

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II



TESIS DOCTORAL

“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
LACTOBACILLUS PARACASEI CNCM I-4034, *BIFIDOBACTERIUM*
BREVE CNCM I-4035 Y *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* CNCM I-
4036, OBTENIDOS A PARTIR DE HECES DE NIÑOS ALIMENTADOS
EXCLUSIVAMENTE CON LECHE MATERNA”

SERGIO IGNACIO MUÑOZ QUEZADA

2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Sergio Ignacio Muñoz Quezada
D.L.: GR 4536-2011
ISBN: 978-84-694-5762-7

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

TESIS DOCTORAL

“AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
LACTOBACILLUS PARACASEI CNCM I-4034, *BIFIDOBACTERIUM*
BREVE CNCM I-4035 Y *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* CNCM I-
4036, OBTENIDOS A PARTIR DE HECES DE NIÑOS ALIMENTADOS
EXCLUSIVAMENTE CON LECHE MATERNA”

**Tesis Doctoral para optar al grado de Doctor por la Universidad de
Granada presentada por:**

Sergio Ignacio Muñoz Quezada

Bajo la dirección de los doctores:

Ángel Gil Hernández

Carolina Gómez Llorente

Granada, 2011.

D. Ángel Gil Hernández, Catedrático del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

Dña. Carolina Gómez Llorente, Doctora Contratada del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

Informan:

Que el trabajo titulado “aislamiento, identificación y caracterización de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, obtenidos a partir de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna” ha sido realizado por Sergio Muñoz Quezada bajo su dirección, y que reúne todos los requisitos para ser defendido y optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, se firma este certificado en Granada el de mayo del 2011

Dr. Ángel Gil Hernández

Dra. Carolina Gómez Llorente

D. Alberto Vargas Morales, Catedrático y Director del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada.

Certifica:

Que el trabajo titulado “aislamiento, identificación y caracterización de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, obtenidos a partir de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna” ha sido realizado por Sergio Muñoz Quezada en las instalaciones del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada, donde están ubicados los laboratorios del grupo de investigación CTS-461 Bioquímica Nutricional: Implicaciones terapéuticas, perteneciente a este Departamento.

Y para que conste donde proceda, se firma este certificado en Granada el de mayo del 2011

Dr. Alberto Vargas Morales.

Este estudio forma parte de dos proyectos de la Fundación Empresa Universidad de Granada, financiado por la Empresa HERO ESPAÑA S.A. Proyecto nº 2659 “Aislamiento, identificación y caracterización de microorganismos probióticos” y proyecto nº3143 “Caracterización de la actividad probiótica de las bacterias *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 y *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035



ABREVIATURAS

ALV	Alergia a la leche de vaca
AOM	Azoximetano
BAL	Bacterias ácido lácticas
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
DAA	Diarrea asociada al uso de antibióticos
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido dexosirribonucleico
DT1	Diabetes tipo 1
EII	Enfermedades inflamatorias intestinales
FBS	Suero bovino fetal
FUFOSE	<i>Functional Food Science in Europe</i>
GALT	Tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
HsP	Proteínas de choque térmico
IgA	Inmunoglobulina A
IGF-I	Factor de crecimiento tipo insulina I
IL	Interleuquina
ILSI	<i>International Life Sciences Institute</i>
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LPL	Lipoproteín lipasa
LPS	Lipopolisacárido
MHC	Complejo de histocompatibilidad principal
MRS	<i>Medium Man Rogosa Shape</i>
NF- κ B	Factor de transcripción nuclear Kappa B
NO	Oxido nítrico
NOD	Dominios de unión a oligonucleótidos
ODC	Ornitina Descarboxilasa
PAMP	Patrones moleculares asociadas a patógenos
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PPR	Receptores reconocedores de patrones
RNA	Ácido ribonucleico
TGF- β	Factor de transformación del crecimiento tipo beta
TLR	Receptores análogos de <i>Toll</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
TS	<i>Tryptone Soya Broth</i>
UFC	Unidades formadoras de colonias bacterianas
VLDL	Lipoproteínas de muy baja densidad
ZO	<i>Zónula occludens</i>

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	21
ANTECEDENTES	27
COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA EN EL TUBO DIGESTIVO	29
IMPORTANCIA Y FUNCIONES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	31
Funciones metabólicas	33
Funciones tróficas	35
Funciones protectoras	35
INMUNOMODULACIÓN	36
MICROBIOTA Y DESÓRDENES EXTRA-INTESTINALES	39
COLONIZACIÓN BACTERIANA EN EL INTESTINO DEL NIÑO	45
Factores que influyen en la colonización bacteriana	45
Colonización durante el primer año de vida	49
Colonización a partir del segundo año	49
RELACIÓN ENTRE EL INTESTINO Y LA MICROBIOTA	50
PROBIÓTICOS	51
Concepto de probiótico	51
Microorganismos probióticos	54
EFEECTO DE LOS PROBIÓTICOS EN DISTINTAS PATOLOGÍAS	56
Probióticos y malabsorción de lactosa	56
Probióticos y reducción de los niveles plasmáticos de colesterol	57
Probióticos y diarrea	58
Probióticos y enfermedades inflamatorias intestinales	60
Probióticos y cáncer	63
ACCIONES DE LAS BACTERIAS PROBÓTICAS SOBRE EL TRACTO GASTROINTESTINAL	65
Inmunomodulación	65
Adhesión a la mucosa intestinal	66
Producción de compuestos antimicrobianos	67
Producción de nutrientes importantes en la función intestinal	68
Mejora de la función de la barrera intestinal	69
EXCLUSIÓN COMPETITIVA DE BACTERIAS PATÓGENAS	70
AISLAMIENTO DE BACTERIAS PROBÍOTICAS	74
Ensayos in vitro de potenciales bacterias probióticas	74
MATERIAL	81
MUESTRAS	81
BACTERIAS PROBÍOTICAS CONTROLES	81
BACTERIAS PROBÍOTICAS DEPOSITADAS EN INSTITUT PASTEUR	81
BACTERIAS PATÓGENAS INTESTINALES	82
OBTENCIÓN DEL SOBRENADANTE PROBÍOTICO LIOFILIZADO	82
CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES	83
REACTIVOS Y MATERIALES UTILIZADOS	83
Reactivos	83
Aparatos	84
MÉTODOS	85

DISEÑO EXPERIMENTAL DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	85
PROCESAMIENTO Y SIEMBRA DE MUESTRAS	86
Materiales	86
Procedimiento	86
PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO	86
Medio de Beerens	86
Medio BFM	87
Medio Columbia Modificado	88
Medio Rogosa Agar	88
SIEMBRA DE MUESTRAS	89
Materiales	89
Procedimiento	89
DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS	89
Materiales	89
Procedimiento	89
DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A pH Y SALES BILIARES	90
Bacterias controles	91
PRUEBAS DE ADHESIÓN A CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES	92
IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS	93
Aislamiento de DNA genómico bacteriano	93
IDENTIFICACIÓN MEDIANTE PRUEBAS DE FERMENTACIÓN	97
EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL SOBRENADANTE DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS ENTEROPATÓGENAS	98
EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS SOBRENADANTES DE LOS PROBIÓTICOS Y DE ESTOS MICROORGANISMOS SOBRE LA ADHESIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS A CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES	101
Evaluación de la adhesión mediante PCR cuantitativa	102
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	105
RESULTADOS	109
EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO Y DE DIVERSAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS POR LOS PROBIÓTICOS IDENTIFICADOS	115
AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS INTERGÉNICOS 16S-23S	119
Lactobacillus rhamnosus CNCM I-4036	119
Lactobacillus paracasei CNCM I-4034	119
Bifidobacterium breve CNCM I-4035	119
ALINEAMIENTO DE SECCIONES SECUENCIADAS	120
ENSAYO DE LA ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE LAS CEPAS DE ESTUDIO EN MEDIO LÍQUIDO FRENTE A ENTEROPATÓGENOS	126
EFFECTO DE LOS SOBRENADANTES O DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS SOBRE LA ADHESIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS A CÉLULAS CACO-2	156

<i>DISCUSIÓN</i>	<i>171</i>
<i>BIBLIOGRAFÍA</i>	<i>195</i>
<i>ANEXO I</i>	<i>196</i>
<i>ANEXO II</i>	<i>242</i>

Introducción

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

La nutrición ha tenido un desarrollo muy importante en las últimas décadas, lo cual ha hecho cambiar su concepto; antes se consideraba que la dieta tenía el papel de aportar los nutrientes necesarios para mantener el estado de salud, mientras que hoy en día este concepto ha evolucionado a la idea de que la dieta puede contener alimentos que además de nutrir, promueven la salud.

En los últimos años, existe evidencia científica suficiente, para sustentar la hipótesis de que la dieta puede tener efectos fisiológicos, más allá de los beneficios nutricionales aceptados. De hecho, la dieta no solo puede ayudar a alcanzar una salud óptima, sino también, desempeñar una función importante reduciendo el riesgo de enfermedad.

A mediados de los años 80, en Japón, con el apoyo gubernamental, se inició la investigación y se propuso el término de “alimentos saludables” para uso específico (en inglés *Foods for Special Health Use*; FOSHU), el cual fue empleado para designar a los alimentos naturales o procesados que, además de sus componentes nutricionales, contienen otros adicionales que favorecen la salud, la capacidad física y el estado mental de una persona, lo que luego derivó al concepto de “alimento funcional”.

Hasta la fecha el concepto de mayor aceptación para “alimentos funcionales” es el definido por el *International Life Sciences Institute* (ILSI), en el documento de consenso de 1999 *Functional Food Science in Europe* (FUFOSE). Esta definición establece que un alimento funcional es aquel que ha demostrado de manera satisfactoria que posee un efecto beneficioso sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, siendo esto relevante para la salud y el bienestar y/o la reducción del riesgo de enfermar. Es importante destacar que los alimentos funcionales han de seguir siendo un alimento, y no se consumirán en otro tipo de presentaciones como polvos, cápsulas, etc. Además, deben demostrar sus beneficios en cantidades que puedan ser consumidas en la dieta. Razón por lo cual, la industria alimentaria ha comenzado a desarrollar una gran cantidad de productos que contribuyen a prevenir las enfermedades crónicas, promoviendo el bienestar.

Dentro de los “alimentos funcionales” se encuentran los que contienen microorganismos denominados como “probióticos”, los cuales se definen como microorganismos vivos no patógenos que, ingeridos en cantidades suficientes, modulan o actúan sobre determinadas funciones del organismo, produciendo un efecto beneficioso, más allá del puramente nutricional, como contribuir al equilibrio de la microbiota intestinal del huésped y potenciar el sistema inmunitario (FAO, 2002). Actualmente, existen criterios internacionalmente aceptados para la definición de microorganismos probióticos como: ser de origen humano; ser resistente a la destrucción por el ácido gástrico y sales biliares; adherirse al epitelio intestinal y modular la respuesta inmunitaria (West *et al.*, 2009).

El uso de probióticos como herramienta médica en algunas patologías está muy aceptado, como es el caso del uso de la levadura *Sacharomyces boulardii* en la prevención y tratamiento de diarreas asociadas al uso de antibióticos. Además, el uso de bacterias ácido lácticas probióticas, ya sean del género *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y/o una mezcla de ellas, han mostrado efectos beneficiosos sobre algunas enfermedades digestivas. Estas bacterias forman parte de la microbiota intestinal tanto de adultos como de niños y su es beneficiosa para el huésped.

Se han propuesto varios mecanismos por los que estas bacterias, que se encuentran mayoritariamente alojadas en el tracto gastrointestinal, podrían ser capaces de tratar y prevenir desórdenes intestinales como reducir el pH, potenciar la reparación de la mucosa (Hickson *et al.*, 2007), aumentar la proliferación de anaerobios (Apostolou *et al.*, 2001), competir con patógenos (Servin, 2004), secretar sustancias antimicrobianas y estimular el sistema inmunitario (Lebeer *et al.*, 2010).

Los efectos beneficiosos de algunos microorganismos son muy amplios; sin embargo, es conocido que muchos de los efectos biológicos de los probióticos son específicos a nivel de cepa, por lo que caracterizar los efectos de cada cepa probiótica es de alta importancia.

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, y el gran aumento del interés de la industria alimentaria como de los consumidores por el desarrollo de estos alimentos funcionales y el interés científico por dilucidar los mecanismos implicados en sus efectos beneficiosos, se creyó conveniente realizar el presente trabajo con el **objetivo**

general de aislar y caracterizar microorganismos probióticos a partir de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna para un posible uso en la industria alimenticia o farmacéutica, y especialmente para ser utilizarlos en fórmulas lácteas para la infancia.

Para ello se han planteado los siguientes **objetivos específicos**:

- a) Aislar cepas bacterianas ácido lácticas a partir de heces de niños alimentados exclusivamente al pecho
- b) Evaluar la resistencia al pH y a sales biliares de las cepas aisladas
- c) Determinar la adherencia de las cepas seleccionadas a células epiteliales intestinales humanas HT29.
- d) Identificar las cepas aisladas mediante estudios de fermentación y de secuenciación del gen 16S del RNA ribosómico (rRNA) bacteriano.
- e) Estudiar la capacidad de competencia de las cepas probióticas frente a enterobacterias.
- f) Estudiar la producción de citoquinas (IL-8 y TNF- α) de las células epiteliales intestinales Caco-2, en presencia de las bacterias patógenas y probióticas.

Antecedentes

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Se sabe que las superficies de las mucosas está colonizada por una gran cantidad y diversidad de microorganismos. La influencia de esta comunidad microbiana sobre nuestra fisiología probablemente es más pronunciada en el intestino, debido a que este órgano contiene la mayor parte de estos organismos; solo el colon contiene sobre el 70% de todos los microorganismos del cuerpo humano (Ley *et al.*, 2006). Se estima que el área de superficie del intestino humano sería la de una pista de tenis (200 m²) (Gebbers y Laissue, 1989), representando el órgano con mayor superficie para la colonización bacteriana. Adicionalmente, el tracto gastrointestinal es rico en moléculas que pueden ser utilizadas como nutrientes por los microorganismos, por lo que es el sitio perfecto para ser colonizado.

El conjunto de microorganismos que habita el intestino, conocido como microbiota intestinal, está compuesto fundamentalmente por microorganismos anaerobios estrictos. Aunque hay más de 50 *Phyla* de bacterias descritos hasta la fecha (Schloss y Handelsman, 2004), la microbiota intestinal está dominada por solo dos de ellos: *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, mientras que proteobacterias, verrucomicrobia, actinobacterias, fusobacterias y cianobacterias están presentes en menores proporciones (Eckburg *et al.*, 2005). Las estimaciones del número de especies de bacterias presentes en el intestino humano varían ampliamente entre los diferentes estudios, aunque se acepta en general que hay entre 500 a 1000 especies (Xu y Gordon, 2003). Sin embargo, un análisis más detallado ha sugerido que la microbiota intestinal humana está compuesta por más de 35.000 especies de bacterias (Frank *et al.*, 2007).

La mucosa intestinal separa al ser humano de las bacterias que se encuentran en la luz intestinal, un número 10 veces mayor que todas las células eucariotas que existen en sus tejidos. Se estima que el organismo contiene alrededor de 10¹⁴ células, de las cuales solo el 10% son de mamífero; por lo tanto, el 90 % de nuestro cuerpo está constituido por bacterias (Hooper *et al.*, 2002).

La microbiota intestinal no es homogénea, el número de bacterias presentes en el intestino humano va desde 10¹ a 10³ unidades formadoras de colonia (UFC/g) en el estómago y duodeno, aumentando a 10¹¹ a 10¹² UFC en el colon (O'Hara y Shanahan,

2006) (Figura 1A). Además, la composición de la microbiota es diferente dependiendo del sitio en que se encuentre en el tracto gastrointestinal. Se han descrito que en individuos sanos, la microbiota del intestino delgado es más enriquecida en la clase de *Bacilli* de *Firmicutes* y *Actinobacteria*. Por otro lado, *Bacteroidetes* y *Lachnospiraceae*, una familia de los *Firmicutes* se encuentran más prevalentes en el colon (Frank *et al.*, 2007). Además de la heterogeneidad longitudinal a través del tubo digestivo, también existe una gran variación latitudinal, debido a que el epitelio intestinal está separado del lumen por una espesa y compleja capa de moco, generando un tipo de hábitat diferente al que pueda existir en el lumen o en la superficie del epitelio intestinal, existiendo una diferencia en la microbiota en cada uno de estos hábitat. Por ejemplo *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Ruminococcus* se encuentran en heces, mientras que solo *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Enterococcus* se encuentran en mucus y criptas del epitelio del intestino delgado (Swidsinski *et al.*, 2005) (Figura 1B).

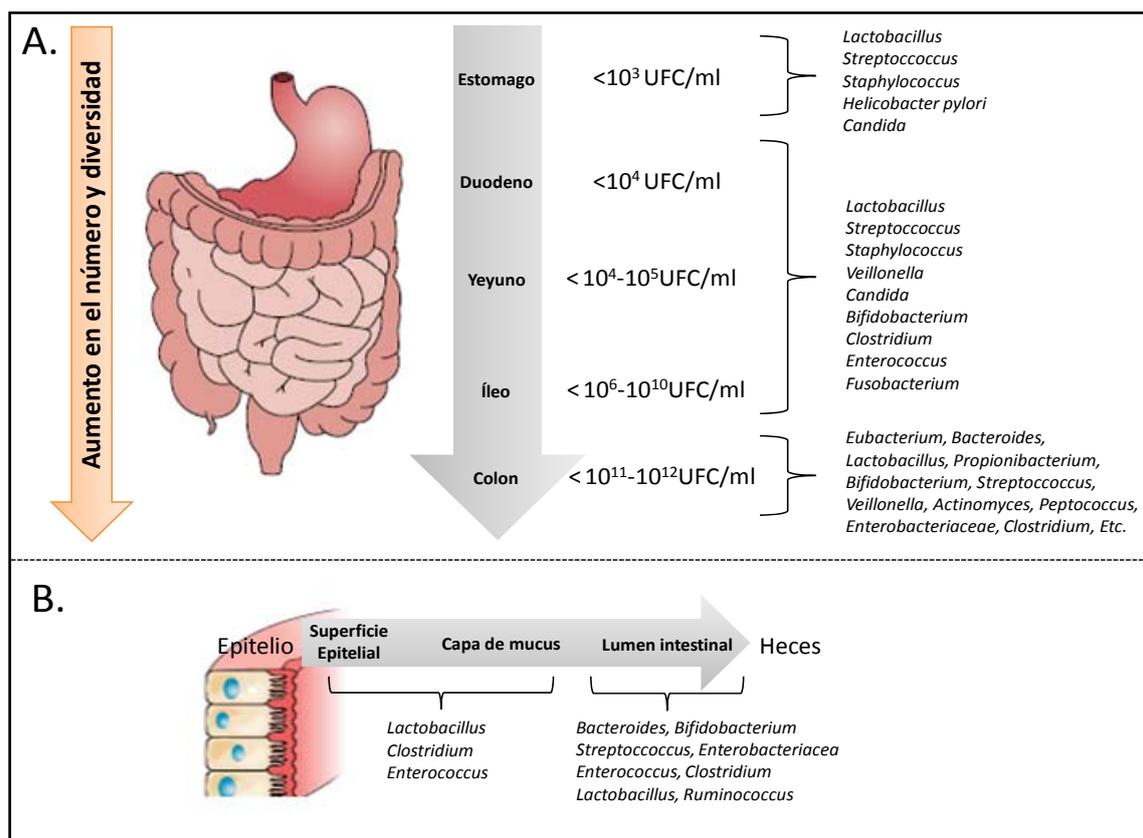


Figura 1. 1A. Variación en la composición y cantidad de la microbiota presente en el trayecto del tubo digestivo. 1B. Variaciones longitudinales en la composición de la microbiota en el intestino.

COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA EN EL TUBO DIGESTIVO

La microbiota del tubo digestivo difiere en el tipo y número de microorganismos dominantes en cada uno de sus segmentos y hay diferencias geográficas e individuales importantes, a pesar de lo cual existe un patrón de colonización más o menos común para todos los seres humanos (Guarner y Malagelada, 2003).

En la cavidad bucal, debido a que el pH de la boca tiende a ser alcalino, la microbiota es diversa y se calcula que existen aproximadamente 500 especies diferentes. La microbiota encontrada está altamente relacionada con el estado clínico de las encías y los dientes, por lo que en una boca sana existen principalmente especies anaerobias Gram positivas; en los huecos gingivales se encuentra una alta proporción de bacterias anaerobias facultativas Gram positivas (*Prevotella sp.*, *Veillonella sp.* y *Fusobacterium sp.*) y en la región supragingival se hallan, sobre todo, bacterias anaerobias facultativas Gram positivas (*Streptococcus sp.* y *Actinomyces sp.*) (10^{11} UFC/g de contenido). Pero cuando existen enfermedades periodontales la microbiota dominante son las especies Gram negativas anaerobias estrictas.

La lengua es reservorio de especies anaerobias obligadas y aunque las bacterias no crecen en la saliva, están presentes en ella en altas concentraciones (más de 10^8 UFC/ml) y la utilizan como medio de transporte para dirigirse a otros lugares del tracto digestivo (Kleessen *et al.*, 2000).

En el estómago y el duodeno, la mayoría de las bacterias deglutidas no sobreviven. En el estómago porque el jugo gástrico es extremadamente ácido (pH 2,5 a 3,5) y, generalmente, está libre de bacterias. No obstante, inmediatamente después de las comidas el pH aumenta y el recuento microbiano aumenta hasta 10^5 UFC/ml con un descenso posterior a 10^3 UFC/ml.

Las bacterias que sobreviven al estómago son especies resistentes al ácido e incluyen microorganismos Gram positivos (estreptococos, lactobacilos y levaduras) y *Helicobacter pylori* (Kleessen *et al.*, 2000). Debido a lo agresivo de los líquidos intestinales y al tiempo corto de tránsito, en el duodeno es difícil la colonización estable de las bacterias por lo que contiene un número relativamente bajo de microorganismos en tránsito (10^3 a 10^4 UFC/ml) (Holzapfel *et al.*, 1998; Guarner y Malagelada, 2003).

En el intestino delgado, desde el duodeno hacia abajo, la composición de la microbiota se conoce poco debido a las dificultades inherentes a la toma de muestras en sujetos sanos, pero dado lo agresivo del medio, la microbiota es escasa y contiene usualmente menos de 10^5 UFC por ml. En el intestino delgado proximal, además de las especies encontradas en el estómago se aíslan *Haemophilus sp*, *Actinomyces sp*, algunos anaerobios (*Veillonella sp* y *Bacteroides sp*) y cantidades considerables de lactobacilos, debido al epitelio escamoso estratificado de esta zona y a la capacidad de adhesión de estas bacterias (Mackie *et al.*, 1999).

En el yeyuno e íleon existe un incremento continuo en el número ($>10^8$ UFC/g) y variedad de la microbiota con lo que, además de las bacterias ácido lácticas, Hay un número considerable de bifidobacterias, de anaerobios facultativos (*Bacteroides* y *Fusobacterium*) y de anaerobios estrictos que están presentes en número creciente a partir de la válvula ileocecal (Holzapfel *et al.*, 1998).

La microbiota en la parte distal del intestino delgado es mucho más densa ($> 10^9$ UFC/ml) y se asemeja a la del ciego, con gran cantidad de bacterias anaerobias estrictas y es considerada una zona de transición (Mackie *et al.*, 1999; Kleessen *et al.*, 2000; Hooper *et al.*, 2002). En los adultos los *Bacteroides* son las especies más comunes (10^{11}), seguido por microorganismos Gram positivos no esporulados (10^9 a 10^{10}) como *Eubacterium*, *Lactobacillus*, cocos anaerobios (*Peptostreptococcus*, *Ruminococcus*, *Coprococcus*, *Veillonella*, *Acidaminococcus* y *Streptococcus*); y el género *Clostridium* (10^7 - 10^8 UFC/g).

En el intestino grueso, son comunes los microorganismos anaerobios facultativos (*Streptococcus* y *Enterococcus*). Así mismo, *Escherichia coli* es la bacteria anaerobia facultativa Gram negativa (10^8 /g de heces) que más se aísla; otros microorganismos Gram negativos como *Klebsiella pneumoniae* y *Enterobacter cloacae* tienen recuentos menores. Diversos bacilos, *Staphilococcus aureus* y *Candida albicans* se aíslan en una concentración de 10^5 /g de heces (Kleessen *et al.*, 2000).

Los pocos estudios realizados en relación con la composición de la microbiota asociada a la mucosa del colon sugieren que las poblaciones epiteliales son similares a las del lumen aunque en cantidades menores (10^6 - 10^{10}). Sin embargo, con métodos de biología molecular, se ha encontrado que la diversidad microbiana tanto en el colon como en las heces es más grande de lo que previamente se había descrito ya que la mayoría de las bacterias encontradas con estos métodos genéticos no habían sido

descritas previamente (Eckburg *et al.*, 2005). Con los métodos de cultivo convencionales, se ha descrito que las eubacterias, bifidobacterias (*B. vulgatus*, *B. distasonis* y *B. fragilis*), *Clostridium* y los cocos Gram positivos son las especies dominantes (Kleessen *et al.*, 2000; Mcfarlane *et al.*, 2000). En los lactantes, además de las eubacterias, las bifidobacterias *B. bifidum*, *B. longum*, *B. adolescentis* y *B. animalis* representan las especies más importantes (Harmsen *et al.*, 2000).

En el lumen las bacterias pueden vivir de forma separada, pero el examen microscópico muestra que la mayor parte de las bacterias no se encuentra en forma dispersa, sino en grandes conglomerados que atacan las estructuras de los restos alimentarios sólidos. El análisis microbiano de partículas de alimentos parcialmente digeridas muestra que las poblaciones bacterianas crecen en superficies particulares y, al menos físicamente, las poblaciones son similares a la microbiota no adherente con predominio importante de bacteroides y bifidobacterias (Mcfarlane *et al.*, 2000). Por último, se ha encontrado que la microbiota asociada a la mucosa del recto es aproximadamente la misma que en el colon (Kleessen *et al.*, 2000).

Además de las condiciones ambientales del tubo digestivo, la cantidad y variedad de las bacterias en las diferentes regiones del mismo está determinada por una gran diversidad de factores complejos intrínsecos y extrínsecos (Mackie *et al.*, 1999) (Tabla 1). De igual forma, así como el huésped directa o indirectamente influye sobre la microbiota que habita su intestino, ésta también tiene un impacto importante sobre el organismo que la aloja y estos efectos pueden ser beneficiosos o perjudiciales para la salud del individuo (Hooper *et al.*, 2002).

IMPORTANCIA Y FUNCIONES DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

Se conoce como microbiota normal a todas aquellas especies de microorganismos que se encuentran en el intestino de individuos sanos y que poseen una o varias funciones que pueden ser beneficiosas para la salud del huésped (Bengmark, 2000). Sin embargo, hay que considerar que más del 60% de las bacterias de la microbiota no pueden ser aun cultivadas ni caracterizadas por completo.

Existe un creciente número de estudios que apuntan a la visión de una co-evolución del huésped y su microbiota nativa: Se ha demostrado que el trasplante de microbiota entre distintas especies hospedadoras resulta en que la comunidad bacteriana

trasplantada cambia y tiende a parecerse a la microbiota nativa del huésped receptor. (Rawls *et al.*, 2006), mostrando que la microbiota presenta un alto nivel de adaptación a su hábitat y con el huésped (Samuel *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2007).

En los últimos años se ha hecho evidente que la microbiota intestinal presenta efectos beneficiosos a través de diferentes vías, jugando un rol importante sobre: metabolismo energético, digestión y síntesis de nutrientes, síntesis de vitaminas, desarrollo epitelial y respuesta inmunitaria (Tappenden y Deutsch, 2007); a cambio los microorganismos cuentan con las condiciones de crecimiento adecuadas y un flujo constante de nutrientes (Savage, 1977).

Tabla 1. Factores que afectan a la microbiota intestinal del ser humano.

1. Factores mediados por el huésped
pH, secreciones (inmunoglobulinas, bilis enzimas)
Motilidad intestinal
Células exfoliadas, mucinas, tejido exudado
2. Factores microbianos
Adhesión
Motilidad
Esporas, cápsulas, enzimas y componentes antimicrobianos
3. Interacciones microbianas
Sinergia
Cooperación metabólica
Cambios en el pH y tensión de oxígeno
Antagonismo/estimulación
Ácidos grasos de cadena corta/aminas
Componentes antimicrobianos, sideróforos
Alimentos
4. Dieta
Composición
Fibras no digeribles
Compuestos no nitrogenados
Leche materna
5. Drogas
Modificadores de la motilidad intestinal
Antibióticos
Antiácidos y bloqueadores de la producción de HCl

Funciones metabólicas

La información genética contenida en la gran cantidad de microorganismos de la microbiota intestinal, codifica cientos de genes que están ausentes en el genoma humano, entre ellos el procesamiento de los polisacáridos de la dieta, metabolismo de complejos proteicos, síntesis de vitaminas y producción de energía para mantener la homeostasis intestinal (Cani y Delzenne, 2009).

El metabolismo microbiano es responsable de la conversión de muchas sustancias energéticas en nutrientes que pueden ser absorbidos y utilizados por el huésped (Hooper *et al.*, 2002). La microbiota del intestino grueso juega un papel importante en los procesos digestivos del huésped, generando energía de los residuos alimentarios no absorbidos, de las células de descamación intestinal y de las secreciones a través de la fermentación de los hidratos de carbono y proteínas, así como de la absorción de los ácidos grasos de cadena corta y otros productos metabólicos (Mcfarlane *et al.*, 2000).

Los mamíferos no tienen la capacidad de degradar polisacáridos complejos, pero transportan activamente azúcares simples de la dieta, como glucosa, a través de los enterocitos del intestino delgado. Los polisacáridos complejos transitan por el tracto gastrointestinal hacia el colon, donde la colonización bacteriana es mayor. Estos polisacáridos complejos como celulosa, almidón resistente y mucinas del mucus intestinal son descompuestos por la microbiota generando, por ejemplo, ácidos grasos de cadena corta que son absorbidos y usados por los enterocitos como principal fuente de energía (Jacobs *et al.*, 2009).

Las dietas que se consumen típicamente en Europa aportan a la fermentación bacteriana entre 50 y 60 gramos de hidratos de carbono al día, los cuales producen 0,5 a 0,6 moles de ácidos grasos de cadena corta con un valor energético total de 140 a 180 kilocalorías, que representan aproximadamente 10% del requerimiento calórico basal del individuo (Hooper *et al.*, 2002). Esta función es tan importante que los roedores libres de bacterias en el intestino o gnotobióticos, para mantener su peso, necesitan ingerir 30% más de energía que los animales con microbiota, lo que prueba que las bacterias intestinales ayudan al huésped a extraer el máximo valor energético de los alimentos (Hooper *et al.*, 2002; Inoue y Ushida, 2003). Se calcula que en el adulto, el epitelio colónico obtiene entre 60 y 70% de sus necesidades energéticas a partir de los

productos de fermentación bacteriana, principalmente del ácido butírico (Hooper *et al.*, 2002). Sin embargo, se ha descrito que el niño alimentado al pecho materno tiene una muy baja producción de ácido butírico debido a lo cual, se ha postulado que en estos niños esta función no sea tan importante como previamente se había creído o que los enterocitos de estos neonatos tengan características diferentes de las del adulto (Parret y Edwards, 1997).

Además de ser capaz de metabolizar polisacáridos complejos, la microbiota también modula la captación y depósito de los lípidos de la dieta. También ha demostrado suprimir la inhibición de la lipoproteína lipasa (LPL), aumentando la actividad de la LPL en el tejido adiposo y, por tanto, estimulando la captación de ácidos grasos por los adipocitos (Backhed *et al.*, 2004). Además, contribuye a suprimir en parte la síntesis hepática de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), resultando en una disminución significativa de los triglicéridos circulantes y en menor medida los niveles de colesterol (Resta, 2009).

La microbiota también contribuye a la homeostasis de los aminoácidos en el huésped. En aquellos animales no rumiantes ni coprófagos, la proteína microbiana no se utiliza en gran medida por el huésped; sin embargo, una pequeña cantidad de los requerimientos de ciertos aminoácidos es proporcionada por la síntesis bacteriana. Este hecho fue observado al marcar aminoácidos con N^{15} y encontrar que entre 1 y 20% de la lisina y la treonina circulante de estos animales derivó de las bacterias intestinales (Holzapfel *et al.*, 1998; Metges, 2000). También, algunas bifidobacterias marcadas con N^{15} y administradas por vía bucal, al ser destruidas en el lumen, aproximadamente 90% de las proteínas es absorbida por el intestino y 70% se retiene en el organismo (Gil y Rueda, 2000).

Los productos de la fermentación bacteriana han sido implicados en la motilidad, la circulación, y la estimulación del flujo intestinal y visceral que modulan la maquinaria metabólica intrínseca de las células del huésped, lo cual resulta en una absorción más eficiente de agua, calcio, magnesio y hierro (Bengmark, 1998; Holzapfel *et al.*, 1998, Younes *et al.*, 2001; Hooper *et al.*, 2002, Guarner y Malagelada, 2003). Además de la capacidad de la microbiota para metabolizar numerosos polisacáridos de plantas, los microorganismos intestinales degradan una gran variedad de

glicoconjugados derivados del huésped (sulfato de condroitina, mucina, hialuronato y heparina) (Hooper *et al.*, 2002).

Finalmente, los microorganismos colónicos también producen vitaminas, aunque algunas de estas también se pueden obtener de la dieta (vitaminas K y C, ácido fólico, biotina, niacina), aunque para ciertas vitaminas (K, B₁₂) la presencia de la microbiota es crucial para nuestra supervivencia (Resta, 2009).

Funciones tróficas

Posiblemente el papel más importante de la microbiota intestinal sobre la fisiología colónica es su efecto trófico en el epitelio intestinal (Guarner y Malagelada, 2003). La diferenciación de las células epiteliales está afectada en gran medida por la interacción con los microorganismos residentes (Hooper *et al.*, 2001) y sus productos metabólicos, principalmente por los ácidos grasos de cadena corta como acetato, propionato y butirato que estimulan la proliferación y diferenciación de las células epiteliales en el intestino humano (Bezitzoglou, 1997). El acetato es utilizado por los músculos esquelético y cardíaco para obtener energía y por los adipocitos para la lipogénesis (Hooper *et al.*, 2002). La microbiota intestinal tiene un impacto directo sobre la estructura del intestino; a diferencia de los animales convencionales, los libres de gérmenes tienen un patrón alterado de células madres de las células epiteliales, lo que modifica los tiempos de diferenciación y la cantidad de tipos de células expresadas en el epitelio intestinal (Tappenden y Deutsch, 2007).

Algunos estudios han descrito la importancia de la microbiota en el desarrollo microvascular del intestino, mediante la regulación de la transcripción de proteínas angiogénicas (Hooper *et al.*, 2001). Además, varias cepas de *Lactobacillus* han demostrado contribuir al mantenimiento de las uniones estrechas del epitelio intestinal, proporcionando un efecto protector frente a bacterias patógenas o lesiones intestinales (Lutgendorff *et al.*, 2008).

Funciones protectoras

La microbiota intestinal nativa representa una barrera física para la entrada de patógenos por exclusión competitiva, como la ocupación de los sitios de unión, consumo de nutrientes y producción de sustancias antimicrobianas. Además, estimula a que el huésped produzca diversos compuestos antimicrobianos.

Numerosos péptidos antimicrobianos, tales como defensinas, catelicidinas y lectinas tipo C, son producidas por el tracto gastrointestinal y pertenecen a un grupo diverso de compuestos que actúan sobre estructuras de la superficie de bacterias comensales y patógenas (Hooper, 2009). Esto permite que una de las principales funciones de los péptidos antimicrobianos sea regular la composición y número de la microbiota intestinal. Este proceso es bidireccional, ya que productos del metabolismo de diferentes especies bacterianas han mostrado estimular la producción de diferentes tipos de péptidos antimicrobianos por parte del huésped (Salzman *et al.*, 2007). Algunos estudios han contribuido a identificar diferentes especies de bacterias constituyentes de la microbiota que actúan contra bacterias patógenas, aunque los mecanismos exactos involucrados en este efecto no han sido esclarecidos totalmente (Sanz *et al.*, 2007).

Algunas especies de bacterias que componen la microbiota intestinal como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* han mostrado prevenir infecciones por *Listeria* en células epiteliales mediante la secreción de compuestos y por modulación de la respuesta inmunitaria (Corr *et al.*, 2007). Compuestos secretados por *Lactobacillus* parecen disminuir la colonización de bacterias patógenas, como *Escherichia coli* (Medellin-Pena y Griffiths, 2009). Estos productos antimicrobianos secretados por especies bacterianas que componen la microbiota intestinal tienden a mostrar una actividad antimicrobiana contra grupos bacterianos similares a los productores de estos compuestos, posiblemente como una estrategia dirigida a mantener los potenciales competidores fuera de los nichos intestinales que son favorables para el crecimiento de bacterias productoras de estos compuestos (Sekirov *et al.*, 2010). Sin embargo, algunas bacterias del género *Lactobacillus* producen sustancias que son activas contra una amplia gama de bacterias enteropatógenas, tanto Gram positivas como Gram negativas (Lievin-Le *et al.*, 2006).

INMUNOMODULACIÓN

El rol central de la microbiota intestinal en el desarrollo del sistema inmunitario no debe ser una sorpresa, ya que la mucosa intestinal representa la mayor superficie de contacto con antígenos y bacterias del medio ambiente, los cuales son presentados a las células inmunes residentes en la mucosa intestinal.

Brevemente, el sistema inmunitario intestinal se compone del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT), incluyendo las placas de Peyer que se encuentran insertas en la lámina propia a lo largo del intestino delgado. Este sistema es considerado el órgano inmunitario más extenso del cuerpo humano, ya que el 80% de todas las células que producen inmunoglobulinas se encuentran en este tejido linfoide (Holzapfel *et al.*, 1998; Guarner y Malagelada, 2003). El GALT consiste en acumulaciones difusas de tejido linfático presente en la lámina propia de la pared intestinal y en la placa epitelial (Hanson *et al.*, 2003). Básicamente, el GALT está constituido por células T y B intraepiteliales, células M insertas entre los enterocitos, células dendríticas, cuyos pseudópodos alcanzan la luz intestinal, a través de las denominadas, uniones cerradas de los enterocitos, y macrófagos y células T y B presentes en la lámina propia. Además, las placas de Peyer están constituidas fundamentalmente por células B. Los propios enterocitos, al ser células procesadoras de antígenos se consideran células del GALT (Rueda y Gil, 2010).

La colonización bacteriana del tracto gastrointestinal afecta de forma directa la composición del GALT, ya que después de la exposición a microorganismos lumbales, el número de linfocitos intraepiteliales se expande de forma significativa, los centros germinales con células productoras de inmunoglobulinas aumentan rápidamente en los folículos y la concentración de inmunoglobulinas aumenta sustancialmente en suero (Tannok, 2001) (figura 2).

El sistema inmunitario se puede dividir en innato y adaptativo. La respuesta adaptativa inmunitaria depende de los linfocitos B y T, los cuales son específicos para cada antígeno en particular. En contraste, el sistema innato responde a estructuras comunes llamadas patrones moleculares asociadas a patógenos (PAMP), compartida por la gran mayoría de estos. La respuesta primaria frente a los patógenos es desencadenada por los receptores reconocedores de patrones (PPR), los cuales se unen a los PAMP. Dentro de los PPR se encuentran los receptores análogos de Toll (*Toll-like receptors-TLR-*), dominios de unión a oligonucleótidos (NOD), moléculas de adhesión y lectinas. Estos receptores son altamente expresados en células presentadoras de antígenos, como macrófagos y células dendríticas (DC). Aunque también son expresados en las células epiteliales intestinales, las que se encuentran en contacto directo con la microbiota e influyen en la iniciación y regulación de la respuesta inmunitaria (Artis, 2008) (Figura

3). Los TLR reconocen principalmente componentes microbianos específicos y desencadenan la activación de vías de señalización celular, las cuales inducen la producción de citoquinas, productos antimicrobianos, quimoquinas y la maduración de las células DC, lo que produce una respuesta inmunitaria adaptativa (Akira *et al.*, 2006).

