrica de Neubauer y proceder al recuento de células viables (identificadas por su capacidad para excluir el colorante azul). La viabilidad de estas suspensiones, fue en todos los casos superior al 95% (las suspensiones con porcentajes inferiores deben ser eliminadas).

La suspensión original se centrifugó en las condiciones ya descritas, y el sedimento celular se resuspendió en un volumen adecuado de medio de cultivo para obtener una concentración de 5×10^6 células viables por ml.

3.11.4. Cultivo de esplenocitos

Las células se cultivaron en placas microtiter de poliestireno de fondo plano (Costar). Se distribuyeron 100 μ l de suspensión por pocillo, de modo que cada pocillo recibió 5×10^5 células. Cada suspensión (procedente del bazo de un único ratón) se distribuyó en columnas de ocho pocillos. La primera columna sólo recibió células y se utilizó como blanco. El resto de las columnas recibieron células así como diferentes agentes mitogénicos a razón de 10 μ l por pocillo. Se probaron dos agentes distintos, LPS (mitógeno estándar de células B) y Concanavalina A (ConA, mitógeno estándar de células T).

El LPS de *Salmonella typhi* se obtuvo de Sigma y se utilizó a una concentración final en cultivo de 2.5 μ g/ml. Del reactivo comercial liofilizado se preparó una solución madre, disolviendo 1 mg del líofilo en 5 ml de medio RPMI 1640 sin suplementar (concentración de 200 μ g/ml). Esta solución se esterilizó mediante filtración a través de membrana de 0.22 μ m de diámetro y se distribuyeron alícuotas en criotubos conservados a -20°C . En el momento de su uso, la solución se diluyó a 1:8 para añadir 10 μ l de esta dilución por pocillo.

La ConA, también de Sigma, se utilizó a la concentración final de 1 μ g/ml. Del reactivo comercial, también liofilizado, se tomaron 5 mg para disolverlos en 5 ml de

medio RPMI 1640 sin suplementar. Esta solución madre se esterilizó por filtración a través de membrana y se distribuyó en alícuotas que se conservaron a -20°C . En el momento de realizar los cultivos, se tomaron 0.1 ml de ConA y se le añadieron 9.9 ml de medio de cultivo RPMI 1640 suplementado. Cada pocillo de la placa de cultivo, recibió 10 μl de esta solución para obtener la concentración final deseada.

Las placas así preparadas se incubaron a 37°C , 5% de tensión de CO_2 y humedad a saturación, durante 72 h, tras lo cual se procedió a la lectura de las mismas. Un esquema de los pasos seguidos hasta este punto se presenta en la **Figura 3.2**.

3.11.5. Medida de la proliferación celular

La proliferación celular se determinó por el método colorimétrico descrito por Mosmann [1983]. Concluidos los tres días de incubación, las placas se llevaron a la cabina de flujo laminar, donde se añadieron a cada pocillo 10 μl de una solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2 il)-2,5-difenil tetrazolio, compuesto designado con las siglas MTT (Sigma), al 0.5% en PBS. Se trata de un reactivo extemporáneo, que debe prepararse inmediatamente antes de su uso. La solución de MTT se esterilizó por filtración a través de membrana Millipore de 0.22 μm y se mantuvo en frío, protegida de la luz.

Las placas se reincubaron en las condiciones descritas anteriormente durante cuatro horas. Durante este tiempo, las células metabólicamente activas reducen el MTT a un derivado tetrazólico coloreado. Transcurrida esta incubación, cada pocillo recibió 200 μl de isopropanol ácido (0.42 ml de HCl al 35% por cada 100 ml de isopropanol),

con el fin de extraer de las células el colorante reducido. Se aspiró y expelió varias veces el contenido de cada pocillo, para solubilizar completamente los cristales del colorante reducido. La densidad óptica de los cultivos se determinó en un lector de microElisa (Behring EL 311), previamente programado para leer absorbancias a 570 nm y 630 nm de referencia. Para los cultivos de cada bazo, se usaron como blanco los ocho pocillos de la columna reservada para ello, que no recibieron ningún estímulo mitogénico. Los resultados se expresaron como la media aritmética de las densidades ópticas de los ocho pocillos de cada columna destinada a un determinado agente mitogénico.

3.12. PRODUCCIÓN DE CITOKINAS

3.12.1. Cultivos de esplenocitos

En los ensayos *ex vivo* de producción de citokinas por ratones BALB/c (testigos y sometidos a tratamientos), se obtuvieron los esplenocitos siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.10.2. A continuación se realizó un recuento de células viables y se ajustaron las suspensiones celulares obtenidas a 5×10^6 células viables por ml. Las suspensiones obtenidas se distribuyeron en placas de cultivo (Costar) de 24 pocillos a razón de 1 ml por pocillo. Cada suspensión (procedente del bazo de un único ratón) se repartió en filas de tres pocillos. El primer pocillo se empleó como blanco, el segundo recibió 100 μ l de LPS, y el tercero 100 μ l de Con A. Las preparaciones de LPS y de ConA fueron las mismas empleadas en los ensayos de proliferación (apartado 3.10.4.). Las placas se incubaron durante 24 h a 37°C y 5% CO₂ y transcurrido este tiempo se recogieron los sobrenadantes de los cultivos obtenidos. Estos sobrenadantes se

conservaron a -20°C y se descongelaron 24 h antes de medir la producción de citoquinas.

3.12.2. Shock séptico

Para inducir el shock séptico en ratones BALB/c, cada animal recibió una dosis de 50 μg de LPS + 20 mg de galactosamina, por vía intraperitoneal. Dos horas después de la inyección, se extrajo sangre a los animales empleando una pipeta Pasteur heparinizada que se introdujo en el seno venoso retroorbital. Las muestras obtenidas se recogieron en tubos eppendorf con heparina y se centrifugaron a 8000 r.p.m. durante 5 minutos. Los sobrenadantes se recogieron con una pipeta Pasteur y se conservaron congelados a -20°C , para descongelarlos 24 h antes de llevar a cabo la medida de citoquinas.

3.12.3. Medida de citoquinas

Los niveles de citoquinas en sobrenadantes de cultivo y en muestras de plasma se cuantificaron mediante inmunoensayo (ELISA) comercial (Endogen, Woburn, MA). Las concentraciones problema se determinaron por interpolación en la recta de calibrado obtenida a partir de las densidades ópticas correspondientes a estándares de concentraciones conocidas, suministradas por la casa comercial y de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

3.13. TRATAMIENTO INMUNOSUPRESOR

Para los ensayos con animales inmunocompetidos, se siguió un protocolo de inmunosupresión mediante tratamiento con ciclofosfamida (Genoxal) (Prasfarma S.A., Barcelona), descrito por Sanati *et al.* [1997]. Cada animal recibió dos dosis de 150 y 100 mg/kg, con un intervalo de tres días entre ambas. La administración se realizó por vía intraperitoneal, inyectando cada vez 0.2 ml de una solución de ciclofosfamida en agua para inyectables. Este tratamiento asegura una leucopenia significativa durante al menos cinco días tras la última inyección, junto con reducción del tamaño del bazo, que, a partir de unos siete días comienza a evolucionar hacia una acusada esplenomegalia.

3.14. ANALISIS ESTADISTICO

La significación estadística de las diferencias entre grupos de medidas se determinó mediante la prueba de la *t* de Student. Los valores de $P < 0.05$ se consideraron significativos.

4. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE CEPAS DE LACTOBACILOS

4.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE CEPAS DE PRODUCTOS COMERCIALES

Tal como se ha indicado en el capítulo de Objetivos del presente trabajo, el estudio de actividad biológica de probióticos en modelos de inmunocopromiso se planteó sobre cepas bacterianas comerciales. Este planteamiento incluye el aislamiento y caracterización de cepas de productos comercializados sobre la base de contener bacterias probióticas. El estudio se restringió a bacterias del género *Lactobacillus*, porque su carácter de fermentadores aerotolerantes les permite crecer en aerobiosis, lo que simplifica la tecnología requerida.

Se adquirieron distintos productos lácteos fermentados, como yogur, yogur líquido y kefir. De todos ellos se tomaron muestras y se procedió a realizar aislamientos en agar LMRS (medio selectivo *Lactobacillus*). Las placas de agar LMRS se incubaron a 37°C durante 24 h en ambiente aerobio. En la mayor parte de los casos, se observó la presencia de distintos tipos de colonias, por lo que se realizó una caracterización

preliminar de los microorganismos aislados, mediante observación al microscopio de preparaciones teñidas con el método de Gram y ensayos de actividad oxidasa y catalasa en las correspondientes colonias. Se seleccionaron aquellas colonias formadas por bacterias Gram-positivas, con resultados negativos en las pruebas de oxidasa y catalasa.

Cada una de las cepas seleccionadas se identificó con la letra ‘C’ y un número. Las cepas se conservaron como cultivos puros en tubos de agar LMRS inclinados. Se procedió a la identificación a nivel de especie, mediante las pruebas incluidas en API 50 CH interpretadas con el software APILAB-PLUS, obteniéndose los siguientes resultados:

Cepa C1: es un bacilo Gram-positivo procedente de yogur líquido. Su patrón de fermentación de azúcares se muestra en la **Tabla 4.1**, y de acuerdo con él se identificó como *L. casei* (el software APILAB-PLUS identifica este perfil como *L. paracasei*, pero, como ya se ha comentado en el apartado 1.2.2, se ha recomendado el rechazo de esta especie y la inclusión de las correspondientes cepas en *L. casei*, lo que concuerda con la denominación asignada a la cepa C1 en el etiquetado del producto y en la documentación que facilita al consumidor la empresa que lo comercializa).

Cepa C2: es un bacilo Gram-positivo procedente de kéfir comercial. Mostró el patrón de fermentación que se muestra en la **Tabla 4.2**, y que corresponde al de *L. casei* (con idénticas consideraciones que en el caso de C1, en lo que se refiere a la clasificación como *L. paracasei* por APILAB-PLUS).

Cepa C3, bacilo Gram-positivo procedente de kéfir comercial. Mostró un patrón de fermentación de azúcares, compatible con *L. plantarum*, que se muestra en la **Tabla 4.3**.

Cepa C4, bacilo Gram-positivo procedente de un kefir comercial. Presentó el patrón de fermentación de *L. plantarum*, que se muestra en la **Tabla 4.4**.

Cepa C5, coco Gram-positivo procedente de un yogur comercial sólido o firme. Según su patrón de fermentación, mostrado en la **Tabla 4.5**, se identificó como *S. salivarius* subsp. *termophilus*.

Cepa C6, coco Gram-positivo procedente de un yogur comercial fabricado con leche de cabra. Su patrón de fermentación de azúcares se muestra en la **Tabla 4.6** y corresponde a la especie *Pediococcus damnosus*.

Cepa C12, bacilo Gram-positivo procedente de un yogur líquido comercial. Presentó el patrón de fermentación que se muestra en la **Tabla 4.7** que fue compatible con *L. casei*.

Cepa C13, bacilo Gram-positivo procedente de yogur comercial. De acuerdo con su patrón de fermentación de azúcares que se muestra en la **Tabla 4.8**, identificó como *L. casei*.

Tabla 4.1. Resultados del test API 50CH para la cepa C1.

Azúcar	Número de prueba	Resultado	Azúcar	Número de prueba	Resultado
Control	0	Negativo	Arbutina	24	Positivo
Glicerol	1	Negativo	Esculina	25	Positivo
Eritritol	2	Negativo	Salicina	26	Positivo
D-arabinosa	3	Negativo	Celobiosa	27	Positivo
L-arabinosa	4	Negativo	Maltosa	28	Positivo
Ribosa	5	Positivo	Lactosa	29	Positivo
D-xilosa	6	Negativo	Melibiosa	30	Negativo
L-xilosa	7	Negativo	Sacarosa	31	Negativo
Adonitol	8	Negativo	Trehalosa	32	Positivo
B-metil-xilósido	9	Negativo	Inulina	33	Negativo
Galactosa	10	Positivo	Melezitosa	34	Negativo
D-glucosa	11	Positivo	D-rafinosa	35	Negativo
D-fructosa	12	Positivo	Almidón	36	Negativo
D-manosa	13	Positivo	Glucógeno	37	Negativo
L-sorbosa	14	Positivo	Xilitol	38	Negativo
Ramnosa	15	Negativo	B-gentabiosa	39	Positivo
Dulcitol	16	Negativo	D-turanosa	40	Negativo
Inositol	17	Negativo	D-lixosa	41	Negativo
Manitol	18	Positivo	D-tagatosa	42	Positivo
Sorbitol	19	Positivo	D-fucosa	43	Negativo
α -metil-D-manosido	20		L-fucosa	44	Negativo
α -metil-D-glucósido	21	Negativo	D-arabitol	45	Negativo
N-acetil-glucosamina	22	Positivo	L-arabitol	46	Negativo
Amigdalina	23	Positivo	Gluconato	47	Negativo
			2-ceto-gluconato	48	Negativo
			5-ceto-gluconato	49	Negativo

Identificación: *Lactobacillus casei* . Perfil: muy bueno.

Tabla 4.2. Resultados del test API 50CH para la cepa C2.

Azúcar	Número de prueba	Resultado	Azúcar	Número de prueba	Resultado
Control	0	Negativo	Arbutina	24	Positivo
Glicerol	1	Negativo	Esculina	25	Positivo
Eritritol	2	Negativo	Salicina	26	Positivo
D-arabinosa	3	Negativo	Celobiosa	27	Positivo
L-arabinosa	4	Negativo	Maltosa	28	Negativo
Ribosa	5	Negativo	Lactosa	29	Positivo
D-xilosa	6	Negativo	Melibiosa	30	Negativo
L-xilosa	7	Negativo	Sacarosa	31	Positivo
Adonitol	8	Negativo	Trehalosa	32	Positivo
B-metil xilósido	9	Negativo	Inulina	33	Positivo
Galactosa	10	Positivo	Melezitosa	34	Positivo
D-glucosa	11	Positivo	D-rafinosa	35	Negativo
D-fructosa	12	Positivo	Almidón	36	Negativo
D-manosa	13	Positivo	Glucógeno	37	Negativo
L-sorbosa	14	Positivo	Xilitol	38	Negativo
Ramnosa	15	Negativo	B-gentabiosa	39	Positivo
Dulcitol	16	Negativo	D-turanosa	40	Positivo
Inositol	17	Negativo	D-lixosa	41	Negativo
Manitol	18	Positivo	D-tagatosa	42	Positivo
Sorbitol	19	Positivo	D-fucosa	43	Negativo
α -metil-D-manosido	20	Negativo	L-fucosa	44	Negativo
α -metil-D-glucósido	21	Negativo	D-arabitol	45	Negativo
N-acetil-glucosamina	22	Positivo	L-arabitol	46	Negativo
Amigdalina	23	Negativo	Gluconato	47	Negativo
			2-ceto-gluconato	48	Negativo
			5-ceto-gluconato	49	Negativo

Identificación: *Lactobacillus casei* . Perfil: dudoso.

Tabla 4.3. Resultados del test API 50CH para la cepa C3.

Azúcar	Número de prueba	Resultado	Azúcar	Número de prueba	Resultado
Control	0	Negativo	Arbutina	24	Positivo
Glicerol	1	Negativo	Esculina	25	Positivo
Eritritol	2	Negativo	Salicina	26	Positivo
D-arabinosa	3	Negativo	Celobiosa	27	Positivo
L-arabinosa	4	Positivo	Maltosa	28	Positivo
Ribosa	5	Positivo	Lactosa	29	Positivo
D-xilosa	6	Negativo	Melibiosa	30	Positivo
L-xilosa	7	Negativo	Sacarosa	31	Positivo
Adonitol	8	Negativo	Trehalosa	32	Positivo
B-metil xilósido	9	Negativo	Inulina	33	Positivo
Galactosa	10	Positivo	Melezitosa	34	Positivo
D-glucosa	11	Positivo	D-rafinosa	35	Negativo
D-fructosa	12	Positivo	Almidón	36	Negativo
D-manosa	13	Positivo	Glucógeno	37	Negativo
L-sorbosa	14	Negativo	Xilitol	38	Negativo
Ramnosa	15	Negativo	B-gentabiosa	39	Positivo
Dulcitol	16	Negativo	D-turanosa	40	Negativo
Inositol	17	Negativo	D-lixosa	41	Negativo
Manitol	18	Positivo	D-tagatosa	42	Negativo
Sorbitol	19	Positivo	D-fucosa	43	Negativo
α -metil-D-manosido	20	Positivo	L-fucosa	44	Negativo
α -metil-D-glucósido	21	Positivo	D-arabitol	45	Negativo
N-acetil-glucosamina	22	Positivo	L-arabitol	46	Negativo
Amigdalina	23	Positivo	Gluconato	47	Negativo
			2-ceto-gluconato	48	Negativo
			5-ceto-gluconato	49	Negativo

Identificación: *Lactobacillus plantarum* . Perfil: dudoso.

Tabla 4.4. Resultados del test API 50CH para la cepa C4.

Azúcar	Número de prueba	Resultado	Azúcar	Número de prueba	Resultado
Control	0	Negativo	Arbutina	24	Positivo
Glicerol	1	Negativo	Esculina	25	Positivo
Eritritol	2	Negativo	Salicina	26	Positivo
D-arabinosa	3	Negativo	Celobiosa	27	Positivo
L-arabinosa	4	Positivo	Maltosa	28	Positivo
Ribosa	5	Positivo	Lactosa	29	Positivo
D-xilosa	6	Negativo	Melibiosa	30	Positivo
L-xilosa	7	Negativo	Sacarosa	31	Positivo
Adonitol	8	Negativo	Trehalosa	32	Positivo
B-metil xilósido	9	Negativo	Inulina	33	Negativo
Galactosa	10	Positivo	Melezitosa	34	Positivo
D-glucosa	11	Positivo	D-rafinosa	35	Negativo
D-fructosa	12	Positivo	Almidón	36	Negativo
D-manosa	13	Positivo	Glucógeno	37	Negativo
L-sorbosa	14	Negativo	Xilitol	38	Negativo
Ramnosa	15	Negativo	B-gentabiosa	39	Positivo
Dulcitol	16	Negativo	D-turanosa	40	Negativo
Inositol	17	Negativo	D-lixosa	41	Negativo
Manitol	18	Positivo	D-tagatosa	42	Negativo
Sorbitol	19	Positivo	D-fucosa	43	Negativo
α -metil-D-manosido	20	Positivo	L-fucosa	44	Negativo
α -metil-D-glucósido	21	Positivo	D-arabitol	45	Negativo
N-acetil-glucosamina	22	Positivo	L-arabitol	46	Negativo
Amigdalina	23	Positivo	Gluconato	47	Negativo
			2-ceto-gluconato	48	Negativo
			5-ceto-gluconato	49	Negativo

Identificación: *Lactobacillus plantarum* . Perfil: excelente.

Tabla 4.5. Resultados del test API 50CH para la cepa C5.

Azúcar	Número de prueba	Resultado	Azúcar	Número de prueba	Resultado
Control	0	Negativo	Arbutina	24	Negativo
Glicerol	1	Negativo	Esculina	25	Negativo
Eritritol	2	Negativo	Salicina	26	Negativo
D-arabinosa	3	Negativo	Celobiosa	27	Negativo
L-arabinosa	4	Negativo	Maltosa	28	Negativo
Ribosa	5	Negativo	Lactosa	29	Positivo
D-xilosa	6	Negativo	Melibiosa	30	Negativo
L-xilosa	7	Negativo	Sacarosa	31	Positivo
Adonitol	8	Negativo	Trehalosa	32	Negativo
B-metil-xilósido	9	Negativo	Inulina	33	Negativo
Galactosa	10	Negativo	Melezitosa	34	Negativo
D-glucosa	11	Positivo	D-rafinosa	35	Negativo
D-fructosa	12	Negativo	Almidón	36	Negativo
D-manosa	13	Negativo	Glucógeno	37	Negativo
L-sorbosa	14	Negativo	Xilitol	38	Negativo
Ramnosa	15	Negativo	B-gentabiosa	39	Negativo
Dulcitol	16	Negativo	D-turanosa	40	Negativo
Inositol	17	Negativo	D-lixosa	41	Negativo
Manitol	18	Negativo	D-tagatosa	42	Negativo
Sorbitol	19	Negativo	D-fucosa	43	Negativo
α -metil-D-manosido	20	Negativo	L-fucosa	44	Negativo
α -metil-D-glucósido	21	Negativo	D-arabitol	45	Negativo
N-acetil-glucosamina	22	Negativo	L-arabitol	46	Negativo
Amigdalina	23	Negativo	Gluconato	47	Negativo
			2-ceto-gluconato	48	Negativo
			5-ceto-gluconato	49	Negativo

Identificación: *Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus* . Perfil: muy bueno.

Tabla 4.6. Resultados del test API 50CH para la cepa C6.

Azúcar	Número de prueba	Resultado	Azúcar	Número de prueba	Resultado
Control	0	Negativo	Arbutina	24	Negativo
Glicerol	1	Negativo	Esculina	25	Positivo
Eritritol	2	Negativo	Salicina	26	Negativo
D-arabinosa	3	Negativo	Celobiosa	27	Negativo
L-arabinosa	4	Negativo	Maltosa	28	Negativo
Ribosa	5	Negativo	Lactosa	29	Positivo
D-xilosa	6	Negativo	Melibiosa	30	Negativo
L-xilosa	7	Negativo	Sacarosa	31	Negativo
Adonitol	8	Negativo	Trehalosa	32	Positivo
B-metil xilósido	9	Negativo	Inulina	33	Negativo
Galactosa	10	Negativo	Melezitosa	34	Negativo
D-glucosa	11	Positivo	D-rafinosa	35	Negativo
D-fructosa	12	Positivo	Almidón	36	Negativo
D-manosa	13	Positivo	Glucógeno	37	Negativo
L-sorbosa	14	Negativo	Xilitol	38	Negativo
Ramnosa	15	Negativo	B-gentabiosa	39	Negativo
Dulcitol	16	Negativo	D-turanosa	40	Negativo
Inositol	17	Negativo	D-lixosa	41	Negativo
Manitol	18	Negativo	D-tagatosa	42	Negativo
Sorbitol	19	Negativo	D-fucosa	43	Negativo
α -metil-D-manosido	20	Negativo	L-fucosa	44	Negativo
α -metil-D-glucósido	21	Negativo	D-arabitol	45	Negativo
N-acetil-glucosamina	22	Positivo	L-arabitol	46	Negativo
Amigdalina	23	Negativo	Gluconato	47	Negativo
			2-ceto-gluconato	48	Negativo
			5-ceto-gluconato	49	Negativo

Identificación: *Pediococcus damnosus* . Perfil: aceptable.

Tabla 4.7. Resultados del test API 50CH para la cepa C12.

Azúcar	Número de prueba	Resultado	Azúcar	Número de prueba	Resultado
Control	0	Negativo	Arbutina	24	Positivo
Glicerol	1	Negativo	Esculina	25	Positivo
Eritritol	2	Negativo	Salicina	26	Positivo
D-arabinosa	3	Negativo	Celobiosa	27	Negativo
L-arabinosa	4	Negativo	Maltosa	28	Negativo
Ribosa	5	Positivo	Lactosa	29	Positivo
D-xilosa	6	Negativo	Melibiosa	30	Negativo
L-xilosa	7	Negativo	Sacarosa	31	Negativo
Adonitol	8	Negativo	Trehalosa	32	Positivo
B-metil xilósido	9	Negativo	Inulina	33	Negativo
Galactosa	10	Positivo	Melezitosa	34	Negativo
D-glucosa	11	Positivo	D-rafinosa	35	Negativo
D-fructosa	12	Positivo	Almidón	36	Negativo
D-manosa	13	Positivo	Glucógeno	37	Negativo
L-sorbosa	14	Positivo	Xilitol	38	Negativo
Ramnosa	15	Positivo	B-gentabiosa	39	Negativo
Dulcitol	16	Positivo	D-turanosa	40	Negativo
Inositol	17	Negativo	D-lixosa	41	Negativo
Manitol	18	Positivo	D-tagatosa	42	Positivo
Sorbitol	19	Positivo	D-fucosa	43	Negativo
α -metil-D-manosido	20	Negativo	L-fucosa	44	Negativo
α -metil-D-glucósido	21	Positivo	D-arabitol	45	Negativo
N-acetil-glucosamina	22	Positivo	L-arabitol	46	Negativo
Amigdalina	23	Positivo	Gluconato	47	Negativo
			2-ceto-gluconato	48	Negativo
			5-ceto-gluconato	49	Negativo

Identificación: *Lactobacillus casei* . Perfil: inaceptable.