La importancia de la microbiota intestinal en el desarrollo de la mucosa intestinal como en el sistema inmunitario puede ser observada en modelos de animales gnotobióticos. Se ha descrito que los animales en ambientes gnotobióticos presentan placas de Peyer pobremente formadas y la composición de CD4⁺T, y células B productoras de Inmunoglobulina A (IgA) está alterada en la lamina propia (Artis, 2008). Tienen bajas densidades de células linfoides en la mucosa intestinal, las estructuras foliculares especializadas son pequeñas y la concentración de inmunoglobulinas circulantes es baja (Pedone *et al.*, 1999; Tannok, 2001). En la periferia, el desarrollo de áreas foliculares de células T y B en el bazo y nódulos linfoides periféricos se encuentra también alterado (Smith *et al.*, 2007). La introducción de un producto aislado de *Bacteroides fragilis*, una de las especies bacterianas comensales dominantes en ratón, corrige los defectos en el tejido linfoide periférico de un ratón gnotobiótico (Mazmanian *et al.*, 2005). Lo que demuestra que las señales de las bacterias comensales tienen un rol esencial en el desarrollo del sistema inmunitario mucoso y periférico. Estas observaciones indican que los mecanismos moleculares que existen para facilitar el reconocimiento de las bacterias comensales permiten un nivel basal de activación inmunitaria para programar patrones de expresión de genes que se requieren para el normal desarrollo y función de las células inmunes.

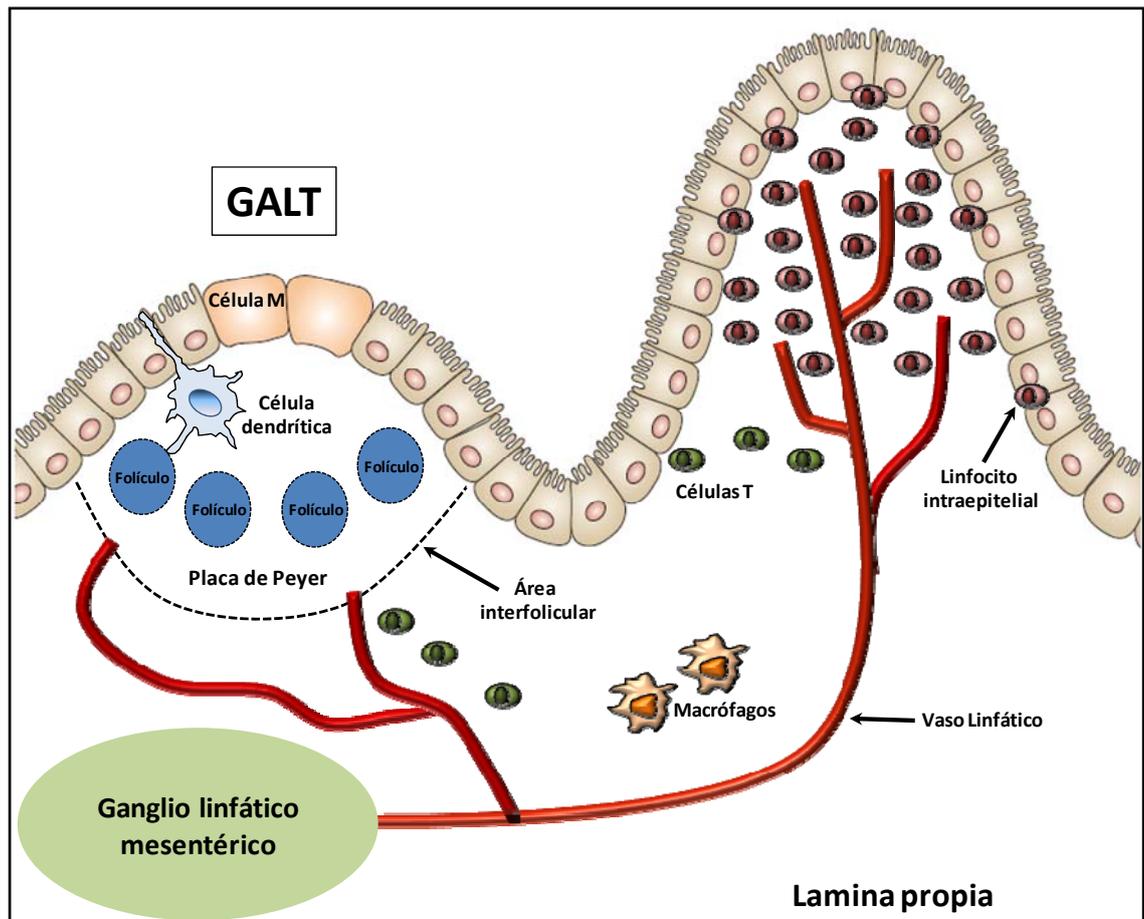


Figura 2. Compartimentos del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT).

Además de la regulación del desarrollo del sistema inmunitario intestinal y sistémico, recientes estudios han sugerido que la adquisición o composición de la microbiota podría desencadenar o influir en el curso de varios estados de enfermedades inflamatorias o metabólicas (Hörmannspurger y Haller, 2010).

MICROBIOTA Y DESÓRDENES EXTRA-INTESTINALES

La relación entre la microbiota y el sistema inmunitario intestinal se describe como “homeostasis”, lo que se refiere en este contexto, a la ausencia de efectos adversos de parte de los microorganismos que componen la microbiota intestinal, incluso durante perturbaciones ambientales, tales como, cambios de la comunidad bacteriana o dieta del huésped (Hooper y Macpherson, 2010). Una alteración de esta homeostasis podría ser la responsable de algunas enfermedades o desórdenes, lo cual puede involucrar al sistema gastrointestinal, a órganos accesorios del intestino u órganos

de sistemas remotos (Sekirov *et al.*, 2010) (Figura 4). Existe abundante evidencia que asocia las enfermedades inflamatorias intestinales (EII): enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, con una respuesta inadecuada del huésped a la microbiota intestinal. Esto se apoya en un cierto grado de efectividad del uso de antibióticos en la prevención y tratamiento de la inflamación, tanto en animales como en humanos. También, se ha asociado a una alteración de la función y composición de la microbiota, lo que produce sobreestimulación del sistema inmunitario, disfunción epitelial y mayor permeabilidad de la mucosa intestinal. Aunque los patógenos tradicionales probablemente no son responsables de estos desórdenes, el aumento de la virulencia de las especies de bacterias comensales, como *Escherichia coli*, que mejora la adherencia a la mucosa, la capacidad invasiva y la presencia intracelular; estimula una respuesta inmunitaria exacerbada (Sartor, 2008).

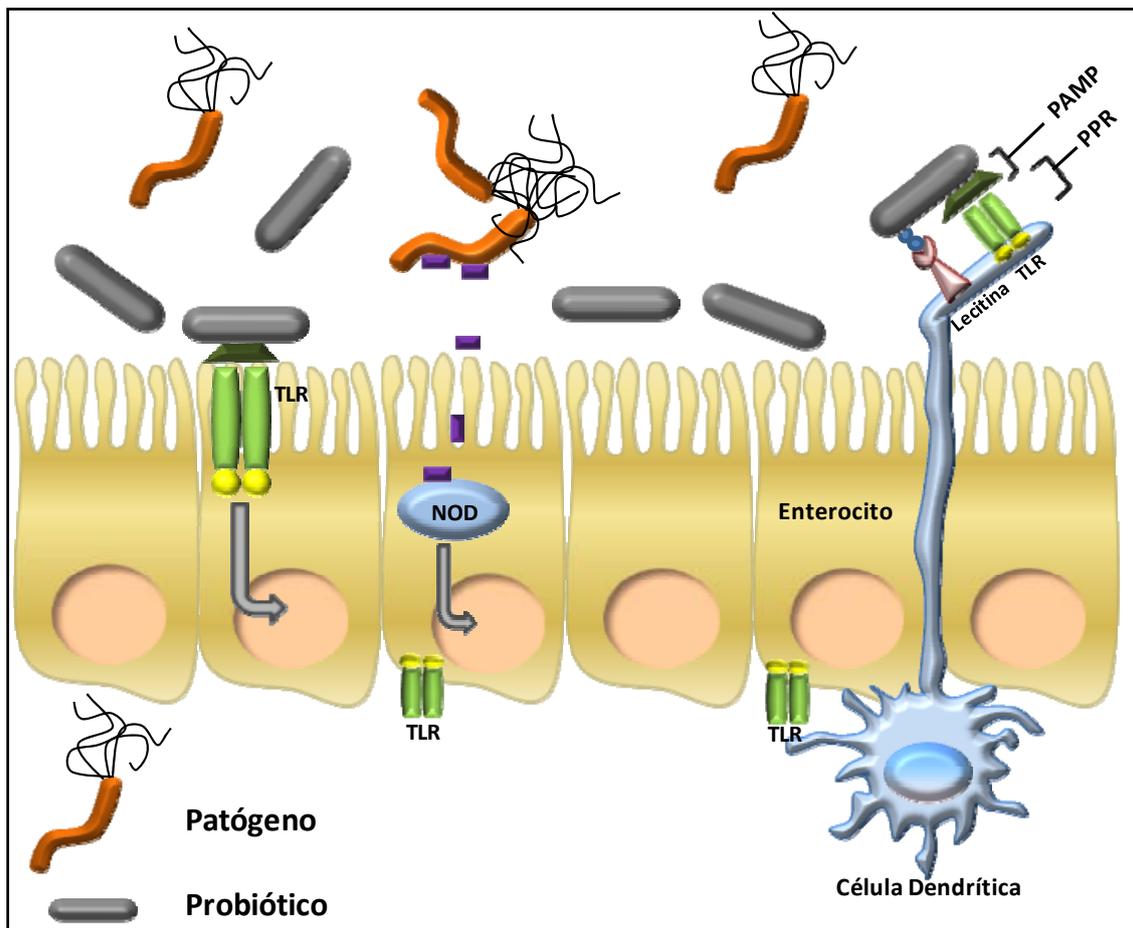


Figura 3. Células epiteliales intestinales y células del sistema inmunitario regulan la respuesta inmunitaria a través de receptores del sistema inmunitario innato (TLR y NOD).

Por otro lado, la microbiota se ha relacionado con alteraciones en órganos accesorios al intestino. Se ha atribuido una participación de la microbiota en la formación de cálculos biliares, ya que dentro de las causas de esta patología se incluyen alteraciones de la secreción y metabolismo del colesterol y de ácidos biliares, así como de la motilidad intestinal, donde la microbiota intestinal está indirectamente implicada (Wang *et al.*, 2009). Asimismo, se ha observado la presencia de miembros de la microbiota intestinal en la bilis, lo que podría ser debido a un aumento de la permeabilidad intestinal durante la obstrucción biliar (White *et al.*, 2006). Esta contaminación podría provocar litogénesis mediante la inducción de colestasis.

En investigaciones realizadas en ratas con cirrosis a las que se les administró factor de crecimiento tipo insulina I (IGF-I), factor responsable del mantenimiento de la barrera intestinal, se observó que el IGF-I es capaz de limitar el desarrollo de cirrosis hepática en animales con daño hepático por aumento de la función de barrera intestinal y que, además, reduce los niveles de translocación bacteriana (Lorenzo-Zuñiga *et al.*, 2006). En pacientes con cirrosis hepática se observa una alteración de la composición de la microbiota, con una reducción de los recuentos de *Bifidobacterium* (Zhao *et al.*, 2004).

Una complicación de la cirrosis hepática es la encefalopatía hepática, que ocurre por acumulación de sustancias neurotóxicas a nivel sanguíneo produciendo manifestaciones neurológicas en el paciente. Se ha observado el efecto de probióticos y/o prebióticos sobre la encefalopatía hepática. Pacientes que recibieron una mezcla simbiótica presentaron una reversión en el 50% de los casos y solo algunos de los que recibieron prebiótico revirtieron este proceso. Este efecto es acompañado por un aumento significativo de *Lactobacillus* no productores de ureasa (Liu *et al.*, 2004).

La investigación sobre la microbiota intestinal durante estos últimos años, se ha centrado en dilucidar la contribución de ésta en la etiología de las enfermedades humanas y su participación en algunas enfermedades complejas que residen en órganos extra intestinales.

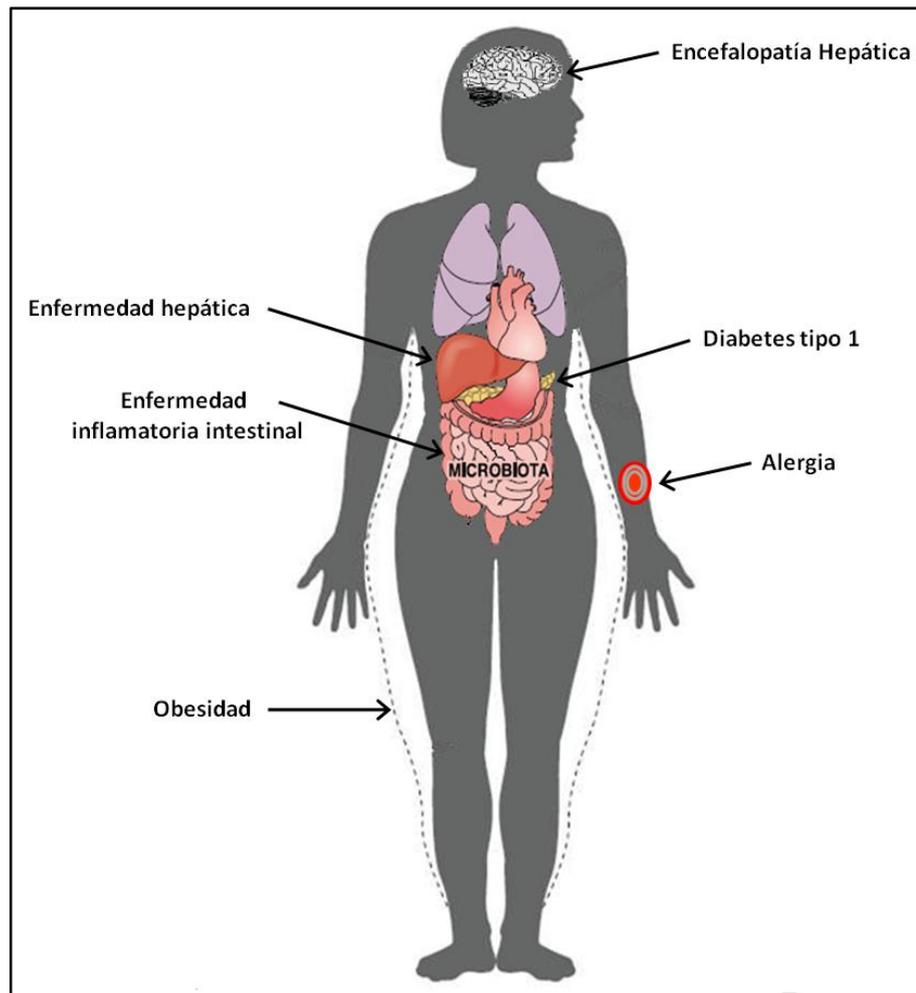


Figura 4. Asociación de la microbiota intestinal con enfermedades fuera del tracto gastrointestinal.

Teniendo en cuenta los antecedentes previamente descritos, no debe sorprender que las investigaciones sobre el rol de la microbiota en el desarrollo de la obesidad muestren resultados interesantes. Estudios recientes han demostrado la implicación directa de la microbiota intestinal en la regulación de la homeostasis energética tanto en ratas como en humanos. El análisis de la microbiota de ratones genéticamente obesos (*ob/ob*, con una mutación en el gen de la leptina) mostraron 50% menos de *Bacteroidetes* y un aumento en la proporción de *Firmicutes*, en comparación con ratones (*Ob/+* y *+/+*) control. Al comparar la microbiota de obesos y delgados, en ratones y humanos se observa que la estructura de las comunidades de bacterias son muy similares (Ley *et al.*, 2005). El perfil de la microbiota de humanos indica que la relación *Bacteroidetes/Firmicutes* de obesos alimentados con una dieta hipocalórica cambia hacia la relación que presentan los individuos delgados, disminuyendo la

presencia de *Bacteroidetes* y aumentando la de *Firmicutes* (Ley *et al.*, 2006). Por otro lado se ha observado que en ratones obesos la microbiota presenta un aumento sustancial de la expresión de genes que codifican enzimas que intervienen en la degradación de polisacáridos de la dieta (Turnbaugh *et al.*, 2006), observándose una disminución significativa de la energía contenida en las heces de los ratones obesos en comparación con sus homólogos delgados, lo que demuestra el aumento de la capacidad de la microbiota para extraer energía de la dieta (Turnbaugh *et al.*, 2006).

Han pasado décadas desde que por primera vez se propuso la “hipótesis de la higiene”, una teoría que sugiere que los factores que influyen en el grado de exposición de un individuo a microorganismos patógenos, tales como saneamiento, hogar, exposición a mascotas, uso de antibióticos, etc., aumenta, drásticamente la prevalencia de enfermedades atópicas como eccema, fiebre del heno y asma, sobre todo en países que han adoptado una forma de vida “occidental” (Strachan, 1989). Recientemente, se ha propuesto que esta hipótesis debe ser revisada para incorporar la función de la microbiota intestinal. Esta ha sido presentada como la “hipótesis de la microbiota”, que sugiere que perturbaciones en la microbiota intestinal como resultado de la escasa exposición a microorganismos debido a cambios en la dieta y al uso de antibióticos da como resultado una microbiota no desarrollada (Noverr y Huffnagle, 2005). Esta microbiota “inmadura” altera el adecuado desarrollo del sistema inmunitario, interrumpiendo la normal madurez de la tolerancia inmunológica, aumentando así la incidencia de alergias (Noverr y Huffnagle, 2005).

Varios estudios de cohorte han indicado la asociación entre el uso de antibióticos y el mayor riesgo de tener alergias (McKeever *et al.*, 2002) y asma (Verhulst *et al.*, 2008; Wjst *et al.*, 2001), haciendo hincapié en que los síntomas alérgicos se correlacionan positivamente con la anterior administración de antibióticos. Otros estudios prospectivos han observado una disminución significativa en ciertos grupos bacterianos de la microbiota intestinal y han sido correlacionados con síntomas de alergia a temprana edad. También, se ha relacionado los niveles de *Bifidobacterium* y *Enterococcus spp.*, con síntomas alérgicos en el primer mes de vida. Sin embargo, a los 6 meses de edad los niveles de *Enterococcus spp.* se normalizaron (Bjorksten *et al.*, 2001). Asimismo, se ha publicado que niños de 2 años de edad con síntomas de atopia, presentan una alta relación *Bacteroidetes/Bifidobacterium* (Suzuki *et al.*, 2008).

En estudios de alergia a la leche de vaca (ALV), una de las alergias más comunes en niños, que presenta diferentes síntomas cutáneos (eritema, urticaria), gastrointestinales (nauseas, vómitos, diarrea y síndrome de alergia oral) o respiratorios (rinoconjuntivitis, estridor y asma), se ha descrito que estos niños presentan una cantidad total de bacterias y de bacterias anaeróbicas mayor que los niños normales, y que después de 6 meses de tratamiento con una fórmula hidrolizada, presentaron una cantidad mayor de anaerobios y de *Lactobacillus*, y una menor cantidad de *Bifidobacterium* y enterobacterias comparado con los niños controles (Thompson *et al.*, 2010).

Debido a que aún no se conoce la mayor parte de la microbiota intestinal, a pesar del conjunto de técnicas utilizadas para poder cuantificarla y determinar su composición, la información disponible puede ser difícil de comprender. Se necesitan más estudios para poder dilucidar la importancia de la microbiota sobre el desarrollo del proceso alérgico.

Otra enfermedad autoinmune es la diabetes tipo 1 (DT1), la cual es mediada por una autodestrucción de las células productoras de insulina en el páncreas. Sin embargo, lo que no se conocía hasta hace poco, es que la DT1 también estaría vinculada a los cambios de la microbiota intestinal. Se han estudiado modelos de ratas que desarrollan espontáneamente DT1. En estas ratas BB-DP, se caracterizó la microbiota antes y después de la aparición de la DT1, las ratas saludables que posteriormente desarrollaron la enfermedad presentaron un número significativamente mayor de *Bacteroidetes*, en comparación a las que no presentaron la enfermedad (Brugman *et al.*, 2006). Además, las ratas que recibieron una combinación de antibióticos y dieta estándar, presentaron una reducción del 50% en la incidencia de DT1, mientras que la en ratas que recibieron antibióticos y dieta alta en caseína (dieta protectora de DT1), la incidencia de DT1 se redujo a cero (Brugman *et al.*, 2006).

Resultados parecidos presentaron los modelos de ratas diabéticas NOD, en las cuales la frecuencia de DT1 fue reducida desde 75 a 20% al administrar un antibiótico y una dieta estándar (Schwartz *et al.*, 2007). Estos estudios establecen un importante vínculo entre la microbiota intestinal y el desarrollo de autoinmunidad.

COLONIZACIÓN BACTERIANA EN EL INTESTINO DEL NIÑO

La primera colonización del intestino es uno de los estímulos más importantes del sistema inmunitario que enfrenta el recién nacido, y es influenciado por factores externos e internos. El tracto gastrointestinal del recién nacido es estéril, aunque este comienza a ser colonizado inmediatamente después del nacimiento (Mackie *et al.*, 1999; Hooper *et al.*, 2002; Kleessen *et al.*, 2000). Se encuentran pequeñas cantidades de microorganismos inmediatamente después del nacimiento (5×10^4 a 5×10^5), siendo las bacterias más frecuentemente *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Propionibacterium* y *Corynebacterium*. Cuando las membranas amnióticas se rompen las bacterias de la microbiota intestinal y vaginal materna también pueden aislarse (Björkstén, 1999). Bajo circunstancias normales, la colonización inicial del intestino del niño ocurre durante el parto al ponerse en contacto con la microbiota vaginal de su madre y, posteriormente, por el contacto con la microbiota normal de sus padres y con los microorganismos presentes en la leche materna (Sekirov *et al.*, 2010). Esto lleva a la inoculación con bifidobacterias, enterobacterias, bacteroides, clostridios y cocos Gram positivos (Björkstén *et al.*, 2001).

Un hallazgo constante es que todos los niños son inicialmente colonizados por *E. coli* y *Streptococcus*, que a veces alcanzan cifras de 10^8 a 10^{10} UFC/g de heces, por lo que se ha propuesto que son las responsables de la creación de un ambiente favorable para el establecimiento de los anaerobios de los géneros *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Clostridium* (Mackie, 1999; Adlerberth y Wold, 2009).

Factores que influyen en la colonización bacteriana

El origen de las cepas bacterianas que colonizan a los niños incluye la microbiota vaginal de la madre, de la piel de padres y hermanos, leche materna y otros alimentos. Por lo que el patrón de colonización influye en mayor o menor medida por el tipo de nacimiento y modo de alimentación, estructura familiar y otros hábitos.

Tipo de nacimiento

Nacimiento vaginal

Normalmente la colonización se inicia durante el parto por exposición a la microbiota de la madre; a esta forma de adquisición microbiana se le conoce como

transmisión vertical y a las posteriores como transmisión horizontal (Inoue y Ushida, 2003).

Con el largo proceso del nacimiento por vía vaginal se hace más viable el aislamiento de microorganismos en el estómago y la boca del bebé. De hecho, inmediatamente después del nacimiento, es posible aislar de la nasofaringe del 62% de los recién nacidos bacterias que fueron aisladas en la vagina de sus madres antes del inicio del parto, y los microorganismos encontrados en el contenido gástrico del neonato entre los 5 y 10 minutos posteriores al nacimiento, son similares a los aislados en el cérvix de la madre antes del parto (Falk *et al.*, 1998; Mackie *et al.*, 1999).

Se han encontrado más de 18 grupos diferentes de bacterias en el tracto gastrointestinal inferior de la mujer embarazada y esas son las principales bacterias a las que está expuesto el recién nacido, siendo *E. coli* y *Streptococcus sp.* las que con mayor frecuencia se aíslan del tracto digestivo del niño (Mackie *et al.*, 1999).

En los neonatos las bacterias aparecen en las heces durante los primeros días de vida, siendo las primeras *E. coli*, *Streptococcus sp.*, *Enterococcus sp.* y *Bifidobacterium* que aparecen alrededor del día 3 de vida extrauterina. Hacia el décimo día postnatal, la mayoría de los neonatos sanos a término están colonizados por una microbiota bacteriana heterogénea, en donde predomina *Bifidobacterium* en los alimentados al pecho y una microbiota mixta en los que reciben fórmula (Walker y Duffy, 1998; Mackie *et al.*, 1999).

Nacimiento por cesárea

Estos niños inician la vida prácticamente sin bacterias y son privados del contacto con la microbiota vaginal e intestinal de su madre, y la colonización de *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *E. coli* son retrasadas (Penders *et al.*, 2006). El primer contacto con ellas es fortuito y los microorganismos son introducidos del ambiente por el equipo hospitalario (Walker y Duffy, 1998). Los niños nacidos por cesárea pueden también estar expuestos a las bacterias de su madre, pero la exposición inicial es más frecuente con gérmenes del ambiente (equipo, aire y otros niños) siendo el vector el personal de enfermería (Mackie *et al.*, 1999). Existen datos acerca de que las mismas cepas de *Bifidobacterium* se detectan en las heces de niños nacidos en el mismo hospital, lo que sugiere una forma de transmisión horizontal (Inoue y Ushida, 2003).

Después del nacimiento, los microorganismos ambientales, orales y cutáneos pueden ser transferidos mecánicamente de la madre al recién nacido por varios mecanismos tales

como la succión, los besos y el cuidado materno (Mackie *et al.*, 1999). En estos niños, la colonización anaerobia es generalmente retardada y la microbiota está compuesta por bacterias microaerófilas, anaerobios facultativos y bacterias esporuladas (*Clostridium*) que se encuentran en el medio hospitalario. Entre los días 4 y 6, todos los niños nacidos por vía vaginal son colonizados por bacterias anaerobias pero sólo el 9% de los nacidos por cesárea tienen estas bacterias (Kleessen *et al.*, 2000). Los microorganismos introducidos durante los primeros siete días de vida tienen una baja capacidad de colonización y la adquisición de bacteroides anaerobios está retrasada. Anteriormente, se creía que la colonización por *Bifidobacterium* y *E. coli* era similar a la de niños nacidos por vía vaginal, (Walker y Duffy, 1998), pero ahora se sabe que en países con buenas medidas de higiene transcurre un lapso considerable de tiempo antes de que se implanten *E. coli* y otras bacterias Gram negativas (Falk *et al.*, 1998; Penders *et al.*, 2006), y que en los niños de países en vías de desarrollo se encuentra una fuerte exposición y adquisición de bacterias en etapas tempranas de la vida (Walker y Duffy, 1998; Mackie *et al.*, 1999). No obstante, los niños nacidos por cesárea pero que se pueden alimentar al pecho, son colonizados en gran parte por las bacterias de la leche materna (Martín *et al.*, 2003)

Cuidados intensivos

En unidades de cuidados intensivos, el tratamiento de antibióticos es de uso común y se realizan esfuerzos para evitar la propagación bacteriana. Los recién nacidos atendidos en estas unidades adquieren una microbiota muy escasa y casi desprovistas de anaerobios (el Mohandes *et al.*, 1993; Hallstrom *et al.*, 2004). Estafilococos, enterococos y enterobacterias coagulasa negativas dominan la microbiota y la presencia de levaduras es común (el Mohandes *et al.*, 1993; Hallstrom *et al.*, 2004). Estos microorganismos pueden ser seleccionados por su resistencia a antibióticos de amplio espectro.

Condiciones sanitarias

Los niños que viven en malas condiciones sanitarias y de hacinamiento en los países no desarrollados son colonizados antes por *E.coli* y otras enterobacterias, enterococos, y lactobacilos que los niños en los países desarrollados. También tienen un mayor número de especies y una más rápida rotación de cepas bacterianas en su microbiota (Adlerberth, 2009; Roger *et al.*, 2010; Adlerberth, 1998). Posiblemente el

proceso de establecimiento de una microbiota compleja es más rápido en países no desarrollados. Por ejemplo, niños paquistaníes a menudo poseen otras enterobacterias diferentes a *E.coli*, pero solo durante la primera semana de vida, aunque posteriormente desaparecen de la microbiota (Adlerberth *et al.*, 1998). En cambio, los niños suecos tienen una tasa de colonización más elevada de este grupo de bacterias en los seis primeros meses de vida (Adlerberth *et al.*, 2006). *Staphylococcus coagulasa* negativa y *S.aureus*, también parecen ser poco comunes en el intestino de los niños en países no desarrollados (Adlerberth, 2009; Roger *et al.*, 2010; Adlerberth *et al.*, 2007). Estos dos grupos de bacterias no son comunes en los adultos. La diferencia en el patrón de colonización también se ha observado en Europa. Los niños de Estonia son colonizados antes por lactobacilos y eubacterias en comparación con los niños de suecos (Sepp *et al.*, 2000; Sepp *et al.*, 1997).

Tipo de alimentación

La alimentación de los lactantes con leche materna es también uno de los factores importantes en la iniciación y desarrollo de la microbiota intestinal del neonato. La leche materna hasta hace muy pocos años era considerada un fluido estéril; sin embargo, la leche humana contiene varias especies bacterianas con recuentos relativamente elevados, aunque todavía son escasos los estudios sobre su microbiología.

Los antecedentes actuales indican que entre las bacterias que se aíslan con mayor frecuencia en la leche materna se encuentran diversas especies de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Weissella* y *Leuconostoc* (Heikkilä y Saris, 2003; Martín *et al.*, 2003; Ng *et al.*, 2004). Además, la leche humana contiene diferentes compuestos con actividad biológica de distinta naturaleza química, donde parecen intervenir lípidos, péptidos y oligosacáridos con actividad antimicrobiana, nucleótidos, enzimas, anticuerpos, macrófagos, linfocitos, y bacterias que componen la microbiota de la leche humana (Isaacs, 2005; Gil, 2002). Para los oligosacáridos que constituyen una fracción significativa de los componentes de la leche humana, se han identificado más de 200 especies moleculares distintas (Ninonuevo *et al.*, 2006). Se ha descrito a través de la secuenciación del genoma, que las bacterias *Bifidobacterium bifidum* y *Bifidobacterium longum* tienen la capacidad de degradar estos oligosacáridos (Miwa *et al.*, 2010), aunque esta misma capacidad no se encontró en *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Walker, 2009). Estos antecedentes

podrían tener también una especial relevancia en el desarrollo de la microbiota intestinal del niño.

Estudios realizados en niños alimentados con leche materna sobre la composición de la microbiota, aportan datos controvertidos; principalmente esto se puede atribuir a las diferentes técnicas utilizadas en el análisis de la microbiota intestinal, (Adlerberth *et al.*, 2009). En niños amamantados con leche materna se observa una mayor proporción de bifidobacterias y una significativa disminución de *Bacteroides*, *Clostridium coccooides* y *Lactobacillus* comparados con niños alimentados con fórmulas (Fallani *et al.*, 2010). Además, presentan una mayor diversidad de *Bifidobacterium* y esta diversidad aumenta después del destete (Roger *et al.*, 2010).

Colonización durante el primer año de vida

En todos los casos existe un aumento del número de bacterias en la primera semana; durante este tiempo se obtienen recuentos bacterianos de 10^9 UFC/g, sin que influya la vía de nacimiento. Esta similitud se debe a que, al nacer, el ambiente en el intestino del niño muestra un potencial redox positivo, que permite la colonización inicial con anaerobios facultativos que a su vez disminuyen este potencial y permiten el crecimiento de anaerobios estrictos, los cuales aumentan paulatinamente durante la primera semana de vida, aunque en los primeros días los alimentados al pecho muestran un recuento superior de colonias, debido a la contaminación por la leche y la piel materna. La leche contiene bacterias ácido lácticas, como *L. gasseri* y *E. faecium*, y es fuente natural de bacterias para el intestino del recién nacido (Martín *et al.*, 2003). Las principales especies aisladas durante esta etapa son: *Staphylococcus aureus* (4%), *S. epidermidis* (20%), *S. fecalis* (30%), *S. faecium* (10%) y *Enterobacteriaceae* [*E. coli* (20%), *Klebsiella aerogenes* (20%), *Proteus mirabilis* (2%), *Enterobacter cloacae* (1%), *Serratia sp.* (1%) y *Pseudomonas aeruginosa* (0.5%)]. Las bacterias aerobias facultativas son seguidas de cerca por *Bifidobacterium sp.* (Walker y Duffy, 1998).

Durante el primer año se establece un patrón parecido al del adulto y se desarrolla el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT) que se convierte en el órgano más importante del sistema inmunitario adaptativo (Björkstén, 1999).

Colonización a partir del segundo año

La microbiota del colon de los niños es generalmente vista como casi idéntica a la de los adultos a partir de los 2 años de edad (Kleessen, 2000), aunque los anaerobios

facultativos se encuentran en mayor cantidad que en el adulto, lo que concuerda con la observación de que la microbiota no se iguala a la del adulto sino hasta la niñez tardía. Se ha descrito que una vez que se ha establecido el clímax de la microbiota, los grupos mayores de bacterias en las heces permanecen relativamente constantes durante el tiempo (Gronlund, 1999). Y hacia el final del segundo año de vida, la microbiota del niño forma placas densas que actúan en forma efectiva como barrera para la colonización de la microbiota exógena, alcanzando una velocidad de replicación que sobrepasa los mecanismos de eliminación bacteriana del huésped (Mackie *et al.*, 1999; Kleessen *et al.*, 2000).

RELACIÓN ENTRE EL INTESTINO Y LA MICROBIOTA

La relación entre intestino y microbiota es muy estrecha y puede ser vista como una relación simbiótica, ya que por ejemplo, la microbiota puede degradar hidratos de carbono que el intestino no puede debido a la falta de maquinaria enzimática. Los productos generados por esta degradación son principalmente utilizados como nutrientes del epitelio intestinal, como sucede con los ácidos grasos de cadena corta. Además, la presencia de esta microbiota tiene un efecto de inmuno-modulación, ya que la principal característica fisiológica de la mucosa intestinal es la capacidad de desarrollar una respuesta enérgica contra patógenos invasivos que pueden colonizar el epitelio intestinal, y al mismo tiempo presentar una respuesta nula frente a bacterias contenidas en alimentos o frente a la microbiota residente. Esta falta de respuesta es un proceso activo de varios mecanismos, llamado “tolerancia oral”, que es esencial para que el huésped no desarrolle una respuesta inflamatoria frente a la presencia de cualquier microorganismo y de esta forma puede presentar diferentes respuestas frente a distintos microorganismos, ayudando así, a la estabilidad de la microbiota intestinal. Por esta razón, tener una microbiota de composición normal puede ayudar al huésped al desarrollo fisiológico, inmune y metabólico. Este ecosistema se mantiene en equilibrio, y cualquier causa que lo rompa puede desencadenar alguna patología (diarreas, enfermedades inflamatorias, alergias, etc.).

Es de interés entender la importancia de este ecosistema, sobre todo la función de cepas no patológicas. Sobre esta idea se ha desarrollado el concepto de probióticos como mediadores de la salud humana. Dentro de las diferentes áreas estudiadas, la

influencia de los probióticos sobre el sistema inmunitario tanto intestinal como sistémico y la modulación de la expresión génica en diferentes situaciones, es una de las más interesantes.

PROBIÓTICOS

Concepto de probiótico

La creciente preocupación por comer sano ha cambiado el concepto de nutrición. La dieta, además de aportar los nutrientes necesarios, puede contener alimentos que promueven específicamente la salud y mejoran el bienestar, especialmente previniendo algunas enfermedades (Vasiljevik y Shah, 2008). La industria alimentaria ha evolucionado con este nuevo concepto desarrollando gran cantidad de productos que ayudan en la prevención de enfermedades crónicas. En este ámbito, aparecen los alimentos funcionales (FuFoSe, 1999; Mollet *et al.*, 2002). Los alimentos funcionales, son como su propio nombre indica, alimentos *per se*: no se trata de cápsulas ni de comprimidos; por el contrario, son elementos que forman parte de una dieta o modelo alimentario a los cuales se les reconoce un efecto potencialmente beneficioso para el bienestar de los individuos y para su salud (FuFose, 1999; Aranceta y Gil, 2010). Dentro de este grupo, se encuentran los probióticos, microorganismos vivos que, ingeridos en cantidades suficientes, modulan o actúan sobre determinadas funciones del organismo, produciendo un efecto beneficioso, más allá del puramente nutricional, como contribuir al equilibrio de la microbiota intestinal del huésped y potenciar el sistema inmunitario (FAO, 2002).

Existen antecedentes muy antiguos que relacionan efectos beneficiosos para la salud con el uso de alimentos con alto contenido de bacterias. Ejemplos de ello es la cita del Antiguo Testamento donde se dice que Abraham atribuye su longevidad al consumo de leche, o las citas históricas que indican que el historiador romano Plinio en el año 76 A.C. recomendó el uso de productos fermentados de leche para el tratamiento de gastroenteritis (Senmier y De Vrese, 2001).

A comienzos del siglo pasado, el microbiólogo Ruso Elie Metchnikoff (1845-1916) sugirió que el consumo de leche fermentada modulaba la microbiota intestinal produciendo un efecto positivo en la salud humana (Metchnikoff, 1908). Fijó su

atención en el hecho de que en Bulgaria existía un increíble número de personas centenarias, a pesar de ser uno de los países europeos más pobres. Observó que los búlgaros consumían grandes cantidades de yogur. Metchnikoff logró aislar las bacterias responsables de la producción del yogur que utilizó en sus investigaciones. Era el inicio del estudio de los probióticos. Metchnikoff se volvió un firme defensor del concepto de que la dieta puede proteger el cuerpo frente a la invasión de patógenos y en consecuencia mejorar y prolongar la calidad de vida. Fue además la primera persona en desarrollar un preparado utilizando lactobacilos en forma de cápsula, denominado *Lactobacillin*.

En la misma época, el microbiólogo francés Tissier observó que la microbiota fecal de recién nacidos amamantados al pecho presentaban más bacterias del género *Bifidobacterium* que la microbiota fecal de niños que habían recibido leche artificial y reconoció el papel benéfico de este microorganismo.

Más tarde, en 1940, apareció la Leche Bifidus, para paliar las deficiencias nutritivas de los niños durante la 1ª Guerra Mundial. En 1950, la fábrica Degusta, elabora el Biogur y el Bio-garde. En 1989, en Suiza aumenta el consumo y la producción de leches fermentadas. En 1993, dos investigadores, Modler y Vila-García, desarrollan el primer yogur bio de baja acidez.

En 1965 Lilly y Stillwell utilizaron por primera vez el término probiótico, para nombrar a los productos de la fermentación láctica. Pero la definición de probiótico más válida y usada será la enunciada más tarde por Fuller (Fuller, 1989; 1992). Este los define como: “suplementos de microorganismos vivos que añadidos a los alimentos, ejercen efectos beneficiosos en la salud del receptor como consecuencia de condicionar una mejora en su balance microbiano intestinal”. Para el ser humano adulto incluye tanto productos derivados de leches fermentadas como preparados liofilizados con estas bacterias.

En 1998 el *International Life Science Institute* (ILSI) en Bruselas definió a los probióticos como microorganismos vivos, que cuando son ingeridos en cantidades suficientes, tienen efectos beneficiosos sobre la salud, lo que va más allá de los efectos nutricionales convencionales, afectan beneficiosamente a una o varias funciones del organismo, proporcionan un mejor estado de salud y bienestar y/o reducen el riesgo de

enfermedad. Pueden ser funcionales para la población en general o para grupos particulares de la misma.

Actualmente existen criterios internacionalmente aceptados para la definición de microorganismos probióticos; éstos se pueden ver en la tabla 2.

Las bacterias probióticas pueden influir en todas las células del intestino y dentro de los mecanismos de acción de estos, encontramos efectos sobre la microbiota (Backhed y Ley, 2005), la modulación de la función inmunitaria (Pickard *et al.*, 2004; Kalliomaki 2004) y el aumento de la función de la barrera epitelial (Madsen *et al.*, 2001; Isolauri y Salminen, 2005).

Tabla 2. Criterio de definición de un probiótico.

Criterio de definición de un microorganismo que puede ser considerado probiótico

1. Ser de origen humano.
 2. Ser de naturaleza no patógena.
 3. Ser resistente a la destrucción por procesos tecnológicos.
 4. Ser resistente a la destrucción por el ácido gástrico y la bilis.
 5. Adherirse al epitelio intestinal.
 6. Ser capaz de colonizar el tracto gastrointestinal.
 7. Producir sustancias antimicrobianas
 8. Modular la respuesta inmunológica
 9. Influenciar las actividades metabólicas humanas (asimilación de colesterol, producción de vitaminas etc).
-

En el desarrollo de los alimentos probióticos propuestos para el consumo humano, las cepas de las bacterias del ácido láctico, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, han sido las más habituales (Lebeer *et al.*, 2010). Las bacterias ácido-lácticas son Gram positivas, no forman esporas, crecen de forma anaerobia con metabolismo fermentativo y se han aplicado en la conservación de productos fermentados (Holzapfel *et al.*, 2001). El grupo más amplio es el género *Lactobacillus*, que presenta más de cincuenta especies diferentes (Tamine, 2002). Por otro lado, también existen levaduras con actividad probiótica, como *Saccharomyces boulardii*, que

se utilizan en el tratamiento de diarreas asociadas al uso de antibióticos (Surawicz *et al.*, 1989).

La evidencia de la eficacia de varios probióticos es razonablemente fuerte, principalmente como resultado de los estudios clínicos y de meta-análisis, para la malabsorción de lactosa, (Adolfsson *et al.*, 2004; Piaia *et al.*, 2003) infecciones gastrointestinales (Brownlee *et al.*, 2003) y diarrea asociado al uso de antibióticos (D'Souza *et al.*, 2002).

Los probióticos se han consolidado como una alternativa al uso de antibióticos en la prevención o tratamiento de desórdenes gastrointestinales (Ouwehand *et al.*, 2004). Por otra parte, los medicamentos pueden producir complicaciones, incluyendo fenómenos de resistencia y toxicidad crónica a largo plazo (O'Flaherty *et al.*, 2005). Se ha descrito en estudios “*in vitro*” que algunos *Lactobacillus* inhiben la adhesión de otras bacterias anaeróbicas como *Clostridium*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Enterobacteriaceae* (Silva *et al.*, 1987).

Además de la actividad antibacteriana de los probióticos, se ha descrito un potencial antivírico, principalmente en rotavirus, causantes de diarreas (Zhang *et al.*, 2008). Los lactobacilos son capaces de potenciar respuestas antigénicas específicas inducidas por vacunas bacterianas o víricas, como gripe (Olivares *et al.*, 2007), polio (de Vrese *et al.*, 2005), difteria y tétanos (West *et al.*, 2010). Los beneficios de los probióticos no se limitan exclusivamente al tracto gastrointestinal. Tanto en niños como en adultos, son útiles en el tratamiento y/o prevención de alergias y enfermedades de distinta índole, como diarrea, vaginitis, dermatitis atópica o cáncer (Huang *et al.*, 2009).

Microorganismos probióticos

Entre las bacterias consideradas probióticas, se encuentran principalmente las de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, importantes en la microbiología de los alimentos y la nutrición humana debido a su rol en la producción de alimentos y su conservación, también por las propiedades probióticas que presentan algunas cepas. Estas propiedades son de una creciente importancia y reciben la atención de tanto los consumidores como de los profesionales de salud.

El género *Lactobacillus* pertenece a las bacterias ácido lácticas (BAL), una definición que agrupa especies de bacterias, capaces de producir ácido láctico como el

principal producto final de la fermentación de hidratos de carbono. El género *Bifidobacterium*, aunque tradicionalmente figura entre las BAL, está muy poco relacionado filogenéticamente con las verdaderas BAL y sus especies utilizan una vía metabólica diferente para la degradación de los hidratos de carbono a las descritas para las BAL (Fellis y Dellaglio, 2007).

Los *Lactobacillus* son bacterias Gram positivas y no formadoras de esporas. Con respecto a su forma celular, se pueden encontrar como bacilos o cocobacilos. Son estrictamente fermentativos, microaerófilos y quimioorganotróficos que necesitan un medio rico para su crecimiento. Son encontrados en ambientes donde existen hidratos de carbono disponibles, como por ejemplo en alimentos (carne, yogurt, vegetales, frutas), tracto respiratorio, gastrointestinal y genital de humanos y animales. De acuerdo con la *Taxonomic Outline Of the Prokaryotes* (Garrity *et al.*, 2004), el género *Lactobacillus* pertenece al *Phylum Firmicutes*, clase *Bacilli*, orden *Lactobacillales*, familia *Lactobacillaceae*. La familia más cercana filogenéticamente es la *Leuconostocaceae*, que incluye los géneros *Leuconostoc*, *Oenococcus* y *Weissella* (Hammes y Hertel, 2003).

El género *Bifidobacterium* son bacterias Gram positivas, no formadoras de esporas, son polimórficas, presentan una forma bacilar o bacilar ramificada. Son anaeróbicas, quimioorganotróficas y presentan un metabolismo fermentativo. A partir de diversos hidratos de carbono producen ácido pero no gas. Se encuentran en animales y humanos, se han aislado desde heces, vagina humana, y rumen de bovinos.

Taxónomicamente el género *Bifidobacterium* pertenece al *Phylum Actinobacteria*, clase *Actinobacteria*, orden *Bifidobacteriales*, familia *Bifidobacteriaceae*.

Cabe señalar que la clasificación taxonómica se genera a partir de la información obtenida a través de la secuenciación del gen 16S rRNA, presente en todos los genomas de las bacterias. Estas secuencias son comparadas con las existentes en las bases de datos de DNA (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este fragmento tiene una extensión de aproximadamente 1500 pares de bases, lo que es solo una pequeña parte del genoma bacteriano; por ello hay discrepancias entre la clasificación en el árbol filogenético y la clasificación de acuerdo con las propiedades metabólicas. Además de

estas discrepancias, también pueden ocurrir fenómenos de transferencia de genes horizontal y adaptación a los nichos ecológicos, lo que podría influir nuestra comprensión sobre la biodiversidad y por tanto en su clasificación. De esta forma la última frontera de esa “información adicional” es el análisis de la secuencia completa del genoma de los diferentes taxones.

Si comparamos las secuencias de los genomas de las bacterias, podríamos obtener la información adecuada que nos permita realizar un “esquema” real de clasificación. Los genomas completos de las especies de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son aún muy pocos en número. La secuencia de las numerosas cepas de la misma especie, probablemente seguirá siendo una tarea inviable a corto plazo, pero el descubrimiento de las tendencias de evolución sobre la base de una muestra de organismos probablemente mejorará nuestra comprensión de la biodiversidad microbiana y por tanto de su catalogación.

EFFECTO DE LOS PROBIÓTICOS EN DISTINTAS PATOLOGÍAS

Probióticos y malabsorción de lactosa

Los mamíferos nacen con suficiente actividad lactasa como para hidrolizar la lactosa procedente de la leche de sus madres. Tras el destete, esta actividad se va reduciendo con la edad y la ingestión de alimentos que la contengan da lugar a signos y síntomas relacionados con la intolerancia a lactosa (incremento anormal de gas, dolor abdominal, diarrea, etc.).

Es bien conocido que personas que sufren esta alteración, toleran y tienen una mejor digestión de la lactosa contenida en el yogur que en la leche (De Vrese *et al.*, 2001). Se ha discutido mucho sobre qué mecanismos están implicados en el proceso y al menos hay dos mecanismos propuestos no excluyentes. Una primera aproximación expone que la digestión de la lactosa en el lumen del intestino la lleva a cabo la β -galactosidasa contenida en una de las bacterias del yogur (*S.thermophilus* del yogur libera β -galactosidasa cuando es lisada por los ácidos biliares), mientras que la otra propuesta interpreta que la causa es el mayor tiempo de tránsito intestinal del yogur comparado con el de la leche (Marteau *et al.*, 1990; Mahé *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 1998).

Otro ejemplo de la mejor actividad enzimática atribuida al empleo de probióticos es el de la enzima sacarasa. Se ha demostrado que niños con deficiencia de esta enzima, tienen un aumento de la digestión de sacarosa cuando consumen *Saccharomyces cerevisiae*, levadura que contiene la enzima sacarasa (Harms, 1987).

Probióticos y reducción de los niveles plasmáticos de colesterol

El alto nivel de lípidos en sangre, tales como el colesterol y los triglicéridos implican un elevado riesgo para la salud humana, debido a su asociación con las cardiopatías. Puesto que el consumo de alimentos con bajo contenido graso o con microorganismos que participan en el metabolismo de lípidos, puede ser beneficioso para evitar estas afecciones, se han caracterizado cepas de lactobacilos reguladores de los lípidos séricos. Este efecto probiótico está estrechamente relacionado con la hidrólisis de sales biliares. Se ha investigado la actividad hidrolasa de ácidos biliares en *Enterococcus faecium* y *Lactobacillus reuteri*. Los ensayos realizados “*in vivo*” utilizando ratones Albino-Suizo como modelo experimental demostraron que *L.reuteri* CRL 1098 administrado a muy bajas dosis (10.000 UFC/día) produjo un 38% y 35% de reducción de colesterol sérico y de triglicéridos, respectivamente, durante el tratamiento terapéutico. Se observó además, una disminución de alrededor del 20% de ambos lípidos durante el tratamiento preventivo. La dosis efectiva utilizada no presentó efectos colaterales indeseables en el huésped y, además, se constató un aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) con respecto a las de baja densidad (LDL), lo cual indica que este microorganismo actúa como regulador biológico de hiperlipemias (Taranto *et al.*, 1998). *In vitro* se ha demostrado que *L. acidophilus* tiene la capacidad de asimilar el colesterol y que posee efectividad a la hora de limitar la hipercolesterolemia de cerdos alimentados con dietas enriquecidas en colesterol (Gillilan *et al.*, 1985; Danielson *et al.*, 1989).

Además, se ha observado en diferentes estudios en animales (Akalin *et al.*, 1997; Fukushima y Nakano, 1996; Kumar *et al.*, 2011) y en humanos (Lin *et al.*, 1989), que la administración de probióticos puede disminuir la concentración sérica de colesterol. El mecanismo por el cual ocurre este efecto, aún no es muy claro, pero en ratas se ha observado que la actividad de la β -hidroxi- β -metilglutaril-Coenzima A reductasa en el hígado disminuye significativamente con el consumo de probióticos, lo que explicaría una disminución de la síntesis de colesterol (Fukushina y Nakano, 1996). Más aún, un

aumento en la concentración de sales biliares fecales y la capacidad de las bacterias probióticas para deconjugar las sales biliares se han relacionado con una disminución de los niveles de colesterol (Kumar *et al.*, 2011). Por otra parte, también se ha relacionado el LPS, componente principal de la pared de las bacterias Gram negativas y una de las más poderosas sustancias proinflamatorias, con la dislipidemia. (Cani *et al.*, 2007).

Probióticos y diarrea

Es un hecho que la aplicación clínica mejor documentada de los probióticos, es el tratamiento de la diarrea aguda. *Saccharomyces boulardii* es una levadura que se utiliza como un agente bioterapéutico. Ensayos clínicos han mostrado su eficacia en el tratamiento para la prevención y/o tratamiento de varios desórdenes intestinales incluidos la diarrea inducida por antibióticos (Mc Farland *et al.*, 1995), diarrea en adultos (Höcter *et al.*, 1990), niños (Cetina-Sauri y Sierra, 1994) y diarrea del viajero (Kollaritsch *et al.*, 1993).

Se ha encontrado que este probiótico aumenta la actividad de las enzimas lactasa, sacarasa, maltasa, α -glucosidasa y fosfatasa alcalina en voluntarios tratados, además, aumenta la actividad β -galactosidasas en ratas (Buts y de Keyser, 2006). En otro estudio experimental realizado en ratas, *S.boulardii* estimuló la actividad total de disacaridasas en enterocitos inmaduros y aumentó la absorción de D-glucosa acoplada a Na^+ , a través del cotransportador glucosa/ Na^+ (Buts *et al.*, 1999). La expresión de SGLT-1, una proteína de 70kDa llamada cotransportador-1 de sodio glucosa, también aumenta en ratas ressecadas tratadas con *S.boulardii*. Por otro lado, se observa un aumento de la producción de IgA en el fluido luminal de ratas. Este probiótico es utilizado como agente bioterapéutico en muchos países y, como describimos anteriormente, afecta la expresión y la actividad de un gran número de enzimas y proteínas, sugiriendo que esta levadura ejerce una fuerte regulación sobre el epitelio intestinal y posiblemente sobre la microbiota.

Diarrea asociada a antibióticos

La diarrea asociada al uso de antibióticos (DAA) es una diarrea que ocurre rápidamente después de la administración de un antibiótico, y es diagnosticada en ausencia de otra causa conocida de diarrea. La frecuencia varía con el tipo de antibiótico, pero se estima que ocurre en aproximadamente 25% de los adultos que

reciben antibióticos. La frecuencia en niños es más baja, presentando un rango desde 11% en un estudio (Turck *et al.*, 2003) a 31% en niños más pequeños (Correa *et al.*, 2005).

Generalmente, los probióticos son administrados en conjunto con los antibióticos para la prevención de DAA. Los microorganismos probióticos que han sido estudiados incluyen *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Streptococcus thermophilus*, *Saccharomyces boulardii*, *Bacillus coagulans* y *Clostridium butyricum*. Se han llevado a cabo cinco meta-análisis de estudios sobre la prevención de DAA. Cremonini *et al.*, (2002) evaluó 7 estudios con un total de 881 sujetos. D'Souza *et al.*, (2002) evaluó 9 estudios, 5 de los cuales fueron incluidos en el meta-análisis de Cremonini. Johnston *et al.*, (2006) evaluó 6 estudios pediátricos. Szajewska *et al.*, (2006) también evaluó 6 estudios de los cuales 5 fueron incluidos en el meta-análisis de Johnston. Cada uno de estos meta-análisis mostraron una reducción del riesgo de DAA durante la coadministración de probióticos y antibióticos. La magnitud de esta reducción varía entre los estudios.

Mc Farland (2006) desarrolló el meta-análisis más grande, el cual evalúa 25 estudios aleatorizados del uso de probióticos para la prevención de DAA incluyendo 2810 sujetos. De estos 13 (52%) demostró una reducción significativa en la incidencia de DAA en el grupo del uso de probióticos comparado con el grupo placebo. Entre los estudios de adultos, solo el 44% presentó una reducción de DAA en el grupo de probióticos, mientras que el 67% de los estudios pediátricos presentó beneficios en el grupo de probióticos.

La diarrea causada por *Clostridium difficile*, el cual es un patógeno oportunista que aprovecha la alteración de la microbiota intestinal provocada por la administración de antibióticos, presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que va desde la diarrea leve de curso benigno, hasta una colitis intensa con desarrollo de megacolon tóxico, complicaciones intraabdominales y sistémicas que pueden llevar a la muerte del paciente. Las diarreas suelen aparecer al par de semanas de iniciar la antibiótico-terapia. La secuencia patogénica se inicia con una alteración de la microbiota bacteriana intestinal, inducida por los antibióticos, lo que permite la colonización por *C. difficile*, si la persona está expuesta a la ingestión de este agente. Posteriormente, la bacteria libera

toxinas que producen el daño tisular. Las cepas patógenas de *C. difficile* son productoras de toxinas, denominadas A y B. *S.Boulardii* inhibe las toxinas A y B por liberación de una proteasa de 54 kDa que hidroliza estas toxinas y sus receptores de membrana (Castagliuolo *et al.*, 1999). Además, se ha propuesto que *S.boulardii* aumenta la absorción de cloruro en el yeyuno y colon descendente, el cual tiene un efecto favorable sobre el volumen de la diarrea. Otros datos sugieren que estaría involucrado en la vía del óxido nítrico (Girard *et al.*, 2003).

Diarrea del viajero

La diarrea del viajero se debe a una infección por una bacteria, virus o parásito. Los microorganismos causantes son muchos y probablemente son diferentes de un país a otro. Entre ellos y por frecuencia son: *E.coli*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *Campylobacter sp.*, *Rotavirus sp.* y *Giardia lamblia*. La diarrea del viajero afecta a la mitad de los viajeros que realizan visitas a zonas de alto riesgo. Se han desarrollado muchos estudios para la aplicación de probióticos como profilácticos de la afección. Las bacterias usadas han sido: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Ententerococcus*. *Lactobacillus GG* ha sido el probiótico más efectivo frente a la diarrea del viajero. Se ha comprobado a través de un ensayo realizado en un grupo de americanos que viajó a zonas en vías de desarrollo. En forma aleatoria se administró una cápsula al día de *Lactobacillus GG* o de placebo, como resultado se obtuvo un 7,4% de riesgo de diarrea en controles placebo y de 3,9% en los que ingerían el probiótico (Hilton, 1997).

Otras pruebas realizadas con cepas de lactobacilos como *L. acidophilus* (Clements *et al.*, 1981) o *E. faecium* no han aportado datos positivos significativos. No obstante, estudios en los que se usaron una mezcla de varios probióticos han proporcionado datos de su eficacia. Black *et al.*, (1989) suministraron una mezcla de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. acidophilus*, *B. bifidum* o placebo a un grupo aleatorio de turistas que viajaron a Egipto; la incidencia de diarrea se redujo de 71% al 43% en el grupo tratado con la mezcla de probióticos.

Probióticos y enfermedades inflamatorias intestinales

Uno de los principales usos de los probióticos es en patologías donde existe un desequilibrio en la microbiota intestinal y el sistema inmunitario. De acuerdo con ello, el estudio de las enfermedades inflamatorias intestinales es uno de los focos de más

interés para el posible uso de los probióticos en las terapias clínicas. Los estudios realizados en esta área han generado importante información sobre el uso clínico de los probióticos y la expresión génica de diferentes intermediarios involucrados en estas enfermedades.

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), son desórdenes inflamatorios crónicos del intestino de origen desconocido (colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn), La patogénesis es compleja e involucra al menos tres elementos importantes: factores de susceptibilidad genética, microbiota entérica y daño mediado por inmunidad. Se ha hipotetizado que las EII se producirían debido a una respuesta anormal de las células T frente a la microbiota y también se ha especulado que la presencia de organismos patógenos podrían causar estas enfermedades.

Existe una reducción de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en biopsias de colon de pacientes con EII (Fabia *et al.*, 1993; Favier *et al.*, 1997). Los tratamientos convencionales para tratar las EII están enfocados a suprimir o modular la inmunidad del huésped; dentro de estos, el uso de antibióticos es un tratamiento efectivo para la enfermedad de Crohn. Todo ello indica que el uso de probióticos para modificar la microbiota puede ser importante en el tratamiento de la EII.

Dentro de los antecedentes, existe un estudio reciente donde se ha encontrado que pacientes con enfermedad de Crohn tienen cantidades disminuidas de β -galactosidasas en heces durante los periodos activos de la enfermedad. Esta disminución se correlaciona con la disminución de bifidobacterias, las cuales son la fuente de β -galactosidasa (Favier *et al.*, 1997).

Grupa *et al.*, (2000) efectuaron un estudio durante 6 meses utilizando *Lactobacillus* conjuntamente con un tratamiento de prednisona y agentes inmunomoduladores. A la semana de iniciar el tratamiento se observó una mejoría significativa que se mantuvo durante todo el estudio. En 3 pacientes fue posible disminuir la dosis de esteroides y 3 pacientes presentaron una recaída de la enfermedad de Crohn dentro de las 4 a 12 semanas de discontinuar el uso de probióticos. Sin embargo, existen estudios con diferentes métodos y análisis que no presentan diferencias significativas en los diferentes grupos estudiados (Rioux y Fedorak, 2006).

En colitis ulcerosa existen estudios bastante interesantes; en uno de ellos se les administró a pacientes una terapia típica para esta enfermedad, que incluía sulfasalazina y glucocorticoides; se separó un grupo al cual se le administró una mezcla con 3 bacterias probióticas durante 8 semanas. Se encontró que la expresión del factor nuclear κ B (NF- κ B), y la unión de NF- κ B al DNA disminuyó significativamente. Además, aumentó la expresión de mRNA de citoquinas antiinflamatorias como interleuquina (IL)-10 (Cui *et al.*, 2004). En otro estudio de Bai *et al.*, (2006), se efectuó un cocultivo de biopsias de pacientes con colitis activa con *Bifidobacterium longum*, encontrándose una disminución en la concentración de factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) e IL-8 en el sobrenadante de los cultivos. La IL-8 es una importante citoquina que participa en la patogénesis de la colitis ulcerosa, la cual tiene un efecto quimiotáctico que induce a las células inmunes a infiltrarse en la mucosa (Steiner *et al.*, 2000). Estos hallazgos, más los estudios clínicos realizados con diversas metodologías y resultados (Rioux y Fedorak, 2006), nos orientan para entender la función de los probióticos en esta patología.

Por otro lado, en pacientes con EII se ha observado un aumento de apoptosis en sitios con daño inflamatorio agudo y a través de todo el eje cripta-vellosidad, (Iwamoto *et al.*, 1996; Di Sabatino, 2003). Además, existe un aumento de los niveles de citoquinas inflamatorias como TNF- α e interferón- γ , pudiendo inducir apoptosis directamente por supresión de las señales antiapoptóticas en el epitelio (Koshiji *et al.*, 1998). El uso de anticuerpos anti-TNF- α (Infliximab) mejora dramáticamente la condición de los pacientes con EII; este tratamiento reduce la apoptosis y la expresión de Fas/CD95 en el epitelio intestinal de ratas que desarrollan ileitis espontánea (Marini *et al.*, 2003). Dentro de las posibles vías de señales intracelulares generadas por TNF- α , estaría la activación de NF- κ B (Jobin y Sartor, 2000), además de las señales que regulan la producción de citoquinas inflamatorias, como p38 MAP quinasa, que son responsables de la expresión de TNF- α , aunque el rol de p38 en la EII todavía no está muy claro.

Dentro de los estudios que relacionan directamente el efecto de un probiótico sobre la apoptosis, se encuentra el desarrollado por Yan y Polk (Yan y Polk, 2002), en el cual se utilizó *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) en cultivo con TNF- α de células colónicas de ratas y humanos. Se encontró que LGG promueve la supervivencia de las células epiteliales a través de la activación de la vía de la Akt/proteína quinasa B, inhibición de caspasas e inhibición de la vía pro-apoptótica p38 MAP quinasa. Se

atribuye a LGG la producción de un factor que activa Akt independientemente de la interacción bacteria-célula. Como se dijo anteriormente, la evidencia de la eficacia de varios probióticos es bastante fuerte para infecciones gastrointestinales (Brownlee, 2003) y para la diarrea asociada al uso de antibióticos (*Saccharomyces boulardii* y *Lactobacillus*) (D'Souza *et al.*, 2002). Sin embargo, aunque se han efectuado muchos estudios con probióticos en enfermedad de Crohn, los resultados han sido contradictorios.

Probióticos y cáncer

El cáncer colorectal es una de las más serias complicaciones de las EII, incluidas la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn (Eaden *et al.*, 2001). El mecanismo preciso por el cual la EII puede generar un proceso carcinogénico es muy poco entendido; se asume que podría ser causa de un proceso inflamatorio crónico (Weitzman y Gordon, 1990), el cual en algunos modelos experimentales puede funcionar como promotor de un tumor.

Se han estudiado los efectos de probióticos en modelos animales que se les administra un inductor de cáncer, como azoximetano (AOM), el cual en un periodo de tiempo de 40 semanas genera adenocarcinomas de colon. En un estudio realizado por Singh *et al.*, (1997), el cual utilizó *Bifidobacterium longum* y AOM como inductor de cáncer, se demostró que la administración de la bacteria disminuyó significativamente la incidencia de adenocarcinomas de colon y la multiplicidad de tumores en términos de tumor/animal. Además, se encontró una disminución del índice de proliferación inducido por AOM, lo cual nos refleja una modulación en la expresión de genes involucrados en el ciclo celular. También se midió la actividad de ornitina descarboxilasa (ODC), la cual es una enzima involucrada en la biosíntesis de poliaminas, que juegan un rol esencial en la proliferación y diferenciación celular, participando en la síntesis de macromoléculas, observándose un aumento de la actividad de esta enzima en adenomas y carcinomas de colon. La ODC presentó una inhibición significativa de la actividad inducida por AOM al suplementar con *B. longum*.

El balance entre proliferación y apoptosis también puede influir fuertemente en la aparición de un tumor cancerígeno ya que la disminución de la proliferación por sí sola no sería suficiente para detener el proceso (Kulkarni *et al.*, 1992). Se ha encontrado un descenso de la apoptosis en la progresión de un tumor en muestras de colon humano

(Sinocrope *et al.*, 1996). Esta disminución podría predisponer a las células a la acumulación de cambios genéticos que son los característicos de una génesis tumoral.

Se ha utilizado una combinación simbiótica para el estudio de la prevención de cáncer; ésta es una mezcla de un probiótico más un prebiótico, que se define como “un ingrediente de la dieta que no es digerible y el cual beneficia y estimula el crecimiento de bacterias intestinales que mejoran el balance intestinal del huésped”. Dentro de los prebióticos utilizados están: inulina, oligofruetosacáridos y almidón resistente. Esta combinación aumentó los niveles de ácidos grasos de cadena corta, productos importantes de la fermentación bacteriana cuyo principal rol es ser fuente de energía para el epitelio intestinal, los cuales están asociados con una inducción de diferenciación, supresión de proliferación y aumento de apoptosis *in vitro*. (Heerdt *et al.*, 1997; Medina *et al.*, 1997). Estos podrían desempeñar una función importante en la prevención de algunas enfermedades como desórdenes gastrointestinales y cáncer (Wong *et al.*, 2006).

Como mecanismo de acción de los ácidos grasos de cadena corta, se ha observado que el butirato aumenta los niveles de mRNA y proteína de p21^{WAF1/Cip1}, la cual bloquea el ciclo celular a G1 resultando en una inhibición de la proliferación celular (Archer *et al.*, 1998; Chai *et al.*, 2000). Todo ello demuestra que, además de la acción directa de los probióticos, sustancias metabolizadas por éstos pueden influenciar la modulación de procesos biológicos como el ciclo celular.

En la expresión de diferentes genes en la mucosa del intestino influye la presencia de probióticos, lo cual queda muy claro en el trabajo de Di Caro *et al.*, (2005), que obtuvo biopsias de pacientes con esofagitis grado I, tratados con *Lactobacillus GG* (LGG) durante 1 mes, utilizando un micro chip de DNA (GeneChip Human U133A array), el cual contiene 22.215 sondas de cDNA de genes humanos, determinándose que existió una sobreexpresión de 334 genes y una inhibición de 92. LGG afectó principalmente a genes involucrados en la respuesta inmunitaria e inflamación, apoptosis y crecimiento celular, adhesión celular, transcripción, comunicación celular y ciclo celular. Muchos genes que se observaron alterados en este estudio se habían descrito ya alterados en otro tipos de estudios con el uso de probióticos como son, incremento de la expresión de mucinas, MAP quinasas, miembros de la familia IL-10 e iNO que produce oxido nitrico (NO), un agente protector en respuesta inflamatoria en el

tracto gastrointestinal (Coronen *et al.*, 2002). Más aún los datos demostraron que LGG indujo muchos miembros de la familia TNF- α , que median la regulación de la respuesta inmunitaria y patogénesis de la inflamación intestinal en la enfermedad de Crohn, estableciendo que el miembro 10 de la familia TNF- α , desencadena la activación de MAPK8/JNK, caspasa 8 y caspasa 3. Dicho miembro presentó una baja expresión en los pacientes tratados con LGG (Agarwal, 2002).

La microbiota intestinal junto con el sistema inmunitario juega un papel importante en la regulación de la carcinogénesis. En ambos pueden influir los probióticos, de ahí que se hayan dirigido esfuerzos hacia este campo de actuación contra el cáncer de colon. Se ha comprobado que los probióticos pueden disminuir las concentraciones de enzimas, mutagénicos y sales biliares secundarias que posiblemente estén involucradas en el proceso carcinogénico del colon (Wollowski *et al.*, 2001). Los datos epidemiológicos apoyan que el consumo diario de productos fermentados tiene un efecto protector contra los adenomas de colon o cáncer (Rafter y Glinghammar, 1998). Actualmente los datos no permiten llegar a conclusiones, pero el campo de investigación está abierto.

ACCIONES DE LAS BACTERIAS PROBÓTICAS SOBRE EL TRACTO GASTROINTESTINAL

Inmunomodulación

Las bacterias probióticas modulan la inmunidad gracias a que las células del sistema inmunitario están dotadas de receptores de reconocimiento o sensibles a productos derivados de los probióticos, que actúan a distintos niveles (Gómez-Llorente *et al.*, 2010). La colonización por enterobacterias del tracto gastrointestinal induce la activación de la cascada inflamatoria que da como resultado la secreción de IL-8 y otras moléculas pro-inflamatorias y, como consecuencia, se produce la atracción de neutrófilos y otras células inflamatorias. En muchos casos, la infiltración masiva y prolongada de neutrófilos provoca una inflamación crónica que conduce al daño celular, disfunción de la barrera epitelial y diarrea. Algunas cepas probióticas, como *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum*, pueden inhibir la producción de IL-8 de las células epiteliales intestinales inducida por la presencia de enteropatógenos (Frick *et al.*, 2007; Candela *et al.*, 2008). La asociación de los probióticos con las

células epiteliales es suficiente para desencadenar cascadas de señalización que finalmente activan a las células del sistema inmunitario de la lámina propia. Alternativamente, los probióticos liberan factores solubles que en sí mismos activan estas cascadas a nivel del epitelio o de las células del sistema inmunitario (Hoarau *et al.*, 2006).

Se ha propuesto un mecanismo (Figura 4) según el cual los probióticos interactúan con las células dendríticas a través de TLRs promoviendo una cascada de señales que conduce a la inmunotolerancia (Gómez-Llorente *et al.*, 2010).

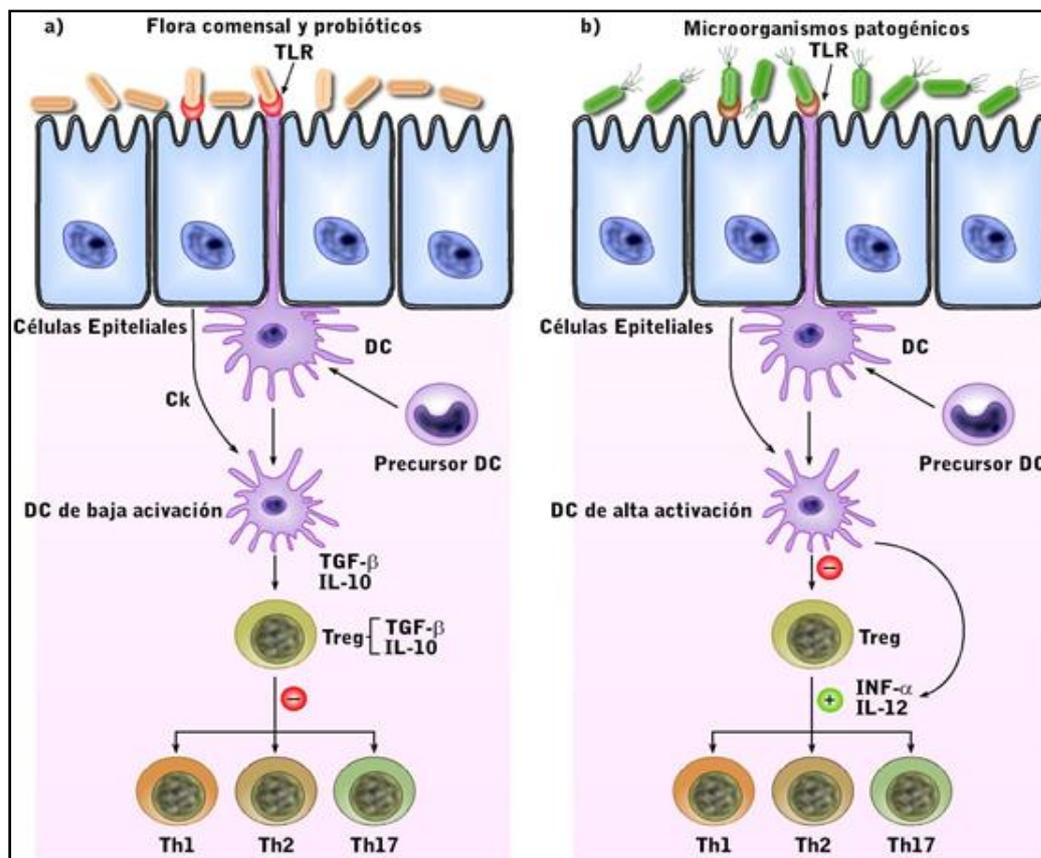


Figura 5. Visión esquemática del potencial mecanismo de acción por el cual las bacterias comensales y patógenas interactúan con los TLR provocando diferentes respuestas inmunitarias. Adaptado de Gómez-Llorente *et al.* 2010.

Adhesión a la mucosa intestinal

Los probióticos son capaces de colonizar el intestino, aunque sea transitoriamente, adhiriéndose a la mucosa intestinal. Varios estudios concluyen que las bacterias probióticas ingeridas no llegan a ser miembros estables de la microbiota pero

persisten durante cortos periodos de tiempo (Gardiner *et al.*, 2004; Klingberg y Budde, 2006).

La adhesión bacteriana al epitelio intestinal es un requisito indispensable en la selección de una cepa como probiótica, ya que afecta al periodo de residencia de esa bacteria en el tracto intestinal (Servin y Coconnier, 2003), evitando que sean eliminadas por los movimientos peristálticos intestinales y/o por otras bacterias que componen la microbiota; y es antagónica frente a patógenos (Reid *et al.*, 2002). Las bacterias probióticas ya adheridas pueden prevenir la adhesión de patógenos, tanto de bacterias coliformes como de clostridios, y estimulan la renovación del tracto intestinal (figura 6) (Forestier *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003; Alemka *et al.*, 2010). En un estudio reciente, Romeo *et al.*, (2011), han descrito que dos cepas de *Lactobacillus*, *L.reuteri* y *L.rhamnosus*, son capaces de prevenir la colonización intestinal de especies de *Candida* y reducir los síntomas de la infección, en neonatos. Esta propiedad de las cepas probióticas de inhibir la colonización e invasión de microorganismos patógenos reside en su capacidad de adherencia al epitelio intestinal (Servin y Coconnier, 2003).

De manera similar a las bacterias probióticas, la adhesión a la superficie intestinal es un factor clave en la patogenicidad de las enterobacterias (Laparra y Sanz, 2009) y un paso previo a la colonización e infección del tracto intestinal (Salminen *et al.*, 2010). Después de causar la infección, las bacterias patógenas atraviesan el mucus intestinal y se adhieren a los enterocitos. El paso inicial en el caso de *Salmonella* está mediado por fimbrias, que reconocen receptores en las células eucariotas. Las bacterias ácido lácticas previenen este acoplamiento de los patógenos; en consecuencia, se reduce la colonización y se protege frente a la infección (Coconnier *et al.* 2000; Servin, 2004).

Producción de compuestos antimicrobianos

Las cepas probióticas producen una gran variedad de compuestos, incluyendo ácidos orgánicos, como el ácido láctico, acético y fenil-láctico; peróxido de hidrógeno y ácidos grasos. Estos compuestos son los que se producen mayoritariamente durante el crecimiento de los probióticos y provocan una disminución de pH en el tracto gastrointestinal que posee un efecto bactericida o bacteriostático. Estos componentes se han descrito como potentes inhibidores de bacterias patógenas Gram negativas (O'hara *et al.*, 2007).

Los probióticos, como otras bacterias del ácido láctico, pueden producir bacteriocinas y péptidos antimicrobianos, efectivos frente a otras bacterias, bien de la misma especie o de distintos géneros (amplio espectro). La generación de estos compuestos antimicrobianos parece estar estimulada por la presencia de patógenos (figura6) (Rossland *et al.*, 2005).

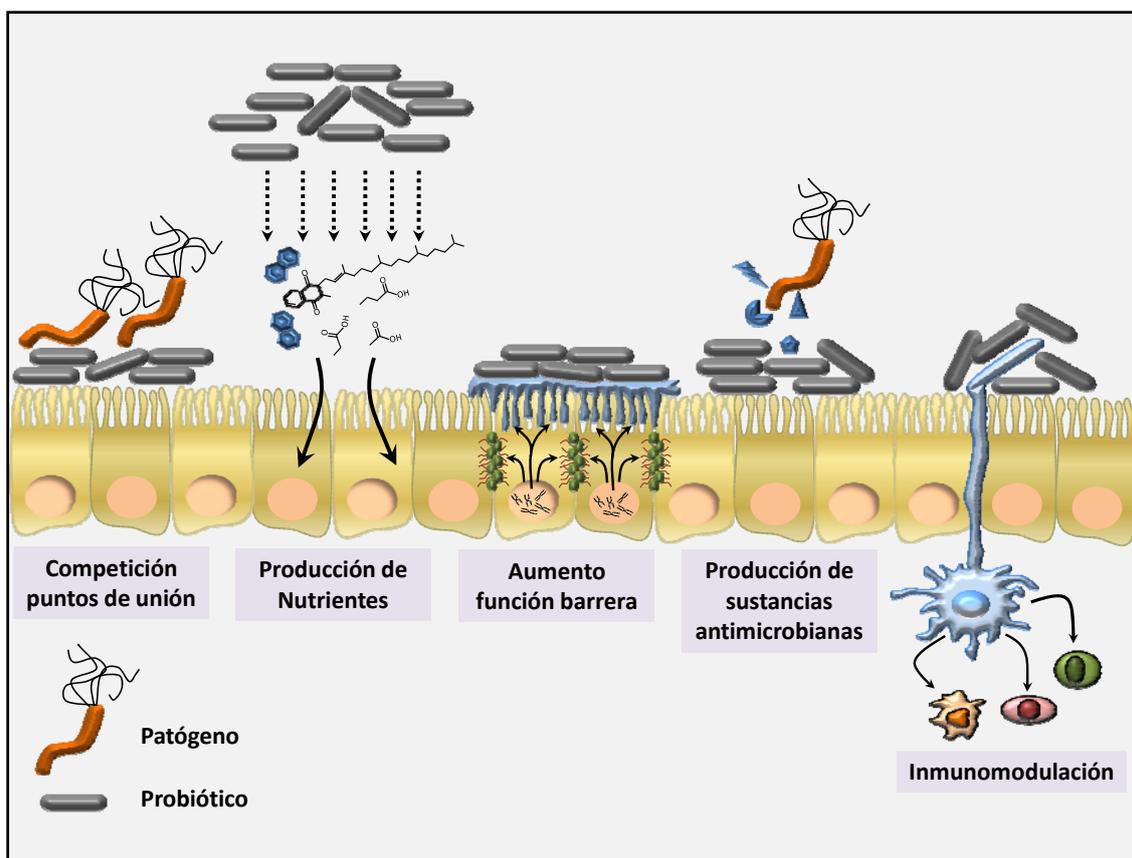


Figura 6. Mecanismos de acción de las bacterias probióticas.

Producción de nutrientes importantes en la función intestinal

Las bacterias del colon, incluyendo las probióticas, generan una gran actividad metabólica, donde las enzimas bacterianas actúan sobre los sustratos que se encuentran en el lumen intestinal generando una gran diversidad de productos (figura 6). La fermentación anaerobia de hidratos de carbono complejos por parte de las bacterias, generan ácidos grasos de cadena corta principalmente acetato, propionato y butirato (Topping y Clifton, 2001). La mayoría de estos ácidos grasos son absorbidos y metabolizados. El ácido propionico y acético intervienen principalmente en el metabolismo hepático de la glucosa y el ácido butírico constituye la principal fuente de

energía para el epitelio intestinal. Además, estimulan la proliferación y diferenciación del epitelio intestinal (De Preter *et al.*, 2010), lo que es de gran importancia para una rápida recuperación del epitelio intestinal frente a algún daño, lo que disminuye la posibilidad de una translocación bacteriana en situaciones de alteración del epitelio intestinal, como ocurre en las enfermedades inflamatorias intestinales (Urao *et al.*, 1999).

Una función metabólica de vital importancia incluye la producción de metabolitos, enzimas y síntesis de vitaminas (K, B₁₂, biotina, ácido fólico y pantoténico). Algunas de las cuales intervienen en el metabolismo óseo, ya que a los probióticos también se les ha atribuido un potencial efecto sobre el aumento óseo (Scholz-Ahrens *et al.*, 2007).