Tabla 4.8. Resultados del test API 50CH para la cepa C13.

Azúcar	Número de prueba	Resultado	Azúcar	Número de prueba	Resultado
Control	0	Negativo	Arbutina	24	Positivo
Glicerol	1	Negativo	Esculina	25	Positivo
Eritritol	2	Negativo	Salicina	26	Positivo
D-arabinosa	3	Negativo	Celobiosa	27	Positivo
L-arabinosa	4	Negativo	Maltosa	28	Positivo
Ribosa	5	Positivo	Lactosa	29	Positivo
D-xilosa	6	Negativo	Melibiosa	30	Negativo
L-xilosa	7	Negativo	Sacarosa	31	Negativo
Adonitol	8	Negativo	Trehalosa	32	Positivo
B-metil xilósido	9	Negativo	Inulina	33	Negativo
Galactosa	10	Positivo	Melezitosa	34	Positivo
D-glucosa	11	Positivo	D-rafinosa	35	Negativo
D-fructosa	12	Positivo	Almidón	36	Negativo
D-manosa	13	Positivo	Glucógeno	37	Negativo
L-sorbosa	14	Negativo	Xilitol	38	Negativo
Ramnosa	15	Negativo	B-gentabiosa	39	Positivo
Dulcitol	16	Negativo	D-turanosa	40	Positivo
Inositol	17	Negativo	D-lixosa	41	Negativo
Manitol	18	Positivo	D-tagatosa	42	Positivo
Sorbitol	19	Positivo	D-fucosa	43	Negativo
α -metil-D-manosido	20	Negativo	L-fucosa	44	Negativo
α -metil-D-glucósido	21	Positivo	D-arabitol	45	Negativo
N-acetilglucosamina	22	Positivo	L-arabitol	46	Negativo
Amigdalina	23	Negativo	Gluconato	47	Negativo
			2-ceto-gluconato	48	Negativo
			5-ceto-gluconato	49	Negativo

Identificación: *Lactobacillus casei* . Perfil: bueno.

4.2. IDENTIFICACION DE CEPAS DE COLECCIÓN

Las cepas de colección, descritas en el apartado 3.1.1, se sometieron al mismo proceso de identificación que las aisladas de productos comerciales, con el fin de

confirmar su clasificación y de validar nuestro procedimiento de identificación. En todos los casos, las identificaciones obtenidas coincidieron con las presuntas, con perfiles buenos o muy buenos.

Cepa C8, cepa de referencia solicitada a la Colección Española de Cultivo Tipo (CECT) con número de referencia CECT4005. Se le realizó la tinción de Gram y resultó ser un bacilo Gram-positivo. Su patrón de fermentación de azúcares se muestra en la **Tabla 4.9** y correspondió con *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus*.

Cepa C9, cepa de referencia solicitada a la CECT con número de referencia CECT475. Según la tinción de Gram se clasificó como bacilo Gram-positivo Su patrón de fermentación de azúcares, que resultó compatible con *L. casei*, se presenta en la **Tabla 4.10**.

Cepa C10, cepa de referencia solicitada CECT con número de referencia CECT903. Al igual que el resto de cepas de referencia, resultó ser un bacilo Gram-positivo cuyo patrón de fermentación de azúcares se muestra en la **Tabla 4.11** y permitió su identificación como *L. acidophilus*.

Tabla 4.9. Resultados del test API 50CH para la cepa C8.

Azúcar	Número de prueba	Resultado	Azúcar	Número de prueba	Resultado
Control	0	Negativo	Arbutina	24	Negativo
Glicerol	1	Negativo	Esculina	25	Negativo
Eritritol	2	Negativo	Salicina	26	Negativo
D-arabinosa	3	Negativo	Celobiosa	27	Negativo
L-arabinosa	4	Negativo	Maltosa	28	Negativo
Ribosa	5	Negativo	Lactosa	29	Positivo
D-xilosa	6	Negativo	Melibiosa	30	Negativo
L-xilosa	7	Negativo	Sacarosa	31	Negativo
Adonitol	8	Negativo	Trehalosa	32	Negativo
B-metil-xilósido	9	Negativo	Inulina	33	Negativo
Galactosa	10	Negativo	Melezitosa	34	Negativo
D-glucosa	11	Positivo	D-rafinosa	35	Negativo
D-fructosa	12	Positivo	Almidón	36	Negativo
D-manosa	13	Positivo	Glucógeno	37	Negativo
L-sorbosa	14	Negativo	Xilitol	38	Negativo
Ramnosa	15	Negativo	B-gentabiosa	39	Negativo
Dulcitol	16	Negativo	D-turanosa	40	Negativo
Inositol	17	Negativo	D-lixosa	41	Negativo
Manitol	18	Negativo	D-tagatosa	42	Negativo
Sorbitol	19	Negativo	D-fucosa	43	Negativo
α -metil-D-manosido	20	Negativo	L-fucosa	44	Negativo
α -metil-D-glucósido	21	Negativo	D-arabitol	45	Negativo
N-acetil-glucosamina	22	Positivo	L-arabitol	46	Negativo
Amigdalina	23	Negativo	Gluconato	47	Negativo
			2-ceto-gluconato	48	Negativo
			5-ceto-gluconato	49	Negativo

Identificación: *Lactobacillus delbruecki* subsp. *bulgaricus* . Perfil: bueno.

Tabla 4.10. Resultados del test API 50CH para la cepa C9.

Azúcar	Número de prueba	Resultado	Azúcar	Número de prueba	Resultado
Control	0	Negativo	Arbutina	24	Positivo
Glicerol	1	Negativo	Esculina	25	Positivo
Eritritol	2	Negativo	Salicina	26	Positivo
D-arabinosa	3	Negativo	Celobiosa	27	Positivo
L-arabinosa	4	Negativo	Maltosa	28	Negativo
Ribosa	5	Negativo	Lactosa	29	Positivo
D-xilosa	6	Negativo	Melibiosa	30	Negativo
L-xilosa	7	Negativo	Sacarosa	31	Negativo
Adonitol	8	Negativo	Trehalosa	32	Positivo
B-metil-xilósido	9	Negativo	Inulina	33	Negativo
Galactosa	10	Positivo	Melezitosa	34	Positivo
D-glucosa	11	Positivo	D-rafinosa	35	Negativo
D-fructosa	12	Positivo	Almidón	36	Negativo
D-manosa	13	Positivo	Glucógeno	37	Negativo
L-sorbosa	14	Negativo	Xilitol	38	Negativo
Ramnosa	15	Negativo	B-gentabiosa	39	Positivo
Dulcitol	16	Negativo	D-turanosa	40	Negativo
Inositol	17	Negativo	D-lixosa	41	Negativo
Manitol	18	Positivo	D-tagatosa	42	Positivo
Sorbitol	19	Negativo	D-fucosa	43	Negativo
α -metil-D-manosido	20	Negativo	L-fucosa	44	Negativo
α -metil-D-glucósido	21	Negativo	D-arabitol	45	Negativo
N-acetil-glucosamina	22	Positivo	L-arabitol	46	Negativo
Amigdalina	23	Positivo	Gluconato	47	Negativo
			2-ceto-gluconato	48	Negativo
			5-ceto-gluconato	49	Negativo

Identificación: *Lactobacillus casei* . Perfil: muy bueno.

Tabla 4.11. Resultados del test API 50CH para la cepa C10.

Azúcar	Número de prueba	Resultado	Azúcar	Número de prueba	Resultado
Control	0	Negativo	Arbutina	24	Positivo
Glicerol	1	Negativo	Esculina	25	Positivo
Eritritol	2	Negativo	Salicina	26	Positivo
D-arabinosa	3	Negativo	Celobiosa	27	Positivo
L-arabinosa	4	Negativo	Maltosa	28	Positivo
Ribosa	5	Negativo	Lactosa	29	Positivo
D-xilosa	6	Negativo	Melibiosa	30	Negativo
L-xilosa	7	Negativo	Sacarosa	31	Positivo
Adonitol	8	Negativo	Trehalosa	32	Positivo
B-metil xilósido	9	Negativo	Inulina	33	Negativo
Galactosa	10	Negativo	Melezitosa	34	Negativo
D-glucosa	11	Positivo	D-rafinosa	35	Negativo
D-fructosa	12	Positivo	Almidón	36	Negativo
D-manosa	13	Positivo	Glucógeno	37	Negativo
L-sorbosa	14	Negativo	Xilitol	38	Negativo
Ramnosa	15	Negativo	B-gentabiosa	39	Positivo
Dulcitol	16	Negativo	D-turanosa	40	Negativo
Inositol	17	Negativo	D-lixosa	41	Negativo
Manitol	18	Negativo	D-tagatosa	42	Negativo
Sorbitol	19	Negativo	D-fucosa	43	Negativo
α -metil-D-manosido	20	Negativo	L-fucosa	44	Negativo
α -metil-D-glucósido	21	Negativo	D-arabitol	45	Negativo
N-acetil-glucosamina	22	Positivo	L-arabitol	46	Negativo
Amigdalina	23	Positivo	Gluconato	47	Negativo
			2-ceto-gluconato	48	Negativo
			5-ceto-gluconato	49	Negativo

Identificación: *Lactobacillus acidophilus* . Perfil: bueno.

5. POTENCIAL PROBIÓTICO DE LAS CEPAS AISLADAS

Los microorganismos probióticos administrados vivos por vía oral deben reunir unas características de resistencia a pH ácido, para sobrevivir al tránsito gástrico, y resistencia a sales biliares, para persistir en el intestino. Ambas propiedades pueden medirse fácilmente *in vitro*, y, por tanto, deben incluirse en las baterías de pruebas diseñadas para la selección de cepas con potencial probiótico.

5.1. RESISTENCIA AL pH ÁCIDO

Como se ha descrito en el capítulo de Material y Métodos (3.3.1), las cepas a examinar se incubaron durante 30 min a distintos valores de pH, con el fin de evaluar simultáneamente la resistencia a pH ácido y la capacidad amortiguadora de distintos vehículos que podrían utilizarse en la administración oral. Los resultados de resistencia al pH de las cepas C1 (*L. casei*) y C4 (*L. plantarum*) mostrados en la **Tabla 5.1**, así como el adecuado perfil de identificación de ambas cepas (ver los datos en el apartado 4.1) aconsejaron su selección para los posteriores estudios.

Tabla 5.1. Resistencia de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* al pH ácido.

Vehículo	pH	Bacterias viables (\log_{10}) por ml	
		<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>
Solución salina	6.0	8.2 ± 0.06	8.6 ± 0.07
Solución salina + HCl	2.1	5.9 ± 0.04	5.2 ± 0.11
PBS	7.1	8.1 ± 0.04	8.7 ± 0.11
PBS + HCl	2.6	6.0 ± 0.03	5.3 ± 0.25
Leche desnatada	7.0	8.4 ± 0.09	8.7 ± 0.09
Leche desnatada + HCl	5.5	8.2 ± 0.04	8.6 ± 0.04

Los resultados son promedio ± desviación estándar de tres determinaciones.

Ambas cepas mostraron una moderada resistencia al pH ácido. Tras 30 min a pH 2.1, la viabilidad de ambas cepas se redujo en 2.3 y 3.4 unidades logarítmicas, respectivamente, con un muy alto nivel de significación ($P < 0.001$). Los datos obtenidos evidencian el elevado poder amortiguador de pH que posee la leche descremada, muy superior al del PBS, ya que la misma proporción de HCl llevó el pH del PBS a un valor francamente ácido (2.6), que redujo el número de bacterias viables en una extensión similar a la alcanzada con la solución salina ácida, mientras el pH de la leche descremada solo descendió a 5.5, que no tuvo efecto apreciable sobre la viabilidad bacteriana en las condiciones del ensayo. Por tanto, se eligió la leche descremada como el vehículo más apropiado para realizar los inóculos destinados a la administración intragástrica en los ensayos *ex vivo* e *in vivo*.

5.2. RESISTENCIA A LAS SALES BILIARES

Las técnicas descritas en Material y Métodos (apartados 3.3.2 y 3.3.3, respectivamente) se aplicaron a evaluar dos parámetros relacionados pero diferentes, como son el crecimiento en presencia de sales biliares y la resistencia a la acción antibacteriana de la bilis sin diluir.

5.2.1. Crecimiento en un medio de cultivo suplementado con sales biliares

La capacidad de las cepas C1 y C4 para crecer en presencia de concentraciones significativas de sales biliares se presenta en la **Tabla 5.2**. No se encontraron diferencias significativas entre el crecimiento cuantitativo en agar LMRS libre de bilis y los valores correspondientes a las placas de medio suplementado con 0.5% o 0.05% de sales biliares de origen porcino o bovino.

Tabla 5.2. Crecimiento de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* en presencia de sales biliares a distintas concentraciones

Origen de la bilis	Concentración (g/100 ml agar LMRS)	Bacterias viables (\log_{10}) por ml	
		<i>L. casei</i>	<i>L. plantarum</i>
Porcino	0.5	7.8 ± 0.14	8.8 ± 0.08
	0.05	8.1 ± 0.07	8.8 ± 0.04
Bovino	0.5	8.0 ± 0.07	8.7 ± 0.10
	0.05	7.9 ± 0.05	8.7 ± 0.11

Los resultados son promedio ± desviación estándar de tres determinaciones.

Las suspensiones originales de *L. casei* y *L. plantarum* contenían 8.1 ± 0.11 y 8.8 ± 0.02 bacterias viables/ml, según los correspondientes recuentos en placas de LMRS sin bilis.

5.2.2. Supervivencia en presencia de bilis

Una vez comprobada la capacidad de las cepas de *L. casei* y *L. plantarum* para crecer en medios suplementados con sales biliares, se procedió a evaluar su supervivencia tras ser incubadas durante una hora en presencia de bilis bovina reconstituida a su concentración original. La suspensión control de *L. casei*, incubada en PBS, contenía $10^{8.0} \pm 10^{0.04}$ bacterias viables por ml, mientras que la incubada en bilis, dio un recuento de $10^{8.0} \pm 10^{0.08}$ (los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar de tres determinaciones). En cuanto a *L. plantarum*, el recuento de la suspensión incubada en PBS fue de $10^{8.8} \pm 10^{0.10}$, y el de la suspensión incubada en bilis dio $10^{8.8} \pm 10^{0.02}$. Por tanto, ambas cepas mantuvieron intacta su viabilidad tras la incubación con bilis bovina.

6. COLONIZACIÓN INTESTINAL

La capacidad de colonizar el intestino es una de las propiedades que se atribuyen a los microorganismos probióticos, si bien, como se ha comentado en el apartado 1.3, son pocas las cepas probióticas capaces de colonizar de forma estable el intestino humano. La adherencia *in vitro* a células del epitelio intestinal se considera correlacionada con el potencial de colonización *in vivo*. Ambos parámetros se investigaron en las cepas seleccionadas para el presente estudio, con el fin de explorar las relaciones entre el ensayo de adherencia *in vitro*, la colonización intestinal *in vivo* y los efectos probióticos que se investigaron posteriormente.

6.1. ADHERENCIA *IN VITRO* A CELULAS DE EPITELIO INTESTINAL

Para cuantificar la capacidad de las bacterias ensayadas para adherirse a la superficie de las células Caco-2, se procedió a contar el número de células y el de bacterias adheridas en diez campos microscópicos consecutivos y los resultados se

expresaron como promedio de bacterias adheridas por célula. Como referencia para la interpretación de los resultados, se utilizaron un control positivo y otro negativo. El control positivo se hizo con la cepa IP383, perteneciente al serotipo O9 de *Y. enterocolitica*: este serotipo es patógeno y como tal posee adhesinas; la adherencia de esta cepa en concreto ha sido comprobada en nuestro laboratorio [Ruiz-Bravo *et al.*, 1986]. Como control negativo se utilizó una cepa de *B. subtilis*. Según los resultados que se presentan en la **Tabla 6.1** la cepa C4 de *L. plantarum* mostró una notable capacidad de adherencia a células Caco-2 (aproximadamente la mitad del promedio de bacterias adheridas por célula de *Y. enterocolitica*). La capacidad de adherencia de la cepa C1 de *L. casei* fue sensiblemente menor.

Tabla 6.1. Adherencia bacteriana a células Caco-2

Bacteria ^a	Adhesión ^b
<i>Y. enterocolitica</i> O9	6.3 ± 1.76
<i>B. subtilis</i>	0.2 ± 0.18
<i>L. casei</i>	1.6 ± 0.90
<i>L. plantarum</i>	3.3 ± 1.56

^aLas cepas de *Y. enterocolitica* y *B. subtilis* fueron empleadas como controles positivos y negativos de adhesión respectivamente.

^bLos valores son el promedio ± la desviación estándar del número de bacterias adheridas por célula en 10 campos microscópicos sucesivos observados con el objetivo de inmersión.

6.2. COLONIZACION INTESTINAL IN VIVO POR *L. plantarum*

6.2.1. Diseño de un medio de cultivo selectivo y diferencial para *L. plantarum*

Uno de los principales problemas que se planteó a la hora de estudiar la colonización del intestino por probióticos fue la imposibilidad de diferenciar entre los lactobacilos exógenos, administrados en el curso de los tratamientos por vía intragástrica, y los lactobacilos endógenos, propios de la microbiota intestinal normal del ratón, cuyos recuentos en medios selectivos como el LMRS eran suficientemente altos (del orden de 10^8 bacterias viables por g de heces en nuestros ensayos) como para enmascarar los recuentos de los exógenos. Por este motivo, se planteó diseñar un medio de cultivo nuevo que reuniese las características de ser selectivo y diferencial para las bacterias exógenas objeto de estudio. Se elaboró la hipótesis de que, partiendo de la formulación original del medio LMRS sería posible diseñar un medio modificado por adición de un agente antimicrobiano que lo hiciera selectivo para la cepa exógena, de un azúcar apropiado, en lugar de la dextrosa, junto con un indicador de pH para diferenciar las colonias de la cepa exógena. De acuerdo con estas características prefijadas, el nuevo medio se designó con las siglas LPSM, de *Lactobacillus plantarum selective medium*.

El trabajo se centró en el diseño de un medio para la cepa C4 de *L. plantarum*. Para la elección del agente antimicrobiano apropiado, se realizaron determinaciones de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de diversos agentes antimicrobianos (β -lactámicos, aminoglicósidos, tetraciclinas y fluorquinolonas) frente a *L. plantarum*. Se siguió el procedimiento de dilución en agar Mueller-Hinton, de acuerdo con la

descripción de Jorgensen y Turnidge [2003] y siguiendo el esquema de diluciones y la estandarización de inóculos (concentración final de aproximadamente 10^4 bacterias por gota) del National Committee for Clinical Laboratory Standards [2000]. Los resultados obtenidos, que no se incorporan a esta Memoria por no estar directamente relacionados con sus objetivos, mostraron en general un patrón de resistencia que concuerda con lo descrito en bibliografía para este género [Charteris *et al.*, 1998; Danielsen y Wind, 2003]. Se eligió, para utilizarlo en el diseño del medio de cultivo, el ciprofloxacino dado el alto valor de CMI obtenido con la cepa C4 de *L. plantarum* (32 $\mu\text{g/ml}$ que coincide con los valores registrados en la bibliografía para esta especie [Danielsen y Wind, 2003]) y la eficacia probada de este agente para inhibir el crecimiento de la casi totalidad de la microbiota fecal del ratón [Jiménez-Valera *et al.*, 1998].

Por otra parte, se examinó el perfil de fermentación de azúcares de un inóculo obtenido de heces murinas mediante el API 50 CH y se comparó con el perfil ya conocido de la cepa C4 de *L. plantarum* para seleccionar azúcares que fuesen rápida y eficazmente fermentados por el lactobacilo exógeno, pero no por la microbiota fecal. Esta comparación mostró que el sorbitol podía ser un sustrato adecuado. Como indicador ácido-base para revelar su fermentación se eligió el púrpura de bromocresol por ser el utilizado en el API 50 CH.

Por tanto, el medio diseñado constaba de la base del LMRS cambiando la dextrosa por sorbitol y añadiendo púrpura de bromocresol, para que actuase como medio diferencial y ciprofloxacino para darle carácter selectivo. Tras algunas pruebas previas se eliminó de la formulación el monooleato de sorbitán, ya que no aportaba nada

a la selectividad del medio y planteaba algunos problemas técnicos de dispersión. La composición final del medio se muestra en la **Tabla 6.2**.

Tabla 6.2. Composición del LPSM

Componente	Cantidad (g/l medio)
Peptona (<i>Bacto proteose peptone</i>)	10
Extracto de carne (<i>Bacto beef extract</i>)	10
Extracto de levadura (<i>Bacto yeast extract</i>)	5
Sorbitol	20
Citrato amónico	2
Acetato sódico	5
Sulfato magnésico	0.1
Sulfato manganésico	0.05
Fosfato potásico	2
Bacto agar	15
Púrpura de bromocresol	0.02
Ciprofloxacino	0.004

Se procedió a la validación de la sensibilidad y especificidad del LPSM comparando el crecimiento de cuatro cepas de *L. plantarum* (cepa C4 aislada de kéfir comercial y 3 cepas de referencia) con el de otras bacterias: *L. casei* C1 (aislada de yogur comercial), *L. casei* de referencia, *L. fermentum* (aislada de heces murinas), *S. salivarius* subsp. *termophilus* (C, aislado de yogur comercial), *E. coli* (aislada de heces de ratones testigo), *E. coli* de referencia y *S. enterica* serovar *Typhimurium*. Se prepararon inóculos en PBS estéril, a partir de cultivos de 24 h realizados en tubos de TSA incubados a 37°C. De estos inóculos, se realizaron diluciones decimales (10^1 hasta 10^{-8}) en PBS estéril y se sembraron 10 µl de cada dilución en placas de TSA, LMRS y LPSM. Las placas se incubaron a 37°C y se realizaron recuentos de colonias a las 24 y 48 h. Los resultados de dichos recuentos se presentan en la **Tabla 6.3**.

Tabla 6.3. Comparación del crecimiento de *Lactobacillus plantarum* y otras bacterias en distintos medios de cultivo

Bacteria ensayada	UFC/ml en los siguientes medios		
	LPSM	LMRS agar	TSA
<i>L. plantarum</i> C4	1.0 x 10 ⁸	1.9 x 10 ⁸	2.2 x 10 ⁸
<i>L. plantarum</i> ATCC8014	4.0 x 10 ⁷	9.0 x 10 ⁷	9.0 x 10 ⁷
<i>L. plantarum</i> ATCC10241	6.0 x 10 ⁷	5.6 x 10 ⁷	6.0 x 10 ⁷
<i>L. plantarum</i> ATCC14431	5.9 x 10 ⁷	5.1 x 10 ⁷	6.0 x 10 ⁷
<i>L. casei</i> C1	< 10 ²	4.5 x 10 ⁷	5.0 x 10 ⁷
<i>L. casei</i> ATCC393	< 10 ²	6.5 x 10 ⁶	3.0 x 10 ⁷
<i>L. fermentum</i> C16	< 10 ²	7.0 x 10 ⁵	2.0 x 10 ⁶
<i>S. salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> C5	< 10 ²	< 10 ²	1.8 x 10 ⁷
<i>E. coli</i> C17	< 10 ²	< 10 ²	2.8 x 10 ⁸
<i>E. coli</i> ATCC25922	< 10 ²	< 10 ²	2.1 x 10 ⁸
<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> CECT4156	< 10 ²	< 10 ²	1.8 x 10 ⁸

Cada cepa se suspendió en PBS y se efectuaron recuentos por triplicado en cada uno de los medios. El límite de detección del método fue 10² bacterias por ml de suspensión

En LPSM, tras 48 h de incubación, todas las cepas de *L. plantarum* formaron colonias amarillas con un diámetro superior a 2 mm y rodeadas de un halo amarillo, amplio y muy bien definido. El color amarillo es consecuencia de la formación de ácidos a partir del sorbitol, lo que causa el viraje del indicador ácido-base. El crecimiento de *L. plantarum* en este medio fue cuantitativamente similar al que se obtuvo en TSA y en agar LMRS. Por el contrario, las cepas de *L. casei* y de *L.*

fermentum ensayadas, dieron recuentos similares en TSA y en agar LMRS, pero en LPSM no crecieron por encima del nivel de detección (10^2 bacterias viables por ml). Las cepas de *S. salivarius* subsp. *termophilus*, *E. coli* y *S. enterica* serovar *Typhimurium* no crecieron en LPSM ni en agar LMRS. La selectividad del medio se confirmó al comprobar que no hubo crecimiento cuando las cepas distintas de *L. plantarum* se sembraron con asa, en placas de LPSM, directamente desde sus respectivos cultivos en tubos de TSA inclinado.

Para evaluar la sensibilidad del LPSM en la detección de *L. plantarum* a partir de muestras altamente contaminadas, como son las muestras fecales, se diluyeron heces de ratones testigos en 1 ml de PBS estéril y se homogeneizaron utilizando un agitador tipo Vórtex. Se preparó un inóculo de la cepa C4 de *L. plantarum* en PBS estéril y se añadieron 10 μ l a las heces diluidas. Las muestras se mezclaron por agitación y se realizaron diluciones decimales en PBS estéril (10^{-1} hasta 10^{-8}). Se sembraron 10 μ l de cada dilución en placas de LPSM, que fueron incubadas a 37°C durante 48 h para realizar un recuento de colonias. El inóculo original de la cepa C4 de *L. plantarum* se sembró tanto en LPSM como en agar LMRS y TSA. Los resultados mostraron que la microbiota fecal no fue capaz de crecer por encima del límite de detección en las placas de LPSM, mientras que *L. plantarum* originaba recuentos de colonias en concordancia con los obtenidos con los del inóculo original.

Finalmente se evaluó la capacidad del nuevo medio para recuperar *L. plantarum* de heces de ratones tratados con el probiótico. Para la preparación de las muestras se siguió la metodología explicada en el apartado 3.7.1. Los animales recibieron, mediante canulación intragástrica, 100 μ l de un inóculo en leche descremada que contenía

aproximadamente 10^9 bacterias viables por ml. Los animales testigos recibieron el mismo volumen de leche descremada. Se tomaron muestras de heces a tiempo 0 (antes del tratamiento) y a las 24 h. Las heces se procesaron tal y como se ha descrito en el apartado 3.9.1 y las diluciones preparadas se sembraron en placas de LPSM y agar LMRS que se incubaron a 37°C durante 48 h para realizar un recuento de colonias. Los resultados de estos recuentos se muestran en la **Tabla 6.4** y confirman la selectividad del LPSM. La excreción fecal de *L. plantarum* C4 se detectó en todos los animales a las 24 h del tratamiento. La microbiota intestinal no creció en LPSM (el límite de detección, en este caso, fue de 10^3 bacterias viables por g de heces, ya que al homogeneizar la muestra se diluyó en PBS 1:10), aunque en algunos casos se detectaron microcolonias (diámetro inferior a 1 mm) no coloreadas que no interfirieron para los recuentos de *L. plantarum*.

Tabla 6.4. Recuperación de *L. plantarum* exógeno (C4) de heces de ratón

Tratamiento	Tiempo (h) tras tratamiento intragástrico	Log ₁₀ UFC por g de heces en los medios indicados	
		Agar LMRS	LPSM
Leche + C4	0	8.3 ± 0.44	< 10 ³
	24	8.4 ± 0.36	6.38 ± 0.41
Leche	0	8.7 ± 0.31	< 10 ³
	24	8.3 ± 0.45	< 10 ³

Los resultados representan el promedio ± la desviación estándar de seis ratones. El nivel de detección fue de 10^3 bacterias por g de heces.

6.2.2. Ensayos de colonización con una dosis única de *L. plantarum*

Los estudios sobre colonización intestinal *in vivo* se centraron en la cepa C4 de *L. plantarum*, dado que fue la que mostró mayor capacidad de adherencia a células de epitelio intestinal. En primer lugar, se planteó medir la capacidad de colonización de una dosis única, comprendida, según los ensayos, entre 6.6×10^8 y 9.4×10^8 UFC por ratón, y administrada por vía intragástrica. Se realizaron coprocultivos en LPSM (para *L. plantarum*), TSA (para aerobios totales) y MacConkey (para enterobacterias) antes de iniciar el tratamiento con el probiótico (día 0) así como en los días 1, 2 y 3 después de recibir el probiótico. En la **Figura 6.1 (A)** se presentan los resultados de un ensayo representativo de estos estudios. Se comprobó que el probiótico sólo apareció en las heces al día siguiente de que los ratones recibieran el tratamiento, pero fue incapaz de permanecer y desarrollarse en el intestino, ya que su presencia se redujo a niveles casi indetectables el día 2, y dejó de detectarse en las muestras de heces tomadas a los animales a partir del día 3. En cuanto a los recuentos de microorganismos aerobios totales en TSA y los de enterobacterias en MacConkey, no se registraron cambios significativos durante el curso de los experimentos.

6.2.3. Ensayos de colonización con varias dosis sucesivas de *L. plantarum*

A continuación, se investigó si la administración diaria del probiótico, durante un espacio de cinco días, podía tener como resultado una mayor colonización intestinal. El inóculo se preparó como se ha descrito y se conservó en frigorífico (4°C) durante el tiempo que duró el ensayo. En los distintos experimentos realizados, las dosis de bacterias administradas por animal oscilaron entre 9.5×10^8 y 9.2×10^8 UFC. Los

recuentos microbianos en muestras de heces se realizaron diariamente, desde el día 0 hasta el 8, en TSA, MacConkey y LPSM. Los resultados de un experimento representativo se muestran en la **Figura 6.1 (B)**.

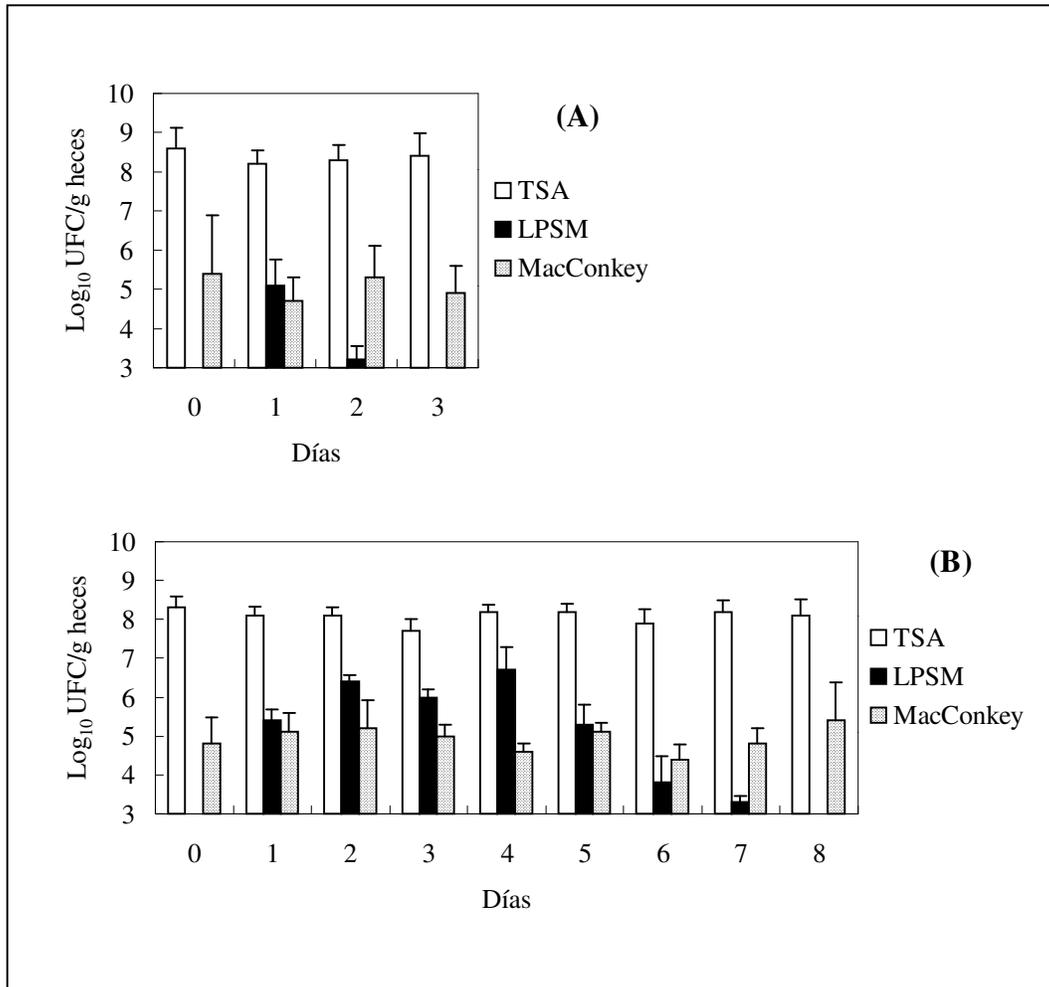


FIGURA 6.1. Recuentos de bacterias en heces de ratones tras la administración de *L. plantarum* en leche desnatada. Los recuentos de bacterias aerobias se realizaron en TSA; los de enterobacterias en MacConkey y los de *L. plantarum* en LPSM. Los animales recibieron una sola dosis (de 9.4×10^8 bacterias por ratón) el día 0 (A) o bien una dosis diaria (entre 9.2×10^8 y 9.5×10^8 bacterias por ratón) durante cinco días consecutivos (B). Los datos muestran el promedio \pm la desviación estándar de tres animales.

Teniendo presente que el probiótico se administró en los días 0 (después del primer coprocultivo), 1, 2, 3 y 4, se observa que la detección de *L. plantarum* en heces

se prolongó tres días después de finalizado en tratamiento, con valores decrecientes, siendo indetectable a partir del cuarto día. Por tanto, el tratamiento continuado durante cinco días tampoco consiguió instaurar a la cepa exógena de lactobacilo en la microbiota intestinal de forma persistente. Tampoco en estos experimentos se observaron cambios apreciables en los recuentos de microorganismos aerobios totales ni en los de enterobacterias. Tratamientos de mayor duración (veinte días o más de administración diaria) mostraron unos parámetros (niveles de C4 por g de heces y duración de la excreción fecal de C4 tras la última dosis intragástrica) similares a los mostrados en la **Figura 6.1B** (datos no mostrados).

6.2.4. Ensayos de colonización por *L. plantarum* tras tratamiento con ciprofloxacino

Tomando como base la resistencia de *L. plantarum* al ciprofloxacino (apartado 6.1), se planteó la hipótesis de que un tratamiento previo con este antimicrobiano de amplio espectro podría, al desequilibrar la microbiota intestinal, facilitar la implantación de la bacteria probiótica. Para contrastar esta hipótesis, se diseñaron varios experimentos.

En el primer protocolo ensayado, se incluyeron cuatro grupos con cuatro ratones cada uno. Todos los tratamientos en este protocolo se administraron mediante canulación intragástrica. Un grupo recibió un tratamiento combinado de ciprofloxacino y probiótico que consistió en la administración de 200 µl de una disolución conteniendo 2 mg de ciprofloxacino por ml de agua destilada (equivalente a 400 µg/ratón/día y a 20 mg/kg de peso corporal/día) y, transcurridas tres horas, 100 µl de una suspensión de C4 en leche desnatada (alrededor de 10^8 bacterias/ratón/día). Un segundo grupo recibió

exclusivamente el tratamiento con el antibiótico y tres horas más tarde 100 μ l de leche descremada. Un tercer grupo recibió solamente el tratamiento probiótico, y tres horas antes 200 μ l de agua destilada estéril. El cuarto grupo se empleó como control, recibiendo con un intervalo de tres horas los mismos volúmenes de los distintos vehículos administrados a los grupos antes descritos. Los días dos y cinco tras el inicio del tratamiento se tomaron muestras fecales para la realización de coprocultivos en placas de agar LMRS (para recuento de lactobacilos), LPSM (para cuantificación de *L. plantarum*), TSA (para aerobios totales) y agar MacConkey (para enterobacterias). Los resultados correspondientes a los recuentos de bacterias en los distintos medios de cultivo se muestran en la **Figura 6.2**.

La administración de ciprofloxacino no facilitó la colonización por *L. plantarum* ni a los dos días (**Figura 6.2 A**) ni a los cinco días (**Figura 6.2 B**). Entre las modificaciones encontradas en la microbiota fecal, cabe destacar incrementos ligeros pero significativos en la población de bacterias aerobias mesófilas capaces de crecer en TSA, a los dos días de administrado el agente antimicrobiano, efecto que, sin embargo, no se apreció en los animales que recibieron la combinación de ciprofloxacino y C4. Dado que a los cinco días esta misma población decreció significativamente en el grupo que recibió el tratamiento combinado, podemos interpretar que las pequeñas alteraciones observadas en esta población microbiana a lo largo del experimento, aún cuando alcancen en algunos casos la significación estadística carecen de significación biológica. La población de bacterias capaces de crecer en MacConkey mantuvo valores aproximadamente un logaritmo por encima del límite de detección a lo largo de todo el experimento excepto en las medidas realizadas a los cinco días del tratamiento con ciprofloxacino que cayeron por debajo del límite de detección. El tratamiento

combinado no produjo este efecto por lo que es posible que *L. plantarum* ejerciese alguna actividad protectora sobre esta población.

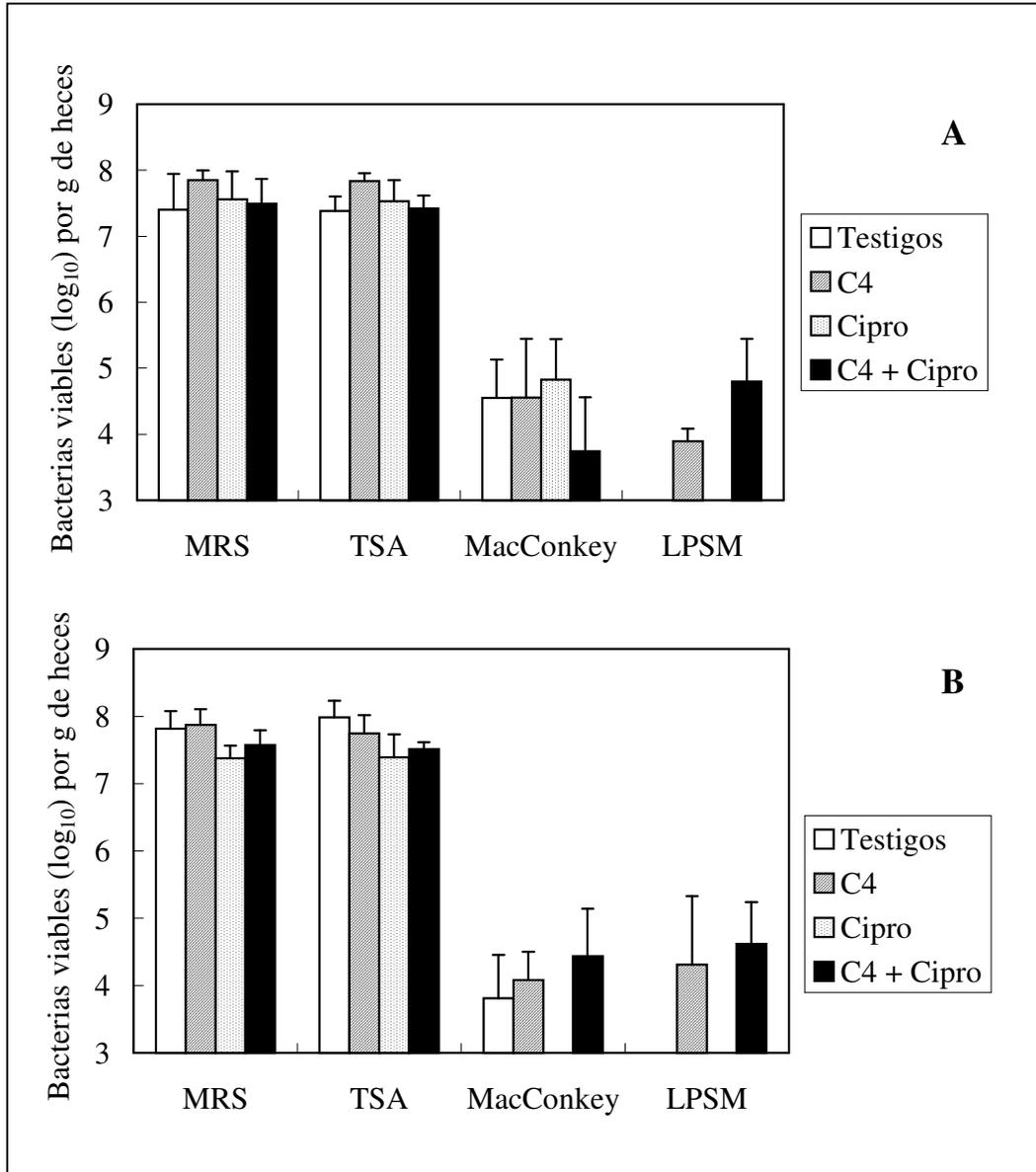


FIGURA 6.2. Efecto del tratamiento simultáneo con ciprofloxacino (400 µg/ratón/día) y con *L. plantarum* C4 en el coprocultivo cuantitativo. Los resultados son promedios ± desviación estándar de los recuentos de cuatro animales por grupo, expresados como log₁₀.

Dado el escaso efecto que la administración de 400 μg de ciprofloxacino por ratón y día tuvo sobre la microbiota intestinal, se decidió incrementar la dosis y la continuidad del tratamiento, para lo cual los bebederos de los ratones fueron rellenos con una disolución conteniendo 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del agente antimicrobiano en agua destilada estéril. Dado que un ratón consume por término medio 5 ml de agua al día, la dosificación por ratón y día se puede evaluar alrededor de 800 μg de ciprofloxacino (equivalente a 40 mg/kg de peso corporal/día). En una primera serie de experimentos con esta dosis de antimicrobiano, la suspensión de *L. plantarum* C4 en leche descremada (alrededor de 10^8 bacterias/ratón/día) se administró mediante canula intraesofágica una vez por día durante cinco días. En los dos primeros días, los animales bebieron agua estéril. En los tres últimos días los animales tuvieron libre acceso a la disolución de ciprofloxacino. El sexto día se retiraron los bebederos y se realizó un coprocultivo. Los resultados presentados en la Figura 6.3 indican que, en estas condiciones, el tratamiento con ciprofloxacino redujo muy significativamente la población de microorganismos aerobios capaces de crecer en TSA tanto cuando se administró sólo ($P < 0.0002$) como cuando se administró a animales que estaban recibiendo *L. plantarum* ($P < 0.005$). La diferencia entre estos dos grupos no tuvo significación. En cuanto a la presencia del lactobacilo exógeno en la microbiota intestinal, se observa que el tratamiento con ciprofloxacino incrementó significativamente el contenido fecal en esta bacteria ($P < 0.02$). Parece razonable deducir que el impacto causado en la microbiota por el ciprofloxacino está directamente relacionado con el incremento en la población de *L. plantarum* exógeno resistente a este agente antimicrobiano.

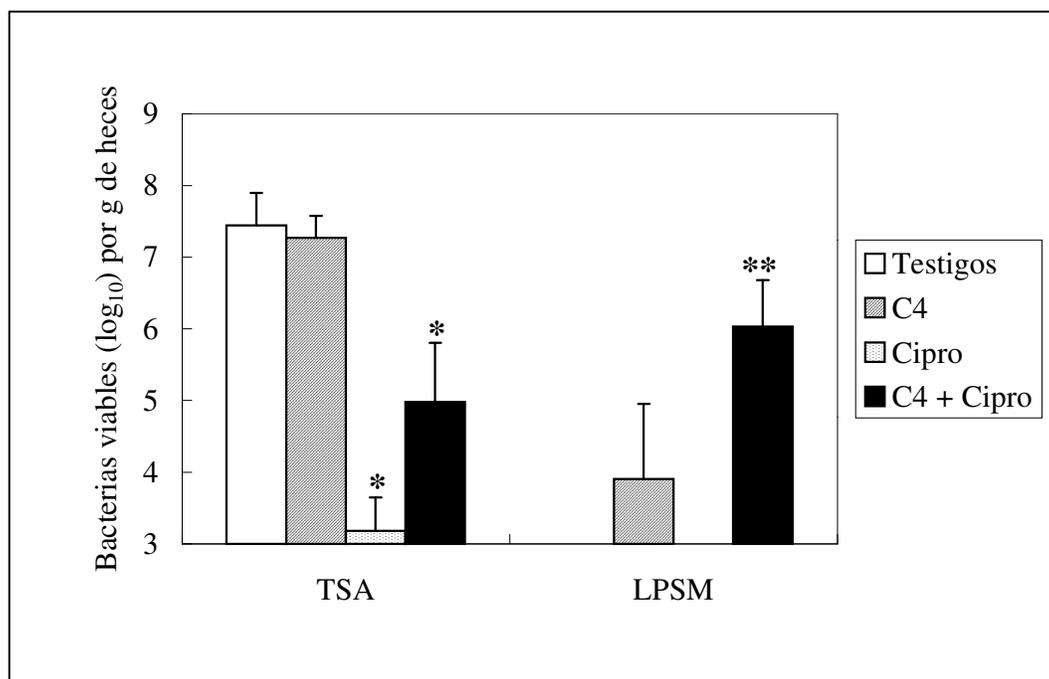
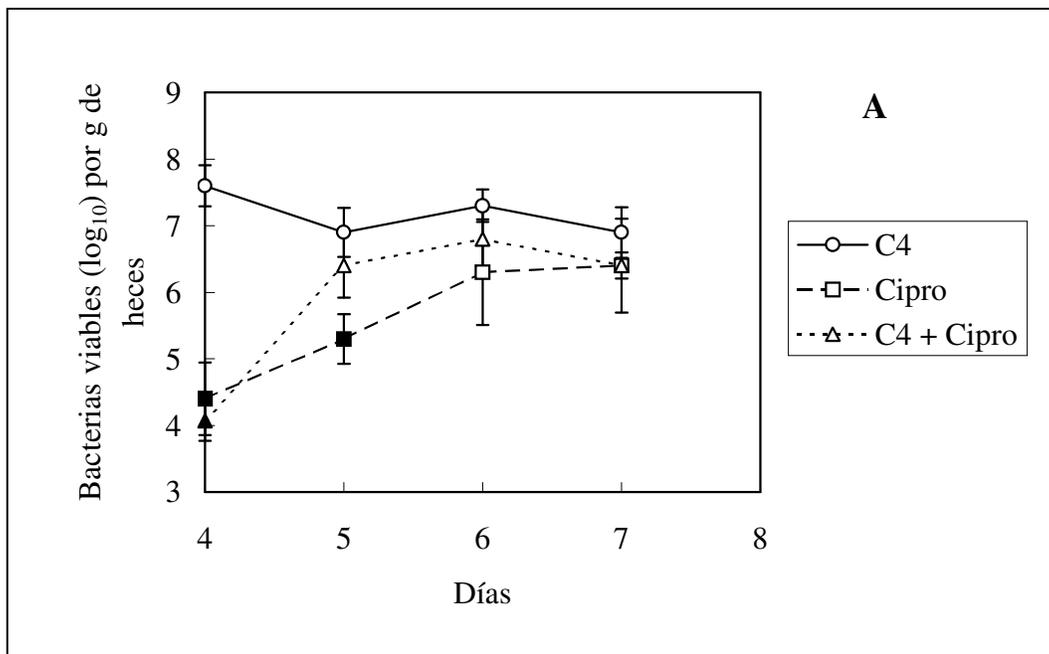


FIGURA 6.3. Efecto del tratamiento con ciprofloxacino (800 $\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}$) y con *L. plantarum* C4 en el coprocultivo cuantitativo. La administración de C4 se inició dos días antes que la del ciprofloxacino y se mantuvo hasta el final del ensayo (cinco días en total). Los resultados son promedios \pm desviación estándar de los recuentos de cinco animales por grupo, expresados como \log_{10} . *, diferencias significativas respecto del grupo testigo; **, diferencias significativas respecto del grupo que recibe C4 sólo.