Mejora de la función de la barrera intestinal

El epitelio intestinal es una monocapa de células que representa la barrera entre el medio interno y el exterior, esta función de barrera se puede ver afectada por estrés, daño o por bacterias patógenas. Estas células están interconectadas por una serie de uniones intercelulares: uniones estrechas, uniones adherentes, desmosomas y uniones gap. También presentan una capa de mucus, la que consiste en productos secretados como mucinas, glicoproteínas, fosfolípidos secretados por las células caliciformes. Estas secreciones actúan como lubricante y como una barrera para los microorganismos previniendo el contacto directo con el epitelio intestinal. Cambios en la estructura o composición de este mucus afectan la función de barrera (Deplancke y Gaskins, 2001).

La mayoría de los estudios con líneas celulares, los probióticos mejoran la función de barrera por una disminución en la permeabilidad. Un posible mecanismo incluye cambios de las proteínas de las uniones estrechas y la producción de mucinas (figura 6) (Lutgendorff *et al.*, 2008; Lodemann, 2010). Se ha observado un efecto estabilizador sobre las uniones estrechas, por un aumento de las proteínas involucradas en la formación de estas uniones intercelulares (Zónula occludens (ZO)-1, ZO-2 y ocludinas) (Ukena *et al.*, 2007; Klingberg *et al.*, 2005; Ewaschuk *et al.*, 2008).

Varias cepas de *Lactobacillus* que se adhieren a células epiteliales intestinales HT29 inducen un aumento de la expresión del mRNA y secreción de la mucina MUC3 (Mack *et al.*, 2003). La capacidad de inducir la secreción de MUC3 es paralelo a un

efecto inhibitorio de la adhesión de *E.coli* enteropatógena. Probablemente MUC3 no está anclada al epitelio, pero es secretada al lumen donde interactúa o se une a las bacterias patógenas las que posteriormente son expulsadas por movimientos peristálticos (Mack *et al.*, 2003).

Las proteínas de choque térmico (HsP) desempeñan un papel central en la protección de las células, tejidos y órganos expuestos a diversas formas de estrés y se encuentran en todos los tejidos de los mamíferos (Feder y Hofmann, 1999). Estas ejercen múltiples efectos en las funciones epiteliales, incluyendo efectos sobre el transporte y la integridad epitelial (Musch *et al.*, 1999). Factores solubles de bajo peso molecular de *L. rhamnosus GG* induce la expresión de algunas HSPs en células epiteliales del colon a través de la activación de la señalización celular de las MAPKs (Tao *et al.*, 2006)

EXCLUSIÓN COMPETITIVA DE BACTERIAS PATÓGENAS

La exclusión competitiva de los microorganismos patógenos es el mecanismo más importante del efecto beneficioso de los probióticos (Adlerbeth *et al.*, 2000). Este mecanismo está basado en una interacción bacteria-bacteria y mediado por la competencia por los nutrientes disponibles y los sitios de adhesión a la mucosa. Las bacterias son capaces de modificar el ambiente para que sea más inhóspito para sus competidores. La producción de sustancias antimicrobianas, como ácido láctico o acético, es un ejemplo claro de este cambio ambiental. Varios estudios demuestran que cepas probióticas específicas inhiben competitivamente la adhesión de patógenos y los desplazan (Lee *et al.*, 2003; Gueimonde *et al.*, 2006). Los lactobacilos y las bifidobacterias comparten receptores de unión a glúcidos con algunos enteropatógenos y esto hace que puedan competir por los sitios de unión de los receptores del huésped con los patógenos (Nesser *et al.*, 2000; Todoriki *et al.*, 2001).

Existen distintos ensayos que utilizan líneas celulares intestinales, como las células Caco-2 y HT29, células derivadas de adenocarcinoma de colon, que se asemejan a la situación *in vivo*. Concretamente, las células Caco-2 han supuesto un gran avance en estudios de interacción celular, ya que crecen formando una monocapa homogénea, que se parece a la de los enterocitos maduros humanos en el intestino delgado (Lenaerts *et al.*, 2007). Estas células se diferencian después de catorce días en cultivo, a partir del

cual ya han formado uniones entre ellas y muestran la formación de criptas, estructura típica de las monocapas epiteliales (Huang *et al.*, 2009).

Se han desarrollado numerosos estudios de adhesión de bacterias ácido lácticas y la exclusión competitiva de bacterias patógenas (Todoriki, 2001; Sanz *et al.*, 2007; Izquierdo *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2008), que describen un efecto antagónico de cepas de bacterias ácido-lácticas, como *L.acidophilus*, *L.rhamnosus*, *L.casei*, *Bifidobacterium breve* y *Enterococcus faecium*, frente a *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens* y *Salmonella typhimurium*, incluyendo la inhibición en el crecimiento de este patógeno y su invasión, tanto *in vitro* como *in vivo* (Lin *et al.*, 2007; Tsai *et al.*, 2005). El probiótico es capaz de inhibir, competir y excluir a estos patógenos (Collado *et al.*, 2007; Gueimonde *et al.*, 2006). Así pues, se ha demostrado que *Salmonella enterica* disminuye su capacidad de adhesión en presencia de *Lactobacillus paracasei* (Jankowska *et al.*, 2008).

Este efecto inhibitorio es extraordinariamente específico, dependiente de la cepa y del patógeno usado. Se ha comprobado que diferentes cepas del mismo género y especie provocan distintos efectos en el hospedador (Salminen *et al.*, 2010). Asimismo, tanto la capacidad de inhibir la adhesión de patógenos como el desplazamiento de los patógenos adheridos, varían en función de la cepa que se ha utilizado. Otro aspecto importante es que la capacidad de adhesión de un probiótico no tiene una correlación con el grado de inhibición de un patógeno (Gueimonde *et al.*, 2006).

La gran mayoría de estudios para evaluar la adhesión e inhibición de las bacterias probióticas frente a bacterias patógenas *in vitro*, utilizan metodología clásica, es decir, el método de dilución en placa (Parassol *et al.*, 2005; Cammarota *et al.*, 2009). Otros autores evalúan la capacidad de inhibición del patógeno por el uso del sobrenadante de la bacteria probiótica en células Caco-2 utilizando una solución de Giemsa (Banerjee *et al.*, 2009), o bien, midiendo el halo de inhibición que se produce al hacer crecer el patógeno en presencia de la bacteria probiótica (Lin *et al.*, 2008). La metodología clásica se encuentra ampliamente contrastada, son métodos sencillos, baratos y no necesitan grandes requisitos para poderse desarrollar en cualquier laboratorio. Sin embargo, estas técnicas son tediosas, se basan en el examen visual por parte del operador, consumen gran cantidad de tiempo en cuanto a la preparación de la

muestra y, actualmente, el tiempo significa resolución. Una de las grandes desventajas que presenta esta metodología es la subestimación del número real de bacterias presentes debido a daños celulares o a fenómenos de agregación de las mismas durante la formación de colonias (Budde y Rasch, 2001). Además, para bacterias anaerobias estrictas, como es el caso del género *Bifidobacterium*, mientras se realiza el proceso de siembra en las placas, el oxígeno del ambiente reduce la viabilidad de este microorganismo (Auty *et al.*, 2001) (Tabla 3).

Tabla 3. Resumen de los métodos de detección de microorganismos.

Método	Error	Tiempo
Método en placa	>10%	Días
Microscopía óptica	>10%	Horas
qPCR	2-10%	Horas
Secuenciación DNA	No disponible	Días – semanas
Citometría de flujo	<5%	Minutos

En los últimos diez años, ha comenzado a utilizarse la citometría de flujo en el campo de la microbiología. La objetividad, la rapidez y la sensibilidad son algunas de las características que ha hecho que esta técnica se use ampliamente en laboratorios analíticos y de investigación (Shapiro, 2003). Gracias a su gran especificidad, es capaz de discernir entre varias poblaciones celulares diferentes (Herzenberg *et al.* 2006). Las desventajas de esta metodología son los costes de instrumentación, la incapacidad de visualizar las células que se están analizando (Givan, 2001; Hammes y Egli, 2005) y que está limitada a muestras en medio líquido (Wang *et al.*, 2010) (Tabla 4).

Dentro de las nuevas tecnologías, la Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa es una técnica que se caracteriza por ser extremadamente sensible, ya que es capaz de detectar una única copia de un fragmento del DNA problema; y de alta precisión (<2% error) (Klein, 2002). Al poder utilizar placas multimuestra se pueden cargar 96 muestras a la vez con lo que se acorta significativamente el tiempo en relación

a las metodologías tradicionales (Matijasić *et al.*, 2010). Asimismo, esta técnica no requiere ningún paso posterior, por lo que evita la posibilidad de que exista contaminación cruzada de los productos de PCR (Espy *et al.*, 2006). (Tabla 5).

Tabla 4. Ventajas y limitaciones de la citometría de flujo.

Ventajas	Limitaciones
Análisis multiparamétrico	Limitado a muestras en medio líquido
Velocidad de detección: 50000 células/s	Análisis sofisticado de los datos
Detección única	Límite detección alto para bacterias
Alta precisión (<5% error)	Coste del equipamiento
No necesita extracción DNA	
No necesita amplificación	

Tabla 5. Resumen de las ventajas y limitaciones de la técnica PCR cuantitativa.

Ventajas	Limitaciones
Alto rendimiento	Falsos negativos
Alta sensibilidad (<5 copias)	Coste del equipamiento
Alta precisión (<2% CV de valores de Ct)	
No necesita pasos posteriores	
Riesgo mínimo de contaminación	

Adaptado de Klein, 2002.

AISLAMIENTO DE BACTERIAS PROBIÓTICAS

Es usual aislar bacterias probióticas en las heces de los bebés. Además, hay cierta tradición de recomendar que los probióticos deben ser de origen humano, supuestamente porque se implantarían mejor en nuestro intestino, aunque actualmente se está poniendo en duda. Sin embargo, muchas de las cepas aisladas no cumplen con la condición de probiótico ya que su resistencia a los jugos digestivos es escasa o nula y muchas de ellas no se adhieren al epitelio intestinal. En nuestro trabajo motivo de esta tesis, seleccionamos lactantes alimentados con leche materna exclusivamente ya que la microbiota intestinal de los bebés alimentados con leche materna es muy rica en bifidobacterias y lactobacilos (Björkstén *et al.*, 2001), a los que se atribuyen parte de las propiedades protectoras de la leche materna en relación con la menor incidencia de enfermedad en los lactantes, comparados con los alimentados con lactancia artificial.

Ensayos in vitro de potenciales bacterias probióticas

Resistencia a la acidez gástrica

Antes de alcanzar el tracto intestinal, la bacteria probiótica debe sobrevivir a su paso a través del estómago (Henriksson *et al.*, 1999). La secreción de ácido gástrico en el estómago constituye un primer mecanismo de defensa frente a la mayoría de la carga de microorganismos que entran vía oral. Por ello, la supervivencia de las cepas bacterianas en ácido gástrico es la más certera indicación de su habilidad para pasar a través del estómago. *The University College of Cork-based Probiotic Research Group* aisló con éxito e identificó bacterias ácido lácticas que mostraban rasgos de probiótico ideal (Dunne *et al.*, 1999). Llevaron a cabo unos experimentos preliminares para determinar el grado de resistencia inicial que presentaban cepas de lactobacilos y bifidobacterias aisladas del íleon humano. El jugo gástrico humano fue obtenido de individuos sanos por aspiración a través de un tubo nasogástrico. Dado que el pH en el estómago es fluctuante (puede llegar a 1,5), se midió antes de usarlo. Este ácido fue añadido al medio MRS (*Medium Man Rogosa Sharpe*). La supervivencia inicial de las cepas se valoró en 10^8 UFC/ml y 10^6 UFC/ml para *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* respectivamente, en medio MRS (De Man *et al.*, 1960) con HCl que corrige el valor de pH entre 2,0 y 3,4; los resultados mostraban una mayor sensibilidad a la acidez por parte de *Bifidobacterium* (Thornton, 1996).

Resistencia a las sales biliares

Como se expuso anteriormente, para caracterizar un potencial probiótico, este debe también ser capaz de resistir las sales biliares (Lee y Salminen, 1995). Los ácidos biliares son sintetizados en el hígado a partir de colesterol y son secretados desde la vesícula biliar al duodeno en forma de conjugados con aminoácidos (500-700 ml/día); estos ácidos experimentan más modificaciones químicas (desconjugación, hidrólisis, deshidrogenación, y desglucuronidación) en el colon casi exclusivamente como resultado de la actividad microbiana. Ambos ácidos conjugados y desconjugados, presentan actividad antibacteriana inhibiendo el crecimiento de cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella sp.*, y *Enterococcus sp. in vitro* (Lewis *et al.*, 1972; Stewart *et al.*, 1986). Las formas desconjugadas son más inhibitorias y las bacterias Gram negativas más sensibles que las Gram positivas (Floch *et al.*, 1972; Percy-Robb, 1972). El grupo de Dunne (Dunne *et al.*, 1999) para evaluar la resistencia a sales biliares de las cepas que seleccionaron, en un primer ensayo, usaron un medio sólido de crecimiento suplementado con ácido biliar de origen bovino, porcino, y humano hasta una concentración final de 0.3% y 7.5%. Tras dejar crecer lactobacilos y bifidobacterias, el resultado fue, que exhibían resistencia al ácido biliar de origen bovino y que el de origen porcino resultaba mucho más inhibitorio para ambos grupos bacterianos (Thornton, 1996). Pero en relación a la búsqueda del posible probiótico para el consumo humano, el resultado más relevante fue su capacidad para crecer en la bilis de origen humano.

Adherencia al epitelio intestinal de cepas probióticas

La adherencia de las cepas microbianas al tejido epitelial del intestino y la habilidad para colonizar el tracto gastrointestinal debe ser también valorada en la selección de los probióticos. La importancia de este hecho reside en que después de seleccionadas muchas de las cepas potencialmente probióticas, más tarde no son capaces de colonizar a su hospedador diana. De hecho, de los actualmente disponibles parece que solo *L. rhamnosus* GG permanece dentro del tracto gastrointestinal un período significativo de tiempo (Berg *et al.*, 1998; Goldin *et al.*, 1992).

Las células HT-29 y Caco-2 pertenecen a líneas celulares intestinales humanas, expresan las características morfológicas y fisiológicas de un colonocito normal humano y son usadas para probar los mecanismos mediadores de la adhesión de enteropatógenos

(Bernet, 1994). Existen estudios en que las han utilizado para investigar la capacidad de adhesión de bacterias ácido lácticas. (Coconnier *et al.*, 1992; Bernet *et al.*, 1994; Greene y Klaenhammer, 1994; Crociani *et al.*, 1995; Sarem *et al.*, 1996; Tuomola y Salminen, 1998).

Evaluación de la actividad probiótica

Dentro de los diferentes tipos de estudios realizados a los probióticos, es de especial interés los que involucran a la competitividad con bacterias patógenas del sistema gastrointestinal. Al momento de elegir una bacteria patógena, hay que tener en cuenta su mecanismo de patogenicidad el cual varía entre una y otra. Una bacteria de interés es *Escherichia coli* enterotoxigénica, debido a la producción de su enterotoxina, causante importante de diarrea en humanos. Estudios recientes, han descrito que ciertas bacterias ácido lácticas tienen un efecto antagonista frente a *Escherichia coli* enterotoxigénica (Gopal *et al.*, 2001; Todoriki *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2008) y frente a otras bacterias patógenas como *Salmonella typhimurium* y *Shigella flexneri* (Tien *et al.*, 2006; Jankowska *et al.*, 2008). Sin embargo, estas últimas bacterias presentan un mecanismo de patogenicidad diferente a la de *Escherichia coli* enterotoxigénica.

Otro aspecto de interés de las cepas probióticas, es la posible producción de sustancias llamadas bacteriocinas; estas son secretadas por algunas bacterias para poder competir con otros microorganismos que están creciendo en el mismo nicho. Estas sustancias pueden inhibir el crecimiento o adhesión de bacterias patógenas sobre las células epiteliales intestinales, las cuales pueden ser producidas por algunas bacterias ácido lácticas (Klaenhammer, 1993; Jack *et al.*, 1995; Sablon *et al.*, 2000).

Un aspecto importante es conocer la interacción de las bacterias, ya sean probióticas o patógenas, con las células epiteliales intestinales, ya que con éstas interactúan en forma directa todas las bacterias presentes en la microbiota humana. Debido a esto los estudios utilizan líneas celulares del epitelio intestinal como Caco-2, HT-29 ó T84. Este modelo nos acerca a lo que puede estar sucediendo *in vivo* y en él se estudia el grado de adhesión de las diferentes bacterias. Se ha descrito que una co-incubación de bacterias patógenas con algunas cepas probióticas disminuye significativamente la adhesión de las bacterias patógenas a las células epiteliales del intestino (Coconnier *et al.*, 1997; Forestier *et al.*, 2001; Jankowska *et al.*, 2008). Esto es

de gran interés, ya que uno de los factores que puede determinar la patogenicidad de una bacteria es el grado de adhesión al epitelio intestinal para su posterior colonización. Además, en este modelo se han descrito algunos patrones de respuestas de las células epiteliales frente a diferentes estímulos, ya sea frente a citoquinas pro-inflamatorias, lipopolisacárido (LPS), TNF- α , IL-8 (Riedel *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2007) o frente a la presencia de diferentes bacterias, ya sean patogénicas, comensales (Gram positivas, Gram negativas) o probióticas, midiendo principalmente secreción y/o expresión de IL-4, IL-8, TNF- α , Factor de transformación del crecimiento tipo beta (TGF- β), receptores TLRs (TLR-1 a TLR-11) y activación de factores involucrados en la respuesta inflamatoria como el NF- κ B (Tien *et al.*, 2006; O'Hara *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008; Wallace *et al.*, 2003).

Los diferentes perfiles de respuesta han sido utilizados para determinar el tipo de respuesta generada por las células epiteliales intestinales, las cuales estimulan las células dendríticas, involucradas en la respuesta inmunitaria, que a su vez podrían promover la diferenciación de las células T hacia una respuesta “pro-inflamatoria” o “T helper tipo 1” (Th1); “proalérgica” o “T helper tipo 2” (Th2) o Th reguladora (Th3) (Rimoldi *et al.*, 2005).

Se ha descrito que la presencia de bacterias patógenas en las células epiteliales intestinales estimula un perfil de respuesta pro-inflamatoria (Th1), liberando citoquinas como TNF- α e IL-8, activando el NF- κ B, (Tien *et al.*, 2006; O'Hara *et al.*, 2006) y aumentando su expresión. Esta respuesta en la mayoría de los casos se ve parcialmente disminuida en presencia de una bacteria probiótica, lo cual indicaría un efecto beneficioso (Servin, 2004).

Otro modelo muy interesante de analizar es el que se realiza con DC; estas células están involucradas en la respuesta inmunitaria, son presentadoras de antígenos, se encuentran en varios tejidos donde reconocen y procesan microorganismos. En el sistema gastrointestinal están estrechamente relacionadas con las células epiteliales intestinales, y en particular con las células M, ya que estas estimulan a las DC para que generen la respuesta inmunitaria. Las DC inmaduras responden a productos procedentes de patógenos, lo cual inicia un programa de maduración que lleva a que éstas migren a los órganos linfoides y finalmente, a presentar los antígenos en asociación con

moléculas del complejo de histocompatibilidad principal (MHC). La expresión de moléculas co-estimuladoras en la superficie celular y la secreción de citoquinas ayudan a activar las células T antígeno-específico, y dependiendo del estímulo encontrado, las DC pueden desarrollar una respuesta Th1, Th2 o T3reg (Niedergang y Kweon, 2005).

Se ha postulado que algunos probióticos podrían modular las propiedades de las DC, incluyendo su capacidad de activar una respuesta inmunitaria específica (Kelsall *et al.*, 2002). Un equilibrio entre estimulación y tolerancia después del contacto con bacterias probióticas en el intestino podría ser importante para mantener su homeostasis y poder llevar a cabo sus funciones beneficiosas de protección frente a bacterias patógenas en el sistema digestivo del huésped.

La medición de secreción y/o expresión de citoquinas, y el grado de maduración de las DC son parámetros importantes que proveen información sobre el posible efecto de modulación sobre estas por parte de las cepas probióticas a estudiar. Existe también un modelo en que se cultivan células epiteliales intestinales en conjunto con DC, lo cual genera un modelo *in vitro* muy interesante que puede ofrecer más información respecto a la respuesta inmunitaria generada frente a los diferentes tipos de bacterias. Este sistema separa dos medios de cultivos, uno apical y otro basolateral (Placas Transwell), por una monocapa de DC intestinales. Las DC se co-cultivan en el lado basolateral y las bacterias en el lado apical (Butler, 2006). Este modelo está siendo muy utilizado y los estudios realizados dan un interesante perfil de respuesta frente a cepas probióticas (Ratajczak *et al.*, 2007).

Material y Métodos

MATERIAL Y
MÉTODOS

MATERIAL

MUESTRAS

En este estudio se utilizaron muestras de heces de niños de entre 2 y 4 meses de vida, alimentados exclusivamente con leche materna. Las muestras se tomaron en la consulta pediátrica del Hospital Clínico de la Universidad de Granada, en condiciones de anaerobiosis. Las muestras se recolectaron a primera hora de la mañana, se estimuló a los niños para que evacuaran y las heces se recogieron en un recipiente estéril mediante una cucharilla de plástico adherida a la tapa. Una vez terminada la recolección, el recipiente con la muestra se introdujo en una jarra de anaerobiosis que contenía en su interior un sobre generador de atmósfera anaeróbica; la jarra se cerró herméticamente y se transportó inmediatamente al laboratorio. Las muestras se procesaron en un tiempo no superior a 2 horas y posteriormente, el resto se congeló a -80 °C.

BACTERIAS PROBIÓTICAS CONTROLES

Como bacterias de referencia en las diferentes pruebas efectuadas se utilizaron bacterias probióticas provenientes de productos comerciales:

- *Bifidobacterium longum* BB536 (Hero España S.A.)
- *Bifidobacterium bifidum* Rosell-71 (Hero España S.A.)
- *Lactobacillus casei* DN 114001 (*L. casei* inmunitas, Danone®)
- *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG, Kaiku®)

BACTERIAS PROBIÓTICAS DEPOSITADAS EN INSTITUT PASTEUR

Finalizada la primera etapa de aislamiento e identificación de bacterias probióticas del presente estudio, las tres cepas de bacterias obtenidas se depositaron en el *Institut Pasteur* (Paris, Francia) y fueron aceptadas como cepas innovadoras, las cuales se denominaron de la siguiente forma:

- *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034
- *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035
- *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036

Estas bacterias se utilizaron posteriormente para caracterizar sus propiedades probióticas.

BACTERIAS PATÓGENAS INTESTINALES

Las bacterias patógenas utilizadas en este estudio se obtuvieron de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Debido al efecto cepa descrito en numerosos estudios (Salminen *et al.*, 2010) y atendiendo a los distintos mecanismos de patogenicidad, se estudiaron las tres bacterias probióticas, anteriormente mencionadas, frente a los siguientes enteropatógenos:

- *E.coli* enterotoxigénica (ETEC)
 - ✓ CECT 434
 - ✓ CECT 501
 - ✓ CECT 515
- *E.coli* enteropatógena (EPEC)
 - ✓ CECT 727
 - ✓ CECT 729
 - ✓ CECT 742
- *Salmonella typhimurium*
 - ✓ CECT 443
 - ✓ CECT 4594
- *Salmonella typhi*
 - ✓ CECT 725

OBTENCIÓN DEL SOBRENADANTE PROBIÓTICO LIOFILIZADO

En este estudio se utilizaron sobrenadantes del medio de cultivo de crecimiento de las bacterias probióticas; estos sobrenadantes fueron estudiados frente a las bacterias patógenas intestinales anteriormente mencionadas.

Los sobrenadantes fueron suministrados por la empresa Biopolis S.L. y se obtuvieron de acuerdo con el siguiente protocolo:

Para obtener sobrenadante concentrado, las cepas se cultivaron en medio líquido MRS durante 17 o 24 h (*Lactobacillus*), o en MRS suplementado con cisteína 0,05% (*Bifidobacterium*) a 37 °C. El sobrenadante de cada una de las cepas se obtuvo por

centrifugación, se liofilizó y se guardó a 4 °C. Posteriormente, los sobrenadantes liofilizados se reconstituyeron con menos volumen para concentrarlos diez veces con el objeto de no diluir demasiado el medio de cultivo de las bacterias enteropatógenas. Una parte de cada sobrenadante se neutralizó a pH 6,5 y en otra el pH no fue modificado (pH 3,0-4,0). Posteriormente, el sobrenadante fue esterilizado por medio de un filtro de 0,22 µm (Millipore). Alícuotas de sobrenadante neutralizado y no neutralizado se almacenaron en congelación a -80°C hasta su uso.

CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES

Como modelo *in vitro* de adhesión, se utilizaron dos líneas celulares epiteliales intestinales inmortalizadas (Caco-2 y HT-29) procedentes de cáncer de colon y suministradas por el Banco de Células del Centro de Investigación Científica de la Universidad de Granada (CIC-UGR). Estas células se cultivaron en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Sigma-Aldrich), con 10% de suero bovino fetal, 1% de glutamina, penicilina G (10 IU/ml), estreptomicina sulfato (100 µg/ml) y amfotericina B (250ng/ml), hasta su confluencia en atmósfera controlada (37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad). Después de una semana de post-confluencia, donde es bien conocido que los enterocitos se encuentran diferenciados, se realizaron las pruebas de adhesión bacteriana en placas de 24 pocillos.

REACTIVOS Y MATERIALES UTILIZADOS

Los reactivos y materiales utilizados proceden de las casas comerciales que a continuación se detallan:

Reactivos

- Oxoid (Hampshire, Reino Unido).
- Deltalab S.L.U. (Barcelona, España).
- Scharlau CEIME (Barcelona, España).
- Sigma-Aldrich (Madrid, España).
- Fluka analytical; Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EE. UU.).
- Becton Dickinson (Massachusetts, EE.UU.).
- Colección española de cultivo tipo (CECT).
- General Electric Healthcare (Freiburg, Alemania).
- bioMérieux's (Marcy-l'Etoile, Francia).

- Macherey-Nagel (Oensingen, Suiza).
- Applied Biosystems (Foster City, California, EE.UU.).
- Millipore (Billerica, MA, EE. UU.).
- Panreac Química S.A. (Barcelona, España).
- Nunc (Rochester, NY, EE. UU.).
- Invitrogen (Londres, reino Unido).
- Merck (V.W.R. International Eurolab S.L., Barcelona, España).
- Cultimed (Barcelona, España).
- AppliChem (Darmstadt, Alemania).

Aparatos

- Baño de agua termostatzado Memmert WB-14 (Schwabach, Alemania).
- pHmetro Crison (Barcelona, España).
- Centrífuga 5415D 24 plazas (Hamburgo, Alemania).
- Incubador células Sanyo Heat CO₂ Incubator (Osaka, Japon).
- Pipetas automáticas Eppendorf Research®plus (Madrid, España).
- Pipeteador electrónico Boeco (Hamburgo, Alemania).
- Congelador vertical -80 °C Thermo Scientific (Waltham, MA, EE. UU.)
- Multiskan FC (Thermo Scientific, Barcelona, España)
- Cabina de seguridad biológica clase II telstar BioUltra (Terrassa, España)
- Colony Counter modelo 608702 (Bio Co, Kobe, Japón)
- Cubeta de electroforesis Horizon 58 Invitrogen (Carlsbad, California, EE.UU.).
- Termociclador 9700 Applied Biosystem (Warrington, Reino Unido).
- Transiluminador UV New Brunswick Scientific (Edison, New Jersey, EE.UU.).
- Baño de agua termostatzado Selecta Unitronic 320 OR (Barcelona, España).
- Termomixer Confort (Hamburgo, Alemania).
- Abi 7900 HT- Fast Real-Time PCR System Applied Biosystem (Foster City, California, EE.UU.).
- Luminex 200TM v2.3 y software *Luminex Xponent*. (Billeca, Massachusetts, EE.UU.)

MÉTODOS

DISEÑO EXPERIMENTAL DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Se aislaron y se caracterizaron microorganismos probióticos mediante técnicas específicas de cultivo y de biología molecular. Se procedió a cultivar una dilución de las muestras de heces de los niños alimentados exclusivamente con leche materna en medios selectivos para el crecimiento de bacterias ácido lácticas. Se seleccionaron al azar 100 colonias que fueron sometidas a pruebas de resistencia de pH (2,0-3,0), sales biliares (0,3-0,7%) y adhesión a células epiteliales HT-29. Las colonias que superaron estas pruebas fueron identificadas genótipica y fenotípicamente, mediante técnicas de biología molecular (secuenciación del gen 16s DNAr y espacio intergénico 16s-23s) y métodos metabólicos (API ZYM y API 50 CHL) (figura 7). Posteriormente, se caracterizaron sus propiedades probióticas estudiando su capacidad de inhibición del crecimiento de bacterias patógenas intestinales (*Escherichia coli* y *Salmonella*) en experimentos *in vitro*.

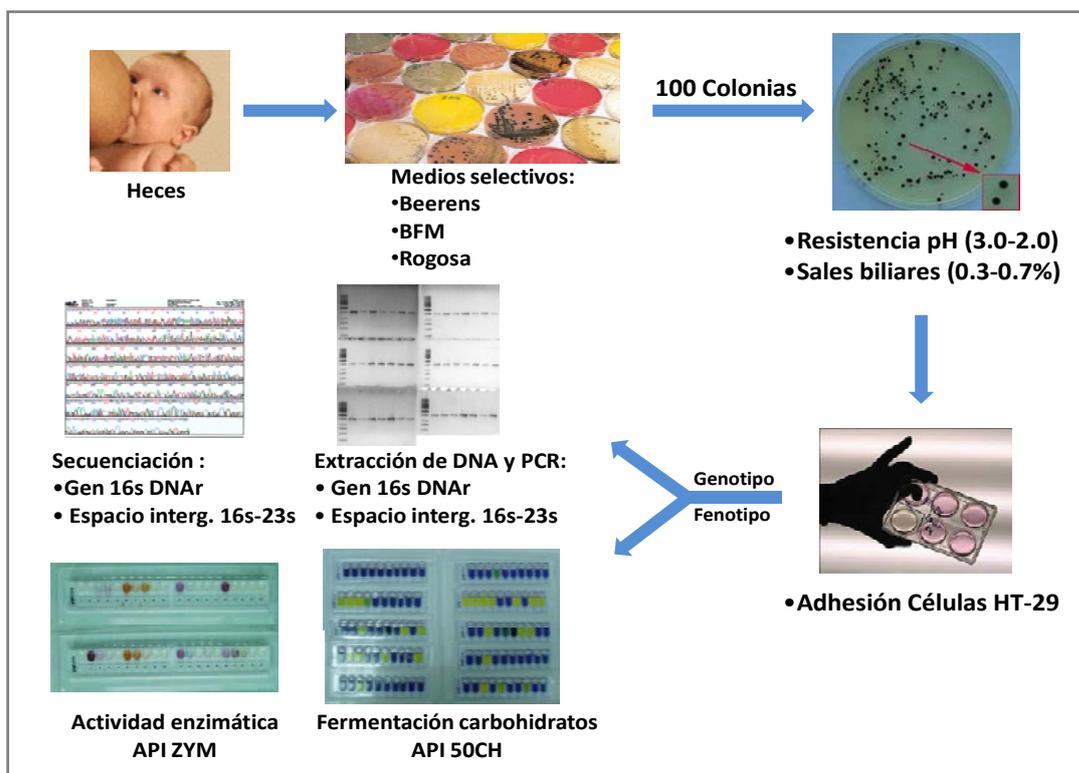


Figura 7. Resumen del diseño experimental de aislamiento e identificación de bacterias ácido lácticas a partir de heces de niños alimentados exclusivamente al pecho.

Este estudio formó parte de dos proyectos financiados por HERO ESPAÑA S.A.

- “Identificación, aislamiento y caracterización de microorganismos probióticos” desarrollado entre 2006-2010.
- “Caracterización de la actividad probiótica de las bacterias *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 y *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035” desarrollado entre 2008-2011.

PROCESAMIENTO Y SIEMBRA DE MUESTRAS

Materiales

- Jarras anaeróbicas (Oxoid).
- Tubos recolectores de heces estéril (Deltalab)
- Sobre generador de atmósfera anaerobia (Anaerogen, Oxoid).
- Sobre generador de atmósfera rica en CO₂ (CO₂Gen, Oxoid)
- Pipetas de 20, 100, 200 y 1000 µl (Eppendorf).
- Hidrocloruro de L-cisteína (Scharlau).
- Tampón fosfato salino (PBS; Sigma-Aldrich).

Procedimiento

Una vez recolectada la muestra de heces, se preparó una suspensión al 10% en PBS e hidrocloruro de L-cisteína (0,05%). Se realizaron 7 diluciones de esta preparación, de 10⁻¹ a 10⁻⁷. Finalmente se sembraron 50 µl de cada dilución en los medios de cultivos seleccionados (Beerens, BFM, Columbia modificado, Rogosa agar) y se incubaron en anaerobiosis en el caso de bifidobacterias y en medio rico en CO₂ en el caso de lactobacilos, durante 72 horas a 37°C.

PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

Medio de Beerens

Este medio (Beerens, 1991) es utilizado como un medio selectivo para aislar y cuantificar bifidobacterias.

Materiales

- *Brain Heart Infusion* Agar. (Becton Dickinson)
- D-(+) Glucosa (Sigma-Aldrich).
- Citrato de hierro III (Sigma-Aldrich).

- Hidrocloruro de L- cisteína (Scharlau).
- Ácido propiónico (Scharlau).
- Hidróxido de sodio 2 Eq/l (Sigma-Aldrich).

Procedimiento

En un matraz Erlenmeyer de un litro se mezclaron 47 g de *Brain Heart Infusion* Agar, 5 g de D-(+) Glucosa, 0,5 g de citrato de hierro III, 0,5 g de L-cisteína y un litro de agua destilada. Esta mezcla se calentó bajo agitación constante, sobre una placa agitadora con calor hasta ebullición durante un par de minutos, luego se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez que alcanzó 55 °C se agregaron 5 ml de ácido propiónico y 2,2 ml de hidróxido de sodio 2Eq/l, luego, el pH se ajustó a 5,0.

Medio BFM

Este medio (Nebra y Blanch, 1999) es utilizado como un medio selectivo específico para bifidobacterias.

Materiales

- | | | |
|------------------------------|-----------------|-------|
| • Extracto de Carne | (Cultimed) | 2 g |
| • Extracto de Levadura | (Cultimed) | 7 g |
| • Almidón | (AppliChem) | 2 g |
| • Hidrocloruro de L-cisteína | (Scharlau) | 0,5 g |
| • Cloruro de Sodio | (Sigma-Aldrich) | 5 g |
| • Peptona | (Cultimed) | 5 g |
| • Triptona | (Cultimed) | 2 g |
| • Lactulosa | (Fluka) | 5 g |
| • Riboflavina* | (Sigma-Aldrich) | 1 mg |
| • Tiamina* | (Sigma-Aldrich) | 1 mg |
| • Azul de metileno | (Sigma-Aldrich) | 16 mg |
| • Cloruro de litio | (Fluka) | 2 g |
| • Ácido propiónico | (Panreac) | 5 ml |
| • Agar | (Cultimed) | 15 g |

Procedimiento

Se prepararon 500 ml de medio selectivo para bifidobacterias (las cantidades están expresadas por litro de solución). Esta mezcla se calentó con agitación constante, sobre una placa agitadora con calor, hasta ebullición durante un par de minutos, después la solución fue autoclavada. Finalmente, las vitaminas (*) se prepararon en soluciones concentradas (solución madre 1 mg/ml) y se esterilizaron mediante un filtro de 0,22 µm (Millipore), y posteriormente se añadieron junto al ácido propiónico, al medio de cultivo cuando la solución alcanzó aproximadamente 55 °C.

Medio Columbia Modificado

Este medio (pH 5,0) es utilizado como medio selectivo para bifidobacterias.

Materiales

- Medio Columbia Agar (Oxoid).
- Glucosa 5 g/l (Sigma-Aldrich).
- Hidrocloruro de L- cisteína 0,5 g/l (Scharlau).
- Agar (hasta 15 g/l; Cultimed).
- Ácido propiónico 5ml (Panreac)

Procedimiento

Se prepararon 1000 ml de medio selectivo para bifidobacterias (las cantidades están expresadas por litro de solución). Esta mezcla se calentó con agitación constante sobre una placa agitadora con calor hasta ebullición durante un par de minutos, después la solución fue autoclavada. Finalmente, se adicionó el ácido propiónico al medio de cultivo cuando la solución alcanzó aproximadamente 55 °C y el pH se ajustó a 5,0.

Medio Rogosa Agar

Este medio es utilizado como un medio selectivo para aislar y cuantificar lactobacilos (Rogosa, 1951), el cual fue preparado siguiendo las especificaciones suministradas por la casa comercial.

SIEMBRA DE MUESTRAS

Materiales

- Placas Petri con los distintos medios de cultivo.
- Pipetas de 20, 100, 200 y 1000 μ l (Eppendorf).
- Asa para siembra de cultivo.
- Jarras de anaerobiosis (Oxoid).
- Sobre generador de atmósfera anaeróbica (Anaerogen, Oxoid).
- Sobre generador de atmósfera CO₂ (CO₂Gen, Oxoid).

Procedimiento

Una vez realizadas las diluciones, las muestras se sembraron por triplicado por medio de un asa de siembra. Posteriormente, todas las placas se incubaron en una estufa con temperatura controlada a 37 °C.

Las placas con los medios de cultivo para bifidobacterias fueron previamente introducidas en jarras de anaerobiosis a las que se les incorporó un sobre generador de atmósfera anaeróbica y aquellas que contenían las placas de cultivo para lactobacilos, se les introdujo un sobre generador de CO₂. Finalmente, se incubaron durante 72 h a 37°C.

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS

Materiales

- 1) Lápiz contador de colonias (Colony Counter modelo 608702, Bio Co, Kobe, Japón).

Procedimiento

Posterior a la incubación, se seleccionaron las diluciones que presentaron un crecimiento mayor a 10 unidades formadoras de colonia (UFC) y menor a 300 UFC y se procedió a realizar el recuento en cada uno de los medios, a través de un lápiz contador de colonias electrónico. Recordando que se diluyó 100 mg de heces en 1ml de PBS y se sembraron 50 μ l de esta dilución, el cálculo de la dilución sería: 50 μ l x 20, para expresar colonias por 1ml o 100mg de heces, para expresarlo por 1g de heces se multiplica por 10. Finalmente se calculó el número total de UFC por gramo de heces mediante la siguiente fórmula:

$$\text{UFC} = \text{N}^\circ \text{ de colonias (10-300)} \times \text{factor de dilución (10}^1\text{-10}^7\text{)} \times 200 (20 \times 10)$$

Una vez realizados los cultivos, las muestras restantes de las heces se almacenaron a -80°C hasta la realización de los estudios de Biología Molecular.

DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A pH Y SALES BILIARES

Materiales

- 2) Sales biliares, Oxgall® (Sigma-Aldrich).
- 3) Medio líquido Man Rogosa Shape (MRS; Cultimed).
- 4) Medio sólido Man Rogosa Shape agar (MRS agar; Cultimed).
- 5) Glicerol (Sigma-Aldrich).
- 6) Tampón fosfato PBS (Sigma-Aldrich).
- 7) HCl (Sigma-Aldrich).
- 8) Jarras de anaerobiosis (Oxoid).
- 9) Sobre generador de atmósfera anaeróbica (Anaerogen, Oxoid).
- 10) Sobre generador de atmósfera CO_2 (CO_2 Gen, Oxoid).

Procedimiento

Una vez cultivadas las heces en los diferentes medios de cultivo, se seleccionaron 100 colonias por cada medio de cultivo. Dichas colonias, tanto lactobacilos como bifidobacterias, se incubaron en medio MRS líquido y en condiciones anaeróbicas durante 48 horas. Posteriormente, se realizó de forma inmediata un *stock* de cada una de ellas en glicerol (MRS+ Glicerol 10%).

Al mismo tiempo que se realizaron los stocks en glicerol de las distintas colonias, se analizó su viabilidad tanto a pH 3,0 como a una concentración del 0,3% de sales biliares. Se utilizó un método modificado de los realizados por los siguientes autores; Gopal *et al.*, (2001), Klingberg *et al.*, (2005) y Jacobsen *et al.*, (1999).