Por último, se realizaron experimentos encaminados a evaluar si el tratamiento previo con ciprofloxacino mejoraba la capacidad de colonización de una dosis única de *L. plantarum* C4. El diseño consistió en mantener a los animales durante tres días con acceso libre a bebederos conteniendo una disolución de 160 $\mu\text{g}/\text{ml}$ del agente antimicrobiano en agua destilada estéril tras lo cual se retiraron los bebederos y cada animal recibió un único inóculo de C4 (alrededor de 10^8 bacterias/ratón/día) por canulación intraesofágica. Los resultados se muestran en la **Figura 6.4** y permiten examinar la persistencia del efecto del ciprofloxacino sobre la microbiota intestinal, una vez finalizado el tratamiento. Las diferencias entre los recuentos en TSA del grupo tratado con ciprofloxacino respecto del que recibió probiótico sólo (que no mostró

variaciones relevantes antes y después de haber recibido el inóculo) fueron significativas el día en que finaliza el tratamiento y 24 h más tarde; a partir de ahí los recuentos comenzaron a recuperar sus valores normales; la administración del probiótico aceleró ligera pero significativamente la recuperación de los recuentos en TSA (**Figura 6.4 A**). El pre-tratamiento con ciprofloxacino no afectó de forma sensible a la colonización por C4: las diferencias entre los datos representados en las **Figura 6.4 B** y **Figura 6.4 C** son mínimas; 24 h después del inóculo el 100% de los ratones excretaba en heces el latobacilo exógeno en cantidades similares en ambos grupos; a las 48 h, sólo un ratón sobre cuatro en cada grupo tuvo coprocultivo positivo en LPSM; a los tres días, un ratón del grupo pre-tratado con ciprofloxacino proseguía excretando C4 pero a niveles muy bajos.



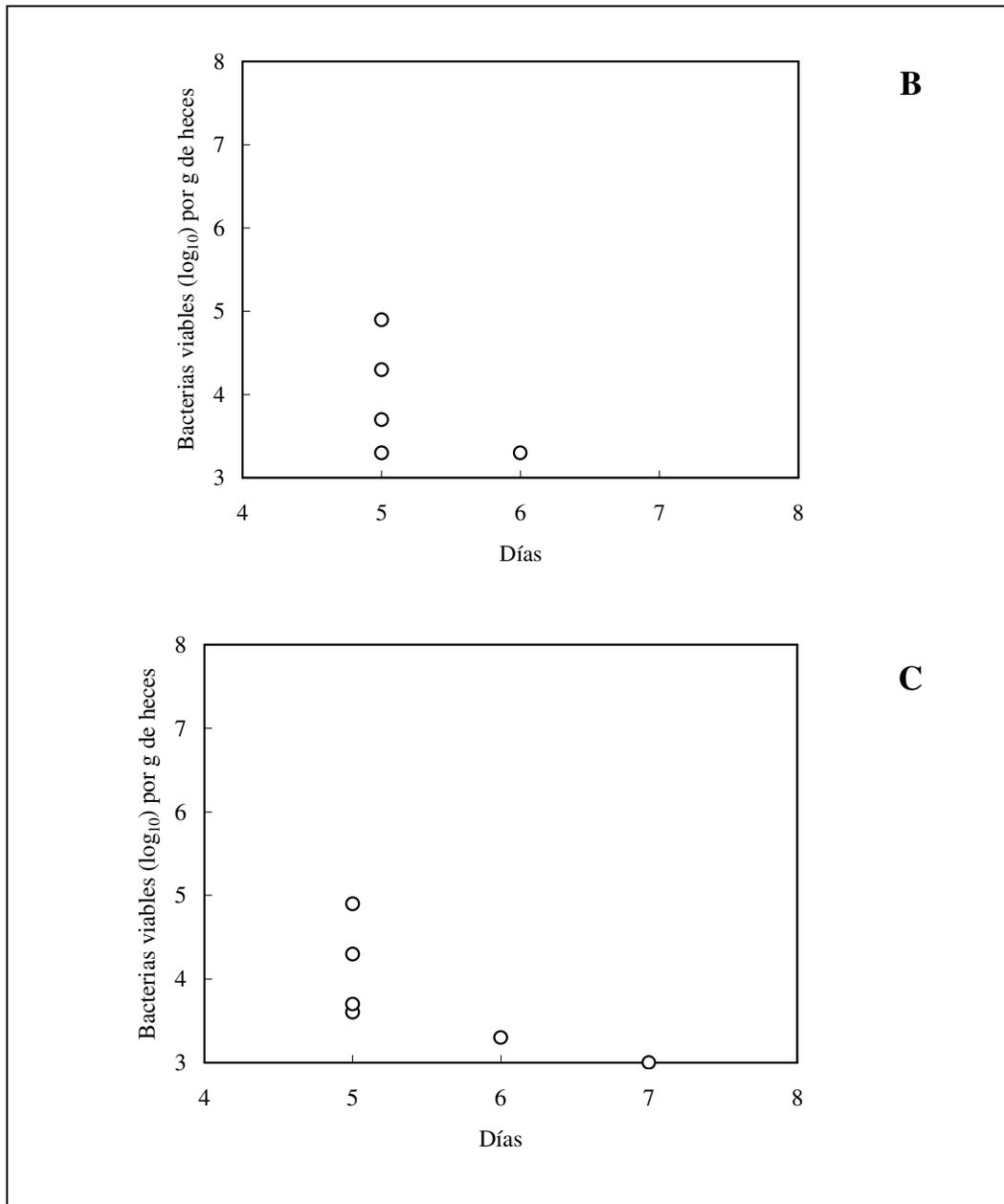


FIGURA 6.4. Efecto del tratamiento con ciprofloxacino (800 μ g/ratón/día, durante tres días) y con *L. plantarum* C4 (una única dosis el día cuatro) en el coprocultivo cuantitativo. (A), recuentos en TSA; los resultados son promedios \pm desviación estándar de los recuentos de cuatro animales por grupo, expresados como log₁₀; los círculos en negro indican diferencias estadísticamente significativas respecto de los animales que no recibieron el agente antimicrobiano. (B), recuentos individuales en LPSM de los animales que recibieron sólo el probiótico. (C), recuentos individuales en LPSM de los animales que recibieron el ciprofloxacino y el probiótico.

7. ANTIBIOSIS *IN VITRO*

Como se indicó en la Introducción (apartado 1.6.2), la antibiosis frente bacterias enteropatógenas es uno de los mecanismos propuestos para explicar la protección por microorganismos probióticos frente a infecciones intestinales. Por ello, las baterías de ensayos *in vitro* para determinar el potencial probiótico de una cepa incluyen pruebas rápidas y sencillas de antibiosis. En el presente trabajo, se realizaron pruebas de antibiosis en placa con las cepas C1 (*L. casei*) y C4 (*L. plantarum*). La notable actividad mostrada por la cepa C4 planteó el interés de profundizar en su estudio.

7.1. ANTIBIOSIS EN PLACA

Para estas pruebas, se emplearon como cepas productoras de antibiosis las cepas C1 y C4, y como cepas indicadoras los microorganismos enteropatógenos *Y. enterocolitica* O9, *S. enterica* serovar *Typhimurium* y *L. monocytogenes*. Adicionalmente, se utilizaron como indicadoras, una cepa endógena de *E. coli*, así como varias cepas de lactobacilos, incluyendo una cepa endógena de *L. acidophilus*. La **Figura 7.1** muestra los halos de inhibición obtenidos en una placa.



FIGURA 7.1. Ensayo de antibiosis en placa. Las bacterias que han crecido en dos zonas de descarga en la capa base inhibieron el crecimiento de la bacteria indicadora añadida al medio que forma la capa superior.

Los resultados de la determinación de los halos de inhibición obtenidos se muestran en la **Tabla 7.1**. Ambas cepas inhibieron a todas las cepas indicadoras, pero los halos de inhibición obtenidos con C4 fueron siempre mayores que los obtenidos con C1: el promedio para C4 fue de 51,4 mm, y para C1 fue de 40,4 y el test de Student para muestras pareadas indicó que esta relación fue claramente significativa ($P < 0.01$). Es interesante resaltar que cada una de las dos cepas estudiadas como productoras de antibiosis, fue capaz de inhibirse a sí misma. Esto puede explicar la dificultad observada

en el presente estudio, para conseguir inóculos de C1 y C4 en medio líquido con elevados números de bacterias viables por ml. Adicionalmente, si el mismo fenómeno de autoinhibición se presentase *in vivo*, podría constituir un límite para el establecimiento de comunidades numerosas de estos lactobacilos, una vez alcanzado el intestino.

Tabla 7.1. Actividad antimicrobiana de dos cepas de *Lactobacillus*

Bacteria indicadora	Tamaño del halo (mm) producido por:	
	<i>L. plantarum</i>	<i>L. casei</i>
<i>L. plantarum</i> C4	26.0 ± 1.00	16.0 ± 2.00
<i>L. casei</i> C1	30.7 ± 1.15	27.3 ± 1.15
<i>L. acidophilus</i> endógeno	41.0 ± 2.00	27.3 ± 1.15
<i>L. monocytogenes</i>	45.3 ± 0.58	41.0 ± 1.00
<i>S. enterica</i> serovar Typhimurium CECT4157	68.7 ± 1.53	64.0 ± 1.73
<i>Y. enterocolitica</i> IP383	84.0 ± 1.00	65.3 ± 0.58
<i>E. coli</i> endógeno	64.3 ± 1.53	41.7 ± 0.58

Los resultados son el promedio ± la desviación estándar de tres medidas

7.2. ANTIBIOSIS CON SOBRENADANTES

Se decidió profundizar en el estudio de la antibiosis por la cepa C4 de *L. plantarum*, para obtener información sobre su naturaleza. En primer lugar, se examinó la actividad inhibidora de los sobrenadantes de crecimiento en medio LMRS líquido, con un método semicuantitativo, como se ha descrito en Material y Métodos. Los resultados de estos ensayos se muestran en la **Tabla 7.2**. Se observa que las cuatro

cepas de enterobacterias ensayadas mostraron una sensibilidad similar frente al sobrenadante. Los tres lactobacilos fueron más resistentes, especialmente las dos cepas probióticas. Sin embargo, esta técnica confirmó que la bacteria productora de antibiosis fue sensible a su propia actividad inhibidora.

Tabla 7.2. Actividad inhibidora del crecimiento bacteriano en el sobrenadante de cultivo de C4

Bacteria indicadora	Título
<i>L. plantarum</i> C4	2
<i>L. casei</i> C1	2
<i>L. acidophilus</i> endógeno C15	4
<i>E. coli</i> endógeno C17	8
<i>Y. enterocolitica</i> IP383	8
<i>L. monocytogenes</i>	8
<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>	8

Se realizaron diluciones dobladas en TSB del sobrenadante de cultivo de C4 en LMRS líquido. Se tomó como título la inversa de la mayor dilución que inhibió el crecimiento de la bacteria indicadora

El procedimiento de semicuantificación por diluciones se aplicó a una serie de ensayos para establecer la influencia de diversos factores como el tiempo de cultivo, el pH del sobrenadante y el calentamiento del sobrenadante sobre la actividad antibacteriana objeto de estudio. Los resultados de estos ensayos se presentan conjuntamente en la **Tabla 7.3.**

Tabla 7.3. Factores que afectan a la actividad inhibidora en los sobrenadantes de C4

Sobrenadante	pH	Tratamiento térmico ^a	Título con las bacterias que se indican ^b	
			<i>Y. enterocolitica</i>	<i>S. enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i>
LMRS 24 h	5.2	No	8	8
	7.0 ^c	No	4	2
LMRS 72 h	5.0	No	16	8
	7.0 ^c	No	4	4
TSB 24 h	6.1	No	< 2	< 2
	7.0 ^c	No	< 2	< 2
TSB 72 h	6.0	No	< 2	< 2
LMRS 24 h	5.2	Sí	4	ND
TSB 24 h	6.1	Sí	< 2	ND
TSBD ^d 24 h	6.0	No	2	< 2
LMRS Sin ^e	6.5	No	< 2	< 2
	4.0 ^f	No	8	4
	3.0 ^f	No	8	8
TSB Sin ^e	7.1	No	< 2	< 2

^a Calentamiento en autoclave a 110°C durante 30 minutos.

^b Se tomó como título la mayor dilución de sobrenadante que inhibió completamente el crecimiento de la cepa indicadora.

^c pH neutralizado por adición de NaOH.

^d TSBD, TSB suplementado con dextrosa hasta alcanzar 20g/l.

^e Sin crecimiento de C4, medio estéril utilizado como control.

^f Medio estéril, acidificado por adición de HCl

Se observa que los controles realizados con los medios LMRS líquido y TSB estériles no inhibieron el crecimiento de C4. Es llamativo que los sobrenadantes de cultivos de C4 en TSB no tuvieron efecto inhibitor. En cuanto a los sobrenadantes de cultivo en caldo LMRS se observó un moderado efecto del tiempo de incubación sobre la actividad antimicrobiana: los sobrenadantes de cultivos de 72 h tuvieron una actividad inhibitora sobre *Y. enterocolitica* ligeramente mayor (título 16) que los sobrenadantes de cultivos de 24 h (título 8). Dado que este incremento de actividad no se observó frente a *S. enterica* serovar *Typhimurium*, su significación biológica es dudosa. Una posible causa de la actividad inhibitora sería el descenso del pH a lo largo del crecimiento de C4 en LMRS líquido, que coincidió en ser también muy modesto: el pH del sobrenadante del cultivo de 24 h fue de 5.2 y el del cultivo de 72 h fue de 5.0. Se deduce por tanto que los efectos del tiempo de cultivo sobre el pH y la actividad inhibitora fueron muy pequeños. Ello no excluye que la actividad antimicrobiana se deba a la acidificación del medio: de hecho el medio LMRS líquido acidificado con HCl 0.15 N tuvo una capacidad inhibitora parecida, aunque algo inferior a la de los sobrenadantes de los cultivos de 24 y 72 h. Cuando estos sobrenadantes se neutralizaron hasta pH 7.0, su actividad inhibitora disminuyó pero persistió. De estos ensayos se deduce que la actividad inhibitora del crecimiento presente en los sobrenadantes de cultivos de C4 en LMRS líquido parece deberse al menos a dos factores: el pH ácido y una hipotética sustancia antimicrobiana. Dado que el calentamiento en autoclave del sobrenadante del cultivo de C4 en LMRS líquido redujo la actividad antimicrobiana, manteniéndose constante el pH ácido, cabe pensar que la hipotética sustancia antimicrobiana sea termolábil. El descenso de pH en los cultivos de C4 se debe a los productos de la fermentación de la dextrosa; dado que este medio contiene ocho veces

más dextrosa que el TSB, ésta podría ser la explicación de la ausencia de actividad en los sobrenadantes de TSB, cuyo pH es ciertamente más alto. Sin embargo, la suplementación del TSB con dextrosa, hasta igualar el contenido del LMRS, no tuvo como resultado que el crecimiento de C4 disminuyera sensiblemente el pH del sobrenadante ni produjera actividad antibacteriana. Hay que considerar que el pH de partida en el TSB fue de 7.1, mientras que en el LMRS es de 6.5; además es posible que el TSB tenga un poder amortiguador superior al del LMRS. Aún admitiendo estas explicaciones, se desconoce por qué la hipotética sustancia antibacteriana producida por C4 cuando crece en LMRS líquido no esté presente en el sobrenadante de TSB.

8. RESISTENCIA A INFECCIONES INTESTINALES

La protección frente a infecciones por bacterias y virus enteropatógenos es uno de los efectos clásicamente atribuido a los microorganismos probióticos. Dado que, como ya se ha indicado en el capítulo de Introducción (apartado 1.6.2), la antibiosis es uno de los mecanismos propuestos para explicar este efecto, y que la cepa C4 de *L. plantarum* demostró ejercer una potente acción inhibidora del crecimiento de bacterias enteropatógenas *in vitro*, se planeó investigar la capacidad de esta cepa para interferir con diversos modelos murinos de infección intestinal. En todos los experimentos incluidos en este capítulo, los animales tratados con probiótico recibieron inóculos diarios conteniendo entre 5×10^8 y 10^9 lactobacilos viables por ratón.

8.1. INFECCIÓN EXPERIMENTAL CON *Y. enterocolitica* O9

El modelo de infección de ratones BALB/c con el serotipo O9 de *Y. enterocolitica*, ha sido extensamente estudiado en nuestro Laboratorio [Ruiz-Bravo *et al.* 1999]. Se trata de un serotipo de moderada patogenicidad, capaz de causar, tanto en humanos como en ratones, una infección intestinal prolongada, con sintomatología escasa o nula, pero con importantes repercusiones en la inmunidad [Ruiz-Bravo *et al.*,

2001], y que puede monitorizarse fácilmente por coprocultivo en medios selectivos para esta bacteria [Ruiz-Bravo *et al.* 1999]. El procedimiento clásico de infección del ratón por vía oral (libre acceso a una suspensión de yersinias viables en agua, dispuesta en el bebedero) ha sido sustituido por el método, más exacto, de canulación intragástrica [Ruiz-Bravo *et al.*, 2003].

Para investigar la posible interferencia de *L. plantarum* C4 con la infección por la cepa IP383 de *Y. enterocolitica* O9, se diseñó un experimento en el que se incluyeron tres grupos de tres ratones cada uno: un grupo sin tratamiento probiótico, que fue infectado el día 0 con la cepa IP383 de *Y. enterocolitica* O9; un segundo grupo que recibió tratamiento diario con *L. plantarum* C4, comenzando el día -6 (seis días antes de la infección con IP383) y durante todo el tiempo de duración del experimento; y un tercer grupo que inició el tratamiento con C4 el día +2 (dos días después de la infección con IP383) para continuarlo también, diariamente, durante todo el resto del experimento. Por tanto, en uno de los grupos se investigó el posible efecto preventivo de C4 frente a la instauración de la bacteria enteropatógena, mientras que en el otro se examinó el posible efecto terapéutico. El inóculo de IP383, ajustado por turbidimetría, contenía 2.0×10^9 bacterias viables por ml; por tanto, cada ratón en todos los grupos recibió 2.0×10^8 yersinias el día 0. La intensidad y eficiencia de la infección intestinal en los animales de cada grupo se monitorizó mediante coprocultivo en agar Yersinia, los días 5, 10, 15 y 25 después de la inoculación con IP383. Los resultados de estos coprocultivos se persentan en la **Figura 8.1**. En todos los casos, los coprocultivos fueron positivos para *Y. enterocolitica* en todos los animales infectados en cada grupo (los coprocultivos rutinarios de control realizados a animales no infectados en el medio selectivo para *Y. enterocolitica* fueron siempre negativos, corroborando que se trata de

animales libres de patógenos específicos). No se observó ninguna diferencia significativa en los niveles de excreción fecal de yersinias entre los tres grupos experimentales, es decir, la administración de C4 no tuvo efecto preventivo ni terapéutico.

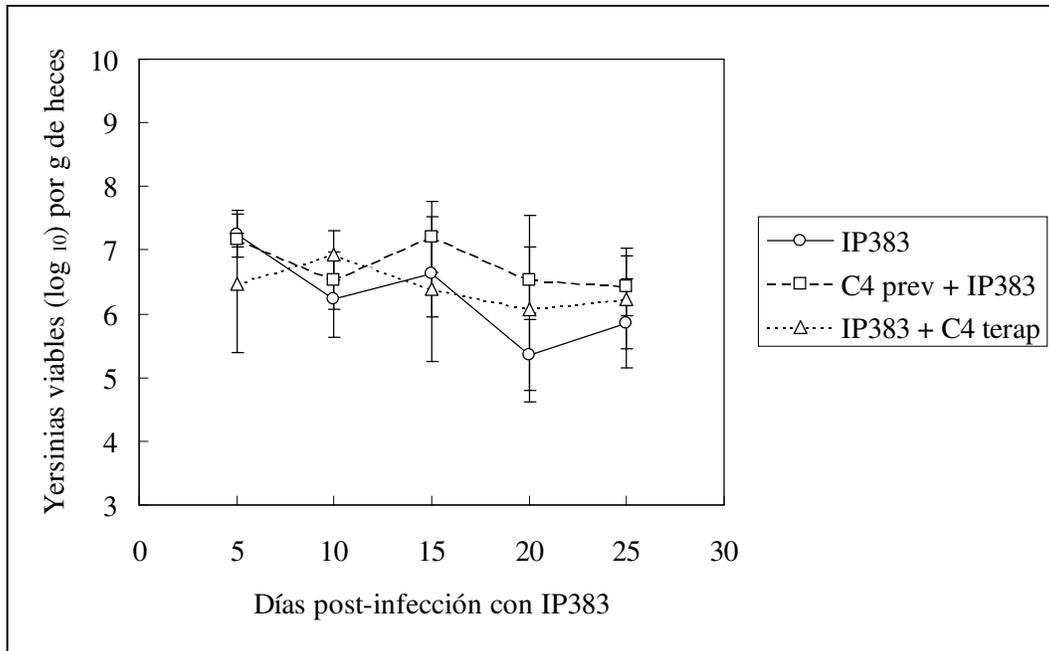


FIGURA 8.1. Excreción fecal de yersinias en animales infectados con *Y. enterocolitica* O9 (cepa IP383), sin probiótico y con tratamiento preventivo (prev) o terapéutico (terap) con *L. plantarum* C4. Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar de los recuentos fecales de tres animales, calculados como \log_{10} .

Ante la ausencia de efecto protector por C4 frente a la infección por un patógeno moderado como *Y. enterocolitica* O9, que había mostrado una notable sensibilidad *in vitro* a la actividad antimicrobiana del probiótico, se planteó la posibilidad de que se estuviese utilizando un inóculo excesivo de la bacteria enteropatógena. Para examinar esta interpretación, se decidió realizar experimentos previos para fijar una dosis mínima de IP383, capaz de infectar alrededor del 50% de los animales inoculados, y con la cual se pudiese revelar incluso un efecto protector modesto de la bacteria probiótica, que

pasase desapercibido con dosis infectantes mayores. La **Figura 8.2** muestra los resultados de uno de estos experimentos. En todas las pruebas realizadas, dosis muy próximas a 10^6 yersinias por ratón infectaron entre un 40% y un 60% de los animales inoculados. Los recuentos de los animales infectados a los cinco días de la infección, se situaron por encima de 10^5 yersinias viables por g de heces y tendieron a aumentar a los 10 días, lo que parece indicar que en los animales infectados con inóculos bajos, las yersinias, una vez iniciada la colonización, incrementan su población hasta alcanzar niveles próximos a los que se establecen en animales infectados con inóculos mayores. La dosis de 10^6 yersinias viables por ratón se eligió para los siguientes ensayos de protección.

El experimento presentado en la **Figura 8.3** se realizó con dos grupos de 10 ratones cada uno (el uso de un número mayor de animales incrementa las posibilidades de detectar como significativas diferencias moderadas entre ambos grupos). Ambos grupos fueron infectados el día 0 con un inóculo que contenía 1.1×10^6 yersinias viables por ratón. Un grupo recibió tratamiento diario con C4, iniciado el día -5 y terminado el 20. Se realizaron coprocultivos los días 5, 10 y 20 después de la infección. El 40% de los animales del grupo control resultó infectado (coprocultivos positivos para *Y. enterocolitica*), porcentaje que se elevó en el grupo tratado al 60%. Por tanto, en este parámetro no se observó protección por el probiótico. En cuanto a los niveles de excreción fecal de yersinias en los animales infectados, el tratamiento con C4 disminuyó el recuento respecto de los controles en el quinto día, rozando la significación estadística; a los diez días, los recuentos se aproximaron, y en el día 20 ambos grupos alcanzaron promedios similares.

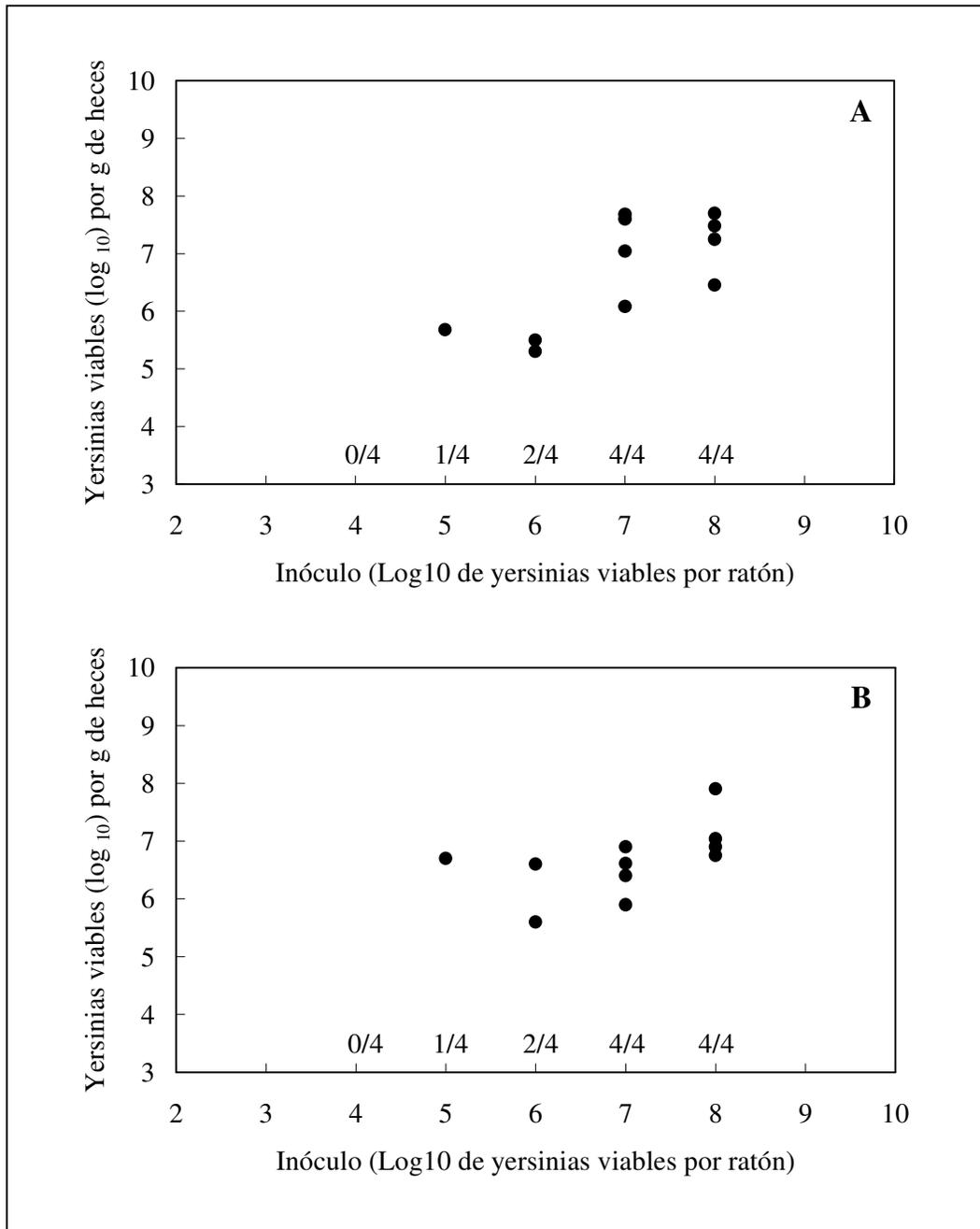


FIGURA 8.2. Excreción fecal de yersinias viables en ratones infectados con dosis seriadas de IP383. Los coprocultivos se realizaron a los cinco (A) y diez (B) días después de la infección. Cada punto representa el \log_{10} del recuento individual correspondiente a un ratón. Las fracciones situadas sobre cada inóculo en abscisas representan el número de animales infectados sobre el total de animales en el grupo.

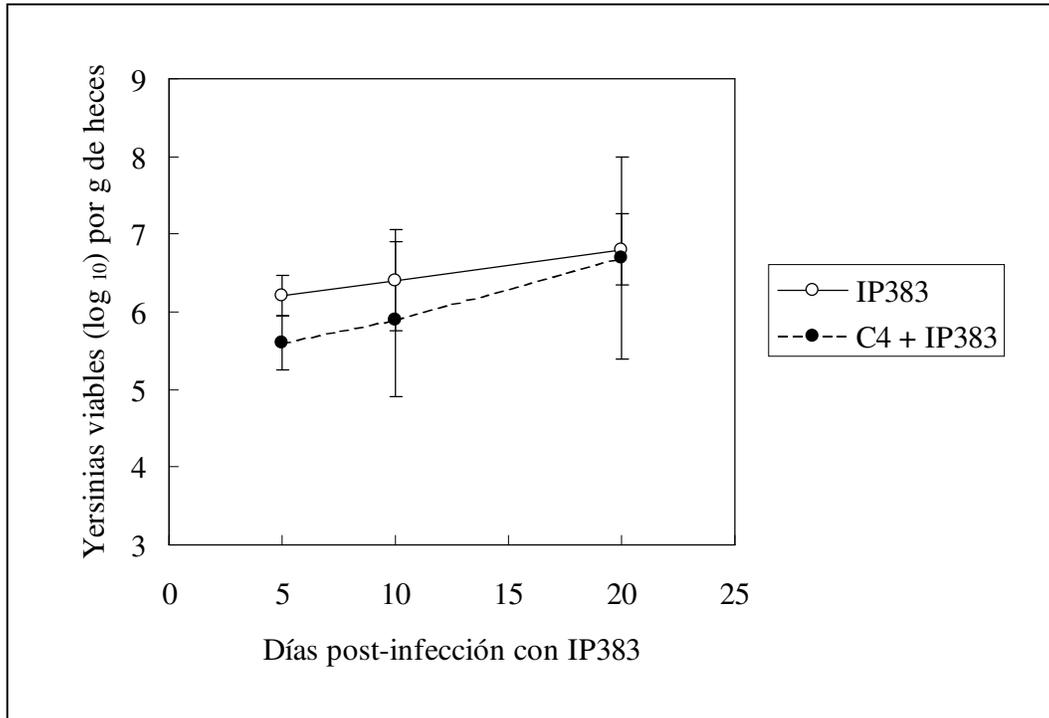


FIGURA 8.3. Efecto del tratamiento con *L. plantarum* C4 en la infección con *Y. enterocolitica* IP383. Las fracciones situadas sobre la marca de cada día en abscisas representan el número de animales infectados sobre el total de animales, en el grupo control (parte superior de la figura), y en el grupo tratado con C4 (parte inferior de la figura). Los resultados se expresan como promedio \pm desviación estándar de los recuentos fecales de los animales infectados e cada grupo, calculados como \log_{10} .

Por tanto, los resultados obtenidos no evidenciaron ningún efecto protector significativo de la cepa C4 de *L. plantarum* sobre la infección experimental con *Y. enterocolitica* O9, ni siquiera en aquellos ensayos en los que se utilizó un inóculo de yersinias reducido, que infectó solo a un 40% de los animales no tratados con el probiótico.

8.2. INFECCION EXPERIMENTAL CON *S. enterica* serovar *Typhimurium* Y CON *L. monocytogenes*

Aunque los ratones BALB/c son susceptibles a la infección experimental por vía intragástrica con *S. enterica* serovar *Typhimurium* [Lockman y Curtiss, 1990] y con *L. monocytogenes* [Saklani-Jusforgues *et al.*, 2001], los ensayos previos realizados en nuestro Laboratorio evidenciaron la necesidad de usar inóculos muy elevados, que ocasionaban una mortalidad dispar y muy extendida en el tiempo, lo que no permitió plantear experimentos basados en el uso de dosis letales de ambas bacterias para evaluar la posible protección por una bacteria probiótica. Se recurrió a un modelo alternativo, en el que se midió la traslocación de ambas bacterias enteropatógenas a través de la mucosa intestinal. La evaluación de la infección se realizó determinando el número de bacterias viables presentes en los ganglios mesentéricos (drenadas desde la lámina propia, la submucosa y las placas de Peyer) y en el bazo (depuradas de la sangre), y, en el caso de *S. enterica* serovar *Typhimurium*, también en contenido colorrectal.

En experimentos previos se estableció la existencia de traslocación con ambas bacterias en ratones BALB/c no sometidos a ningún tratamiento previo; el tiempo óptimo para conseguir recuentos positivos en bazo y en ganglios mesentéricos se fijó en el tercer día después de la infección (datos no mostrados).

Para investigar el posible efecto protector de las cepas C1 y C4 frente a la traslocación intestinal de *S. enterica* serovar *Typhimurium* y de *L. monocytogenes*, se utilizó un diseño común: un grupo control de animales infectados con la bacteria enteropatógena; y sendos grupos que recibieron pretratamiento con cada una de las

cepas probióticas, que fueron administradas diariamente desde seis días antes de la infección.

En la **Figura 8.4** se presentan los resultados de un ensayo de protección frente a *S. enterica* serovar *Typhimurium* (**8.4A**) y *L. monocytogenes* (**8.4B**).

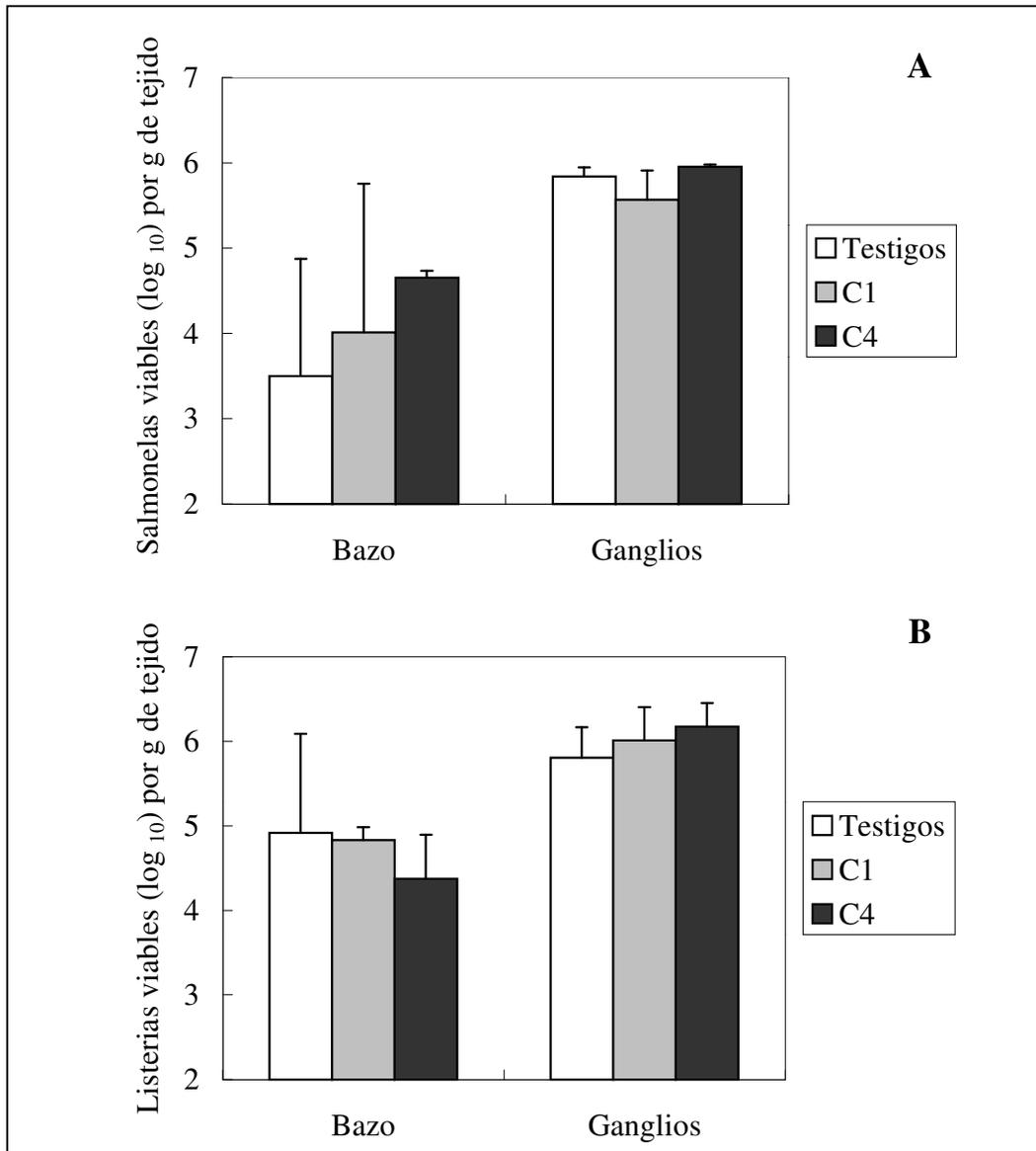


FIGURA 8.4. Traslocación de *S. enterica* serovar *Typhimurium* (A) y *L. monocytogenes* (B) en ratones pretratados con *L. casei* (C1) y *L. plantarum* (C4). El pretratamiento se mantuvo durante seis días antes de la infección. Los resultados se expresan como promedio + desviación estándar de las determinaciones en tres animales.

Los inóculos infectantes fueron 4×10^9 salmonelas viables por ratón y 1×10^9 listerias viables por ratón respectivamente. En ninguno de los casos se encontraron diferencias significativas debidas al pretratamiento con las cepas probióticas.

La ausencia de protección tras un periodo de pretratamiento de seis días, se interpretó en el sentido de que no hubo un efecto de antibiosis *in vivo* paralelo al observado *in vitro* (capítulo 7). Como la protección frente a enteropatógenos puede deberse a otros mecanismos alternativos, especialmente la estimulación de la inmunidad, que probablemente requiera un tiempo mayor de presencia de la cepa probiótica en el intestino, se realizó un nuevo ensayo de protección frente a *S. enterica* serovar *Typhimurium* (dosis infectante 3×10^9), en el que las cepas probióticas se administraron diariamente durante 20 días antes de la infección.

Los resultados de este experimento se presentan en la **Figura 8.5**. En este caso, aunque tampoco se obtuvieron diferencias significativas, los pretratamientos tendieron a reducir el número de bacterias enteropatógenas, rozándose el nivel de significación en la diferencia de recuentos de salmonelas en ganglios mesentéricos entre el grupo testigo y el grupo pretratado con *L. plantarum* C4. Cabe interpretar que el tratamiento con esta cepa probiótica pudo estimular mecanismos inmunitarios, lo que se tradujo en un cierto nivel de protección frente a la infección. En apoyo de este argumento hay que señalar que los altos valores de desviación estándar obtenidos como consecuencia de la heterogeneidad de los resultados intragrupalos dificultó que se alcanzasen niveles de significación estadística.

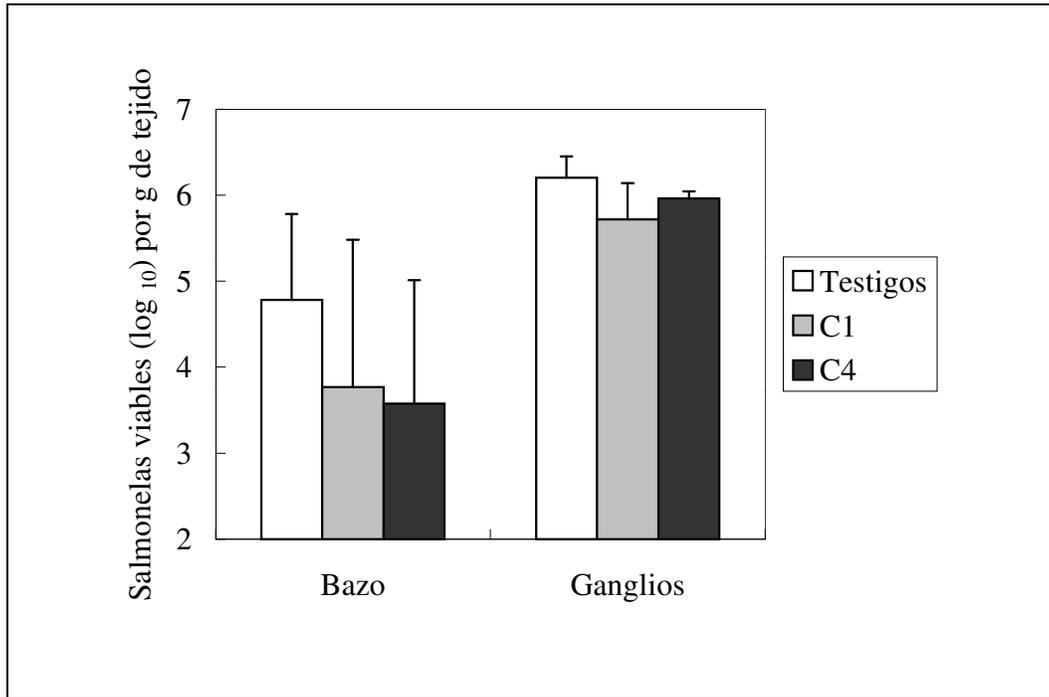


FIGURA 8.5. Traslocación de *S. enterica* serovar *Typhimurium* en ratones sometidos a pretratamiento de larga duración con *L. casei* (C1) y *L. plantarum* (C4). El pretratamiento se mantuvo durante 20 días antes de la infección. Los resultados se expresan como promedio + desviación estándar de las determinaciones en tres animales.

9. EFECTOS SOBRE EL SISTEMA INMUNE

Para evaluar la capacidad de las cepas C1 y C4 para modificar mecanismos inmunitarios, se recurrió a medir distintos parámetros. Como pruebas *in vivo*, se determinaron los niveles de leucocitos en sangre periférica y el número de esplenocitos, y mediante ensayos *ex vivo*, la capacidad de los esplenocitos para proliferar y producir citokinas en respuesta a mitógenos de células B (LPS) y células T (Con A). Adicionalmente, se investigaron los niveles de citokinas plasmáticas en un modelo murino de *shock* endotóxico. Todos estos ensayos se realizaron siguiendo diseños apropiados para examinar el efecto del tratamiento con las cepas probióticas en ratones inmunológicamente intactos y ratones inmunocomprometidos por tratamiento con ciclofosfamida. El modelo de inmunosupresión con ciclofosfamida ha sido previamente estudiado en nuestro Laboratorio [Jimenez-Valera *et al.*, 2003] y cursa con leucopenia, que persiste al menos cuatro días desde la última inyección; esplenocitopenia, también en los cuatro días posteriores a la última inyección, que sobre el día séptimo se invierte, pasando a esplenomegalia; y supresión de la respuesta proliferativa de los esplenocitos, más acusada en los linfocitos B que en los T.

9.1. EFECTOS EN EL NUMERO DE LEUCOCITOS PERIFÉRICOS Y DE ESPLENOCITOS

Se dispusieron cuatro grupos de 12 animales cada uno, distribuidos del siguiente modo: testigos, tratados con la cepa probiótica, tratados con ciclofosfamida y tratados con ciclofosfamida y con la cepa probiótica. La administración de la bacteria probiótica se inició 10 días antes de la primera inyección de ciclofosfamida y continuó diariamente durante todo el experimento. Las dosis de probiótico se mantuvieron siempre entre 5×10^8 y 10^9 lactobacilos viables por ratón. Se sacrificaron cuatro animales por grupo, los días 15, 18 y 25 después del inicio del experimento, que corresponden a los días 1, 4 y 11 después de la última inyección con ciclofosfamida, y se realizaron los recuentos de leucocitos periféricos y esplenocitos. Se comparan entre sí, el grupo testigo con el que recibió el probiótico (para establecer el posible efecto del probiótico sobre un organismo inmunológicamente intacto), y el tratado con ciclofosfamida con el que recibió el tratamiento combinado de probiótico más ciclofosfamida (para examinar el posible efecto del probiótico sobre un organismo inmunocomprometido).

9.1.1. Efectos de *L. casei* C1

La **Figura 9.1** representa los efectos de la administración de C1, de ciclofosfamida y de la combinación de ambos tratamientos en la evolución de los recuentos de leucocitos en sangre periférica y de esplenocitos. La única diferencia significativa se observó en el día 1, entre el promedio de esplenocitos de ratones tratados con ciclofosfamida y el de ratones tratados con C1 y ciclofosfamida, pero este aparente efecto protector de C1 no se extendió a los restantes días.

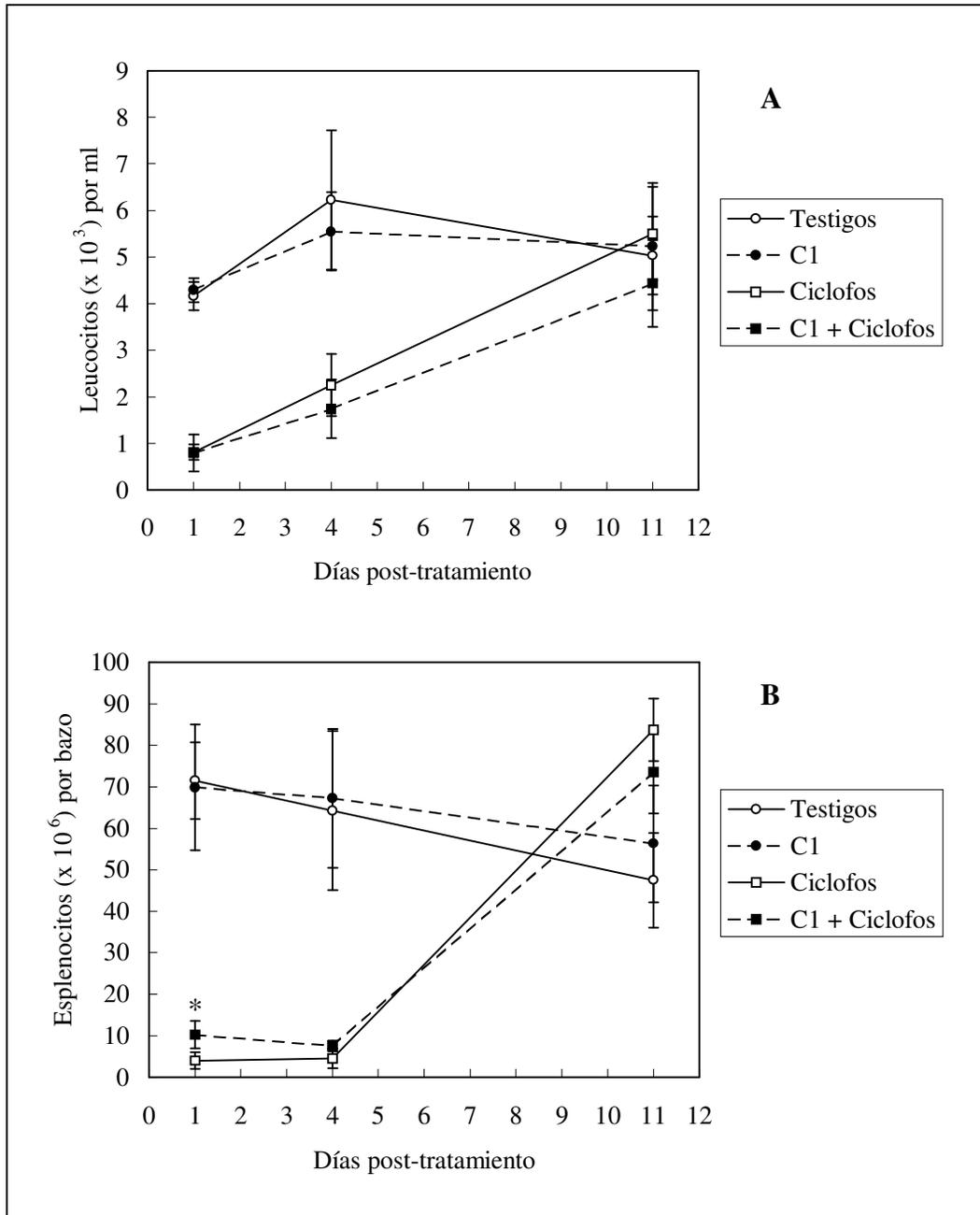


FIGURA 9.1. Recuentos de leucocitos periféricos (A) y esplenocitos (B) en ratones testigos y tratados con *L. casei* C1, ciclofosfamida (ciclofos) y combinación de C1 y ciclofosfamida. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de los recuentos de cuatro animales. *, diferencia significativa ($P < 0.03$) entre el recuento de esplenocitos del grupo tratado con ciclofosfamida y el grupo que recibió C1 y ciclofosfamida.