En resumen se procedió de la siguiente manera: las colonias a ensayar se incubaron en anaerobiosis en medio MRS líquido durante 48 h a 37°C , 1 ml de las bacterias correspondientes a las colonias crecidas en medio líquido fueron centrifugadas a 5000 g durante 5 minutos y el sobrenadante se eliminó y se resuspendió en PBS estéril. Este procedimiento se repitió 2 veces más. Cien μl de la suspensión anterior se mezcló con

900 µl de: PBS pH 7,0, PBS pH 3,0 y sales biliares 0,3% en PBS. Estas mezclas se incubaron en condiciones anaeróbicas a 37 °C durante 3 horas. Tras este tiempo se realizaron diversas diluciones (10^{-1} - 10^{-5}) de las cuales se sembraron 50 µl de cada dilución en medio solido MRS agar durante 72 h a 37 °C en anaerobiosis. Finalizado este periodo se determinó el número de colonias presentes en condiciones de control (pH 7,0), pH 3,0 y sales biliares 0,3% y se calculó la viabilidad de cada bacteria seleccionada mediante el siguiente cociente:

$$\% \text{ Viabilidad} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ colonias a pH o } \acute{\text{a}}\text{c. biliar}}{\text{N}^{\circ} \text{ colonias control}} \times 100$$

Todas aquellas colonias que mostraron una viabilidad >90%, tanto a pH 3,0 como a sales biliares 0,3% se consideraron como positivas, las cuales se guardaron para realizar las demás pruebas. Las colonias restantes se eliminaron.

Bacterias controles

Como se mencionó anteriormente, las colonias utilizadas como controles positivos fueron las siguientes:

Para bifidobacterias: *Bifidobacterium bifidum* BB536 y *Bifidobacterium longum* Rosell-71 (Hero España S.A).

Para lactobacilos: *Lactobacillus casei* DN114001 (Danone®) y *Lactobacillus rhamnosus* GG (Kaiku®).

Una vez concluido el cribado inicial con las colonias que superaron esta prueba, se realizó un segundo cribado; en este caso, se verificó la viabilidad a pH 2,5, pH 2,0 y a concentración de sales biliares 0,5 y 0,7%. El protocolo utilizado fue el anteriormente explicado.

PRUEBAS DE ADHESIÓN A CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES

Materiales

- Células HT-29 (CIC UGR).
- Tampón fosfato PBS (Sigma-Aldrich).
- Medio MRS (Cultimed).
- Jarras de anaerobiosis (Oxoid).
- Sobre generador de atmósfera anaeróbica (Anaerogen, Oxoid).
- Sobre generador de atmósfera CO₂ (CO₂Gen, Oxoid).
- Medio DMEM (Sigma-Aldrich)
- Placas de cultivo celular de 24 pocillos (Nunc)
- Suero bovino fetal (FBS; Invitrogen).
- Pipeta pasteur (Labortecnic).

Procedimiento

Una vez que las colonias se seleccionaron de acuerdo con su resistencia al pH y a sales biliares, se procedió a realizar el ensayo de adhesión celular. Dicho ensayo se efectuó con células epiteliales intestinales HT-29; para ello se siguió el método de Gopal *et al.*, (2001) y Jacobsen *et al.*, (1999) con modificaciones.

Las colonias a ensayar se incubaron en anaerobiosis en medio MRS líquido durante 48 h a 37°C, 1 ml de las colonias crecidas fueron centrifugadas a 5000 g durante 5 minutos y el sobrenadante se eliminó y se resuspendió en PBS estéril. Este procedimiento se repitió 2 veces más. Se determinó la densidad óptica (DO) de cada bacteria a 600 nm y el cultivo bacteriano se diluyó hasta una DO de 0,8 en medio de cultivo, previamente preparado sin FBS y antibióticos (1-5 x 10⁶ UFC/ml).

Las células HT-29 se cultivaron previamente en placas de 24 pocillos (Nunc) a 37 °C y 5% de CO₂ hasta confluencia. El medio de cultivo se eliminó y las células se lavaron varias veces con PBS estéril para eliminar los restos de FBS y antibióticos. A cada pocillo se añadió 250 µl de suspensión bacteriana preparada (en triplicado) y se incubó a 37 °C y 5% CO₂ durante 90 minutos. Finalizada la incubación, se procedió a eliminar el medio mediante aspiración con una pipeta pasteur y los pocillos fueron lavados con PBS estéril 4 o 5 veces, con el objeto de eliminar las bacterias que no

tuvieron la capacidad de adherirse a la superficie de las células HT-29. Se añadió 100 µl de tripsina y se incubó durante 10-15 minutos a 37 °C. Después, todo el volumen del pocillo se recuperó y se trasladó a un vial, y cada pocillo se lavó con 150 µl de PBS que se añadieron al mismo vial. Se realizaron varias diluciones (10^{-1} - 10^{-5}), de las cuales se sembraron 50 µl de cada una de ellas en medio sólido MRS agar durante 72 h a 37 °C en anaerobiosis. Del mismo modo, se efectuaron diluciones de la suspensión inicial de bacterias inoculadas para determinar el número de bacterias. Tras este periodo se determinó el % de adhesión de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Adhesión} = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ colonias adherentes}}{\text{N}^{\circ} \text{ colonias inoculadas}} \times 100$$

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS

Aislamiento de DNA genómico bacteriano

Materiales

- Tampón fosfato PBS (Sigma-Aldrich).
- Tampón Tris-EDTA (TE; Sigma-Aldrich).
- Dodecil sulfato de sodio (SDS; Sigma-Aldrich).
- Proteinasa K (20 mg/ml; Sigma-Aldrich).
- NaCl (Sigma-Aldrich).
- Cetil trimetilamonio bromuro (CTAB)/NaCl (Sigma-Aldrich).
- Cloroformo (Sigma-Aldrich).
- Alcohol isoamílico (Panreac).
- Etanol (Panreac).
- Fenol (Panreac).
- Isopropanol (Panreac).

Procedimiento

Para extraer el DNA genómico de las bacterias seleccionadas se procedió a incubarlas en anaerobiosis en medio MRS líquido durante 48 h a 37°C. Un ml de las bacterias crecidas fueron centrifugadas a 5000 g durante 5 minutos y el sobrenadante se eliminó y se resuspendió en PBS estéril. Este procedimiento se repitió 2 veces.

Posteriormente, el precipitado bacteriano se resuspendió en 567 μ l de tampón TE, se agregaron 30 μ l de SDS 10% y 3 μ l de proteinasa K y esta mezcla se incubó a 37 °C durante 1 hora. Después, se agregaron 100 μ l de NaCl 5M y 80 μ l de CTAB/NaCl, se mezcló bien y se incubó a 65 °C durante 10 minutos. Se agregó igual volumen (780 μ l) de mezcla cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó durante 5 minutos a 10000 g. La fase acuosa superior se extrajo y se transfirió a un nuevo vial, al cual se le agregó un volumen igual de la mezcla fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó durante 5 minutos a 10000 g. La fase acuosa superior se extrajo y se transfirió a un nuevo vial al cual se agregó 0,6 volúmenes de isopropanol y se centrifugó durante 13 minutos a 10000 g a 4°C. Tras este paso se puede observar un precipitado que corresponde al DNA. Posteriormente, el sobrenadante se eliminó y se agregó 1ml de etanol 70%, el cual se centrifugó durante 5 minutos a 10000 g a 4°C. El sobrenadante fue eliminado y el precipitado de DNA se dejó secar a temperatura ambiente. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 20-50 μ l de agua y la concentración de DNA se cuantificó por medio de un espectrofotómetro a 260 nm. Se calculó la relación de DO 260/280 para verificar su pureza.

Amplificación del gen 16S DNAr y espacio intergénico 16s-23s por PCR

Material

- DNA bacteriano aislado.
- Cloruro de magnesio 50 mmol/l
- Desoxirribonucleótidos (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), con una concentración de 10 mmol/l de cada uno de ellos.
- Oligonucleótidos (27R, 1492F, 39F, 1391R, Bif 250bp F, Bif 250bp R, lactoF, lactoR, F_allbif_IS, R_allbif_IS) (Sigma-Aldrich).
- Agarosa (Sigma-Aldrich)
- Termociclador 9700 (Applied Biosystem)

Procedimiento

Para amplificar el gen 16s DNAr, se utilizó el par de oligonucleótidos universales 27F-1492R, esto se hace para amplificar de la mayor cantidad posible del gen 16S de diferentes especies de bacterias y/o grupos específicos, ya que son

frecuentemente utilizados en estudios moleculares de diversidad y son considerados universales para el dominio *Bacteria* (Lane, 1991). Dichos oligonucleótidos amplifican un fragmento de aproximadamente 1450 pares de bases (bp) y se utilizan a una temperatura de hibridación de 55 °C y un tiempo de amplificación de 90 seg y 35 ciclos.

27F 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (M = A + C)

1492R 5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3' (Y = C + T)

También, se utilizó otro par de oligonucleótidos (39F-1391R), que asimismo se clasifican como universales para el 16s DNAr de bacterias. (Zhu et al., 2002; Eckburg *et al.*, 2005; Hongoh *et al.*, 2003). Estos amplifican un fragmento de aproximadamente 1350 bp y se utilizó una temperatura de hibridación de 52 °C y un tiempo de amplificación de 90 seg y 35 ciclos.

39F 5'-TGGCTCAGRWYGAACGCTRG-3' (R = A + G, W = A + T, Y = C + T)

1391R 5'-GACGGGCGGTGWGTRCA-3'

Además, en nuestro laboratorio se diseñaron oligonucleótidos específicos (Bif 250bp F-Bif 250bp R) para poder distinguir bifidobacterias. Estos amplifican un fragmento de aproximadamente 250 bp y se utilizó una temperatura de hibridación de 65 °C y un tiempo de amplificación de 20 seg y 30 ciclos.

Bif 250bp F 5'-CTCGTAGGCGGTTCGTCG-3'

Bif 250bp R 5'-AACGGGCCCCACATCCAG-3'

Por otro lado, se diseñaron oligonucleótidos (lactoF-lactoR) para amplificar las zonas intergénicas 16s-23s de lactobacilos. Estos amplifican un fragmento de aproximadamente 600 bp y se utilizó una temperatura de hibridación de 65 °C y un tiempo de amplificación de 30 seg y 30 ciclos.

lactoF 5'-ACACCGCCCGTCACACCATG-3'

lactoR 5'-CCHSTTCGCTCGCCGCTACT-3' (H = A + T, S = G + C)

También, se utilizaron oligonucleótidos específicos para bifidobacterias (F_allbif_IS- R_allbif_IS; Haarman y Knol, 2005). Estos amplifican un fragmento de

aproximadamente 240 bp y se utilizó una temperatura de hibridación de 60 °C y un tiempo de amplificación de 30 seg y 30 ciclos.

F_allbif_IS (ISBif F) 5'-GGGATGCTGGTGTGGAAGAGA-3'

R_allbif_IS (ISBif R) 5'-TGCTCGCGTCCACTATCCAGT-3'

Para amplificar el gen 16s DNAr y el espacio intergénico 16s-23s se cargaron entre 50-100 ng de DNA para una PCR de volumen final de 50 µl. En cada ciclo se utilizó una temperatura de desnaturalización de 94 °C durante 30 seg, posteriormente, se programó la temperatura de hibridación según las condiciones de cada juego de oligonucleótidos antes especificadas.

El resultado de la amplificación se verificó en un gel de agarosa al 1.3%, se tiñeron las muestras con bromuro de etidio y se visualizaron en un transiluminador ultravioleta New Brunswick Scientific.

Las amplificaciones que resultaron negativas se repitieron revisando las condiciones de la PCR y reajustando estas. Las que resultaron positivas se purificaron con el kit *Ilustra™ GFX™ PCR DNA and gel Band Purification* (General Electric healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez purificados los fragmentos de PCR, se resuspendieron en 25 µl de agua y la purificación fue ratificada visualizando en un nuevo gel de agarosa al 1.3%.

Posteriormente, las muestras se secuenciaron en el Servicio de Secuenciación de DNA del Instituto de Parasitología y Biomedicina “Lopez-Neyra” (CSIC) de Granada.

Una vez secuenciados los fragmentos del gen16S se procedió a la búsqueda de homología en la base de datos de la *National Center of Biotechnology Information* (NCBI). La comparación de las secuencias de los 16s DNAr permitió establecer las relaciones filogenéticas entre las colonias de bacterias seleccionadas incluyendo la identificación de lactobacilos y bifidobacterias (Tannock, 1999).

IDENTIFICACIÓN MEDIANTE PRUEBAS DE FERMENTACIÓN

Materiales

- API ZYM (bioMerieux's).
- API 50 CHL (bioMerieux's).
- API CHL medio (bioMerieux's).

Se utilizaron los sistemas API ZYM y API 50 CHL. Estos test enzimáticos pueden ser usados para una rápida y teóricamente reproducible identificación fenotípica de cultivos puros. Aunque, estos han sido utilizados principalmente para identificar distintas especies de lactobacilos (Coeuret *et al.*, 2003; Charteris *et al.*, 2001).

El sistema API ZYM es un método semi-cuantitativo que mide actividades enzimáticas. Este sistema posee 20 pocillos, 19 de los cuales contiene un substrato deshidratado para detectar la actividad de 19 enzimas (Tabla 6); se obtiene un resultado colorimétrico que indica el grado de actividad enzimática, el cual es graduado en una escala de 0-5 en comparación con el control.

También, se utilizaron tiras de API 50 CH y medio API CHL (bioMerieux's). Este método se utiliza para obtener un perfil de fermentación de 49 hidratos de carbono (Tabla 7). Se obtiene un resultado colorimétrico, pero en este caso sólo se clasifican como positivo (+), negativo (-), o intermedio (V), en comparación con el control. En todas las pruebas se utilizaron bacterias controles.

Tabla 7. Enzimas cuya actividad relativa se valora con el sistema APIZYM.

1	Control	11	Fosfatasa ácida
2	Fosfatasa alcalina	12	Naftol-AS-BI-fosfosfohidrolasa
3	Esterasa(C4)	13	α -galactosidasa
4	Esterasa lipasa (C8)	14	β -galactosidasa
5	Lipasa (C14)	15	β -glucuronidasa
6	Leucina arilamidasa	16	α -glucosidasa
7	Valina arilamidasa	17	β -glucosidasa
8	Cistina arilamidasa	18	N-acetil- β -glucosaminidasa
9	Tripsina	19	α -manosidasa
10	α -quimotripsina	20	α -fucosidasa

Tabla 8. Hidratos de carbono que componen el sistema API 50 CHL.

1	Control	26	Esculina citrato férrico
2	Glicerol	27	Salicina
3	Eritritol	28	D-Celobiosa
4	D-Arabinosa	29	D-Maltosa
5	L-Arabinosa	30	D-Lactosa
6	D-Ribosa	31	D-Meliobiosa
7	D-Xilosa	32	D-Sacarosa
8	L-Xilosa	33	D-Trehalosa
9	D-Adonitol	34	Inulina
10	Metil- α D-Xilopiranosido	35	D-Melezitosa
11	D-galactosa	36	D-Rafinosa
12	D-Glucosa	37	Almidón
13	D-Fructosa	38	Glucógeno
14	D-Manosa	39	Xilitol
15	L-Sorbosa	40	Gentiobiosa
16	L-Rhamnosa	41	D-Turanosa
17	Dulcitol	42	D-Lixosa
18	Inositol	43	D-Tagatosa
19	D-Manitol	44	D-Fucosa
20	D-Sorbitol	45	L-Fucosa
21	Metil- α D-Manopiranosido	46	D-Arabitol
22	Metil- α D-Glucopiranosido	47	L-Arabitol
23	N-Acetilglucosamina	48	Gluconato potásico
24	Amigdalina	49	2-Cetogluconato potásico
25	Arbutina	50	5-Cetogluconato potásico

EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL SOBRENADANTE DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS SOBRE EL CRECIMIENTO DE BACTERIAS ENTEROPATÓGENAS

Materiales

- Sobrenadantes (10X) de 17 y 24h de crecimiento de las bacterias *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036 (Biopolis S.L.)
- *E.coli* enterotoxigénica (ETEC)
 - ✓ CECT 434
 - ✓ CECT 501
 - ✓ CECT 515

- *E.coli* enteropatógena (EPEC)
 - ✓ CECT 727
 - ✓ CECT 729
 - ✓ CECT 742
- *Salmonella typhimurium*
 - ✓ CECT 443
 - ✓ CECT 4594
- *Salmonella typhi*
 - ✓ CECT 725
- *Tryptone Soya Broth* (TS; cultimed)
- Placa 96 pocillos (Nunc)
- Film Adhesivo placa (VWR)
- Multiskan FC (Thermo Scientific)

Procedimiento

Se utilizó el sobrenadante (10X) del medio de crecimiento (17 y 24 h) de las bacterias probióticas para la evaluación de su efecto sobre el crecimiento de bacterias enteropatógenas.

Para establecer la concentración del sobrenadante de las bacterias probióticas en el ensayo, se adicionaron los sobrenadantes (10X) en porcentajes crecientes: 0,25%, 0,4%, 0,5%, 1%, 2% y 4%. Estos se utilizaron neutralizados (pH 6,5) y sin neutralizar (~ pH 4,0). Según los resultados preliminares obtenidos se decidió utilizar las concentraciones 1 y 4%, principalmente, debido a que la primera, corresponde a la concentración más baja en donde se observaron efectos de inhibición, mientras que la segunda, se eligió para verificar si se este efecto de inhibición se mantenía a una concentración superior.

Una vez establecidas las concentraciones de sobrenadante a utilizar, se siguió el protocolo de Spinler *et al.*, (2008), con ligeras modificaciones. Brevemente, las bacterias enteropatógenas se cultivaron 17 h en el medio de cultivo *Tryptone Soya Broth* (TS) (Cultimed): posteriormente se inocularon al 5% en medio TS, a los cuales se le añadieron por separado los sobrenadantes de los probióticos (10X) al 1% y 4%, a pH neutro (6,5) y a pH ácido (~4.0). Estas diferentes mezclas se trasladaron a una placa de 96 pocillos (Nunc) y se colocó sobre la placa un film adhesivo (VWR) para evitar

posibles contaminaciones entre pocillos. La placa se mantuvo durante 17 h en un lector de placas multipocillos (Multiskan FC Thermo Scientific) en condiciones de temperatura constante a 37 °C y agitación continua (300-600 rpm). La DO se midió a 620 nm en intervalos de una hora. Como control negativo se utilizó el medio de cultivo TS y como referencia las curvas de crecimiento de las distintas bacterias patógenas en ausencia del sobrenadante probiótico. Cada experimento se realizó por cuadruplicado para poder efectuar un análisis estadístico de los datos obtenidos (figura 8). Para determinar el porcentaje de inhibición se determinó el área bajo la curva mediante el método de los trapezoides.

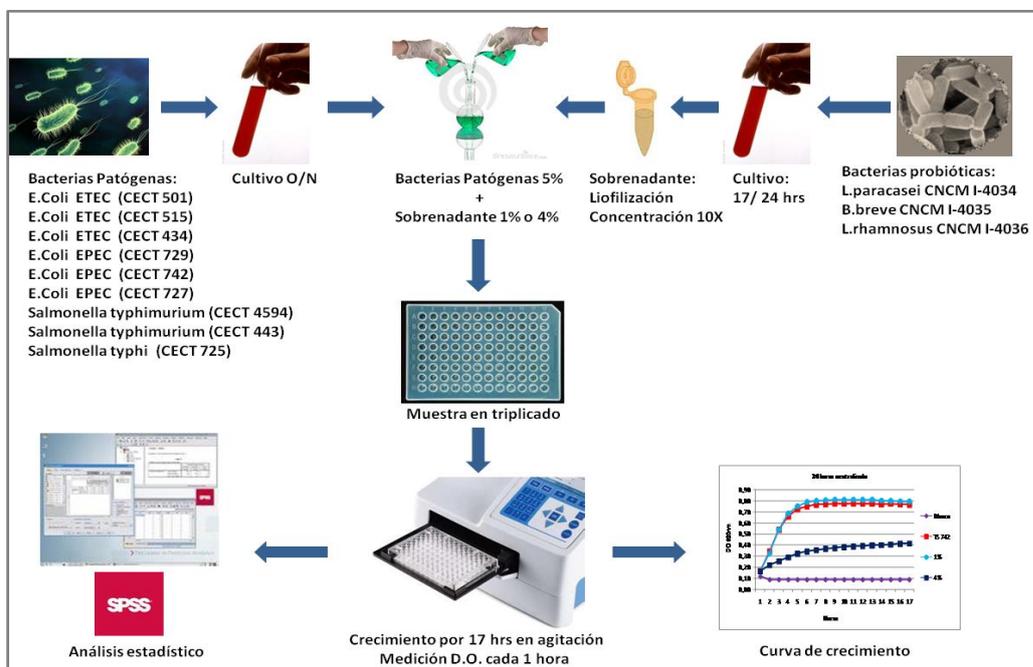


Figura 8. Resumen de procedimiento experimental para determinar los efectos de los sobrenadantes de bacterias probióticas sobre el crecimiento de enterobacterias patógenas.

EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS SOBRENADANTES DE LOS PROBIÓTICOS Y DE ESTOS MICROORGANISMOS SOBRE LA ADHESIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS A CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES

Material

- Tampón fosfato PBS (Sigma-Aldrich).
- Células Caco-2 (CIC UGR).
- DMEM (Sigma-Aldrich)
- Sobrenadantes (10X) de 17 y 24h de crecimiento de las bacterias *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036 (Biopolis S.L.)
- kit NucleoSpin Tissue (Macherey-Nagel)
- Oligonucleótidos (Bif164, Bif 662, Bact 0011f, Lab-0677r, S18, S19, ECO-1, ECO-2) (Sigma-Aldrich).
- Abi 7900 HT- *Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems)
- *Sybr Green I* (Applied Biosystems)

Procedimiento

Para realizar esta prueba se utilizó el método descrito por Jankowska et al. (2008), con ligeras modificaciones. Brevemente, se cultivaron las bacterias patógenas en aerobiosis durante 18 h. Se centrifugaron a 5000 g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de PBS estéril. Se determinó la DO de cada bacteria a 620 nm y se diluyeron en medio DMEM (sin suero bovino fetal ni antibióticos) a una concentración de $1-2 \times 10^8$ UFC/ml. Se eliminó el medio de cultivo de las células Caco-2 y se lavó varias veces con PBS estéril para eliminar los restos de suero fetal y antibióticos. Se añadió 300 μ l de la suspensión bacteriana preparada anteriormente. Se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas. En otros pocillos, se añadió el sobrenadante de la bacteria probiótica (1% y 4%) o la bacteria probiótica en la misma concentración que la bacteria enteropatógena, junto con la bacteria patógena seleccionada, además, de sus respectivos controles. Tras 4 horas de incubación, se eliminó el medio y las células se lavaron con PBS. Posteriormente, se agregó 150 μ l de tripsina y se incubó durante 5-10 minutos a 37 °C. Se recogió toda la superficie celular en un vial y se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos. Con el precipitado se siguió el

protocolo de extracción de DNA del kit NucleoSpin Tissue, de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Evaluación de la adhesión mediante PCR cuantitativa

Los oligonucleótidos utilizados para la cuantificación mediante PCR de las especies o géneros bacterianos: *Escherichia coli*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* (Candela *et al.*, 2008) y *Salmonella* (Malorny *et al.*, 2003) están resumidos en la tabla 9.

Tabla 9. Resumen de los oligonucleótidos seleccionados.

Primer	Secuencia	Género	T° Anillamiento
Bif 164	5'-CATCCGGCATTACCACCC-3'	<i>Bifidobacterium</i>	60 °C
Bif 662	5'-CCACCGTTACACCGGGAA-3'		
Bact 0011f	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3'	<i>Lactobacillus</i>	63 °C
Lab-0677r	5'-CACCGCTACACATGGAG-3'		
S18	5'-ACCGCTAACGCTCGCCTGTAT-3'	<i>Salmonella</i>	58 °C
S19	5'-AGAGGTGGACGGGTTGCTGCCGTT-3'		
ECO-1	5'-GACCTCGGTTTAGTTCACAGA-3'	<i>Escherichia</i>	60 °C
ECO-2	5'-CACACGCTGACGCTGACCA-3'		

Se comprobó que los oligonucleótidos anillan con su género y no con los otros grupos de estudio, a través de una PCR convencional.

Posteriormente, se realizó la PCR cuantitativa para evaluar los efectos de los sobrenadantes de los probióticos o de los probióticos sobre la adhesión de las bacterias enteropatógenas a las células epiteliales intestinales Caco-2. Se utilizó el equipo *Abi 7900 HT- Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems), y como fluoróforo se usó *Sybr Green I* (Applied Biosystems) para correlacionar la cantidad de los productos de PCR con una señal de fluorescencia. Los resultados se expresan en nanogramos de DNA de cada bacteria patógena, obtenidos a través de una curva patrón (figura 9). Posteriormente se expresan en porcentaje con respecto a la cantidad de DNA obtenida para cada bacteria enteropatógena individual (100%), y se comparo con los valores obtenidos cuando fueron expuestas frente a un sobrenadante o bacteria probiótica.

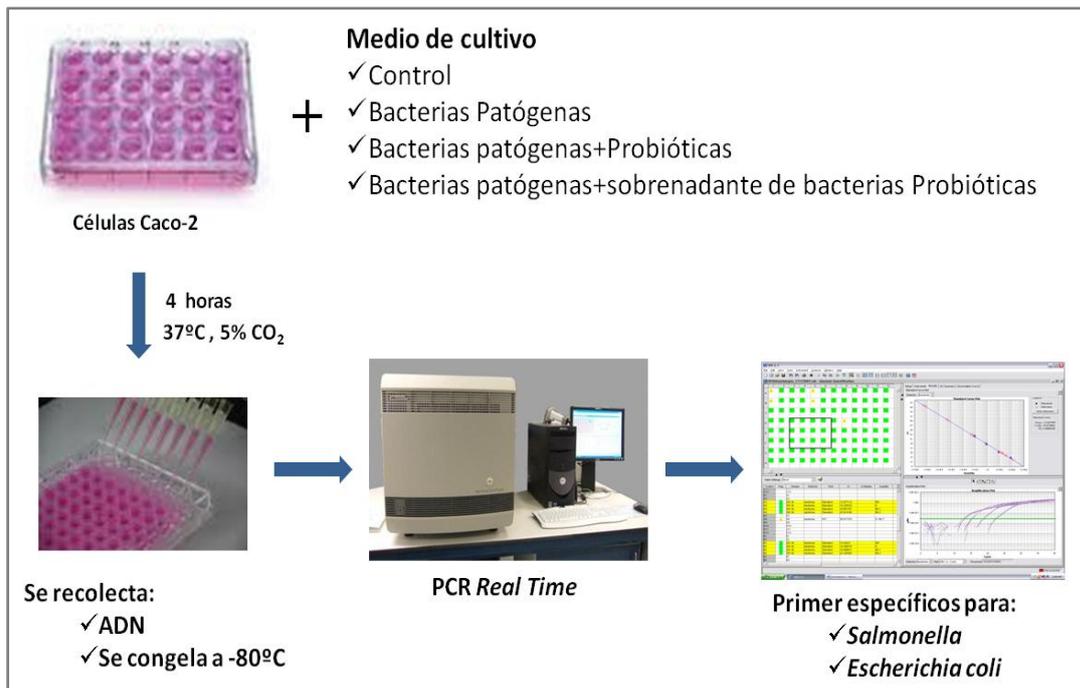


Figura 9. Resumen del procedimiento experimental de la evaluación de la adhesión mediante PCR cuantitativa.

El programa de PCR utilizado fue el siguiente: (i) preincubación de 95 °C durante 10 minutos; (ii) amplificación de 40 ciclos en 4 pasos: desnaturalización a 95 °C durante 15 segundos, anillamiento durante 25 segundos a la temperatura adecuada para cada grupo bacteriano (*E.coli* 60 °C, *Lactobacillus* 63 °C, *Bifidobacterium* 60 °C y *Salmonella* 58 °C), extensión a 72 °C durante 30 segundos; (iii) extensión adicional a 72 °C durante 10 minutos; (iv) curva de disociación. La mezcla de reacción incluye 1 µl de la muestra, 1 µl de cada *primer* (Sigma) y 12,5 µl de DNA-Master Sybr Green I (Applied Biosystem), en un volumen final de 25 µl (Candela *et al.*, 2008). Se estudió la eficiencia de cada pareja de oligonucleótidos.

DETERMINACIÓN DE LOS EFECTOS DE LOS PROBIÓTICOS SOBRE LA PRODUCCIÓN DE IL-8 Y TNF- α POR LAS CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES CACO-2

Material

- *E.coli* enterotoxigénica (ETEC)
 - ✓ CECT 501
 - ✓ CECT 515
- *E.coli* enteropatógena (EPEC)
 - ✓ CECT 729
 - ✓ CECT 742
- *Salmonella typhimurium*
 - ✓ CECT 443
 - ✓ CECT 4594
- *Salmonella typhi*
 - ✓ CECT 725
- Células Caco-2 (CIC UGR).
- DMEM (Sigma-Aldrich)
- Bacterias *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036 (Biopolis S.L.)
- Kit MILLIPLEXTM_{MAP} *High Sensitivity Human Cytokine* (Millipore)
- Luminex 200TM v2.3 y software *Luminex Xponent*. (Luminex)

Procedimiento

Para realizar esta prueba se utilizó el método descrito por Jankowska *et al.*, (2008), con ligeras modificaciones. Brevemente, se cultivaron las bacterias patógenas en aerobiosis durante 18 h. Se centrifugaron a 5000 g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 1 ml de PBS estéril. Se determinó la DO de cada bacteria a 620 nm y se diluyó en medio DMEM (sin suero bovino fetal ni antibióticos) a una concentración de $1-2 \times 10^7$ UFC/ml de bacteria enteropatógena y $1-2 \times 10^8$ UFC/ml, de bacteria probiótica, utilizando una relación patógena/probiótica de 1/10. Se eliminó el medio de cultivo de las células Caco-2 y se lavó varias veces con PBS estéril para eliminar los restos de suero fetal y antibióticos. Se añadió 300 μ l de la suspensión

bacteriana con cada bacteria de forma individual, co-incubaciones de probiótico/patógena y controles solo con DMEM. Se incubó a 37°C y 5% de CO₂ durante 4 horas después de las cuales, se recolectó el medio, se centrifugó a 5000 g durante 10 minutos y se congeló a -80°C hasta la determinación de las citoquinas producidas mediante Tecnología Luminex® xMAP® Corporation.

Se descongelan las muestras y se determinan las citoquinas IL-8 y TNF- α presentes en estos sobrenadantes siguiendo el protocolo correspondiente al Kit MILLIPLEX™_{MAP} *High Sensitivity Human Cytokine 96 Well Plate Assay* de Millipore. Según instrucciones del fabricante. Finalmente se procedió al análisis en el equipo Luminex 200™ v2.3 y software *Luminex Xponent*.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los valores del análisis la comparación de los efectos de los sobrenadantes de las bacterias probióticas de estudio sobre el crecimiento de las bacterias patógenas con respecto al tiempo y a los tratamientos (concentración 1% y 4%), se expresan como media de cuatro experimentos independientes, considerando como valor individual de cada experimento la media de cuatro réplicas. Los valores se analizaron mediante un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas, utilizando el programa estadístico SPSS 15.0. Se realizaron pruebas inter-sujetos (efecto del tratamiento comparando el control frente al sobrenadante) y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*, que ajusta el nivel de significación en relación al número de pruebas estadísticas realizadas sobre un conjunto de datos.

La comparación de los efectos de las cepas probióticas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 sobre la adhesión de las bacterias patógenas a células Caco-2, se llevó a cabo utilizando un modelo ANOVA de un factor.

Para comparar la producción de IL-8 y TNF- α , por las células Caco-2, los resultados se expresaron en porcentaje con respecto a la cantidad producida por el estímulo de las bacterias enteropatógenas; para la comparación de los porcentajes se aplicó un modelo lineal general de medidas repetidas, una vez transformados los porcentajes en una variable que se distribuye normalmente ($\arcsin \arcsin \sqrt{x}$)

Resultados

RESULTADOS

RESULTADOS

Se procesaron 12 muestras de heces de niños alimentados exclusivamente al pecho, las cuales fueron incubadas en los diferentes medios de cultivos señalados en la sección anterior y, se seleccionaron 4680 colonias que fueron sometidas a las pruebas posteriores. Tras el primer ensayo de resistencia a pH 3,0 y en presencia de sales biliares, se seleccionaron 758 colonias que presentaron una viabilidad del 90% o superior. Tras las pruebas de adhesión a las células epiteliales intestinales quedaron sólo 42 colonias. De estas 29 cepas bacterianas fueron aisladas del medio de Beerens, 13 del medio de Rogosa y 10 del medio Columbia modificado. Dado el número de colonias seleccionadas, se procedió directamente a su identificación molecular mediante amplificación del gen 16S rRNA de cada colonia, para su posterior secuenciación y búsqueda de homología en la base de datos del NCBI (BLAST) (Figura 10).

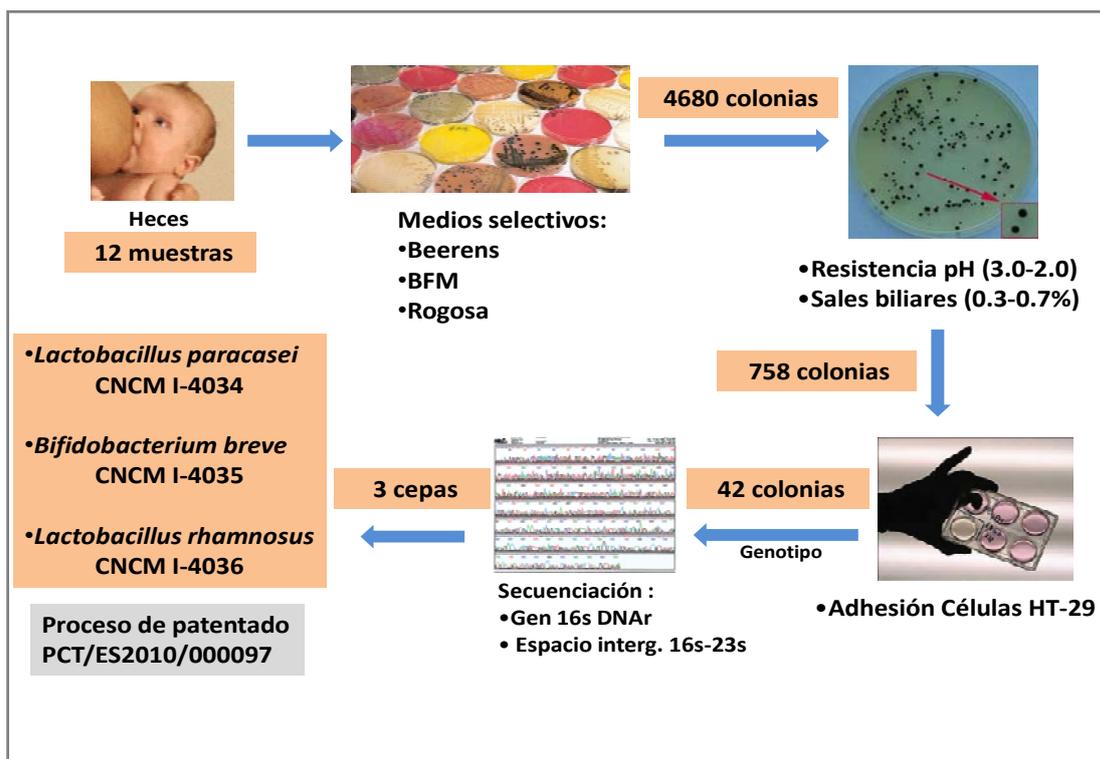


Figura 10. Resumen del proceso de selección de bacterias probióticas procedentes de heces de lactantes alimentados al pecho. Se indica el número de colonias seleccionadas tras cada ensayo, hasta llegar al aislamiento de las 3 cepas finales.

Las cepas clasificadas como lactobacilos se secuenciaron y estas secuencias fueron alineadas entre ellas para saber si existían bacterias que presentaran el mismo gen 16s DNAr, y se encontró que las 41 bacterias se podrían separar en 2 grupos:

Un grupo que presentó una homología del 99% del gen 16s DNAr de un fragmento de 1474 bp con:

Lactobacillus rhamnosus strain R-11

Lactobacillus rhamnosus strain La

Lactobacillus rhamnosus, strain: MNFLM01

Lactobacillus rhamnosus strain IDCC 3201

Lactobacillus Lactobacillus rhamnosus rhamnosus strain: YIT 0105 (= ATCC 7469)

Con estos resultados, se seleccionó una bacteria con los mejores valores de las pruebas de resistencia del grupo y se le denominó de forma transitoria *Lactobacillus rhamnosus* 22A.

El otro grupo que presentó una homología del 100% del gen 16s DNAr de un fragmento de 1276 bp con:

Lactobacillus paracasei, strain: T11-9

Lactobacillus paracasei, strain: T7-10

Lactobacillus casei strain KLDS 1.0720

Lactobacillus casei strain L5

Lactobacillus casei, strain: YIT 0209 (= NCDO 151)

Lactobacillus casei, strain: YIT 0180 (= ATCC 334)

Lactobacillus paracasei strain IMPC 2.1

Lactobacillus paracasei, strain: NRIC 1944

Lactobacillus paracasei, strain: NRIC 1942

Lactobacillus paracasei, strain: NRIC 1938

Lactobacillus paracasei, strain: NRIC 1934

Lactobacillus paracasei, strain: NRIC 0638

Lactobacillus casei ATCC 334

Lactobacillus paracasei strain DJ1

Lactobacillus casei strain Ru2-2i

Lactobacillus paracasei isolate 3C

Lactobacillus paracasei isolate 2C

Lactobacillus casei strain MCRF-284

Lactobacillus sp. L02

Lactobacillus paracasei, strain SM20

Lactobacillus casei strain BL23

Lactobacillus paracasei subsp. *paracasei*

Lactobacillus paracasei subsp. *tolerans*

Con estos resultados, se seleccionó una bacteria con los mejores valores de las pruebas de resistencia de este segundo grupo y se denominó transitoriamente *Lactobacillus paracasei* HERO 7.

Posteriormente, se efectuó el mismo procedimiento con el grupo de las bifidobacterias, encontrándose un solo grupo. Este grupo de bifidobacterias presentó una homología del 100% del gen 16s DNAr de un fragmento de 1136 bp con:

Uncultured bacterium clone rRNA235

Bifidobacterium breve, strain: ATCC 15700

Con estos resultados, se seleccionó una bacteria del grupo de bifidobacteria y se llamó de forma transitoria *Bifidobacterium breve* HERO 15B.

Es necesario señalar que numerosas colonias que crecieron en el medio descrito para bifidobacterias pertenecían al grupo lactobacilos.

Las bacterias denominadas inicialmente como:

Lactobacillus rhamnosus HERO 22A, *Lactobacillus paracasei* HERO 7 y *Bifidobacterium breve* 15B fueron enviadas al *Institut Pasteur* para su depósito, y se les asignó la siguiente denominación final (anexo I):

<u>Denominación inicial</u>	<u>Denominación final</u>
<i>Lactobacillus paracasei</i> HERO 7	CNCM I-4034
<i>Bifidobacterium breve</i> HERO 15B	CNCM I-4035
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HERO 22A	CNCM I-4036

Por otra parte, se inició el proceso de patentado de estas tres bacterias aisladas PCT/ES2010/000097 (anexo II).

En las tablas 10 a 16, se presentan los resultados de viabilidad de los estudios de resistencia a pH, sales biliares y adhesión a celular epiteliales intestinales de las cepas aisladas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4036 y sus respectivos controles comerciales (*L.casei* inmunitas de Danone®, *L.rhamnosus* GG de Kaiku®, *Bifidobacterium bifidum* BB536, *Bifidobacterium longum* Rosell-71)

Tabla 10. Resultado de la resistencia a pH 3,0; 2,5 y 2,0 de las cepas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y controles comerciales (*L.casei* inmunitas de Danone® y *L.rhamnosus* GG de Kaiku®) (UFC/ml).

Muestra	Control	pH 3,0	%*	pH 2,5	%*	pH 2,0	%*
<i>Lactobacillus GG</i>	6.97 x10 ⁷	7.40 x10 ⁷	106.2	0	0	0	0
<i>Lactobacillus casei</i>	7.53 x10 ⁷	7.30 x10 ⁷	96.9	0	0	0	0
<i>L.paracasei</i> CNCM I-4034	5.33 x10 ⁷	5.99 x10 ⁷	112.4	0	0	0	0
<i>L.rhamnosus</i> CNCM I-4036	7.74 x10 ⁷	7.88 x10 ⁷	101.8	6.30 x10 ⁷	81.4	5.90 x10 ⁷	76.2

*Resultados en % de viabilidad.