9.1.2. Efectos de *L. plantarum* C4

Como muestra la **Figura 9.2**, la administración de C4 no modificó significativamente los recuentos de leucocitos en sangre periférica ni los de esplenocitos, ya sea en animales inmunológicamente intactos o en animales inmunosuprimidos.

9.2. EFECTOS EN LA PROLIFERACIÓN DE ESPLENOCITOS EN RESPUESTA A MITÓGENOS

Los animales incluidos en estos ensayos fueron los mismos utilizados para las determinaciones de leucocitos periféricos y esplenocitos descritas en el apartado anterior.

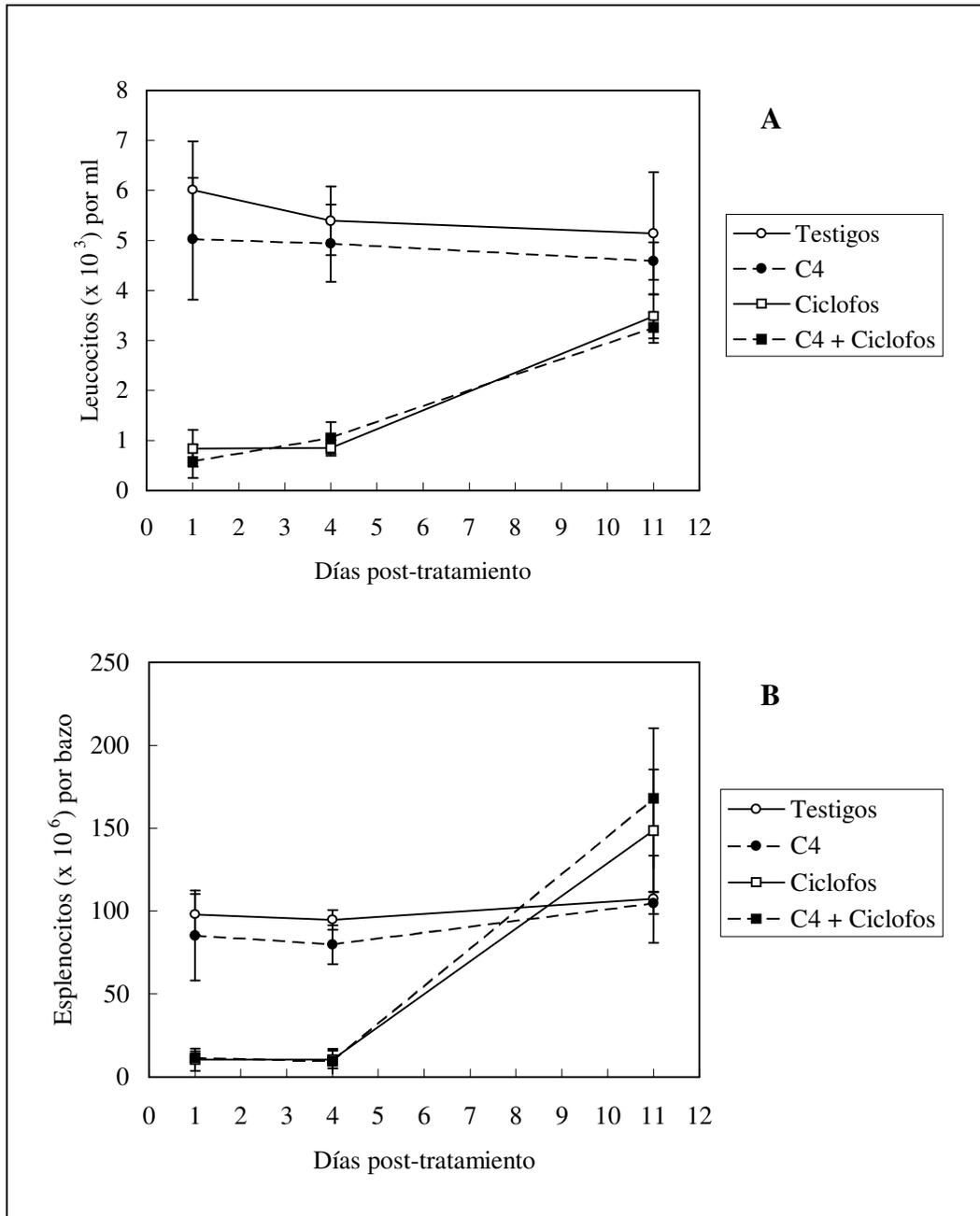


FIGURA 9.2. Recuentos de leucocitos periféricos (A) y esplenocitos (B) en ratones testigos y tratados con *L.plantarum* C4, ciclofosfamida (ciclofos) y combinación de C4 y ciclofosfamida. Cada punto representa el promedio \pm desviación estándar de los recuentos de cuatro animales.

9.3. EFECTOS EN LA PRODUCCION DE CITOKINAS *EX VIVO*

Como en los diseños anteriores, se dispusieron cuatro grupos de animales (testigos, tratados con probiótico, tratados con ciclofosfamida y tratados con probiótico y con ciclofosfamida). La administración diaria del probiótico se prolongó durante 15 días; en los tres últimos, se llevó a cabo el tratamiento con ciclofosfamida, y un día después de la segunda inyección de ciclofosfamida, los animales fueron sacrificados para poner sus esplenocitos en cultivo en presencia de LPS o Con A y medir los niveles de citokinas como se ha descrito en el apartado 3.12. Como en los casos anteriores, las comparaciones se establecieron entre los cultivos de células de animales testigos y animales tratados con probiótico, por una parte, y animales tratados con ciclofosfamida y animales que recibieron probiótico y ciclofosfamida, por otro.

9.4. EFECTOS EN LA PRODUCCION *IN VIVO* DE CITOKINAS EN UN MODELO DE *SHOCK* ENDOTOXICO

Se mantuvo el mismo diseño experimental que en el apartado anterior. Al día siguiente a la última inyección de ciclofosfamida, cada animal recibió una dosis de 500 mg de LPS por Kg de peso corporal, por vía intraperitoneal. Esta dosis letal induce un *shock* endotóxico, con producción masiva de citokinas proinflamatorias. A las 6 h de la inyección de LPS, se procedió a la extracción de sangre incoagulada para la separación del plasma, en el que se procedió a determinar los niveles de citokinas.

10. BIOSEGURIDAD

El uso de bacterias vivas como probióticos hace necesario comprobar su inocuidad para el hospedador. Los ensayos de bioseguridad pueden llegar a ser muy complejos [Fernández *et al.*, 2005; Anadón *et al.*, 2006], pero en el contexto del presente estudio parece suficiente establecer que las bacterias utilizadas no son capaces de causar infección en animales inmunocomprometidos. Para ello, se diseñó un ensayo exigente, en el que los animales inmunosuprimidos con ciclofosfamida, según el protocolo utilizado a lo largo del trabajo, recibieron un inóculo elevado (entre 1×10^7 y 5×10^7 bacterias viables por ratón) de las bacterias a probar por vía intravenosa 24 h después de recibir la segunda dosis de ciclofosfamida.

Dado que con las dosis utilizadas no se observó letalidad en ningún caso, se repitieron los ensayos, con animales inmunológicamente intactos y animales inmunocomprometidos que fueron sacrificados en días sucesivos después de la inoculación intravenosa para extraer los bazo y determinar las bacterias viables retenidas en ellos según los procedimientos ya descritos. La **Figura 10.1** muestra los resultados de un ensayo en el que los inóculos exactos fueron 1.9×10^7 bacterias viables por ratón para la cepa C1 y 3.8×10^7 bacterias viables por ratón para la cepa C4.

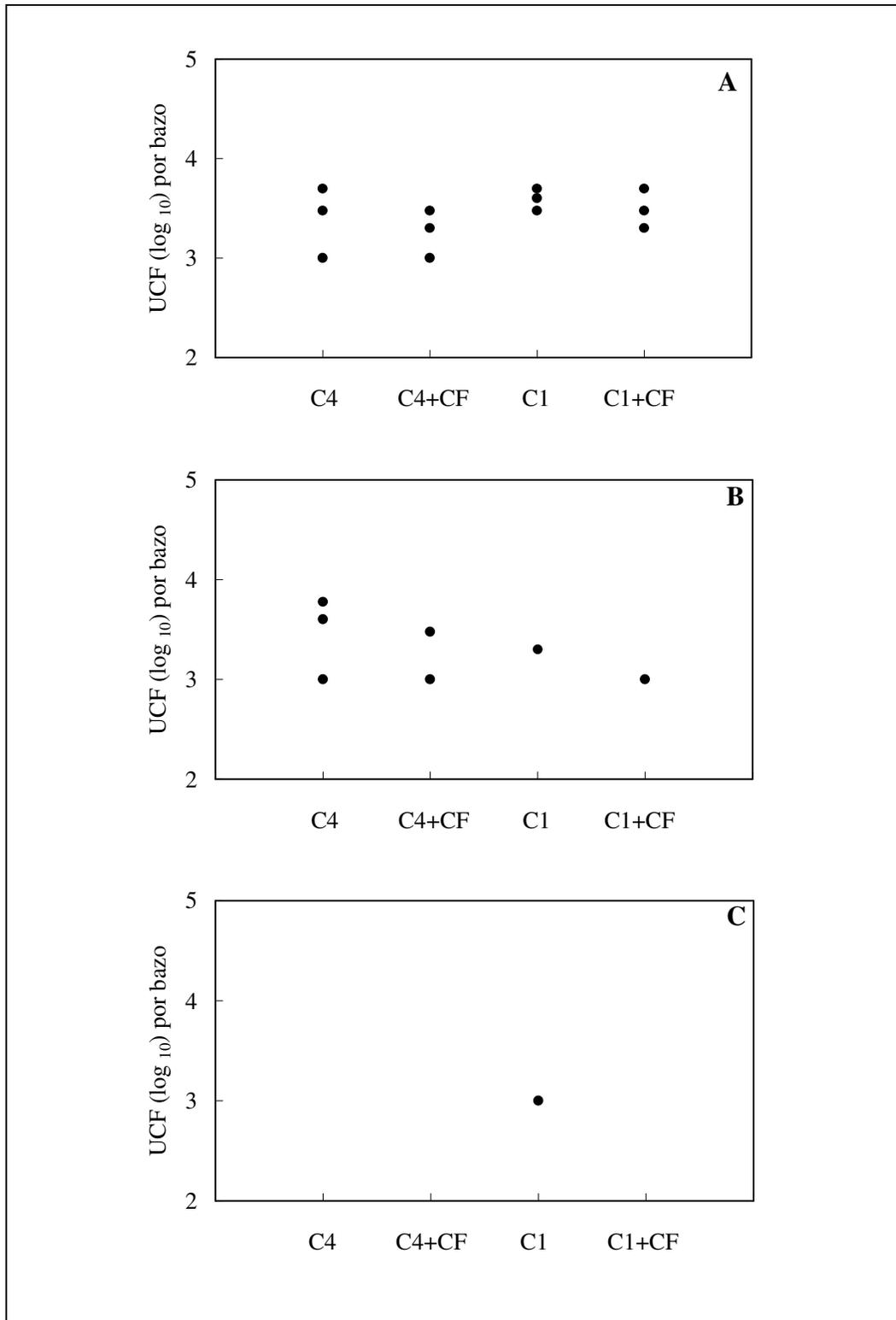


FIGURA 10.1. Recuperación de bacterias viables del bazo de ratones inmunológicamente intactos e inmunocomprometidos, sacrificados uno (A), dos (B) y tres (C) días después de la inoculación. Cada punto representa el recuento individual del bazo de un ratón. Cada grupo constaba de tres ratones. C4 y C1 designan a las correspondientes cepas de *L. plantarum* y *L. casei*. CF significa Ciclofosfamida.

En todos los grupos experimentales, los recuentos obtenidos en un mismo día para cada una de las cepas resultaron similares y decayeron con rapidez de forma que el tercer día sólo un ratón, inmunológicamente intacto, tratado con la cepa C1 dio recuento positivo. En el cuarto día nunca se obtuvieron recuentos positivos (datos no mostrados).

11. DISCUSSION

En el presente trabajo, se ha procedido al aislamiento de bacterias del ácido láctico, a partir de derivados lácteos fermentados comerciales publicitados como alimentos suplementados con bacterias probióticas. Se seleccionaron dos cepas, apropiadamente identificadas como *L. casei* (cepa C1) y *L. plantarum* (cepa C4). Ambas cepas mostraron su potencial probiótico en pruebas *in vitro* de resistencia a pH ácido y a bilis, adherencia a células de epitelio intestinal y antibiosis.

11.1. POTENCIAL PROBIOTICO DE LAS CEPAS ESTUDIADAS

Los mecanismos que diversos grupos de bacterias Gram-positivas pueden poner en juego para resistir el pH ácido son bien conocidos (bomba de extrusión de protones, descarboxilación del glutamato, transporte electrogénico, protección o reparación de macromoléculas, modificaciones en la membrana citoplásmica, producción de compuestos alcalinos, utilización de factores sigma alternativos, formación de biofilms, alteraciones en vías metabólicas) [revisado por Cotter e Hill, 2003]. Sin embargo, no

poseemos información sobre los mecanismos concretos responsables de la resistencia en las especies *L. casei* y *L. plantarum*. La reducción del número de bacterias viables en alrededor de dos unidades de logaritmo, tras media hora de incubación a un pH similar al gástrico, subraya la importancia del factor dosis en la administración por vía oral: si se pretende que llegue un número suficiente de bacterias viables al intestino, será preciso utilizar inóculos con alta densidad bacteriana.

Las dos cepas objeto de estudio mostraron resistencia a bilis e incluso fueron capaces de crecer en presencia de sales biliares. Esta capacidad puede asociarse a la deconjugación de sales biliares. Como se indicó en el capítulo de Introducción, la deconjugación de sales biliares se considera un mecanismo que contribuye a la reducción de la colesterolemia; sin embargo, una deconjugación excesiva podría ser perjudicial y acarrear daños a la mucosa intestinal [Salminen *et al.*, 1998]. Sería, pues, de interés estudiar este aspecto en las cepas probióticas, y, en su caso, establecer el balance entre los efectos beneficioso y perjudicial y la posibilidad de encontrar un auténtico “margen terapéutico”.

Se han propuesto diversos procedimientos para evaluar la resistencia de las bacterias probióticas a las sales biliares, basados en la supervivencia tras incubación en bilis [Rönkä *et al.*, 2003] o en la capacidad para crecer a una determinada concentración de sales biliares [Gardiner *et al.*, 1998; Dunne *et al.*, 2001]. En general, las cepas comúnmente usadas como probióticos muestran una notable resistencia a la bilis, aunque son pocas las que crecen en su presencia [Jacobsen *et al.*, 1999].

11.2. COLONIZACION INTESTINAL POR *L. plantarum* C4

11.2.1. Desarrollo y aplicaciones del LPSM

Los estudios de colonización intestinal por lactobacilos o bifidobacterias probióticas plantean la necesidad de discriminar entre la bacteria exógena y la población autóctona intestinal que puede crecer en los mismos medios. Los medios selectivos como Rogosa y similares son útiles para estudiar los lactobacilos indígenas presentes en heces, pero no sirven para enumerar lactobacilos exógenos [Jackson *et al.*, 2002]. Algunos autores han recurrido a la morfología colonial para diferenciar cepas exógenas [Alander *et al.*, 1999]; semejante criterio podría ser útil para propósitos cualitativos (aislamiento de colonias), pero parece excesivamente engorroso para propósitos de cuantificación; incluso, según Jackson *et al.* [2002], la morfología de las colonias no puede considerarse un indicador fiable de la identidad a nivel de género. Ello obliga a recurrir a técnicas de tipaje molecular [Satokari *et al.*, 2003; Park e Itoh, 2005]. En este sentido, el desarrollo del LPSM debe apreciarse como un logro importante del presente trabajo. La utilidad del LPSM se revaloriza si se tiene presente que técnicas moleculares universalmente aceptadas y consideradas como muy potentes, no son capaces de discriminar entre la cepa C4 de *L. plantarum* y bacterias endógenas de la misma especie, que parecen abundar en el intestino de los ratones utilizados en nuestras investigaciones [Fuentes, 2005], mientras que tales cepas indígenas no crecen en LPSM, como se desprende de los resultados de validación del medio: en esta ocasión, un procedimiento de bacteriología clásica muestra una mayor potencia de discriminación y mayor versatilidad que técnicas contrastadas de biología molecular. Un valor añadido de la formulación en la que se basa el LPSM es la posibilidad de adaptarla a la detección

diferencial de otras especies de lactobacilos: basta identificar un azúcar que sea fermentado por la especie en cuestión, pero no por la microbiota fecal aerobia, y un agente antimicrobiano que inhiba, al menos mayoritariamente, dicha microbiota, sin reducir la población viable de la especie con la que se trabaja.

11.2.2. ¿Coloniza la cepa C4?

Según Alander *et al.* [1999], el estudio de muestras fecales no es suficiente para evaluar la colonización por una cepa probiótica, debiendo examinarse adicionalmente biopsias de la mucosa colónica, que pueden ser positivas en ausencia de excreción fecal de la cepa en cuestión. En nuestra opinión, la práctica de biopsias de colon es excesivamente engorrosa para aplicarla a estudios rutinarios de colonización; por otra parte, la sensibilidad del coprocultivo cuantitativo (nivel de detección, 10^3 UFC por g de heces) parece suficiente para detectar una población de lactobacilos varios logaritmos inferior al nivel global de lactobacilos indígenas, siempre que se cuente con un medio que ofrezca el rendimiento del LPSM. Sin embargo, y de acuerdo con la aportación de Alander *et al.* [1999], no puede excluirse la posibilidad de que *L. plantarum* C4 persista durante algún tiempo, proliferando a un ritmo suficiente para mantener una población bacteriana adherida a la mucosa, sin ser detectada por los coprocultivos de rutina.

Es importante tener presente que no hay unanimidad en la definición del término “colonización”. La interpretación de nuestros estudios de colonización intestinal tras administración intragástrica de *L. plantarum* C4 es negativa, si se hace de acuerdo con el criterio de Freter [1992]: hay colonización intestinal cuando una población bacteriana permanece estable en el tracto gastrointestinal a lo largo del tiempo, sin necesidad de ser

reintroducida periódicamente. Sin embargo, sería positiva si utiliza el criterio, mucho menos restrictivo, de Rönkä *et al.* [2003], para quienes es suficiente que la bacteria sea detectada en coprocultivo después de la ingestión (lo que, simplemente, significa que ha sido capaz de conservar su viabilidad a lo largo de su recorrido por el tracto gastrointestinal).

El impacto del tratamiento con ciprofloxacino sobre la microbiota intestinal, y la resistencia de *L.plantarum* C4 a las fluoroquinolonas, explican que, en determinadas circunstancias, el tratamiento con ciprofloxacino favoreciera la persistencia del probiótico en el intestino. A su vez, éste pareció ejercer un moderado efecto protector sobre algunos componentes de la microbiota como los coliformes, normalmente eliminados por el agente antimicrobiano.

12. CONCLUSIONES

Primera.- Una cepa de *Lactobacillus plantarum*, y otra de *Lactobacillus casei*, aisladas ambas como bacterias probióticas de muestras de derivados lácteos comerciales, han mostrado poseer propiedades de resistencia a pH ácido y a sales biliares, adherencia a células de epitelio intestinal y antibiosis *in vitro*, pero no fueron capaces de colonizar o persistir en el intestino de ratones BALB/c tras administración intragástrica. Por tanto, no existe necesariamente correlación entre los ensayos de potencial probiótico *in vitro* y la capacidad de colonización intestinal *in vivo*.

Segunda.- La notable capacidad de la cepa probiótica de *Lactobacillus plantarum* para inhibir el crecimiento *in vitro* de bacterias entéricas y enteropatógenas se debe al menos a dos componentes: la acidificación del medio y la producción de una sustancia antibacteriana aparentemente termolábil. Ambos componentes se produjeron cuando la bacteria creció en el medio LMRS líquido pero no en caldo de tripticasa soja (Tryptic Soy Broth).

Tercera.- Se ha diseñado y validado un nuevo medio selectivo y diferencial para *Lactobacillus plantarum* exógeno. El diseño de este medio, que aprovecha las diferencias en el perfil fermentador de la cepa exógena respecto de la microbiota fecal aerobia y en la sensibilidad a agentes antimicrobianos de amplio espectro, podría extenderse a otras especies de *Lactobacillus* exógenos.

Cuarta.- La producción de antibiosis *in vitro* por la cepa probiótica de *Lactobacillus plantarum* frente a las bacterias enteropatógenas *Y. enterocolitica* O9, *S. enterica* serovar *Typhimurium* y *L. monocytogenes*, no se correlaciona con un nivel significativo de protección frente a la infección intestinal de ratones BALB/c con estas bacterias.

Quinta.- A pesar de su incapacidad para colonizar el tracto intestinal murino, las cepas probióticas de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus casei* ejercieron algunos moderados pero significativos efectos sobre la capacidad de los esplenocitos para proliferar en respuesta a mitógenos. Por tanto, la colonización intestinal no es un requisito imprescindible para la inmunomodulación por bacterias probióticas, pudiendo ejercerse esta a través de la persistencia de las mismas en el intestino durante un periodo suficientemente prolongado de administración diaria.

Sexta.- La administración de las cepas probióticas de *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus plantarum* a ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida no modificó significativamente, en ningún sentido, la leucopenia causada por el tratamiento mielotóxico. *L. casei* moderó los efectos de la ciclofosfamida sobre el número de esplenocitos, limitando tanto la esplenocitopenia inicial como la esplenocitosis subsiguiente.

Séptima.- La administración de la cepas probiótica de *Lactobacillus plantarum* a ratones BALB/c tratados con ciclofosfamida restauró parcialmente la proliferación de los esplenocitos en respuesta a un mitógeno de linfocitos B. *Lactobacillus casei* no tuvo efecto sobre la capacidad de respuesta de los esplenocitos.