Tabla 11. Resultado de la resistencia a concentraciones de 0,3%, 0,5% y 0,7% de sales biliares (Oxgall) de las cepas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y controles comerciales (*L.casei immunitas* de Danone® y *L.rhamnosus GG* de Kaiku®) (UFC/ml).

Muestra	Control	0,3%	%*	0,5%	%*	0,7%	%*
<i>Lactobacillus GG</i>	6.97 x10 ⁷	4.03 x10 ⁷	57.8	7.61 x10 ⁷	231.8	7.13 x10 ⁷	76.1
<i>Lactobacillus casei</i>	7.53 x10 ⁷	3.08 x10 ⁷	40.9	8.11 x10 ⁷	141.6	8.00 x10 ⁷	110.6
<i>L.paracasei</i> CNCM I-4034	1.16 x10 ⁷	1.33 x10 ⁷	114.7	1.23 x10 ⁷	106.0	1.79 x10 ⁷	154.3
<i>L.rhamnosus</i> CNCM I-4036	7.44 x10 ⁷	7.55 x10 ⁷	101.5	7.82 x10 ⁷	105.1	7.81 x10 ⁷	105.0

*Resultados en % de viabilidad.

Tabla 12. Resultado de la adhesión a células HT 29 de las cepas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y controles comerciales (*L.casei immunitas* de Danone® y *L.rhamnosus GG* de Kaiku®) (UFC/ml).

Muestra	Control	Células adheridas	%*
<i>Lactobacillus GG</i>	1.98 x10 ⁸	9.50 x10 ⁶	4.80
<i>Lactobacillus casei</i>	3.25 x10 ⁹	1.33 x10 ⁸	4.09
<i>L.paracasei</i> CNCM I-4034	1.05 x10 ⁸	7.87 x10 ⁶	7.48
<i>L.rhamnosus</i> CNCM I-4036	5.68 x10 ⁸	6.56 x10 ⁷	11.55

*Resultados en % de viabilidad.

Las bacterias probióticas aisladas del género *Lactobacillus* presentaron una viabilidad a pH 3,0 cercana al 100%, similar a la de los controles utilizados. Sin embargo, a pH 2,5 y 2,0, solo la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 presentó una viabilidad de alrededor del 75% (Tabla 10). Frente a las sales biliares los lactobacilos aislados mostraron una viabilidad superior a 100% en todas las concentraciones de sales biliares utilizadas (0,3, 0,5 y 0,7%). Además, presentaron valores de viabilidad mayores que sus controles a concentración 0,3% (Tabla 11).

Resultados

Los resultados de la capacidad de adhesión se resumen en la tabla 12. En ella se puede observar que los porcentajes de adhesión de las bacterias controles a las células epiteliales HT-29 fueron muy similar entre ellas (4%), mientras que las bacterias probióticas ensayadas en el presente estudio mostraron valores muy superiores, 7,5% para *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 y 11,6% para *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (Tabla 12).

Tabla 13. Resultado de la resistencia a diferentes pH de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y controles comerciales (*Bifidobacterium bifidum* BB536, *Bifidobacterium longum* Rosell-71) (UFC/ml).

Muestra	control	pH 3,0	%*	pH 2,5	%*	pH 2,0	%*
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB536	1.04 x10 ⁸	5.80 x10 ⁷	55.6	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium longum</i> Rosell-71	9.62 x10 ⁷	1.01 x10 ⁸	104.8	0	0	0	0
<i>Bifidobacterium breve</i> CNCM I-4035	5.33 x10 ⁷	5.99 x10 ⁷	139.6	0	0	0	0

*Resultados en % de viabilidad.

Tabla 14. Resultado de la resistencia a sales biliares (Oxgall) a diferentes concentraciones de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y controles comerciales (*Bifidobacterium bifidum* BB536, *Bifidobacterium longum* Rosell-71) (UFC/ml).

Muestra	Control	0,3%	%	0,5%	%	0,7%	%
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB536	7.57 x10 ⁷	7.54 x10 ⁷	99.6	6.70 x10 ⁷	88.5	7.00 x10 ⁷	92.5
<i>Bifidobacterium longum</i> Rosell-71	7.51 x10 ⁷	7.54 x10 ⁷	100.4	7.20 x10 ⁷	95.9	6.90 x10 ⁷	91.9
<i>Bifidobacterium breve</i> CNCM I-4035	6.10 x10 ⁷	5.30 x10 ⁷	86.9	6.00 x10 ⁷	98.4	7.50 x10 ⁷	123

*Resultados en % de viabilidad.

Tabla 15. Resultado de la adhesión a células HT 29 de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y controles comerciales (*Bifidobacterium bifidum* BB536, *Bifidobacterium longum* Rosell-71) (UFC/ml).

Muestra	Control	Células adheridas	%*
<i>Bifidobacterium bifidum</i> BB536	7.80 x10 ⁶	6.90 x10 ⁵	8.8
<i>Bifidobacterium longum</i> Rosell-71	1.10 x10 ³	1.00 x10 ²	9.1
<i>Bifidobacterium breve</i> CNCM I-4035	6.00 x10 ²	1.00 x10 ²	16.7

*Resultados en % de viabilidad.

La cepa aislada *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 presentó una viabilidad a pH 3,0 de 140%, valor muy superior a los que mostraron los controles utilizados (56 y 105%). Sin embargo, a pH 2,5 y 2,0 ninguna de las bacterias fue viable (Tabla 13). Frente a las sales biliares, esta bifidobacteria mostró una viabilidad cercana a 100% en todas las concentraciones utilizadas (0,3, 0,5 y 0,7%) y presentó valores mayores de viabilidad que sus controles a concentración 0,5 y 0,7% (Tabla 14).

Los resultados de la capacidad de adhesión de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 se resumen en la tabla 15, en donde se puede observar que los porcentajes de adhesión de las bacterias controles a células epiteliales HT-29 fueron muy similares entre ellas (9%); a su vez, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 mostró un porcentaje de adhesión (17%) casi dos veces mayor que sus controles (Tabla 15).

EVALUACIÓN DE LA FERMENTACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO Y DE DIVERSAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS POR LOS PROBIÓTICOS IDENTIFICADOS

En las tablas 16, 17 y 18 se observan los resultados de fermentación de hidratos de carbono (API ZYM) y de actividades enzimáticas (API 50 CHL) de las diferentes cepas seleccionadas con sus respectivos controles comerciales, los resultados fueron expresados como se describió en material y métodos.

En la tabla 16, se puede observar que los resultados de las actividades enzimáticas de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 fueron muy similares al perfil que presenta el control *Bifidobacterium longum* Rosell-71. En cuanto a los controles, ellos presentaron diferencias entre sí, *Bifidobacterium bifidum* BB536 mostró actividad para una mayor cantidad de enzimas que *Bifidobacterium longum* Rosell-71. Sin embargo, todas las cepas presentaron una alta actividad para α -glucosidasa, α -galactosidasa y β -galactosidasa. La única actividad enzimática ausente en la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, y que presentan ambos controles, es para N-acetil- β -glucosaminidasa.

Tabla 16. Resultados de actividades enzimáticas (API ZYM) de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y controles (*Bifidobacterium bifidum* BB536, *Bifidobacterium longum* Rosell-71).

	ENZIMA	<i>B.bifidum</i>	<i>B.longum</i>	CNCM I-4035
1	Control	0	0	0
2	Fosfatasa alcalina	2	0	0
3	Esterasa(C4)	2	2	1
4	Esterasa lipasa (C8)	3	2	1
5	Lipasa (C14)	1	1	1
6	Leucina arilamidasa	5	2	3
7	Valina arilamidasa	1	0	0
8	Cistina arilamidasa	4	0	0
9	Tripsina	0	0	0
10	α -quimotripsina	0	0	0
11	Fosfatasa ácida	3	1	1
12	Naftol-AS-BI-fosfosfohidrolasa	2	1	2
13	α -galactosidasa	5	5	5
14	β -galactosidasa	5	5	5
15	β -glucuronidasa	0	0	0
16	α -glucosidasa	5	5	5
17	β -glucosidasa	1	1	2
18	N-acetil- β -glucosaminidasa	5	2	0
19	α -manosidasa	0	0	0
20	α -fucosidasa	0	0	0

Intensidad de color: 0, sin actividad; 1-4 actividad intermedia; y 5 máxima actividad.

La tabla 17 muestra los resultados de las actividades enzimáticas de las bacterias probióticas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y sus respectivos controles. La actividad enzimática de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 fue muy similar a la que presenta el control *L.rhamnosus* GG. Así mismo,

la bacteria *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 presentó actividad para las mismas enzimas que el control *Lactobacillus casei*. Sin embargo, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 es la única bacteria que presentó actividad para α -quimotripsina y β -glucuronidasa.

Tabla 17. Resultados de actividades enzimáticas (API ZYM) de la cepas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y controles (*L.casei* inmunitas de Danone® y *L.rhamnosus* GG de Kaiku®).

	ENZIMA	<i>L.GG</i>	<i>L.casei</i>	<i>L.paracasei</i> CNCM I-4034	<i>L.rhamnosus</i> CNCM I-4036
1	Control	0	0	0	0
2	Fosfatasa alcalina	5	1	3	5
3	Esterasa(C4)	3	1	4	5
4	Esterasa lipasa (C8)	4	5	4	5
5	Lipasa (C14)	0	0	0	0
6	Leucina arilamidasa	3	4	5	4
7	Valina arilamidasa	5	5	5	5
8	Cistina arilamidasa	1	1	1	1
9	Tripsina	0	0	0	0
10	α -quimotripsina	0	0	0	1
11	Fosfatasa ácida	5	4	4	5
12	Naftol-AS-BI-fosfosfohidrolasa	5	3	2	5
13	α -galactosidasa	2	0	0	4
14	β -galactosidasa	5	3	4	5
15	β -glucuronidasa	0	0	0	1
16	α -glucosidasa	2	5	5	2
17	β -glucosidasa	2	0	0	3
18	N-acétil- β -glucosaminidasa	0	0	0	0
19	α -manosidasa	0	0	0	0
20	α -fucosidasa	5	0	0	5

Intensidad de color: 0, sin actividad;1-4 actividad intermedia; y 5 máxima actividad.

En la tabla 18 se puede observar los resultados de la fermentación de hidratos de carbono de las bacterias probióticas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y sus controles. El perfil de fermentación fue similar entre los lactobacilos; sin embargo, cabe destacar algunas diferencias. Ambas cepas probióticas presentaron la capacidad de fermentar L-rhamnosa, no así sus controles. Además, la cepa *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 presentó la capacidad de

fermentar la mayor cantidad de hidratos de carbono (29) y fue la única capaz de fermentar inulina. Sin embargo, ambas cepas probióticas no presentaron la capacidad de fermentar L-fucosa, capacidad que si mostraron sus controles.

Tabla 18. Resultados de fermentación de hidratos de carbono (API 50 CHL) de las cepas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y controles comerciales (*L.casei* *immunitas* de Danone® y *L.rhamnosus* GG de Kaiku®).

	HIDRATOS DE CARBONO	<i>L.GG</i>	<i>L.casei</i>	<i>L.paracasei</i> CNCM I-4034	<i>L.rhamnosus</i> CNCM I-4036
0	Testigo	-	-	-	-
1	Glicerol	-	-	-	-
2	Eritritol	-	-	-	-
3	D-Arabinosa	V	-	-	-
4	L-Arabinosa	-	-	-	-
5	D-Ribosa	V	+	+	+
6	D-Xilosa	-	-	-	-
7	L-Xilosa	-	-	-	-
8	D-Adonitol	-	+	V	-
9	Metil-βD-Xilopiranosido	-	-	-	-
10	D-galactosa	+	+	+	+
11	D-Glucosa	+	+	+	+
12	D-Fructosa	+	+	+	+
13	D-Manosa	+	+	+	+
14	L-Sorbosa	-	+	+	+
15	L-Rhamnosa	-	-	+	+
16	Dulcitol	+	V	+	-
17	Inositol	-	-	-	-
18	D-Manitol	+	+	+	+
19	D-Sorbitol	+	+	+	+
20	Metil-αD-Manopiranosido	-	-	-	-
21	Metil-αD-Glucopiranosido	-	V	V	V
22	N-Acetilglucosamina	+	+	+	+
23	Amigdalina	+	V	V	+
24	Arbutina	+	+	+	+
25	Esculina citrato férrico	+	+	+	+
26	Salicina	+	+	+	+
27	D-Celobiosa	+	+	+	+
28	D-Maltosa	-	+	V	V
29	D-Lactosa (or. bovino)	-	+	+	+
30	D-Meliobiosa	-	-	-	-
31	D-Sacarosa	V	V	+	-
32	D-Trehalosa	+	+	+	+

33	Inulina	-	-	+	-
34	D-Melezitosa	+	-	+	+
35	D-Rafinosa	-	-	-	-
36	Almidón	-	-	-	-
37	Glucógeno	-	-	-	-
38	Xilitol	-	-	-	-
39	Gentiobiosa	+	V	V	V
40	D-Turanosa	-	+	+	+
41	D-Lixosa	-	V	V	-
42	D-Tagatosa	+	+	+	+
43	D-Fucosa	-	-	-	-
44	L-Fucosa	+	V	-	-
45	D-Arabitól	-	-	-	-
46	L-Arabitól	-	-	-	-
47	Gluconato potásico	V	V	V	V
48	2-Cetogluconato potásico	-	-	-	-
49	5-Cetogluconato potásico	-	-	-	-

Intensidad de color: positivo (+), negativo (-), e intermedio (V).

AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS INTERGÉNICOS 16S-23S

Se amplificaron los segmentos intergénicos de las cepas seleccionadas, se secuenciaron y se efectuó la búsqueda de homología en la base de datos del NCBI (BLAST), lo cual generó los siguientes resultados:

***Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036**

Presenta una homología del 100%, de un fragmento de 579 bp con:

Lactobacillus rhamnosus isolate TS1

Lactobacillus rhamnosus isolate PS1 16S

***Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034**

Presenta una homología del 100%, de un fragmento de 512 bp con:

Lactobacillus casei ATCC 334

***Bifidobacterium breve* CNCM I-4035**

Presenta una homología del 99% del espacio intergénico 16s-23s, de un fragmento de 182 bp con:

Bifidobacterium breve (ITS), strain Y8

Bifidobacterium longum (ITS), strain Y10

ALINEAMIENTO DE SECCIONES SECUENCIADAS

Se utilizó la herramienta *on-line* del programa Clustalw (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>), el cual utilizamos para alinear las secciones secuenciadas de las cepas seleccionadas y los controles.

Alineamiento global de las secuencias del gen 16S DNAr de las cepas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, controles (*L.casei* inmunitas de Danone® y *L.rhamnosus* GG de Kaiku®) y una cepa de *L.paracasei*.

LGG	AGAGTTTGATCATGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAAC	60
L.CASEI	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAAC	60
CNCM I-4036	-----CTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAAC	31
L.paracasei	-----GATGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAAC	40
CNCM I-4034	-----	
LGG	GAGTTCGTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTAAATTTGAAACGAGTGGCGGACGG	120
L.CASEI	GAGTTCGTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTAAATTTGAAACGAGTGGCGGACGG	120
CNCM I-4036	GAGTTCGTGATTATTGAAAGGTGCTTGCATCTTGATTAAATTTGAAACGAGTGGCGGACGG	91
L.paracasei	GAGTTCGTGATTGATGATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGG	100
CNCM I-4034	-----	
LGG	GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTA	180
L.CASEI	GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTA	180
CNCM I-4036	GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTA	151
L.paracasei	GTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTA	160
CNCM I-4034	-----TAACACGTGGGTAACCTGCCCTTAAGTGGGGGATAACATTTGGAACAGATGCTA	55

LGG	ATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCT	240
L.CASEI	ATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCT	240
CNCM I-4036	ATACCGCATAAATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCT	211
L.paracasei	ATACCGCATAAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCT	220
CNCM I-4034	ATACCGCATAAGATCCAAGAACCGCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCT	115

LGG	TTTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCAAGGCAATGA	300
L.CASEI	TTTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCAAGGCAATGA	300
CNCM I-4036	TTTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCAAGGCAATGA	271
L.paracasei	TTTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCAAGGCAATGA	280
CNCM I-4034	TTTGGATGGACCCGCGCGTATTAGCTAGTTGGTGAAGTAAACGGCTCACCAAGGCAATGA	175

LGG	TACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCC	360
L.CASEI	TACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCC	360
CNCM I-4036	TACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCC	331
L.paracasei	TACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCC	340
CNCM I-4034	TACGTAGCCGAAGTGAAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAAACTCC	235

LGG	TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCG	420
L.CASEI	TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCG	420
CNCM I-4036	TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCG	391
L.paracasei	TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCG	400
CNCM I-4034	TACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCG	295

LGG	CGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAG	480
L.CASEI	CGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAG	480
CNCM I-4036	CGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAG	451
L.paracasei	CGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAG	460
CNCM I-4034	CGTGAGTGAAGAAGGCTTTTCGGGTCGTAAAACCTCTGTTGTTGGAGAAGAATGGTCGGCAG	355

LGG	AGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC	540
L.CASEI	AGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC	540
CNCM I-4036	AGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC	511
L.paracasei	AGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC	520
CNCM I-4034	AGTAACTGTTGTCGGCGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGC	415

LGG	AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC	600
L.CASEI	AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC	600
CNCM I-4036	AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC	571
L.paracasei	AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC	580
CNCM I-4034	AGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGCGTAAAGCGAGCGC	475

LGG	AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAAA	660
L.CASEI	AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAAA	660
CNCM I-4036	AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAAA	631
L.paracasei	AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAAA	640
CNCM I-4034	AGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGTGCATCGGAAA	535

LGG	CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA	720
L.CASEI	CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA	720
CNCM I-4036	CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA	691
L.paracasei	CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA	700
CNCM I-4034	CTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTA	595

LGG	GATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC	780
L.CASEI	GATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC	780
CNCM I-4036	GATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC	751
L.paracasei	GATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC	760
CNCM I-4034	GATATATGGAAGAACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGC	655

LGG	TCGAAAGCATGGT TAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGA	840
L.CASEI	TCGAAAGCATGGT TAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGA	838
CNCM I-4036	TCGAAAGCATGGT TAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGA	811
L.paracasei	TCGAAAGCATGGT TAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGA	820
CNCM I-4034	TCGAAAGCATGGT TAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGA	715

LGG	ATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTT CAGTGCCGACGCTAACGCATTAAGCATTCCG	900
L.CASEI	ATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTT CAGTGCCGACGCTAACGCATTAAGCATTCCG	898
CNCM I-4036	ATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTT CAGTGCCGACGCTAACGCATTAAGCATTCCG	871
L.paracasei	ATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTT CAGTGCCGACGCTAACGCATTAAGCATTCCG	880
CNCM I-4034	ATGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTT CAGTGCCGACGCTAACGCATTAAGCATTCCG	775

LGG	CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG	960
L.CASEI	CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG	958
CNCM I-4036	CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG	931
L.paracasei	CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG	940
CNCM I-4034	CCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAGCG	835

LGG	GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGCTTGACATCTTT	1020
L.CASEI	GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGCTTGACATCTTT	1018
CNCM I-4036	GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGCTTGACATCTTT	991
L.paracasei	GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGCTTGACATCTTT	1000
CNCM I-4034	GTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTACCAGGCTTGACATCTTT	895

LGG	TGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTG	1080
L.CASEI	TGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTG	1078
CNCM I-4036	TGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTG	1051
L.paracasei	TGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTG	1060
CNCM I-4034	TGATCACCTGAGAGATCAGGTTTCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGCATGGTTG	955

Resultados

LGG	TCGTCAGCTCGTGTCTGAGG	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATGAC	1140
L. CASEI	TCGTCAGCTCGTGTCTGAGAT	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATGAC	1138
CNCM I-4036	TCGTCAGCTCGTGTCTGAGAT	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATGAC	1111
L. paracasei	TCGTCAGCTCGTGTCTGAGAT	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATGAC	1120
CNCM I-4034	TCGTCAGCTCGTGTCTGAGAT	TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATGAC	1015
	*****	*****	
LGG	TAGTTGCCAGCATT	TAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG	1200
L. CASEI	TAGTTGCCAGCATT	TAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG	1198
CNCM I-4036	TAGTTGCCAGCATT	TAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG	1171
L. paracasei	TAGTTGCCAGCATT	TAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG	1180
CNCM I-4034	TAGTTGCCAGCATT	TAGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGG	1075
	*****	*****	
LGG	TGGGGATGACGTCAAATCATCATG	CGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG	1260
L. CASEI	TGGGGATGACGTCAAATCATCATG	CGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG	1258
CNCM I-4036	TGGGGATGACGTCAAATCATCATG	CGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG	1231
L. paracasei	TGGGGATGACGTCAAATCATCATG	CGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG	1240
CNCM I-4034	TGGGGATGACGTCAAATCATCATG	CGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGG	1135
	*****	*****	
LGG	ATGGTACAACGAGTTGCGAGAC	CGGAGGTCAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTT	1320
L. CASEI	ATGGTACAACGAGTTGCGAGAC	CGGAGGTCAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTT	1318
CNCM I-4036	ATGGTACAACGAGTTGCGAGAC	CGGAGGTCAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTT	1291
L. paracasei	ATGGTACAACGAGTTGCGAGAC	CGGAGGTCAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTT	1300
CNCM I-4034	ATGGTACAACGAGTTGCGAGAC	CGGAGGTCAGCTAATCTCTTAAAGCCATTCTCAGTT	1195
	*****	*****	
LGG	CGGACTGTAGGCTGCAACTCGC	CTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC	1380
L. CASEI	CGGACTGTAGGCTGCAACTCGC	CTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC	1378
CNCM I-4036	CGGACTGTAGGCTGCAACTCGC	CTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC	1351
L. paracasei	CGGACTGTAGGCTGCAACTCGC	CTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC	1360
CNCM I-4034	CGGACTGTAGGCTGCAACTCGC	CTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGC	1255
	*****	*****	
LGG	ACGCCGCGGTGAATACGTTCC	CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTT	1440
L. CASEI	ACGCCGCGGTGAATACGTTCC	CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTT	1438
CNCM I-4036	ACGCCGCGGTGAATACGTTCC	CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTT	1411
L. paracasei	ACGCCGCGGTGAATACGTTCC	CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTT	1420
CNCM I-4034	ACGCCGCGGTGAATACGTTCC	CGGGCCTTGTACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTT	1276
	*****	*****	
LGG	GTAACACCCGAAGCCGGTGGC	GTAAACCCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGGGACAA	1500
L. CASEI	GTAACACCCGAAGCCGGTGGC	GTAAACCCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGGGACAA	1498
CNCM I-4036	GTAACACCCGAAGCCGGTGGC	GTAAACCCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGGGACAAAN	1471
L. paracasei	GTAACACCCGAAGCCGGTGGC	GTAAACCCTTTTAGGGAGCGAGCCGTCTAAGGTGGGACAA	1480
CNCM I-4034	-----	-----	
LGG	ATGATTAGGGTGAAGTCGTA	ACAAGG-----	1526
L. CASEI	ATGATTAGGGTGAAGTCGTA	ACAAGGTAGCCGTA	1532
CNCM I-4036	ATA-----	-----	1474
L. paracasei	ATGATTAGGGTGAAG-----	-----	1495
CNCM I-4034	-----	-----	

Se observan diferencias entre las secuencias de los controles y las muestra *L.rhamnosus* CNCM I-4036 y *L.paracasei* CNCM I-4034. Así mismo se observa una homología completa entre la muestra *L.paracasei* CNCM I-4034 y una secuencia de *L.paracasei* seleccionada.

Alineamiento global de las secuencias del gen 16S DNAr de la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, controles (*Bifidobacterium bifidum* BB536, *Bifidobacterium longum* Rosell-71) y una cepa de *B.breve*.

CNCM I-4035	-----	
B.breveAY850360.	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTCAACACATGCAAGTCGAAC	60
B.Long	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTCGAAC	60
B.Bifidum	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAAACACATGCAAGTCGAAC	60
CNCM I-4035	-----	
B.breveAY850360.	GGGATCCAGGCAGCTT-GCTGCCTGGTGGAGAGTGGCGAACCGGTGAGTAATGCGTGACCG	119
B.Long	GGGATCCATCAAGCTT-GCTTGGTGGTGGAGAGTGGCGAACCGGTGAGTAATGCGTGACCG	119
B.Bifidum	GGGATCCATCGGGCTTTGCTTGGTGGTGGAGAGTGGCGAACCGGTGAGTAATGCGTGACCG	120
CNCM I-4035	-----CACCGBAATAGTCTCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCA	48
B.breveAY850360.	ACCTGCCCATGCACCCGAATAGTCTCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCA	179
B.Long	ACCTGCCCATGCACCCGAATAGTCTCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCA	179
B.Bifidum	ACCTGCCCATGCTCCGGAATAGTCTCTGGAAACGGGTGGTAATGCCGGATGCTCCA	180
	* ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****	
CNCM I-4035	CACCGCATGGTGTGTGGGAAAGCCTTTG-CGGCATGGGATGGGGTTCGCGTCTATCAGC	107
B.breveAY850360.	CACCGCATGGTGTGTGGGAAAGCCTTTG-CGGCATGGGATGGGGTTCGCGTCTATCAGC	238
B.Long	GATCGCATGGTCTTCTGGGAAAGCTTTG-CGGTATGGGATGGGGTTCGCGTCTATCAGC	238
B.Bifidum	GATCGCATGTGATTGTGGGAAAGATTCTATCGGCCTGGGATGGGGTTCGCGTCTATCAGC	240
	* ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****	
CNCM I-4035	TTGATGGCGGGTAACGGCCACCATGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC	167
B.breveAY850360.	TTGATGGCGGGTAACGGCCACCATGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC	298
B.Long	TTGACGGCGGGTAACGGCCACCCTGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC	298
B.Bifidum	TTGTTGGTGAAGTAACGGCTCACCAAGGCTTCGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGACC	300
	*** * * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****	
CNCM I-4035	GGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT	227
B.breveAY850360.	GGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT	358
B.Long	GGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT	358
B.Bifidum	GGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATT	360

CNCM I-4035	GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCGCGTGAGGGATGGAGGCCCTTCGGGTTG	287
B.breveAY850360.	GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCGCGTGAGGGATGGAGGCCCTTCGGGTTG	418
B.Long	GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCGCGTGAGGGATGGAGGCCCTTCGGGTTG	418
B.Bifidum	GCACAATGGGCGCAAGCCTGATGCAGCGACGCGCGTGAGGGATGGAGGCCCTTCGGGTTG	420

CNCM I-4035	TAAACCTCTTTTGTAGGGAGCAAGGCACCTTTGTGTTGAGTGTACCTTTTCGAATAAGCAC	347
B.breveAY850360.	TAAACCTCTTTTGTAGGGAGCAAGGCACCTTTGTGTTGAGTGTACCTTTTCGAATAAGCAC	478
B.Long	TAAACCTCTTTTATCGGGAGCAAGCGA----GAGTGAGTTTACCCTTGAATAAGCAC	473
B.Bifidum	TAAACCTCTTTTGTGGGAGCAAGCCT---TCGGGTGAGTGTACCTTTTCGAATAAGCGC	477
	***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * ***** * *****	
CNCM I-4035	CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTA	407
B.breveAY850360.	CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTA	538
B.Long	CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTA	533
B.Bifidum	CGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTAGGGTGCAAGCGTTATCCGGAATTA	537

CNCM I-4035	TTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTCGTCGCGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAAC	467
B.breveAY850360.	TTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTCGTCGCGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAAC	598
B.Long	TTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGTTTCGTCGCGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAAC	593
B.Bifidum	TTGGGCGTAAAGGGCTCGTAGGCGGCTCGTCGCGTCCGGTGTGAAAGTCCATCGCTTAAC	597

CNCM I-4035	GGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTTGGTGGTGGTGGGAGACTGGAATTTCCCGG	527
B.breveAY850360.	GGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTTGGTGGTGGTGGGAGACTGGAATTTCCCGG	658
B.Long	GGTGGATCCGCGCCGGGTACGGGCGGGCTTGGTGGTGGTGGGAGACTGGAATTTCCCGG	653
B.Bifidum	GGTGGATCTGCGCCGGGTACGGGCGGGCTGGAGTGGTGGTGGGAGACTGGAATTTCCCGG	657

Resultados

CNCM I-4035	TGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGG	587
B.breveAY850360.	TGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGG	718
B.Long	TGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGAACACCAATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGG	713
B.Bifidum	TGTAACGGTGGAAATGTGTAGATATCGGGAAGAACGCGGATGGCGAAGGCAGGTCTCTGGG	717
***** ** *****		
CNCM I-4035	CCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGG-TA	646
B.breveAY850360.	CCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGG-TA	777
B.Long	CCGTTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGG-TA	773
B.Bifidum	CCGTACTGACGCTGANAGCGAAAGCGTGGGAGCGAACAGGATTAGATACCTGG-TA	776
**** ***** *		
CNCM I-4035	GTCCACGCCGTAACCGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCGTTCACCGGTTCCGTGTCTCGGA	706
B.breveAY850360.	GTCCACGCCGTAACCGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCGTTCACCGGTTCCGTGTCTCGGA	837
B.Long	GTCCACGCCGTAACCGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCGTTCACCGGTTCCGTGTCTCGGA	833
B.Bifidum	GTCCACGCCGTAACCGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCGTTCACCGGTTCCGTGTCTCGGA	836
***** ***** *		
CNCM I-4035	GCTAACGCGTTAAGCATCCCCTGGGAGTACGCGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGAAAT	766
B.breveAY850360.	GCTAACGCGTTAAGCATCCCCTGGGAGTACGCGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGAAAT	897
B.Long	GCTAACGCGTTAAGCATCCCCTGGGAGTACGCGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGAA-T	891
B.Bifidum	GCTAACGCGTTAAGCATCCCCTGGGAGTACGCGCCGAAGGCTAAAACCTCAAAGAAAT	896
***** ***** *		
CNCM I-4035	TGACGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACC	826
B.breveAY850360.	TGACGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACC	957
B.Long	TGACGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACC	950
B.Bifidum	TGACGGGGCCCGCACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTAATTCGATGCAACGCGAAGAACC	956
***** ***** *		
CNCM I-4035	TTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGACGATCCCAGAGATGGGGTTTCCCTTCGGGGCGGGT	886
B.breveAY850360.	TTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGACGATCCCAGAGATGGGGTTTCCCTTCGGGGCGGGT	1017
B.Long	TTAC-TGGGCTTGACATGT-CCCGACG-TCGTAGAGATACGGCTTCCCTTCGGGGCGGGT	1007
B.Bifidum	TTACCTGGGCTTGACATGTTCCCGACGATCCCAGAGATGGGGTTTCCCTTCGGGGCGGGT	1016
**** ***** * *****		
CNCM I-4035	TCACAGGTGGTGCATGTTGCTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA	946
B.breveAY850360.	TCACAGGTGGTGCATGTTGCTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA	1077
B.Long	TCACAGGTGGTGCATGTTGCTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA	1067
B.Bifidum	TCACAGGTGGTGCATGTTGCTGCTCAGCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA	1076
***** *****		
CNCM I-4035	ACGAGCGCAACCCTCGCCCCGTGTTGCCAGCGGATTGTGCCGGAACTCACGGGGACCG	1006
B.breveAY850360.	ACGAGCGCAACCCTCGCCCCGTGTTGCCAGCGGATTATGCCGGAACTCACGGGGACCG	1137
B.Long	ACGAGCGCAACCCTCGCCCCGTGTTGCCAGCGGATTATGCCGGAACTCACGGGGACCG	1127
B.Bifidum	ACGAGCGCAACCCTCGCCCCGTGTTGCCAGC-ACGTTATGTTGGGAACTCACGGGGACCG	1136
***** ***** ** *		
CNCM I-4035	CCGGGGTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCTTACGTCCAG	1066
B.breveAY850360.	CCGGGGTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCTTACGTCCAG	1197
B.Long	CCGGGGTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCTTACGTCCAG	1187
B.Bifidum	CCGGGGTAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGATCATCATGCCCTTACGTCCAG	1196
***** *****		
CNCM I-4035	GGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACAGTGCAGGCTGGAGCGGA	1126
B.breveAY850360.	GGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACAGTGCAGGCTGGAGCGGA	1257
B.Long	GGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACAGTGCAGGCTGGAGCGGA	1247
B.Bifidum	GGCTTCACGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGGGATGCGACAGTGCAGGCTGGAGCGGA	1256
***** ***** *		
CNCM I-4035	TCCCTGAAAACC-----	1138
B.breveAY850360.	TCCCTGAAAACCAGGCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGGCGGAG	1317
B.Long	TCCCTGAAAACCAGGCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGGCGGAG	1307
B.Bifidum	TCCCTGAAAACCAGGCTCAGTTCGGATCGGAGCTGCAACCAGGCTCCTGTAAGGCGGAG	1316

CNCM I-4035	-----	-----
B.breveAY850360.	TCGCTAGTAATCGGAAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGCCTTGTACACAC	1377
B.Long	TCGCTAGTAATCGGAAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGCCTTGTACACAC	1367
B.Bifidum	TCGCTAGTAATCGGAAATCAGCAACGTCGCGGTGAATGCGTTCCCGGCCTTGTACACAC	1376
CNCM I-4035	-----	-----
B.breveAY850360.	CGCCCGTCAAGTCATGAAAGTGGGCAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGA	1437
B.Long	CGCCCGTCAAGTCATGAAAGTGGGCAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGA	1427
B.Bifidum	CGCCCGTCAAGTCATGAAAGTGGGCAGCACCCGAAGCCGGTGGCCTAACCCCTTGTGGGA	1436

Se observa una gran diferencia entre la secuencia de los controles; entre la secuencia de los controles y la muestra *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y solo una base diferente entre *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y una secuencia de *Bifidobacterium breve* seleccionada.

ENSAYO DE LA ACTIVIDAD PROBIÓTICA DE LAS CEPAS DE ESTUDIO EN MEDIO LÍQUIDO FRENTE A ENTEROPATÓGENOS

Las Figuras 11 a la 18 muestran las curvas de crecimiento de bacterias patógenas en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, tras 17 y 24 horas de crecimiento, neutralizado y no neutralizado.

Se observa que el sobrenadante de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 de 17 horas no neutralizado, no afectó el crecimiento de *Salmonella typhimurium* CECT 4594 (Figura 13). Sin embargo, inhibió: en un 29% el crecimiento de *Salmonella typhimurium* CECT 443 cuando se utilizó a una concentración de 4% (Figura 11); en un 23% el crecimiento de *Salmonella typhi* CECT 725 cuando se utilizó a una concentración de 1% y en un 40% a una concentración de 4% (Figura 15). No obstante, cuando este sobrenadante fue neutralizado no inhibió el crecimiento de *Salmonella typhi* CECT 725 en ninguna concentración (Figura 17).

El sobrenadante de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 de 24 horas no neutralizado, no afectó el crecimiento de *Salmonella typhimurium* CECT 443 (Figura 12). Sin embargo, inhibió: en un 39% el crecimiento de *Salmonella typhimurium* CECT 4594 cuando se utilizó a una concentración de 4% (Figura 14); en un 25% el crecimiento de *Salmonella typhi* CECT 725 cuando se utilizó a una concentración de 1% y en un 23% cuando se usó a una concentración de 4% (Figura 16). Cuando este sobrenadante fue neutralizado mantuvo su efecto inhibitor sobre *Salmonella typhimurium* CECT 4594, en 24 y 23 % cuando se utilizaron a concentraciones de 1 y 4%, respectivamente (Figura 18).

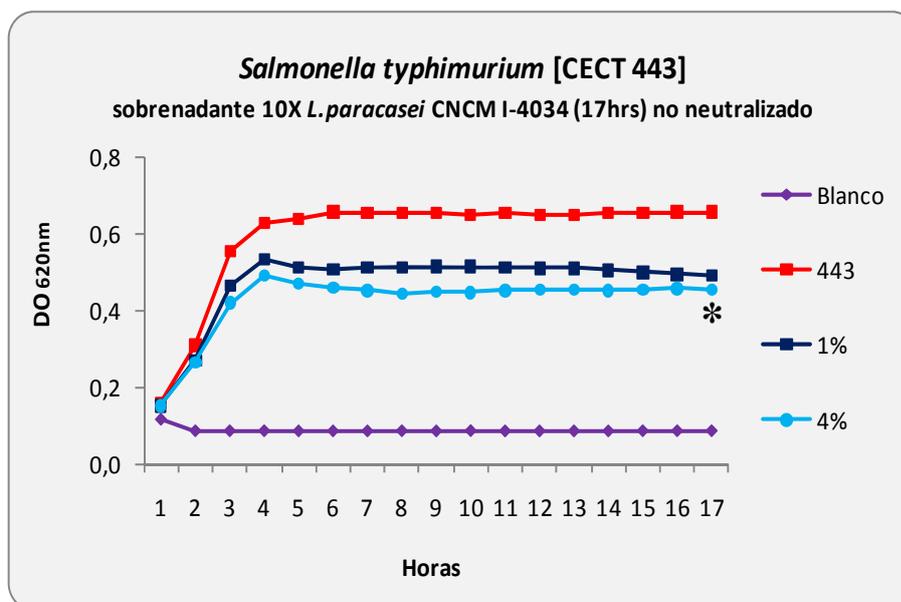


Figura 11. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhimurium* (CECT 443) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 (17 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 4%, *P= 0.026) se utilizó un modelo lineal general de varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de Bonferroni.

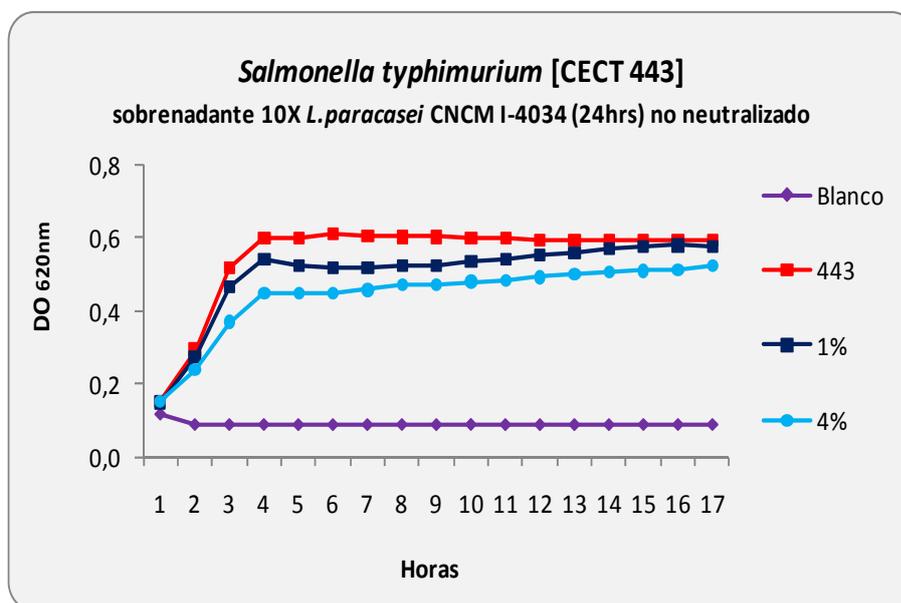


Figura 12. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhimurium* (CECT 443) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 (24 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de Bonferroni.

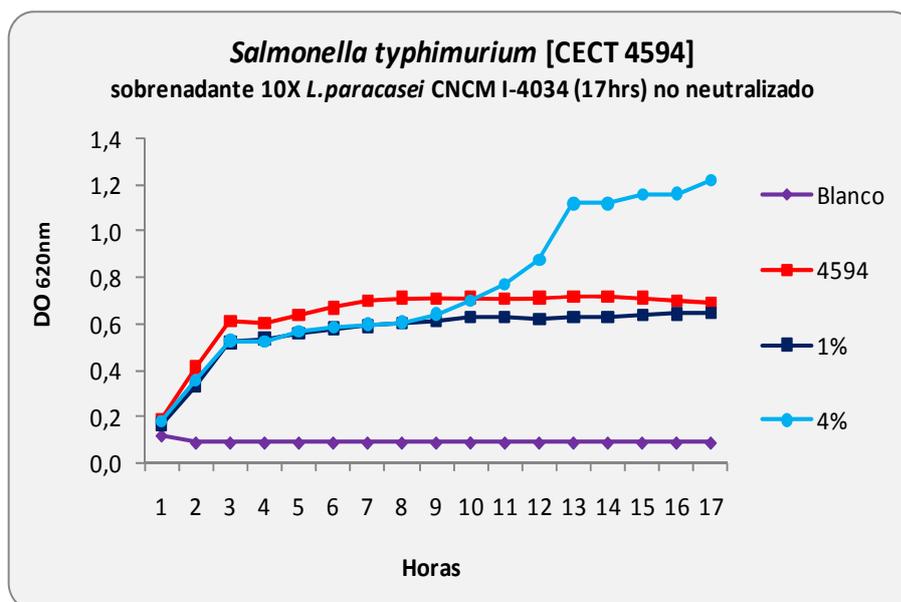


Figura 13. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhimurium* (CECT 4594) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 (17 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

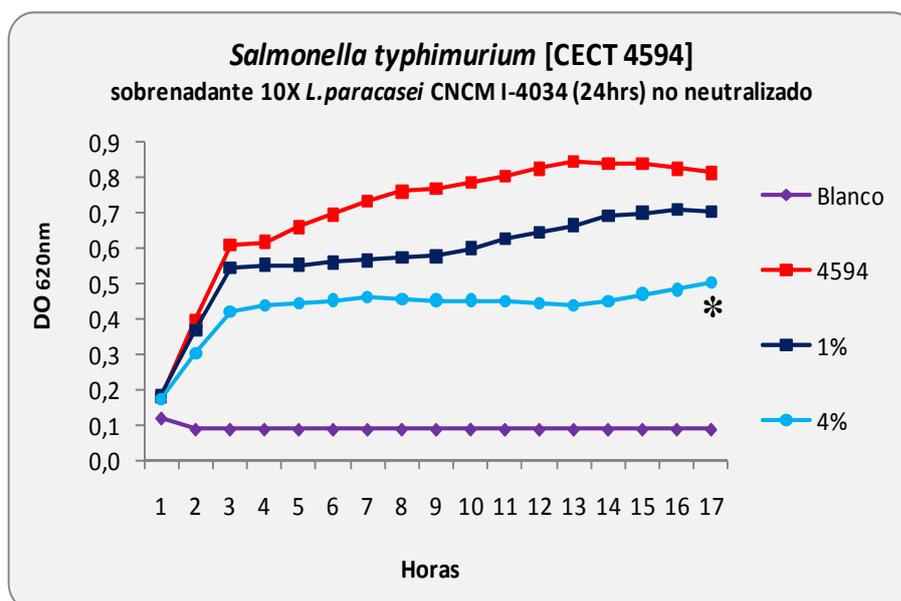


Figura 14. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhimurium* (CECT 4594) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 (24 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 4%, * $P=0.027$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

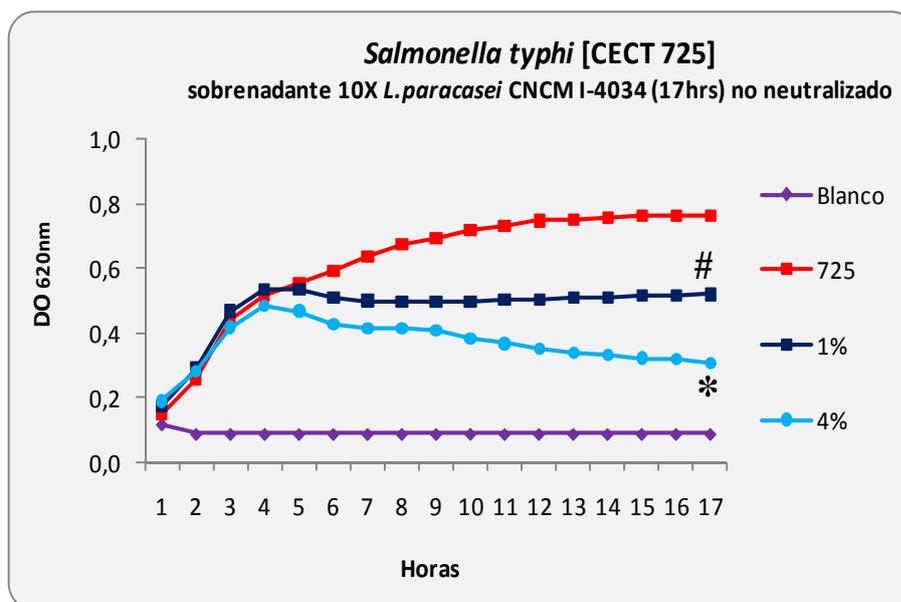


Figura 15. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhi* (CECT 725) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 (17 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 1%, # $P=0.016$, y 4%, * $P<0.001$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de Bonferroni.

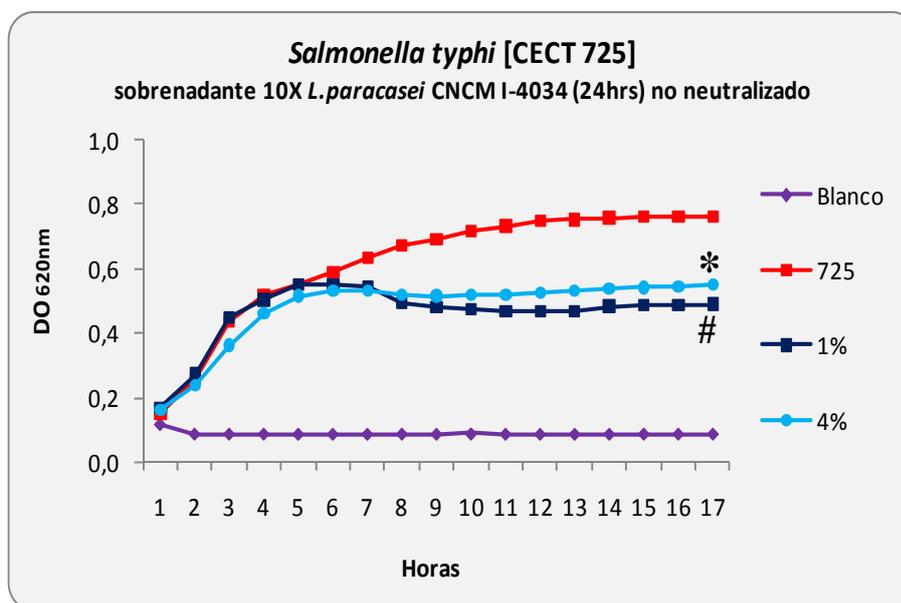


Figura 16. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhi* (CECT 725) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 (24 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 1%, # $P=0.018$, y 4%, * $P=0.021$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de Bonferroni.

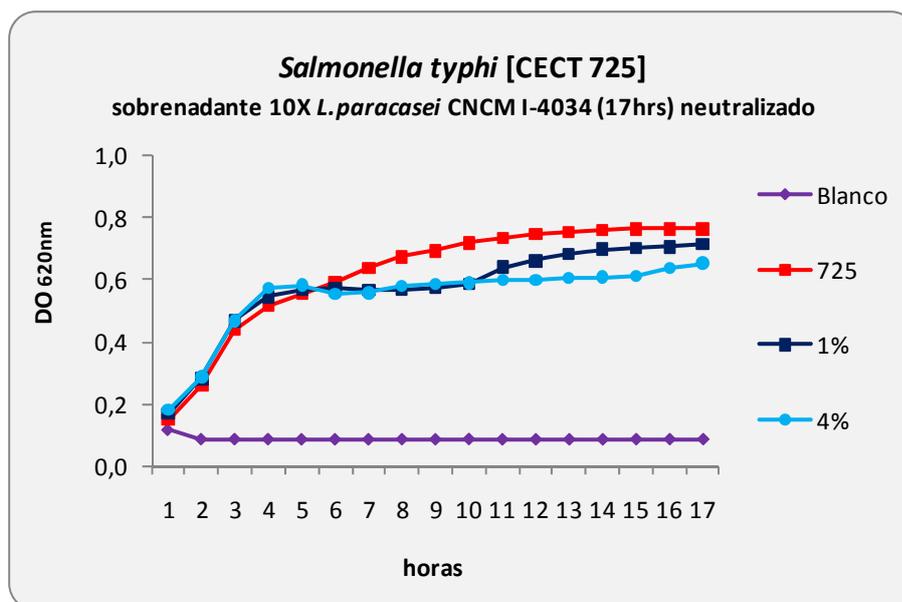


Figura 17. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhi* (CECT 725) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 (17 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

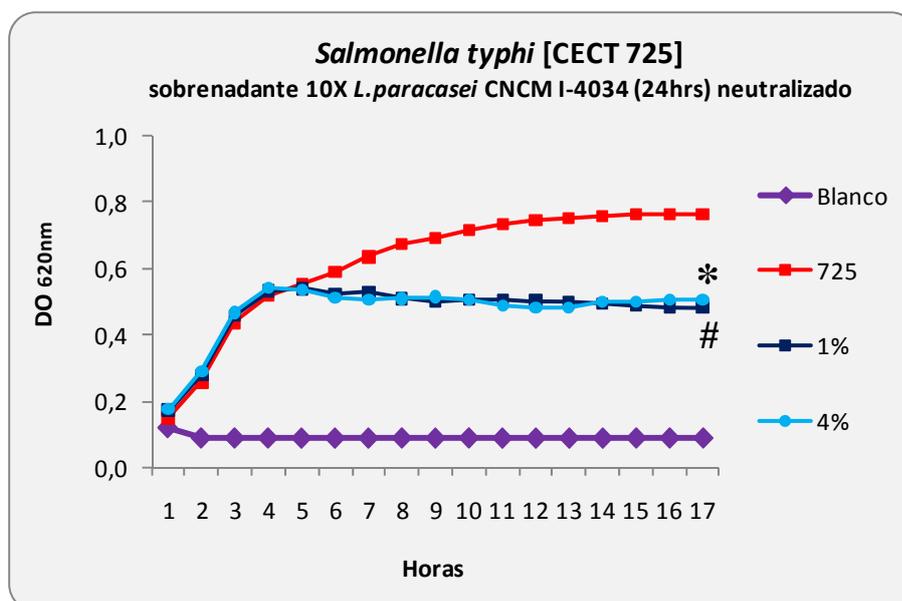


Figura 18. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhi* (CECT 725) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 (24 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 1%, # $P=0.017$, y 4%, * $P=0.018$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

Las Figuras 19 a la 29 muestran las curvas de crecimiento de bacterias patógenas en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, de 17 y 24 horas de crecimiento, neutralizado y no neutralizado.

El sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 de 17 horas no neutralizado inhibió en un 37% el crecimiento de *Salmonella typhi* CECT 725 cuando se utilizó a una concentración de 1% y en 44% cuando se utilizó al 4% (Figura 21). Cuando este sobrenadante fue neutralizado mantuvo su efecto inhibitorio sobre *Salmonella typhi* CECT 725, a una concentración de 1 y 4%, inhibiendo su crecimiento en un 25 y 29%, respectivamente (Figura 20).

El sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 de 24 horas no neutralizado, no afectó el crecimiento de *Escherichia coli* EPEC CECT 727 (Figura 24), *Escherichia coli* EPEC CECT 729 (Figura 26), ni de *Escherichia coli* EPEC CECT 742 (Figura 28). El sobrenadante neutralizado de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, tampoco inhibió el crecimiento de las cepas *Escherichia coli* EPEC CECT 727 (Figura 25), *Escherichia coli* EPEC CECT 729 (Figura 27). Sin embargo, estimuló en 47% el crecimiento de *Salmonella typhimurium* CECT 443 cuando se utilizó una concentración de 1% (Figura 19) y en 12% el crecimiento de *Escherichia coli* EPEC CECT 742 cuando se utilizó al 4% (Figura 29). No obstante, este sobrenadante ejerció un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *Salmonella typhi* CECT 725 en un 34%, cuando se utilizó a una concentración de 1% y en 48% cuando se utilizó al 4% (Figura 22). El sobrenadante neutralizado de esta bifidobacteria mantuvo su efecto inhibitorio en un 34 y 15 % cuando se usó una concentración de 1 y 4%, respectivamente (Figura 23).

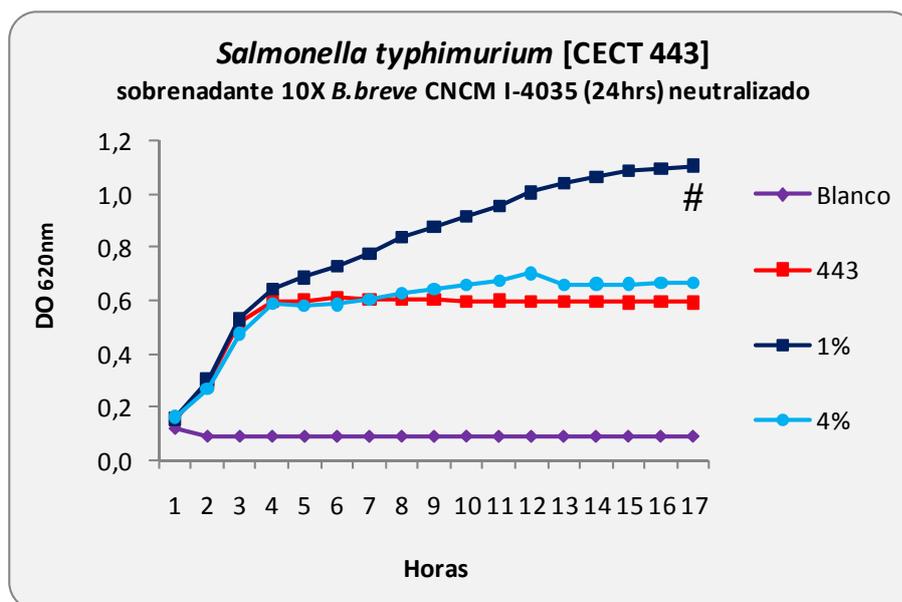


Figura 19. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhimurium* (CECT 443) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 (24 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 1%, * P=0.01) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

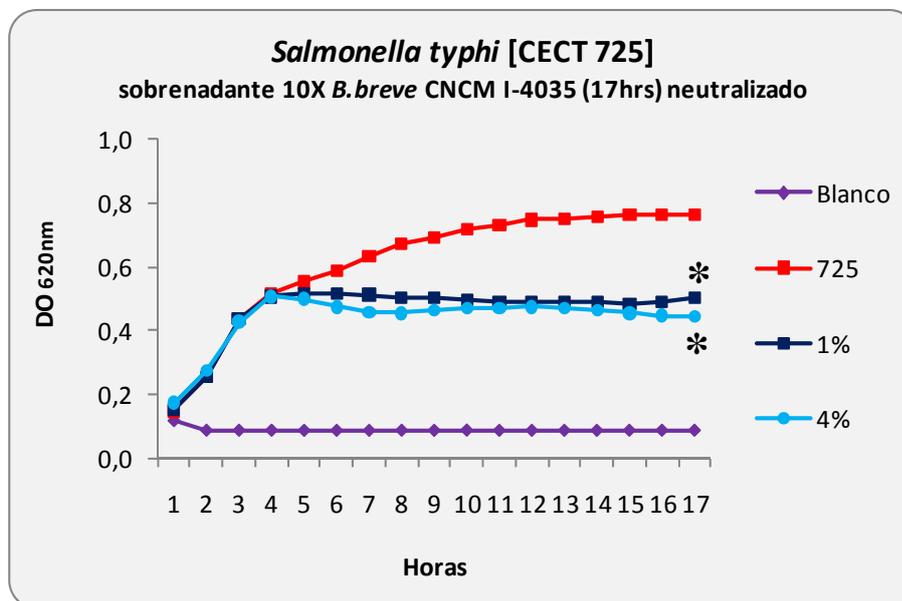


Figura 20. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhi* (CECT 725) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 (17 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 1 y 4%, * P<0.001) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

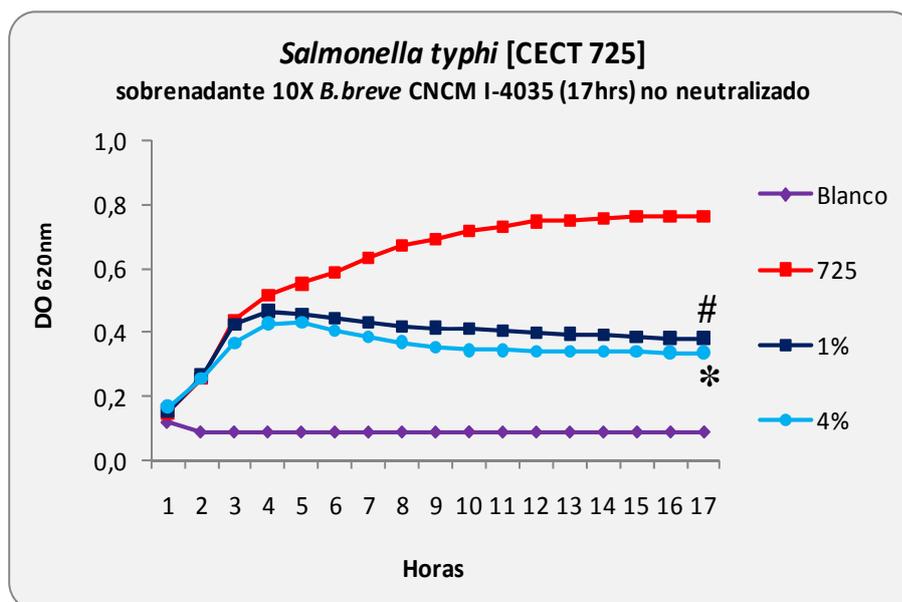


Figura 21. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhi* (CECT 725) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 (17 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 1%, # $P < 0.001$, y 4%, * $P < 0.001$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de Bonferroni.

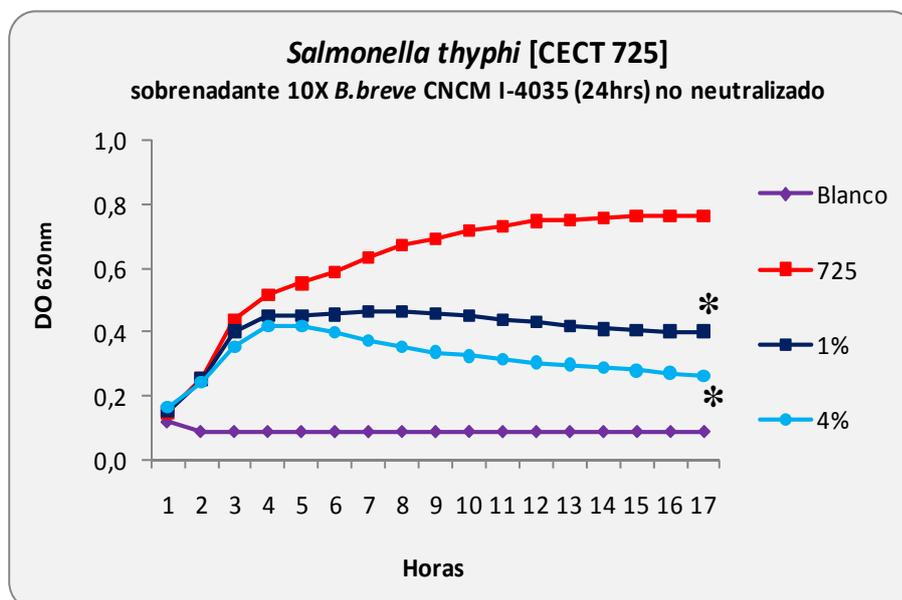


Figura 22. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhi* (CECT 725) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 (24 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 1% y 4%, * $P < 0.001$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de Bonferroni.

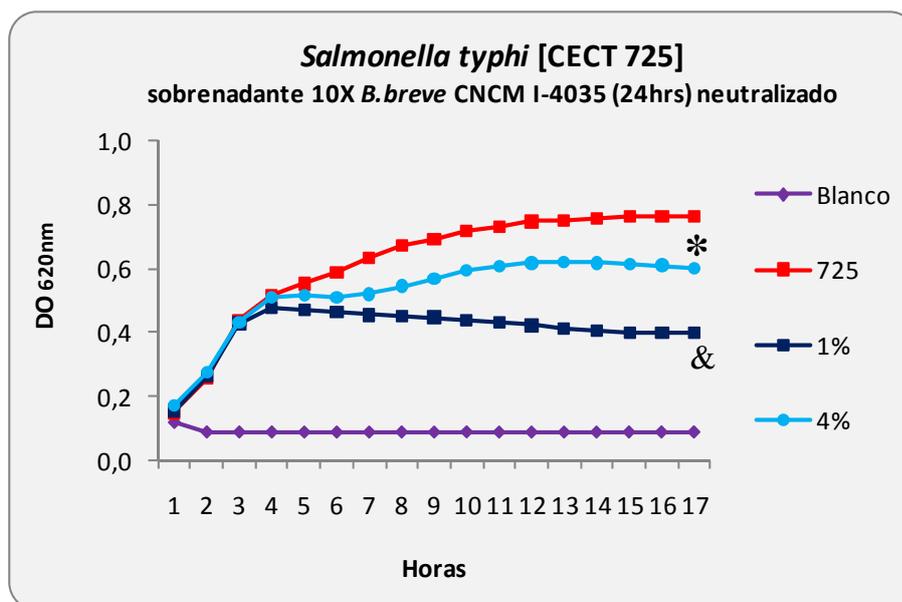


Figura 23. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhi* (CECT 725) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 (24 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 1%, & $P < 0.001$, y 4%, * $P = 0.039$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de Bonferroni.

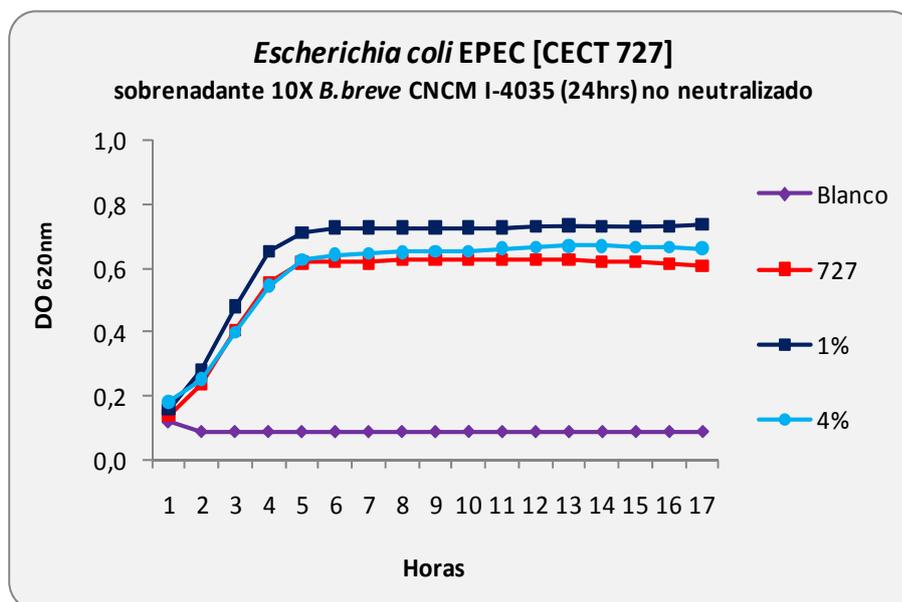


Figura 24. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* EPEC (CECT 727) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 (24 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de Bonferroni.

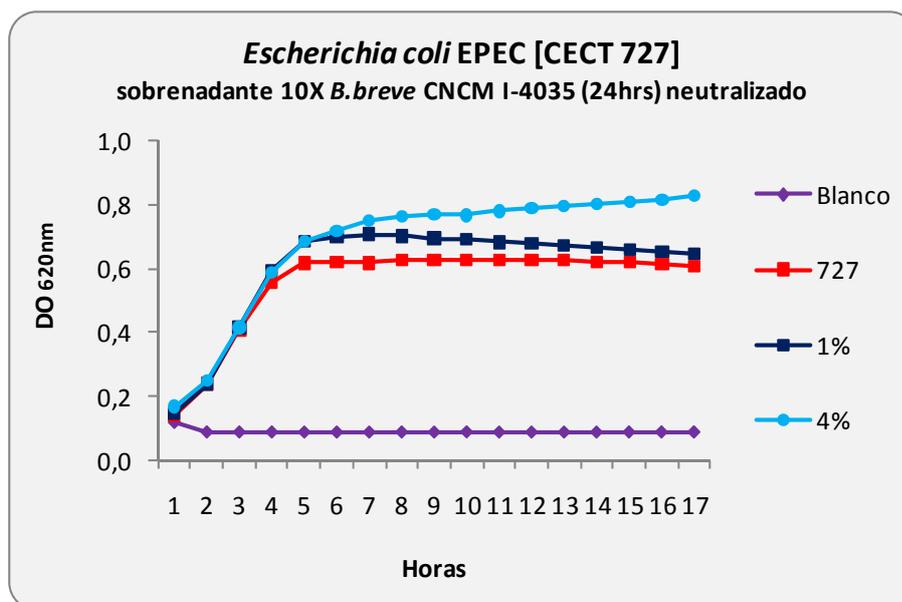


Figura 25. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* EPEC (CECT 727) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 (24 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

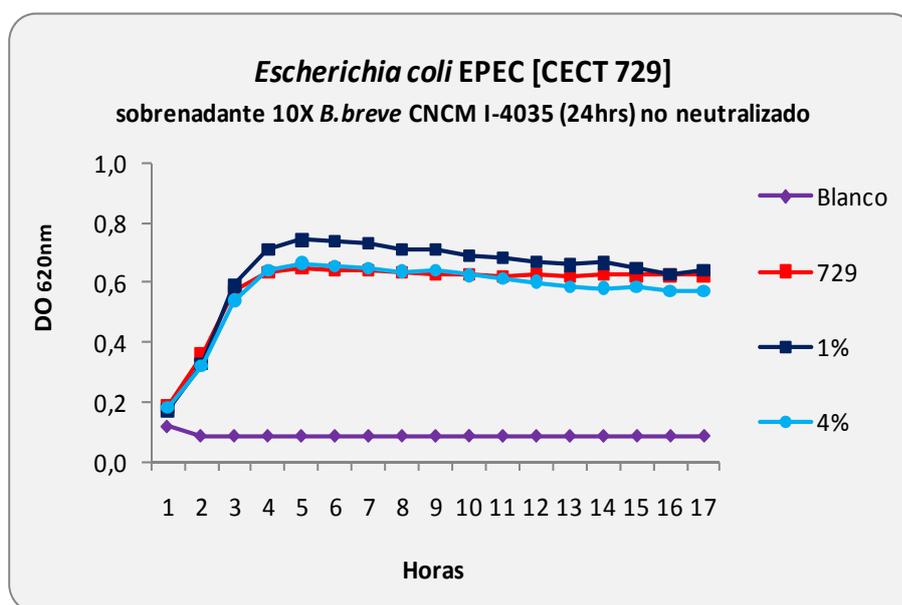


Figura 26. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* EPEC (CECT 729) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 (24 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

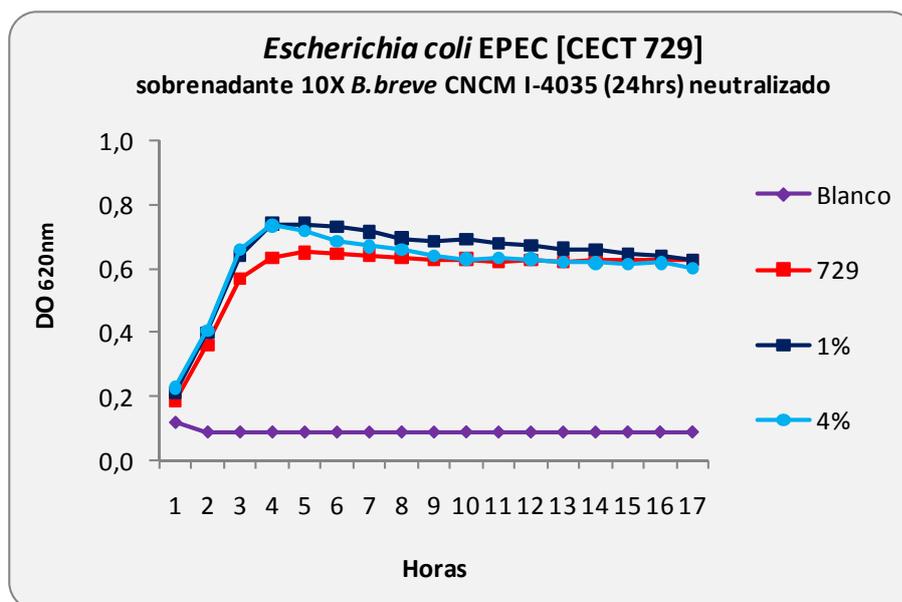


Figura 27. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* EPEC (CECT 729) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 (24 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

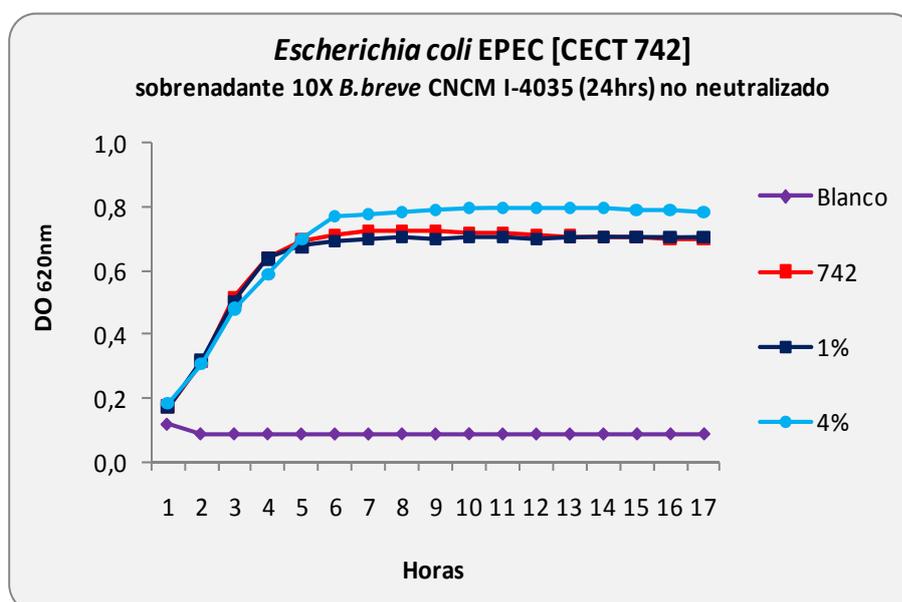


Figura 28. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* EPEC (CECT 742) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 (24 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

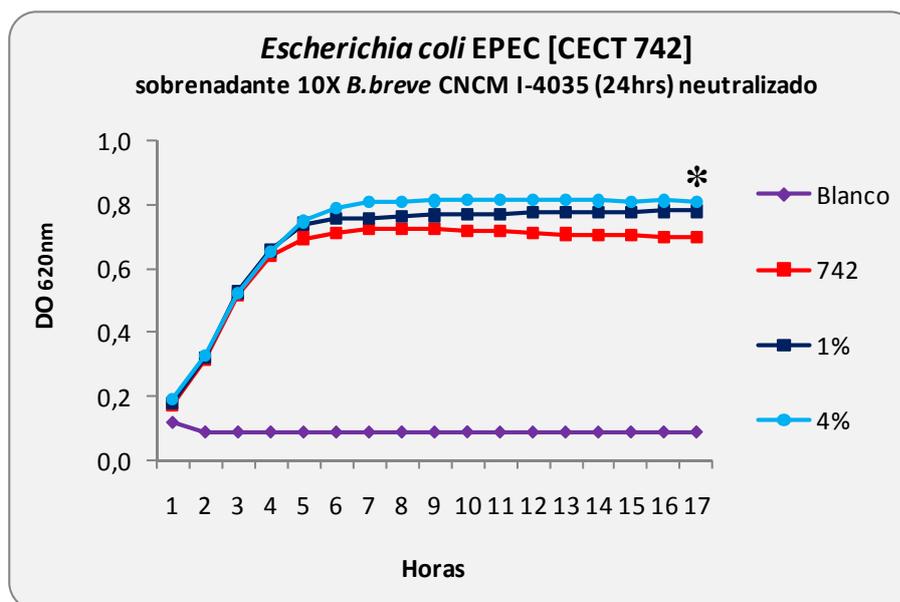


Figura 29. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* EPEC (CECT 742) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 (24 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 4%, * $P=0.003$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

Las Figuras 30 a la 53 muestran las curvas de crecimiento de bacterias patógenas en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, de 17 y 24 horas de crecimiento, neutralizado y no neutralizado.

El sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 de 17 horas no neutralizado, estimuló en 10% el crecimiento de *Salmonella typhimurium* CECT 4594 a una concentración de 4% (Figura 50). Cuando el sobrenadante fue neutralizado este efecto permaneció, estimulando el crecimiento en 19% a igual concentración (Figura 52). Sin embargo, el sobrenadante no afectó el crecimiento de *Escherichia coli* EPEC CECT 742 (Figura 42) en ninguna de las concentraciones utilizadas; no obstante, cuando este sobrenadante fue neutralizado estimuló en 52% su crecimiento a una concentración de 4% (Figura 44).

El efecto inhibitor del sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 se observó a una concentración de 4%. Esta concentración inhibió: en 40% a *Escherichia coli* ETEC CECT 501 (Figura 30), en 29% a *Escherichia coli* ETEC CECT 515 (Figura 34), en 27% a *Escherichia coli* EPEC CECT 729 (Figura 38) y en 55% a *Salmonella*

typhi CECT 725 (Figura 46). Sin embargo, cuando el sobrenadante fue neutralizado no afectó a ninguna de las bacterias anteriores a ninguna de las concentraciones utilizadas (Figuras 32, 36,40 y 48).

Cuando se utilizó el sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 de 24 horas neutralizado y no neutralizado, no afectó el crecimiento de *Escherichia coli* EPEC CECT 729 (Figura 39 y 41). Sin embargo, este sobrenadante a una concentración de 4% inhibió: un 25% a *Escherichia coli* ETEC CECT 501 (Figura 31), 31% a *Escherichia coli* ETEC CECT 515 (Figura 35) y 29% a *Salmonella typhi* CECT 725 (Figura 47). No obstante, cuando se neutralizó el sobrenadante no afectó el crecimiento de ninguna de las bacterias anteriores (Figuras 33, 37 y 49). Por el contrario, *Escherichia coli* EPEC CECT 742 y *Salmonella typhimurium* CECT 4594 no se vieron afectadas por el sobrenadante (Figuras 43 y 51); sin embargo, cuando el sobrenadante se neutralizó y utilizó a una concentración de 4%, el crecimiento de estas bacterias se inhibió en un 50% y 37%, respectivamente (Figuras 45 y 53).