13. BIBLIOGRAFIA

Adlerberth, I., M. Cerquetti, I. Poilane, A. Wold y A. Collignon. 2000. Mechanismos of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. *Microb. Ecol. Health Dis.* **12**(Suppl 2): 223-239.

Agerholm-Larsen, L., A. Raben N. Haulrik, A. S. Hansen, M. Menders y A. Astrup. 2000. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. *Eur. J. Clin. Nutr.* **54**:288-297.

Ahmed, F. E. 2003. Genetically modified probiotics in foods. *Trends Biotechnol.* **21**:491-497.

Alexpoulos, C., I. E. Georgoulakis, A. Tzivaram S. K. Kritas, A. Siochu y S. C. Kyriakis. 2004. Field evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores on the health status and performance of sows and their litter. *J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr.* **88**:381-392.

Alvarez, S., C. Herrero, E. Bru y G. Perdigon. 2001. Effect of *Lactobacillus casei* and yogurt administration on prevention of *Pseudomonas aeruginosa* infection in young mice. J. Food Prot. **64**:1768-1774.

Amores, R., A. Calvo, J. R. Maestre y D. Martínez-Hernández. 2004. Probiotics. Rev. Esp. Quimioter. **17**:131-139.

Anandón, A., M. R. Martínez-Larrañaga y M. A. Martínez. 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assesment. Regul. Toxicol. Pharmacol. **45**:91-95.

Asahara, T., K. Nomoto, K. Shimizu, M. Watanuki y R. Tanaka. 2001. Increased resistance of mice to *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection by synbiotic administration of Bifidobacteria and transgalactosylated oligosaccharides. J. Appl. Microbiol. **91**:985-996.

Atlas, M. R. 1999. Probiotics: snake oil for the new millennium?. Environ. Microbiol. **1**:375-382.

Baharav, E., F. Mor, M. Halpern y A. Weinberger. 2004. *Lactobacillus* GG bacteria ameliorate arthritis in Lewis rats. J. Nutr. **134**:1964-1969.

Bamias, G., M. Marini, C. A. Moskaluk, M. Odashima, W. G. Ross, J. Rivera-Nieves y F. Cominelli. 2002. Down regulation of intestinal lymphocyte activation and

Th1 cytokine production by antibiotic therapy in a murine model of Chron's disease. J. Immunol. **169**:5308-5314.

Begley, M., C.Hill y C. G. M. Graham. 2006. Bile salt hydrolase activity in probiotics. Appl. Environ. Microbiol. **72**:1729-1738.

Benyacoub, J., G. L. Czarnecki-Maulden, C. Cavadini, T. Sauthier, R. E. Anderson, E. J. Schiffrin y T. Von der Weid. 2003. Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. J. Nutr. **133**:1158-1162.

Berg, R. D. 1998. Probiotics, prebiotics or ' conbiotics' ?. Trends. Microbiol. **6**:89-92.

Bergogne-Bérézin, E. 2000. Treatment and prevention of antibiotic associated diarrhea. Int. J. Antimicrob. Agents. **16**:521-526.

Borody, T. J., E. F. Warren, S. M. Leis, R. Surace, O. Ashman y S. Sirakas. 2004. Bacteriotherapy using fecal flora: toying with human motions. J. Clin. Gastroenterol. **38**:475-483.

Brady, L. J., D. D. Gallaher y F. F. Busta. 2000. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. J. Nutr. **130**(Suppl.2):410-414.

Brumell, J. H. y B. B. Finlay. 2000. Bacterial adherence, colonization, and invasion of mucosal surfaces, p. 3-17. En K. A. Brogden, J. A. Roth, T. B. Stanton, C. A. Bolin, F.

C. Minion y M. J. Wannemuehler (eds.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. ASM Press, Washington.

Bry, L., P. Falk, T. Midtvedt y J. Gordon. 1996. A model of host-microbial interactions in an open intestinal ecosystem. *Science* **273**:1380-1383.

Campbell, C. G., B. P. Chew, L. O. Luedecke y T. D. Shultz. 2000. Yogurt consumption does not enhance immune function in healthy premenopausal women. *Nutr. Cancer.* **37**:27-35.

Carol, M., N. Borruel, M. Antolin, M. Llopis, F. Casellas, F. Guarner y J. R. Malagelada. 2006. Modulation of apoptosis in intestinal lymphocytes by a probiotic bacteria in Crohn's disease. *J. Leukoc. Biol.* **79**:917-922.

Casas, I y W. J. Dobrogosz. 2000. Validation of the probiotic concept: *Lactobacillus reuteri* confers broad-spectrum protection against disease in human and animals. *Microb. Ecol. Health Dis.* **12**:247-285.

Charteris, W. P., P. M. Kelly, L. Morelli y J. K. Collins. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* **61**:1636-1643.

Chiang, B. L., Y. H. Sheih, L. H. Wang, C. K. Liao, H. S. Gill. 2000. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *Eur. J. Clin. Nutr.* **54**:849-855.

Coakley, M., R. P. Ross, M. Nordgren, G. Fitzgerald, R. Devery y C. Stanton. 2003. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. *J. Appl. Microbiol.* **94**:138-145.

Colgan, S. P., G. T. Furuta y C. T. Taylor. 2003. Cytokines and epithelial function, p. 61-78. En G.A. Hecht (ed.), *Microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cell.* ASM Press, Washington.

Cortes-Perez N. G., V. Azevedo, J. M. Alcocer-Gonzalez, C. Rodriguez-Padilla, R. S. Tamez-Guerra, G. Corthier, A. Gruss, P. Langella y L. G. Bermudez-Humaran. 2005. Cell-surface display of E7 antigen from human papillomavirus type-16 in *Lactococcus lactis* and in *Lactobacillus plantarum* using a new cell-wall anchor from lactobacilli. *J. Drug Target.* **13**:89-98.

Cremonini, F., S. Di Caro, E. C. Nista, F. Bartolozzi, G. Capelli, G. Gasbarrini y A. Gasbarrini. 2002. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **16**:1461-1467.

Cross, M. L., R. R. Mortensen, J. Kudsk y H. S. Gill. 2002. Dietary intake of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 enhances production of both Th1 and Th2 cytokines in antigen-primed mice. *Med. Microbiol. Immunol.* **191**:49-53.

Cui, H. H., C. L. Chen, J. D. Wang, Y. J. Yang, Y. Cun, J. B. Wu, Y. H. Liu, H. L. Dan, Y. T. Jian y X. Q. Chen. 2004. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* **10**:1521-1525.

Czuprynski, C. y N. G. Faith. 2002. Sodium bicarbonato enhances the severity of infection in neutropenic mice orally inoculated with *Listeria monocytogenes* EGD. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **9**:477-481.

Danielsen, M. y A. Wind. 2003. Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. Int. J. Food Microbiol. **82**:1-11.

De La Cochetière, M. F. T. Durand, P. Lepage, A. Burreille, J. P. Galmiche y J. Dore. 2005. Resilience of the dominant human fecal microbiota upon short-course antibiotic challenge. J. Clin. Microbiol. **43**:5588-5592.

De Moreno de Le Blanc, A. y G. Perdigón. 2004. Yogurt feeding inhibits promotion and progresión of experimental colorectal cancer. Med. Sci. Monit. **10**:96-104.

De Ross, N. M. y M. B. Katan. 2000. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. Am. J. Clin. Nutr. **71**:405-411.

De Smet, I., P. De Boever y W. Verstraete. 1998. Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. Br. J. Nutr. **79**:185-194.

De Souza, A. L., C. Rajkumar, J. Cooke y C. J. Bulpitt. 2002. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. BMJ. **324**:1361-1366.

De Vos, W., P. A. Bron y M. Kleerebezem. 2004. Post-genomics of lactic acid bacteria and other food-grade bacteria to discover gut functionality. *Curr. Opin. Biotechnol.* **15**:86-93.

De Waard, R., E. Claassen, G. C. A. M. Bokken, B. Buiting, J. Garssen y J. G. Vos. 2003. Enhanced immunological memory responses to *Listeria monocytogenes* in rodents, as measured by delayed-type hypersensitivity (DTH), adoptive transfer of DTH, and protective immunity, following *Lactobacillus casei* shirota ingestion. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**:59-65.

Del Campo, R., D. Bravo, R. Canton, P. Ruiz-Garbajosa, R. Garcia-Albiach, A. Montesi-Libois, F. J. Yuste, V. Abaira y F. Baquero. 2005. Scarce evidence of yogurt lactic acid bacteria in human feces after daily yogurt consumption by healthy volunteers. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:547-549.

Dendukury, N., V. Costa, M. McGregor y J. M. Brophy. 2005. Probiotic therapy for the prevention and treatment of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review. *CMAJ.* **173**:167-170.

Di Giacinto, C., M. Marinaro, M. Sánchez, W. Strober y M. Boirivant. 2005. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10 dependent TGF- β bearing regulatory cells. *J. Immunol.* **174**:3237-3246.

Donnet-Hughes, A., F. Rochat, P. Serrant, J. M. Aeschlimann y E. J. Schiffrin.

1999. Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J. Dairy. Sci.* **82**:863-869.

Dotan, I. y L. Mayer. 2003. Intestinal immunity, p. 43-59. En G.A. Hecht (ed.), *Microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cell.* ASM Press, Washington.

Dunne, C., L. Murphy, S. Flynn, L. O'Mahony, S. O'Halloran, M. Feeney, D. Morrissey, G. Thornton, G. Fitzgerald, C. Daly, B. Kiely, E. M. M. Quigley, G. C.

O'Sullivan, F. Shanahan y J. K. Collins. 1999. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek.* **76**:279-292.

Elmer, G. W., C. M. Surawicz y L. V. McFarland. 1996. Biotherapeutic agents. A neglected modality for the treatment and prevention of selected intestinal and vaginal infections. *JAMA.* **275**:870-876.

El-Nezami, H. S., N. N. Polychronaki, J. Ma, H. Zhu, W. Ling, E. K. Salminen, R.

O. Juvonen, S. J. Salminen, T. Poussa y H. M. Mykkanen. 2006. Probiotic supplementation reduces a biomarker for increased risk of liver cancer in young men from Southern China. *Am. J. Clin. Nutr.* **83**:1199-1203.

Endo, T., M. Nakano, S. Shimizu, M. Fukushima y S. Miyoshi. 1999. Effects of a probiotic on the lipid metabolism of cocks fed on a cholesterol-enriched diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**:1569-1575.

- Erickson K. L. y N. E. Hubbard.** 2000. Probiotic immunomodulation in health and disease. *J. Nutr.* **130**(Suppl. 2): 403-409.
- Euzéby, J.P.** 2006. List of prokaryotic names with standing in nomenclature. URL: <http://www.bacterio.net> (última revisión 24 de Abril de 2006).
- Ewaschuk, J. B., J. W. Walker, H. Diaz y K. L. Madsen.** 2006 Bioproduction of conjugated linoleic acid by probiotic bacteria occurs in vitro and in vivo in mice. *J. Nutr.* **136**:1483-1487.
- Farnworth, E. R.** 2005. Kefir: a complex probiotic. *Food Sci. Technol. Bull.* **2**:1-17.
- Femia, A. P., C. Luceri, P. Dolara, A. Giannini, A. Biggeri, M. Salvadori, Y. Clune, K. J. Colli, M. Paglierani y C. Caderni.** 2002. Antitumorigenic activity of the prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on azoxymethane induced colon carcinogenesis in rats. *Carcinogenesis.* **23**:1953-1960.
- Fernández, M. F., S. Boris y C. Barbés.** 2005. Safety evaluation of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* UO 004, a probiotic bacterium. *Res. Microbiol.* **156**:154-160.
- Focareta A., J. C. Paton, R. Morona, J. Cook y A. W. Paton.** 2006. A recombinant probiotic for treatment and prevention of cholera. *Gastroenterology.* **130**:1688-1695.

Fons, M., A. Gómez y T. Karjalainen. 2000. Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of digestive tract. *Microb. Ecol. Health Dis.* **12**(Suppl 2): 241-246.

Forman, M. S. y A. Valsamakis. 2003. Specimen collection, transport, and processing: virology, p. 1227-1241. En P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller y R. H. Tenover (eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (8^a ed), ASM Press, Washington.

Freitas, M. y C. Cayuela. 2000. Microbial modulation of host intestinal glycosylation patterns. *Microb. Ecol. Health Dis.* **12**(Suppl 2):165-178.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66**:365-378.

Gamage, S. D., A. K. Patton, J. E. Strasser, C. L. Chalk y A. A. Weiss. 2006. Commensal bacteria influence *Escherichia coli* O157: H7 persistence and shiga toxin production in the mouse intestine. *Infect. Immun.* **74**:1977-1983.

Gibson G. R., E. R. Beatty, X. Wang y J. H. Cummings. 1995. Selective stimulation of bifidobacteria in the human colon by oligofructose and inulin. *Gastroenterology* **108**:975-982.

Gibson, G. R., A. L. McCartney y R. A. Rastall. 2005. Probiotics and resistance to gastrointestinal infections. *Br. J. Nutr.* **93**(Suppl.1): S531-S534.

Gibson, G. R. y M. B. Roberfroid. 1995. Dietary modulation of the colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **125**:1401-1412.

Gill, H. S., F. Doull, K. J. Rutherford y M. L. Cross. 2000^a. Immunoregulatory peptides in bovine milk. *Brit. J. Nutr.* **84**(Suppl. 1):S111-S117.

Gill, H. S. y F. Guarner. 2004. Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgrad. Med. J.* **80**:516-526.

Gill, H. S. y K. J. Rutherford. 2001. Viability and dose-response studies on the effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* in mice. *Br. J. Nutr.* **86**:285-289.

Gill, H. S., K. J. Rutherford, M. L. Cross y P. K. Gopal. 2001^b. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am. J. Clin. Nutr.* **74**:833-839.

Gill, H. S., K. J. Rutherford, J. Prasad y P. K. Gopal. 2000^b. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br. J. Nutr.* **83**:167-176.

Gill, H. S., Q. Shu, H. Lin, K. J. Rutherford y M. L. Cross. 2001^a. Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immunoenhancing probiotica *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. *Med. Microbiol. Immunol.* **190**:97-104.

Goldsby, R. A., T. J. Kindt, B. A. Osborne y J. Kubis. 2004. *Inmunología*. McGraw-Hill Interamericana, México.

Green D. H., P. R. Wakeley, A. Page, A. Barnes, L. Baccigalupi, E. Ricca y S. M. Cutting. 1999. Characterization of two *Bacillus* probiotics. *Appl Environ Microbiol.* **65**:4288-4291.

Grozdanov, L., C. Raasch, J. Schulze, U. Sonnenborn, G. Gottschalk, J. Hacker y U. Dobrindt. 2004. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J. Bacteriol.* **186**:5432-5441.

Guarner, F., R. Bourdet-Sicard, P. Brandtzaeg, H. S. Gill P. McGuirk, W. van Eden, J. Versalovic J. V. Weinstock y G. A. Rook. 2006. Mechanisms of disease: the hygiene hypothesis revisited. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **3**:275-284.

Guarner, F., G. Perdigon, G. Corthier, S. Salminen, B. Koletzko y L. Morelli. 2005. Should yoghurt be considered probiotic?. *Br. J. Nutr.* **93**: 783-786.

Hamilton-Miller, J. M. T. 2003. The role of probiotics in the treatment and prevention of *Helicobacter pylori* infection. *Int. J. Antimicrob. Agents.* **22**:360-366.

Havenaar, R. y M. J. H. Huis In 't Veld.1992. Probiotics: a general view. En *Lactic acid bacteria in health and disease*. Vol. 1. Amsterdam: Elsevier Applied Science Publishers.

Herias, M. V., C. Hessle, E. Telemo, T. Midtvedt, L. A. Hanson y A. E. Wold. 1999. Immunomodulatory effects of *Lactobacillus plantarum* colonizing the intestine of gnotobiotic rats. Clin. Exp. Immunol. **116**:283-290.

Hilliam, M. 1996. Functional foods: the western consumer viewpoint. Nutr. Rev. **54**(Suppl.11):189-194.

Hughenoltz, J. y E. J. Smid. 2002. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. Curr. Opin. Biotechnol. **13**:497-507.

IDF. 1992. General standard of identity for fermented milks, Standard n°.163. Brussels: International Dairy Federation.

Irrgang, K. y U. Sonnenborn. 1988. The historical development of Mutaflor therapy. Ardeypharm GMBH. Herdecke, Alemania.

Isolauri, E., Y. Sütas, P. Kanlaanpää, H. Arvilommi y S. Salminen. 2001. Probiotics: effects on immunity. Am. J. Clin. Nutr. **73**(Suppl 1):444S-450S.

Jacobsen, C. N., V. Rosenfeldt, A. E. Hayford, P. L. Moller, K. F. Michaelsen, A. Paerregaard, B. Sandström, M. Tvede y M. Jakobsen. 1999. Screening of probiotic activities of forty seven strains of *Lactobacillus* spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in human. Appl. Env. Microbiol. **65**:4949-4955.

Jiang H. Q., N. A. Bos y J. J. Cebra. 2001. Timing, localization, and persistence of colonization by segmented filamentous bacteria in the neonatal mouse gut depend on immune status of mothers and pups. *Infect Immun.* **69**:3611-3617.

Jijon, H., J. Backer, H. Diaz, H. Yeung, D. Thiel, C. McKaigney, C. De Simone y K. Madsen. 2004. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology.* **126**:1358-1373.

Jimenez-Valera, M., C. González-Torres, E. Moreno y A. Ruiz-Bravo. 1998. Comparison of ceftriaxone, amikacin, and ciprofloxacin in treatment of experimental *Yersinia enterocolitica* O9 infection in mice. *Antimicrob Agents Chemother.* **42**:3009-3011.

Jimenez-Valera, M., E. Moreno, M. A. Amat y A. Ruiz-Bravo. 2003. Modification of mitogen-driven lymphoproliferation by ceftriaxone in normal and immunocompromised mice. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22**:607-612.

Jorgensen, J. H. y J. D. Turnidge. 2003. Susceptibility Test Methods: Dilution and Disk Diffusion Methods, p. 1108-1125. En P. R. Murray, E. J. Baron, J. H. Jorgensen, M. A. Pfaller y R. H. Tenover (eds.), *Manual of Clinical Microbiology* (8^a ed), ASM Press, Washington

Kajander, K., K. Hatakka, T. Pousa, M. Färkkilä y R. Korpela. 2005. A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **22**:387-394.

Kalliomäki, M., S. Salminen, T. Poussa, H. Arvilommi y E. Isolauri. 2003. Probiotics and prevention of atopic disease : 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. **361**:1869-1871.

Kano, H., T. Kaneko y S. Kaminogawa. 2002. Oral intake of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1 prevents collagen-induced arthritis in mice. *J. Food Prot.* **65**:163-166.

Keshav, S. 2004. Paneth cells in innate immunity and intestinal inflammation, p. 171-196. En S.H.E. Kaufmann, R. Medzhitov y S. Gordon (eds.), *The innate immune response to infection*. ASM Press, Washington.

Kiesling, G., J. Schneider y G. Jahreis. 2002. Long-term consumption of fermented dairy products over 6 months increases HDL cholesterol. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56**:843-849.

Kim, H., K. Kwack, D. Y. Kim y G. E. Ji. 2005. Oral probiotic bacterial administration suppressed allergic responses in an ovalbumina-induced allergy mouse model. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **45**:259-267.

Kirjavainen, P. V., H. S. El Nezami, S. J. Salminen, J. T. Ahokas y P. F. A. Wright. 1999^a. Effects of orally administered viable *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* JS on mouse lymphocyte proliferation. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **6**:799-802.

Kirjavainen, P. V., H. S. El Nezami, S. J. Salminen, J. T. Ahokas y P. F. A. Wright. 1999^b. The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **26**:131-135.

Kleessen, B., E. Bezirtzoglou y J. Mättö. 2000. Culture-based knowledge on biodiversity, development and stability of human gastrointestinal microbiota. *Microb. Ecol. Health Dis.* **12**(Suppl 2):53-63.

Klein, G., A. Pack, C. Bonaparte y G. Reuter. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **41**:103-125.

Ko, E. J., J. S. Goh, B. J. Lee, S. H. Choi, y P. H. Kim. 1999. *Bifidobacterium bifidum* exhibits a lipopolysaccharide-like mitogenic activity for murine B lymphocytes. *J. Dairy Sci.* **82**:1869-1876.

Kolars, J. C., M. D. Levitt, M. Aouji y D. A. Savaiano. 1984. Yogurt: an autodigesting source of lactose. *N. Engl. J. Med.* **310**:1-3.

Korhonen, R., R. Korpela, M. Saxelin, M. Maki, H. Kankaanranta y E. Moilanen. 2001. Induction of nitric oxide synthesis by probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in J774 macrophages and human T84 intestinal epithelial cells. *Inflammation.* **25**:223-232.

Krieg, A. M. 2002. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:709-760.

Křivová J., A. Španová y B. Rittich. 2006. Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and species-specific PCR for identification of *Bifidobacterium* species. Syst. Appl. Microbiol. **29**:36-44.

Kruis, W., P. F. J. Pokrotnieks, M. Lukás, B. Fixa, M. Kadacák, M. A. Kamm, J. Weismuller, C. Beglinger, M. Stolte, C. Wolff y J. Schulze. 2004. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. Gut. **53**:1617-1623.

Kumura, H., Y. Tanoue, M. Tsukahara, T. Tanaka y K. Shimazaki. 2004. Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. J. Dairy. Sci. **87**:4050-4056.

LeBlanc, J., I. Fliss y C. Matar. 2004. Induction of a humoral immune response following an *Escherichia coli* O157:H7 infection with an immunomodulatory peptidic fraction derived from *Lactobacillus helveticus*-fermented milk. Clin. Diagn. Lab. Immunol. **11**:1171-1181.

Le Leu, R. K., I. L. Brown, Y. Hu, A. R. Bird, M. Jackson, A. Esterman y G. P. Young. 2005. A synbiotic combination of resistant starch and *Bifidobacterium lactis* facilitates apoptotic deletion of carcinogen-damaged cells in rat colon. J. Nutr. **135**:996-1001.

Ley R. E., D. A. Peterson y J. I. Gordon. 2006. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. Cell. **124**:837-848.

Liévin-Le Moal, V. y A. L. Servin. 2006. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**:315-337.

Lilly, D. M. y R. H. Stillwell. 1965. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. *Science.* **147**:747-748.

Lin, D. C. 2003. Probiotics as functional foods. *Nutr. Clin. Pract.* **18**: 497-506.

Lin, S. Y., J. W. Ayres, W. Jr. Winkler, W. E. Sandine. 1989. *Lactobacillus* effects on cholesterol: in vitro and in vivo results. *J. Dairy Sci.* **72**:2885-2899.

Lockman, H. A. y R. Curtis 3rd. 1990. *Salmonella typhimurium* mutants lacking flagella or motility remain virulent in BALB/c mice. *Infect. Immun.* **58**:137-143.

Lorca, G. L., T. Wadström, G. Font de Valdez y A. Ljungh. 2001. *Lactobacillus acidophilus* autolysins inhibit *Helicobacter pylori* in vitro. *Curr. Microbiol.* **42**:39-44.

Ma, D., P. Forsythe y J. Bienenstock. 2004. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect. Immun.* **72**:5308-5314.

Maassen C. B., C. Van Holten-Neelen, F. Balk, M. J. Den Bak-Glashouwer, R. J. Leer, J. D. Laman, W. J. Boersma y E. Claassen. 2000. Modulation of cytokine expression by Lactobacilli and its possible therapeutic use, p.176-192. En R. Fuller y G.

Perdigón (eds.), Probiotics 3: immunomodulation by the gut microflora and probiotics. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht

Macfarlane, S., M. J. Hopkins y G. T. Macfarlane. 2000. Bacterial growth and metabolism on surfaces in the large intestine. *Microb. Ecol. Health Dis.* **12**(Suppl. 2): 64-72.

Marteau, P., P. Seksik y R. Jian. 2002. Probiotics and health: new facts and ideas. *Curr. Op. Biotechnol.* **13**:486-489.

Marteau, P. y F. Shanahan. 2003. Basic aspects and pharmacology of probiotics: an overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **17**:725-740.

Matsuguchi, T., A. Takagi, T. Matsuzaki, M. Nagaoka, K. Ishikawa, T. Yokokura e Y. Yoshikai. 2003. Lipoteichoic acids from *Lactobacillus* strains elicit strong tumor necrosis factor alpha-inducing activities in macrophages through toll-like receptor 2. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **10**:259-266.

Matsumoto, M. e Y. Benno. 2004. Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutat. Res.* **568**:147-153.

Matsuzaki, T. y J. Chin. 2000. Modulating immune responses with probiotic bacteria. *Immunol. Cell. Biol.* **78**:67-73.

Mattar, A. F., D. H. Teitelbaum, R. A. Drongowski, F. Yongyi, C. M. Harmon y A. G. Coran. 2002. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell culture model. *Pediatr. Durg. Int.* **18**:586-590

Mazigh, D., J. M. Alonso y H. H. Mollaret. 1983. Simple method for demonstration of differential colony morphology of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* **17**:555-557.

McCracken, V. J. y R. G. Lorenz. 2001. The gastrointestinal ecosystem: a precarious alliance among epithelium, immunity and microbiota. *Cell. Microbiol.* **3**:1-11.

McNaught, C. E., N. P. Woodcock, J. MacFie, C. J. Mitchell. 2002. A prospective randomised study of the probiotic *Lactobacillus plantarum* 299V on indices of gut barrier function in elective surgical patients. *Gut.* **51**:827-831.

Medzhitov, R. y C. A. Janeway. 2000. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol. Rev.* **173**:89-97.

Menard, S., C. Candalh, J. C. Bambou, K. Terpend, N. Cerf-Bensussan y M. Heyman. 2004. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. *Gut.* **53**:821-828.

Mercenier, A., S. Pavan y B. Pot. 2003. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. *Curr. Pharm. Des.* **9**:175-191.

Miettinen, M., A. Lehtonen, I. Julkunen y S. Matikainen. 2000. Lactobacilli and Streptococci activate NF- κ B and STAT signaling pathways in human macrophages. *J. Immunol.* **164**:3733-3740.

Mims, C. A., J. H. L. Playfair, I. M. Roitt, D. Wakelin, R. Williams y R. M. Anderson. 1993. *Medical microbiology.* Mosby Europe Limited, London.

Mollet, B. e I. Rowland. 2002. Functional foods: at the frontier between food and pharma. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**:483-485.

Montalto, M., V. Curigliano, L. Santoro, M. Vastola, G. Cammarota, R. M. Gasbarrini, G. Gasbarrini. 2005. Management and treatment of lactose malabsorption. *World J. Gastroenterol.* **12**:187-191.

Moreau, M. C. y V. Gaboriau-Routhiau. 2000. Influence of resident intestinal microflora on the development and functions of the intestinal-associated lymphoid tissue, p. 69-114. En R. Fuller y G. Perdigón (eds.), *Probiotics 3: immunomodulation by the gut microflora and probiotics.* Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* **65**:56-63.

Mullany, P. 2000. Gene transfer in the GI tract and oral cavity. *Microb. Ecol. Health Dis.* **12**(Suppl 2):73-80.

Myhal, M. L., D. C. Laux y P. S. Cohen. 1982. Relative colonizing abilities of human fecal and K 12 strains of *Escherichia coli* in the large intestines of streptomycin-treated mice. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **1**:186-192.

Nagafuchi, S., T. Takahashi, T. Yajima, T. Kuwata, K. Hirayama y K. Itoh. 1999. Strain dependency of the immunopotentiating activity of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63**:474-479.

Naruszewicz, M., M. L. Johanson, D. Zapolska-Downar y H. Bukowska. 2002. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. *Am. J. Clin. Nutr.* **76**:1249-1255.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 2000. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, Pa.

Neisch, A. S. 2003. Microbial interferences with host inflammatory responses, p. 175-190. En G.A. Hecht (ed.), *Microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cell*. ASM Press, Washington.

Niers, L. E. M., H. M. Timmerman, G. T. Rijkers, G. M. Van Bleek, N. O. P. Van Uden, E. F. Knol, M. L. Kabsenberg, J. L. L. Kimpeny M. O. Hoekstra. 2005. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clin. Exp. Allergy.* **35**:1481-1489.

Ogawa, T., S. Hashikawa, Y. Asai, H. Sakamoto, K. Yasuda e Y. Makimura. 2006.

A new synbiotic, *Lactobacillus casei* subsp. *casei* together with dextran, reduces murine and human allergic reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **46**:400-409.

Ouwehand, A. C., S. Salminen y E. Isolauri. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek.* **82**:279-289.

Parker, R. B. 1974. Probiotics, the other half of the antibiotic story. *Anim. Nutr. Health.* **29**:4-8.

Parra, M. D., B. E. Martínez de Morentin, J. M. Cobo, A. Mateos y J. A. Martínez. 2004. Daily ingestion of fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN114001 improves innate-defense capacity in healthy middle-aged people. *J. Physiol. Biochem.* **60**:85-91.

Parvez, S., K. A. Malik, S. Ah Kang y H. Y. Kim. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* **100**:1171-1185.

Pathmakanthan S., C. K. Li, J. Cowie y C. J. Hawkey. 2004. *Lactobacillus plantarum* 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **19**:166-173.

Peña, J. A. y J. Versalovic. 2003. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF - α production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell. Microbiol.* **5**:277-285.

Perdigon, G. y A. Pesce de Ruiz Holgado. 2000. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria, p.213-233. En R. Fuller y G. Perdigón (eds.), Probiotics 3: immunomodulation by the gut microflora and probiotics. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.

Pereira, D. I. A., A. L. McCartney y G. R. Gibson. 2003. An in vitro study of the probiotic potential of a bile-salt hydrolyzing *Lactobacillus fermentum* strain, and determination of its cholesterol-lowering properties. *App. Environ. Microbiol.* **69**: 4743-4752.

Pessi, T., Y. Sütas, M. Saxelin, H. Kallioinen y E. Isolauri. 1999. Antiproliferative effects of homogenates derived from five strains of candidate probiotic bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:4725-4728.

Pestka, J. J., C. L. Ha, R. W. Warner, J. H. Lee y Z. Ustunol. 2001. Effects of ingestion of yogurts containing *Bifidobacterium* and *Lactobacillus acidophilus* on spleen and Peyer's patch lymphocyte populations in the mouse. *J. Food Prot.* **64**:392-395.

Petrof, E. O., K. Kojima, M. J. Ropeleski, M. W. Musch, Y. Tao, C. De Simone y E. B. Chang. 2004. Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology* **127**: 1474-1487.

Podolsky, S. 1998. Cultural divergence: Elie Metchnikoff's *Bacillus bulgaricus* therapy and his underlying concept of health. *Bull. Hist. Med.* **72**:1-27.

Posteraro, B., M. Sanguinetti, L. Romano, R. Torelli, L. Novarese y G. Fadda. 2005. Molecular tools for differentiating probiotic and clinical strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J. Food Microbiol.* **103**:295-304.

Pouwels P. H., R. J. Leer, M. Shaw, M-J. H. Bak-Glashouwer, F. D. Tielen, E. Smit, B. Martínez, J. Jore y P. L. Conway. 1998. Lactic acid bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int. J. Food Microbiol.* **41**:155–167.

Prescott, L. M., J. P. Harley y D. A. Klein. 2005. *Microbiology* (6th ed.). McGraw-Hill, Boston.

Prioult, G., S. Pecquet e I. Fliss. 2004. Stimulation of interleukin-10 production by acidic \bullet -lactoglobulin-derived peptides hydrolyzed with *Lactobacillus paracasei* NCC2461 peptidases. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **11**:266-271.

Rachmilewitz, D., K. Katakura, F. Karmeli, T. Hayashi, C. Reinusm B. Rudenskym, S. Akira, K. Takeda, J. Lee, K. Takabayashi y E. Raz. 2004. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology.* **126**:520-528.

Ramos-Cormenzana, A., S. Fuentes, R. Ferrer-Cebrian y M. Monteoliva-Sanchez. 2005. Probiotics and biotherapy. *Recent Res. Devel. Microbiol.* **9**:97-127.

Rao, S., S. Hu, L. McHugh, K. Lueders, K. Henry, Q. Zhao, R. A. Fekete, S. Kar, S. Adhya y D. H. Hamer. 2005. Toward a live microbial microbicide for HIV: commensal bacteria secreting an HIV fusion inhibitor peptide. *Appl. Biol. Sci.* **102**:11993-11998.

Real Decreto 179/2003. 2003. B.O.E. **42**:6458-6450.

Reid, G. 1999. The scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**:3763-3766.

Reid, G., J. Jass, M. T. Sebulsy y J. K. McCornick. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**:658-672.

Reid, G., J. Jass, M. T. Sebulsy y J. K. McCornick. 2003. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**: 658-672.

Reuter, G. 2001. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2**:43-53.

Rinne, M. M., M. Gueimonde., M. Kalliomaki., U. Hoppu., S. J. Salminen y E. Isolauri. 2005. Similar bifidogenic effects of prebiotic-supplemented partially hydrolyzed infant formula and breastfeeding on infant gut microbiota. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **43**:59-65.

Rodrigues, A. C. P., D. C. Cara, S. H. G. G. Fretez, F. Q. Cunha, E. C. Vieira, J. R. Nicoli y L. Q. Vieira. 2000. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. *J. Appl. Microbiol.* **89**:404-414.

Roller, M., G. Rechkemmer y B. Watzi. 2004. Prebiotic inulin enriched with oligofructose in combination with the probiotics *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* modulates intestinal immune functions in rats. *J. Nutr.* **134**:153-156.

Ruiz-Bravo, A., C. Bujalance, F. Romero, E. Moreno y M. Jimenez-Valera. 2003. Immunomodulation by *Yersinia enterocolitica*: comparison of live and heat-killed bacteria. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **39**:229-233.

Ruiz-Bravo, A. y M. Jiménez-Valera. 2005. Sistema inmune y mecanismos de inmunidad innata y adaptativa, p. 1191-1227. En A. Gil y F. Sánchez de Medina (eds.), *Tratado de Nutrición. Acción Médica*, Madrid.

Ruiz-Bravo, A., M. Jiménez-Valera, G. Álvarez de Cienfuegos, K. Kouwatli y A. Ramos-Cormenzana. 1986. Spontaneous binding of *Yersinia enterocolitica* to murine leukocytes. *Curr. Microbiol.* **13**: 313-316.

Ruiz-Bravo, A., M. Jiménez-Valera, M. M. López y A. Sampedro. 1992. *Fundamentos de biología e inmunología tumoral*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Granada, Granada.

Ruiz-Bravo, A., E. Moreno y M. Jimenez-Valera. 2001. Intestinal infection of BALB/c mice with *Yersinia enterocolitica* O9 causes major modifications in phenotype and functions of spleen cells. *Microbiology*. **147**:3165-3169.

Ruiz-Bravo, A., E. Moreno, A. Sampedro, y M. Jimenez-Valera. 1999. Experimental infection of mice with *Yersinia enterocolitica* serotype O9 by oral and parenteral routes: spreading and enterotropism of virulent yersiniae. *Curr. Microbiol.* **38**:257-263

Ruiz-Bravo, A., R. Rotger y M. Sanchez-Perez. 1998. Modificación de la respuesta inmunitaria e inmunización, p. 209-270. En M. Sanchez-Perez (ed.), *Inmunología aplicada y técnicas inmunológicas*. Editorial Síntesis, Madrid.

Sait, L., M. Galic, R. A. Strgnell y P. H. Janssen. 2003. Secretory antibodies do not affect the composition of the bacterial microbiota in the terminal ileum of 10-week-old mice. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:2100-2109.

Sakata, S., C. S. Ryu, M. Kitachara, M. Sakamoto, H. Hayashi, M. Fukuyama e Y. Benno. 2006. Characterization of the genus *Bifidobacterium* by automated ribotyping and 16S rRNA gene sequences. *Microbiol. Immunol.* **50**:1-10.

Saklani-Jusforgues, H., E. Fontan, P. L. Goossens. 2001. Characterisation of a *Listeria monocytogenes* mutant deficient in D-arabitol fermentation. *Res. Microbiol.* **152**:175-177.

Salminen, S. 1996. Uniqueness of probiotics strains. *IDF Nutr. News Lett.* **5**:16-18.

Salminen, S. J., M. Gueimonde y E. Isolauri. 2005. Probiotics that modify disease risk. *J. Nutr.* **135**: 1294-1298.

Salminen, S., A. Ouwehand, Y. Benno e Y.K. Lee. 1999. Probiotics: how should they be defined?. *Trends Food Sci. Technol.* **10**:107-110.

Salminen, S., E. Isolauri y E. Salminen. 1996. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek.* **70**:347-358.

Salyers, A. A. y D. D. Whitt. 2002. *Bacterial pathogenesis.* ASM Press, Washington.

Sanati, H., C. F. Ramos, A. S. Bayer y M. A. Ghannoum. 1997. Combination therapy with amphotericin B and fluconazole against invasive candidiasis in neutropenic-mouse and infective-endocarditis rabbit models. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**:1345-1348.

Sanders, M. E. 2003. Probiotics: considerations for human health. *Nutr. Rev.* **61**:91-99.

Sartor, R. B. 2004. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics and prebiotics. *Gastroenterology.* **126**:1620-1633.

Schaafsma, G. 1996. State of art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutr. News Lett.* **5**:23-24.

Schrezenmeir, J. y M. De Vrese. 2001. Probiotics, prebiotics and synbiotics: approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**:361-364.

Schiffrin, E. J., D. Brassart, A. L. Servin, F. Rochat y A Donnet-Hughes. 1997. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**:133-134.

Schiffrin, E. J., F. Rochat, H. Link-Amster, J. M. Aeschlimann y A. Donnet-Hughes. 1995. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **78**:491-497.

Sell, S. 2001. Immunology, immunopathology, and immunity. ASM Press, Washington.

Sen, S., M. M. Mullan, T. J. Parler, J. T. Woolner, S. A. Tarry y J. O. Hunter. 2002. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on colonic fermentation and symptoms of irritable bowel syndrome. *Dig. Dis. Sci.* **47**:2615-2620.

Sghir, A., G. Gramet, A. Suau, V. Rochet, P. Pochart y J. Dore. 2000. Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2263-2266.

Sheih, Y. H., B. L. Chiang, L. H. Wang, C. K. Liao y H. S. Gill. 2001. Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *J. Am. Coll. Nutr.* **20**(Suppl. 2):149-156.

Shu, Q. y H. S. Gill. 2002. Immune protection mediated by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* HN001 (DR20) against *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. FEMS Immunol. Med. Microbiol. **34**:59-64.

Silva, A. M., F. H. F. Barbosa, R. Duarte, L. Q. Vieira, R. M. E. Arantes y J. R. Nicoli. 2004. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. J. Appl. Microbiol. **97**:29-37.

Simpson, S. y L. M. Wetzler. 2004. Mucosal immunity, p. 399-423. En G.B. Pier, J.B. Lyczak y L.M. Wetzler (eds.), Immunology, infection, and immunity. ASM Press, Washington.

Smits, H. H., A. Engering, D. Van der Kleij, E. C. De Jong, K. Schipper, T. M. M. Van Capel, B. A. J. Zaat, M. Yazdanbakhsh, E. A. Wierenga, Y. Van Kooyk y M. L. Kapsenberg. 2005. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. J. Allergy Clin.Immunol. **115**:1260-1267.

Swallow, D. M. 2003. Genetics of lactase persistence and lactose intolerance. Annu. Rev. Genet. **37**:197-219.

Swift, S., E. E. Vaughan y W. M. De Vos. 2000. Quorum sensing within the gut ecosystem. Microb. Ecol. Health Dis. **12**(Suppl 2): 81-92.

Takahashi, N., H. Kitazawa, N. Iwabuchi, J. Z. Xiao, K. Miyaji, K. Iwatsuki y T. Saito. 2006. Immunostimulatory oligodeoxynucleotide from *Bifidobacterium longum* suppresses Th2 immune responses in a murine model. Clin. Exp. Immunol. **145**:130-138.

Takeda, K., T. Kaisho y S. Akira. 2003. Toll-like receptors. Annu. Rev. Immunol. **21**:335-376.

Tamime, A. Y. 2002. Fermented milks: a historical food with modern applications. A review. Eur. J. Clin. Nutr. **56**(Suppl. 4): 2-15.

Tanaka, K. y H. Ishikawa. 2004. Role of intestinal bacterial flora in oral tolerance induction. Histol. Histopathol. **19**:907-914.

Tannock, G. W. 2004. A special fondness for Lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol. **70**:3189-3194.

Tannock G. W. y M. A. McConnell. 1994. Lactobacilli inhabiting the digestive tract of mice do not influence serum cholesterol concentrations. Microbiol. Ecol. Health Dis. **7**:331-334.

Taranto, M. P., M. Medici, G. Perdigon, A. P. Ruiz-Holgado y G. F. Vadez. 1998. Evidence for hypocoolesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. J. Dairy Sci. **81**:2336-2340.

Tejada-Simon, M. V., J. H. Lee, Z. Ustunol y J. J. Pestka. 1999. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *J. Dairy Sci.* **82**:649-660.

Tejada-Simon, M. V., Z. Ustunol y J. J. Pestka. 1999. Effects of lactic acid bacteria ingestion of basal cytokine mRNA and immunoglobulin levels in the mouse. *J. Food Prot.* **62**:287-291.

Tissier, H. 1906. Traitement des infections intestinales par la méthode de la flore bactérienne de l'intestin. *Critical Reviews of the Society for Biology* **60**:359-361.

Tlaskalová-Hogenová H., R. Stepanková, T. Hudcovic, L. Tucková, B. Cukrowska, R. Lodinová-Zadniková, H. Kozaková, P. Rossmann, J. Bártová, D. Sokol, D. P. Funda, D. Borovská, Z. Reháková, J. Sinkora, J. Hofman, P. Drastich y A. Kokesová. 2004. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune disease. *Immunol. Lett.* **93**:97-108.

Turner, J. R. 2003. Functional morphology of the intestinal mucosae: from crypts to tips, p. 1-22. En G.A. Hecht (ed.), *Microbial pathogenesis and the intestinal epithelial cell*. ASM Press, Washington.

Tuohy, K. M., H. M. Probert, C. W. Smejkal y G. R. Gibson. 2003. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. *Therap. Focus* **15**:692-700.

Tzianabos, A. O. y L. M. Wetzler. 2004. Cellular communication, p.343-369. En G.B. Pier, J.B. Lyczak y L.M. Wetzler (eds.), Immunology, infection, and immunity. ASM Press, Washington.

Uchida, M. y O. Mogami. 2005. Milk whey cultura with *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 is effective on the colitis induced by 2,4,6-Trinitrobenzee sulfonic acid in rats. J. Pharmacol. Sci. **99**:329-334.

Ukena, S. N., A. M. Westendorf, W. Hansen, M. Rohde, R. Geffers, S. Coldewey, S. Suerbaum, J. Buer y F. Gunzer. 2005. The host response to the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917: specific up-regulation of the proinflammatory chemokine MCP-I. BMC Med. Gen. **6**:43-55.

Umesaki, Y. y H. Setoyama. 2000. Structure of the intestinal flora responsible for development of the gut immune system in a rodent model. Microb. Infect. **2**:1343-1351.

Usman y A. Hosono. 2001. Hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus gasseri* SBT0270 in rats a cholesterol-enriched diet. J. Dairy Res. **68**:617-624.

Valeur, N., P. Engel, N. Carbajal, E. Connolly y K. Ladefoged. 2004. Colonization and immunomodulation by *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 in the human gastrointestinal tract. Appl. Environ. Microbiol. **70**:1176-1181.

Viljanen, M., E. Pohjavuori, T. Haajtela, R. Korpela, M. Kuitunen, A. Sarnesto, O. Vaarala y E. Savilahti. 2005. Induction of inflammation as a possible mechanism of probiotic effect in atopic eczema-dermatitis syndrome. *J. Allergy Clin. Immunol.* **115**:1254-1259.

Villena, J., S. Racedo, G. Agüero y S. Alvarez. 2006. Yogurt accelerates the recovery of defence mechanisms against *Streptococcus pneumoniae* in protein-malnourished mice. *Br. J. Nutr.* **95**:591-602.

Vinderola, C. G., M. Medici y G. Perdigón. 2004. Relationship between interaction sites in the gut, hydrophobicity, mucosal immunomodulating capacities and cell wall protein profiles in indigenous and exogenous bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **96**:230-243.

Walker, R. y M. Buckley. 2006. Probiotic microbes: the scientific bases. A report from the American Academy of Microbiology. ASM Press, Washington.

Wehkamp, J., J. Harder, K. Wehkamp, B. Wehkamp-von Meissner, M. Schlee, C. Enders, U. Sonnenborn, S. Nuding, S. Bengmark, K. Fellermann, J. M. Schroder, E. F. Stange. 2004. NF- κ B and AP-1 mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infect. Immun.* **72**:5750-5758.

Wijburg, O. L. C., T. K. Uren, K. Simpfendorfer, F. E. Johansen, P. Brandtzaeg y R. A. Strugnell. 2006. Innate secretory antibodies protect against natural *Salmonella typhimurium* infection. *J. Exp. Med.* **203**:21-26.

Wijtzes, T., M. R. Bruggeman, M. J. R. Nout y M. H. Zwietering, 1997. A computerised system for the identification of lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **39:**65-70.

Wollowski, I., G. Rechkemmer y B. L. Pool-Zobet. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am. J. Clin. Nutr.* **73:**451-455.

Wong, J. M., R. de Souza, C. W. Kendall, A. Emam y D. J. Jenkins. 2006. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J. Clin. Gastroenterol.* **40:**235-243.

Xiao, J. Z., S. Kondo, N. Yanagisawa, N. Takahashi, T. Odamaki, N. Iwabuchi, K. Iwatsuki, S. Kokubo, H. Togashi, K. Enomoto, T. Enomoto. 2006. Effect of probiotic *Bifidobacterium longum*, BBS36 in relieving clinical symptoms and modulating plasma cytokine levels of japanese cedar pollinosis during the pollen season. A randomized double-blind, placebo-controlled trial. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.* **16:**86-93.

Xu, S., T. D. Boylston y B. A. Glatz. 2005. Conjugated linoleic acid content and organoleptic attributes of fermented milk products produced with probiotic bacteria. *J. Agric. Food Chem.* **53:**9064-9072.

Yamazaki, K., A. Tsunoda, M. Sibusawa, Y. Tsunoda, M. Kusano, K. Fukuchi, M. Yaman, M. Kushima, K. Nomoto y M. Morotomi. 2000. The effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* strain Shirota on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci and colon cancer in the rat. *Oncol. Rep.* **7:**977-982.

Yasui, H., K. Shida, T. Matsuzaki, y T. Yokokura. 1999. Immunomodulatory function of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* **76**:383-389.

Yeung, P. S. M., C. L. Kitts, R. Cano, P. S. Tong y M. E. Sanders. 2004. Application of genotypic and phenotypic analyses to commercial probiotic strain identity and relatedness. *J. Appl. Microbiol.* **97**:1095-1104.

Zhang, L., N. Li, R. Caicedo y J. Neuf. 2005. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J. Nutr.* **135**:1752-1756.

Zhu, L., W. Li y X. Dong. 2003. Species identification of genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences and proposal of *Bifidobacterium themacidophilum* subsp. porcinum subsp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**:1619-1623.

Zuercher A. W., R. Fritsché, B. Corthésy y A. Mercenier. 2006. Food products and allergy development, prevention and treatment. *Curr. Op. Biotechnol.* **17**:198-203.