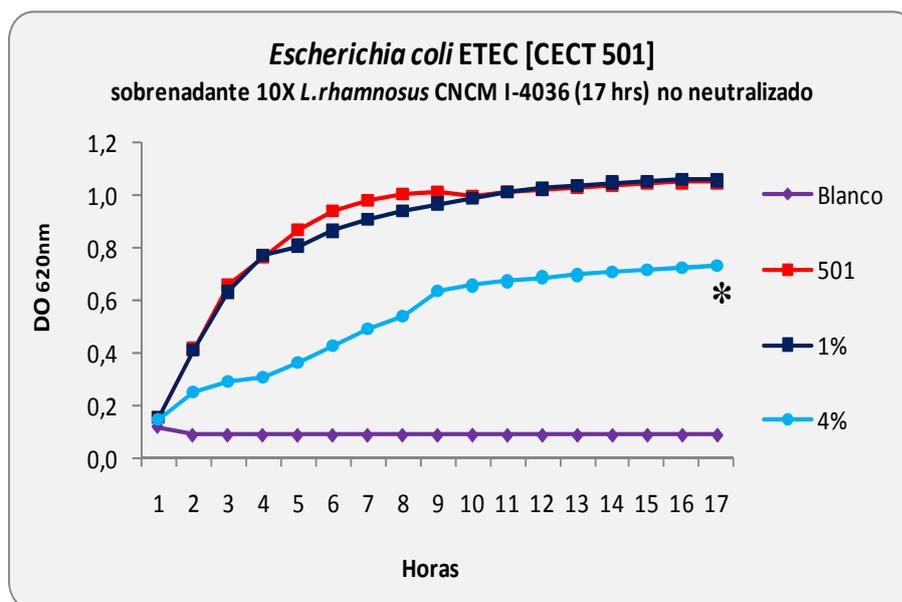


Figura 30. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* ETEC (CECT 501) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (17 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 4%, * $P < 0.001$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

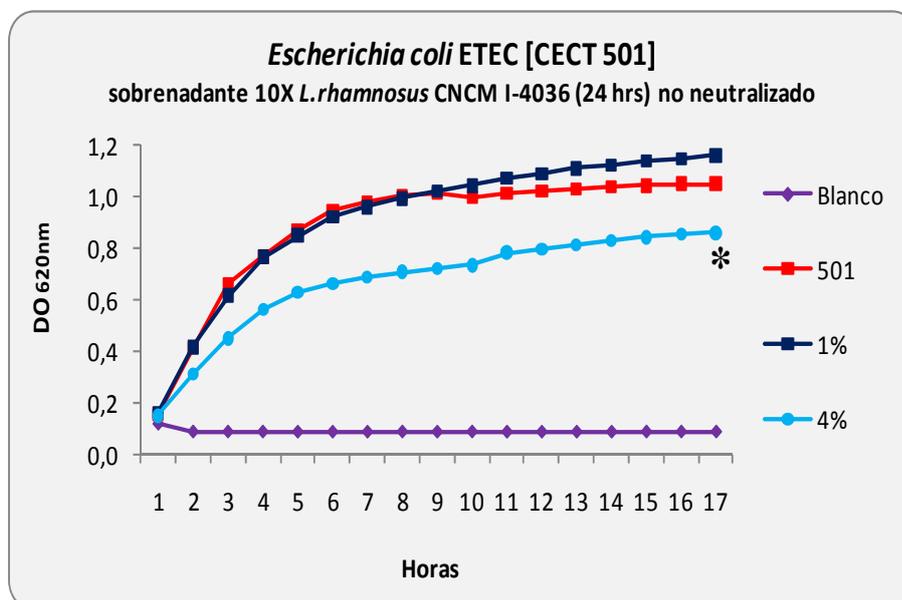


Figura 31. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* ETEC (CECT 501) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (24 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 4%, * $P < 0.001$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

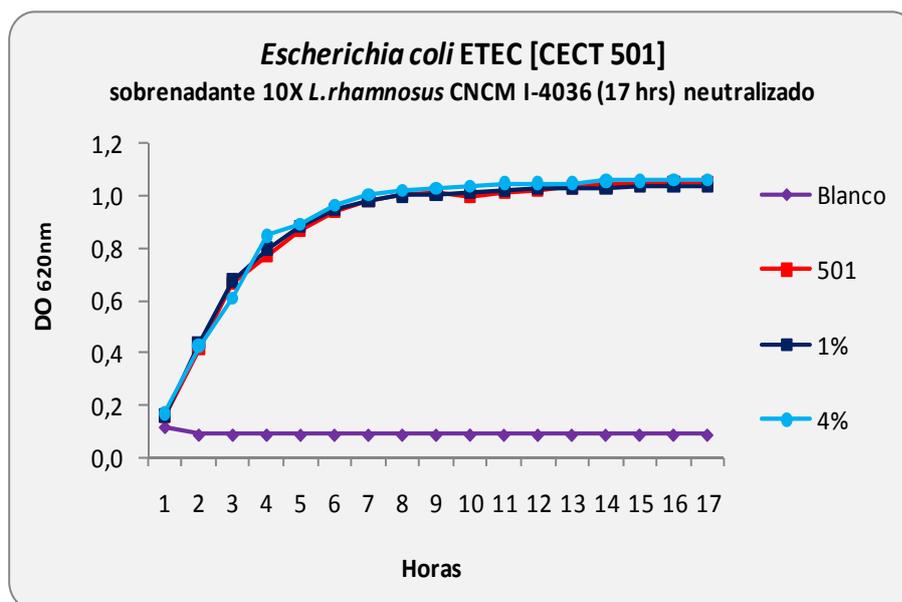


Figura 32. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* ETEC (CECT 501) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (17 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

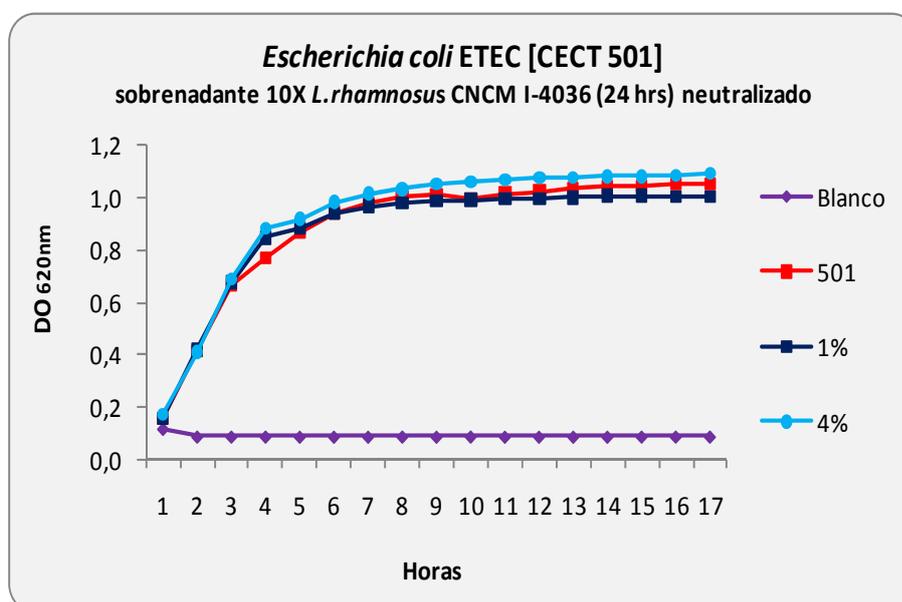


Figura 33. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* ETEC (CECT 501) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (24 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

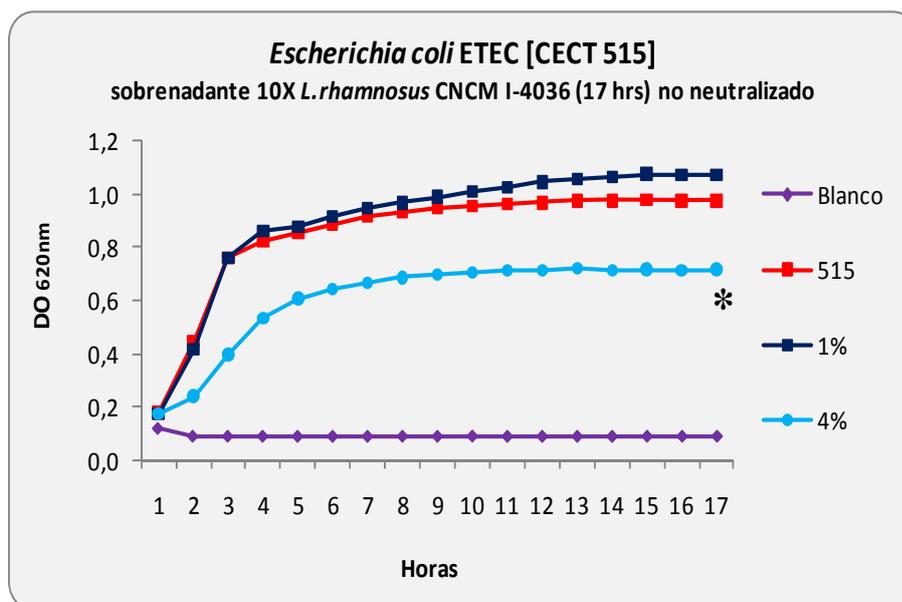


Figura 34. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* ETEC (CECT 515) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (17 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 4%, * P=0.006) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

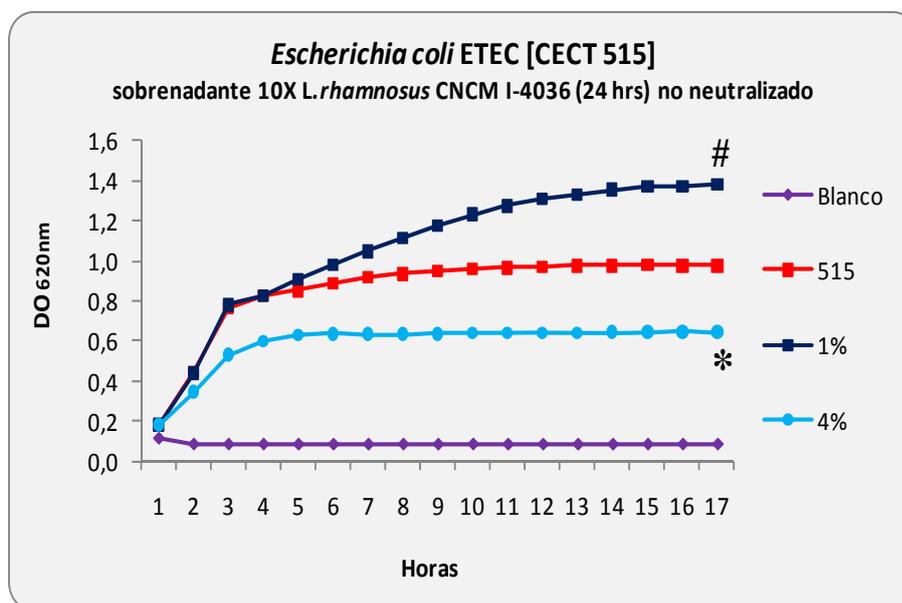


Figura 35. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* ETEC (CECT 515) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (24 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 1%, # P=0.014 y 4%, * P=0.002) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

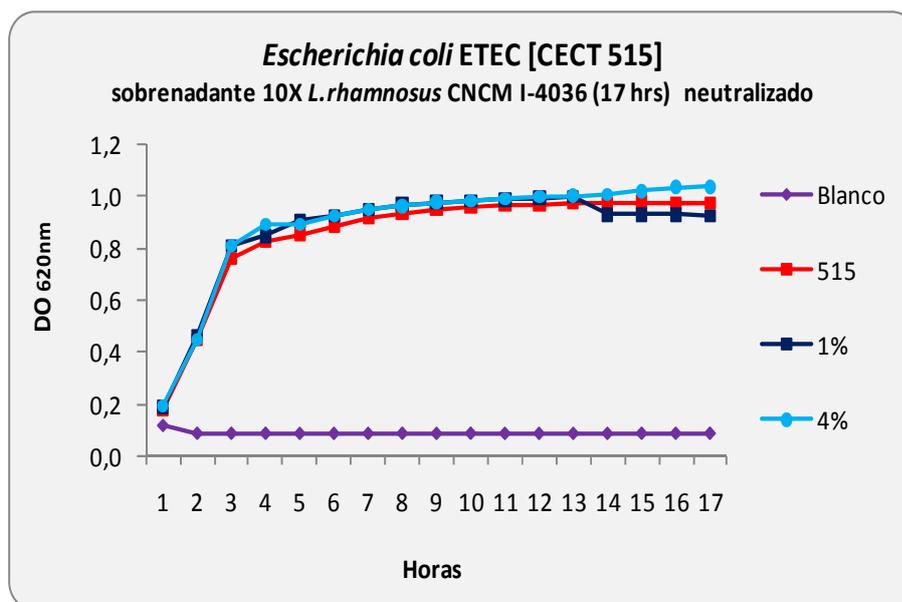


Figura 36. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* ETEC (CECT 515) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (17 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

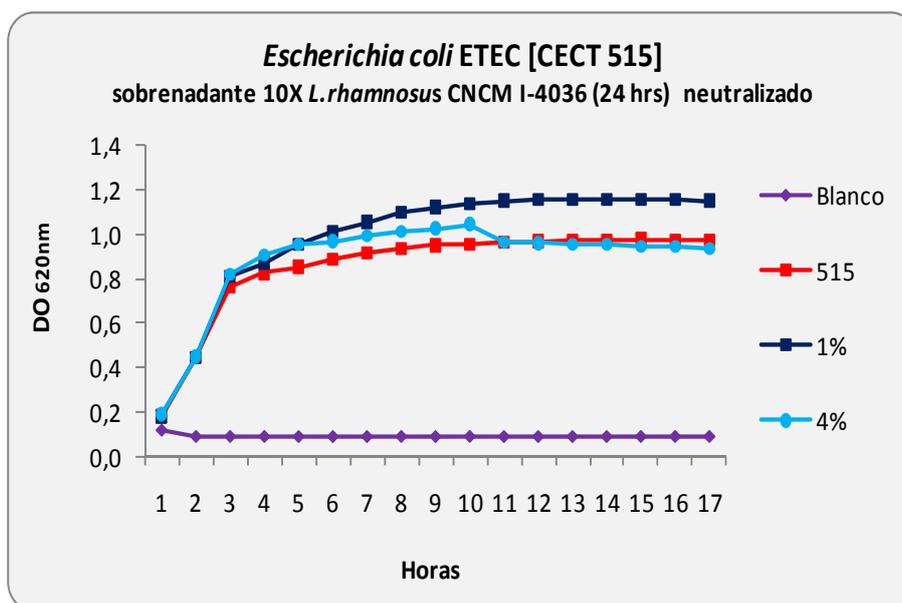


Figura 37. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* ETEC (CECT 515) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (24 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

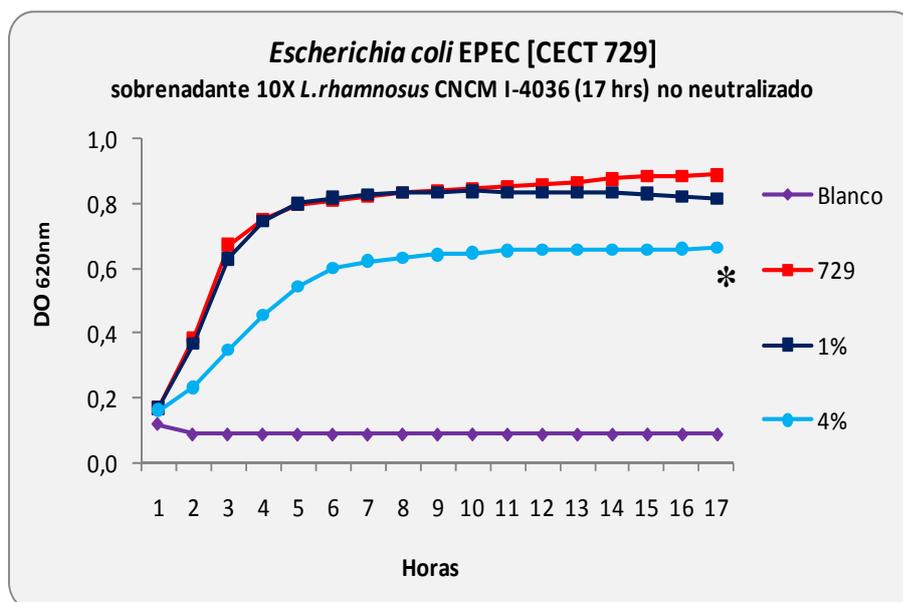


Figura 38. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* EPEC (CECT 729) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (17 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 4%, * $P=0.005$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

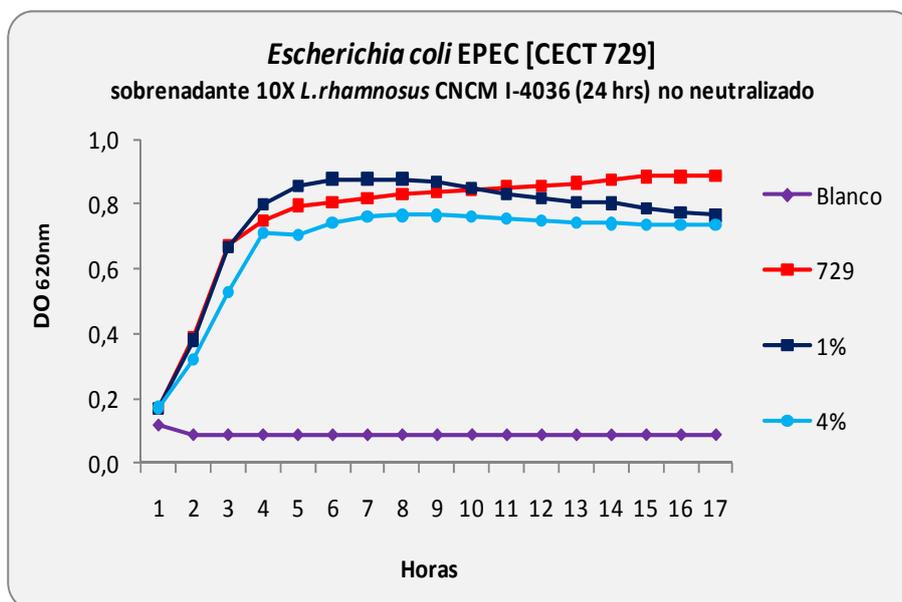


Figura 39. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* EPEC (CECT 729) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (24 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

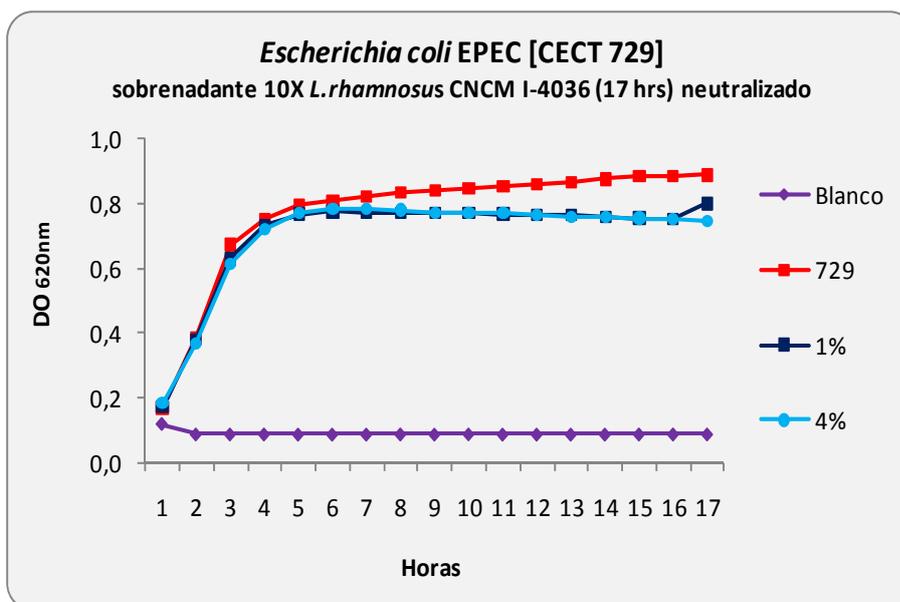


Figura 40. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* EPEC (CECT 729) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (17 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

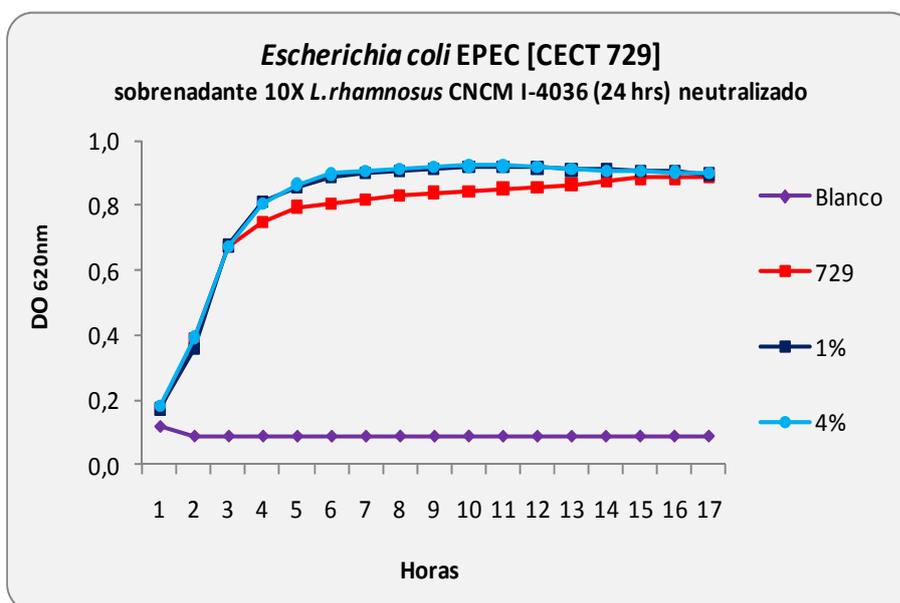


Figura 41. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* EPEC (CECT 729) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (24 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

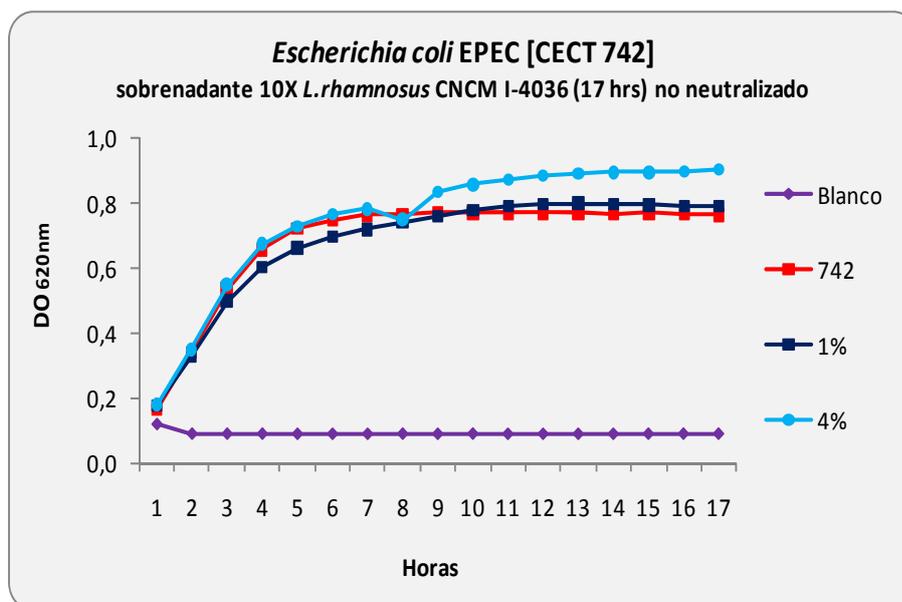


Figura 42. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* EPEC (CECT 742) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (17 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

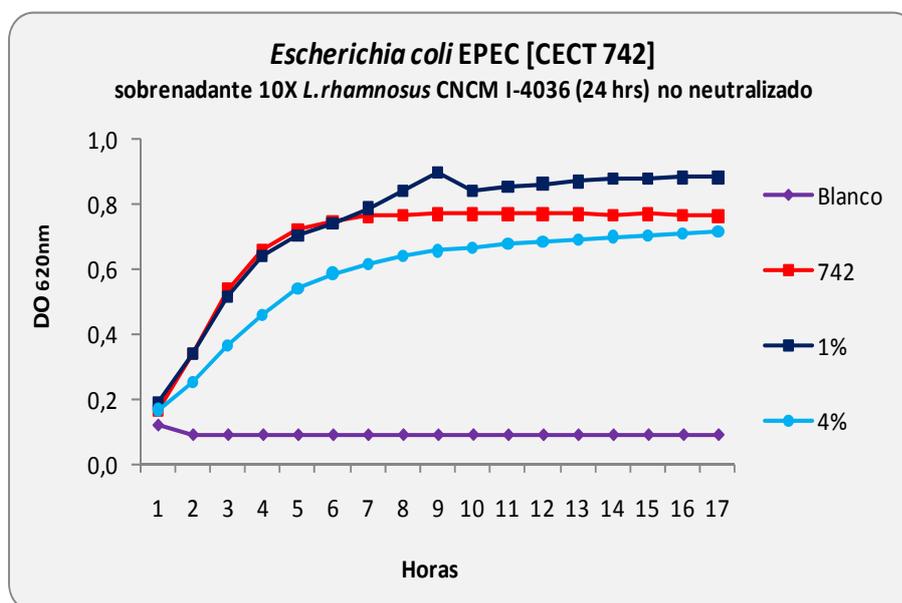


Figura 43. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* EPEC (CECT 742) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (24 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

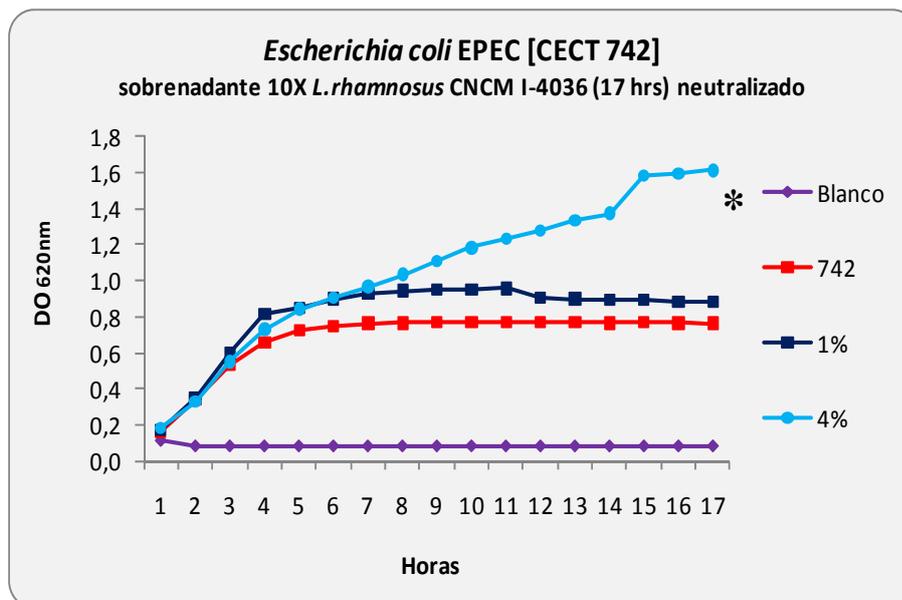


Figura 44. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* EPEC (CECT 742) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (17 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 4%, * $P < 0.001$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de Bonferroni.

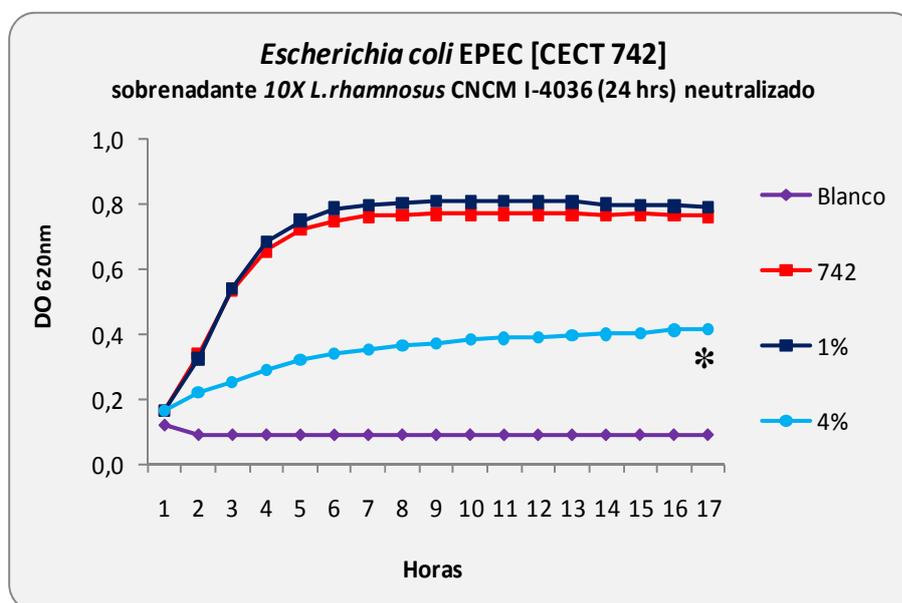


Figura 45. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Escherichia coli* EPEC (CECT 742) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (24 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 4%, * $P < 0.001$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de Bonferroni.

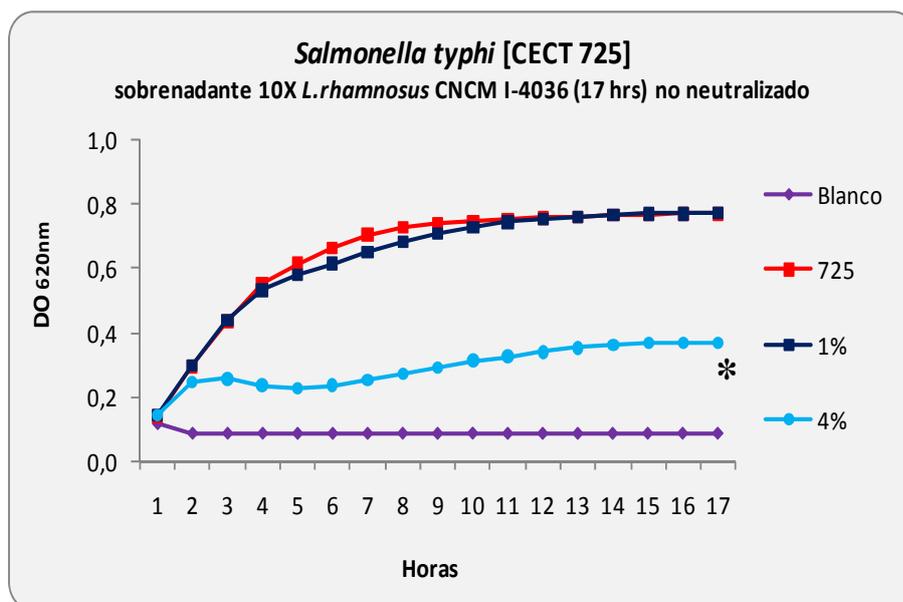


Figura 46. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhi* (CECT 725) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (17 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 4%, * $P < 0.001$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

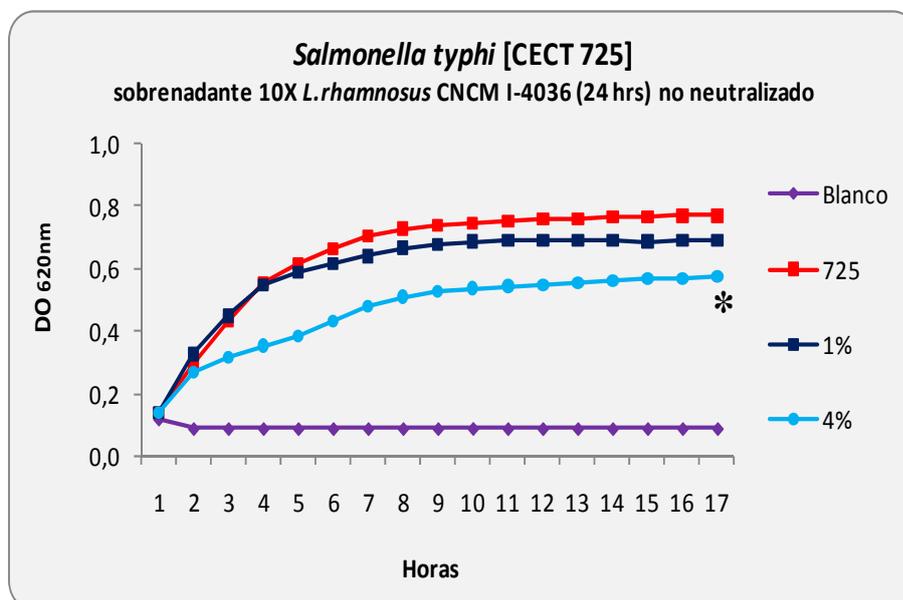


Figura 47. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhi* (CECT 725) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (24 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 4%, * $P < 0.001$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

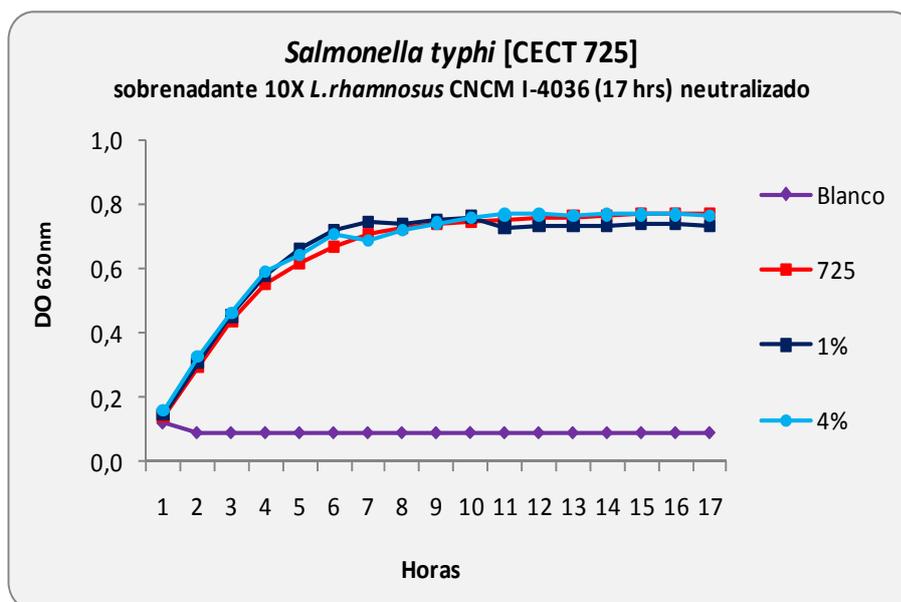


Figura 48. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhi* (CECT 725) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (17 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

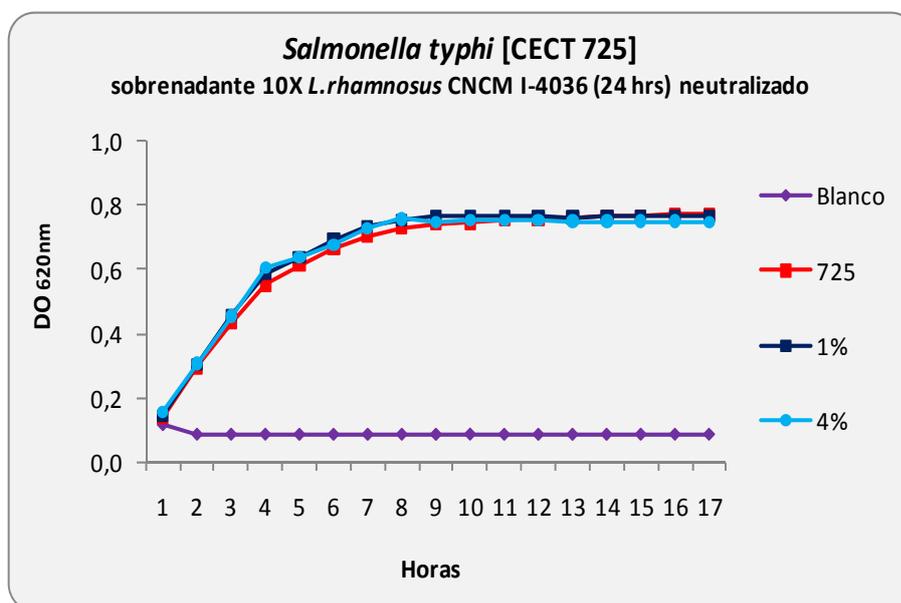


Figura 49. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhi* (CECT 725) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (24 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (sin significación estadística) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

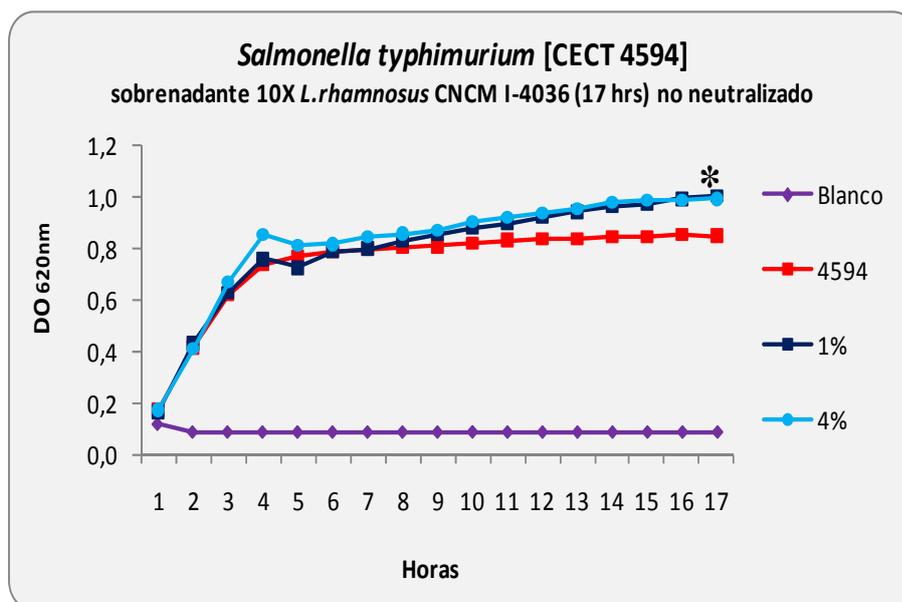


Figura 50. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhimurium* (CECT 4594) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (17 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para 4%, * $P=0.034$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

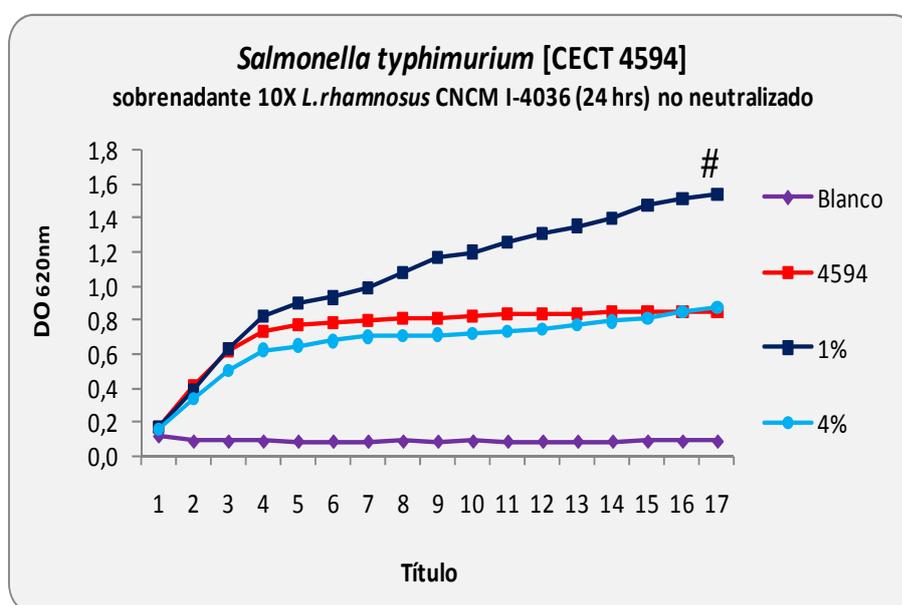


Figura 51. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhimurium* (CECT 4594) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (24 horas de crecimiento, no neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para %, # $P<0.001$) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de *Bonferroni*.

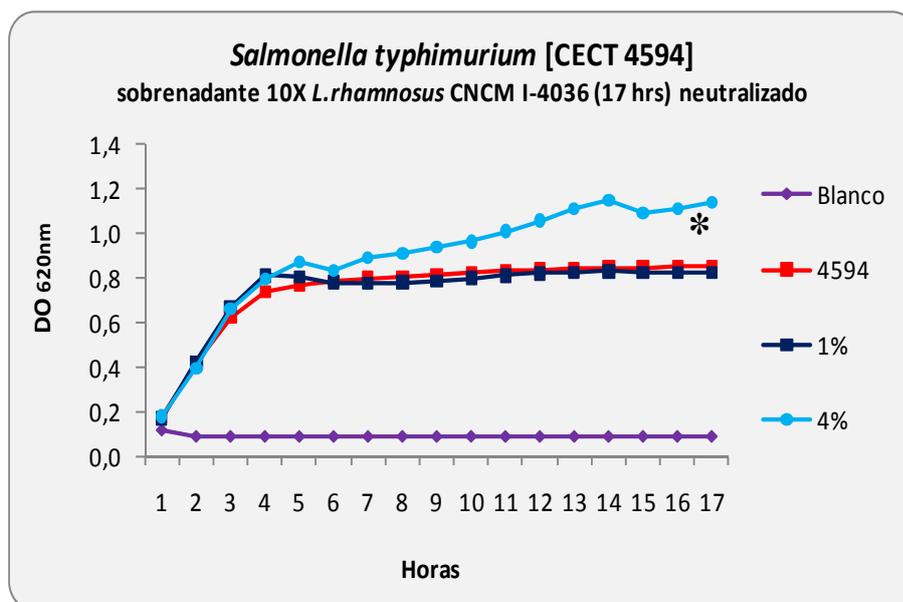


Figura 52. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhimurium* (CECT 4594) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (17 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para %, * P=0.035) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de Bonferroni.

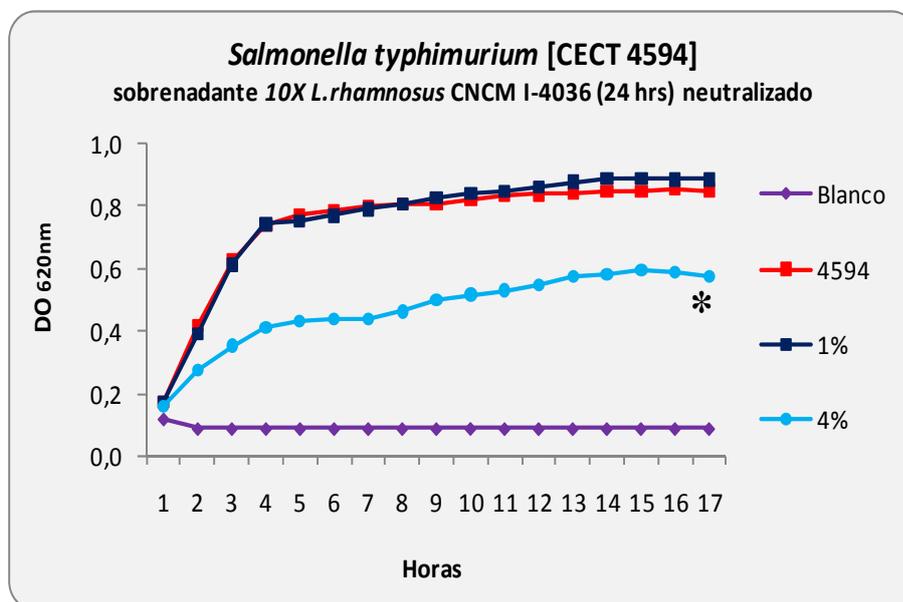


Figura 53. Curva de crecimiento de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhimurium* (CECT 4594) en presencia del sobrenadante (10X) de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (24 horas de crecimiento, neutralizado) al 1% y 4% en el medio de cultivo. Para la comparación entre las curvas de crecimiento (diferencia significativa para %, * P<0.001) se utilizó un modelo lineal general de la varianza para medidas repetidas y pruebas *a posteriori* (post hoc). Estos valores fueron corregidos con el test de Bonferroni.

En la tablas 19 y 20 se resumen los efectos del sobrenadante de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034. La tabla muestra los valores de significación estadística (P) y las diferencias de porcentajes para las curvas de crecimiento de las bacterias patógenas *Salmonella typhimurium* CECT 443, *Salmonella typhi* CECT 725 y *Salmonella typhimurium* CECT 4594. El sobrenadante de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, inhibió el crecimiento de forma significativa de las bacterias *Salmonella typhimurium* CECT 443 y *Salmonella typhimurium* CECT 4594, solo cuando no fue neutralizado. Así mismo, inhibió el crecimiento de *Salmonella typhi* CECT 725 se encuentre o no neutralizado. En la tabla 20 se puede observar que en prácticamente todos los casos existió una tendencia de inhibición del crecimiento de las bacterias enteropatógenas. La magnitud de los valores significativos de inhibición se encontraron entre 23 y 40%.

Tabla 19. Valores de significación estadística (P), para los efectos del sobrenadante de la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, sobre el crecimiento de las bacterias patógenas: *Salmonella typhimurium* CECT 443, *Salmonella typhi* CECT 725 y *Salmonella typhimurium* CECT 4594.

Sobrenadante	Bacteria enteropatógena	Tiempo de cultivo	Neutralizado	Significación p<	
				Porcentaje	
				1%	4%
<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034	<i>S.typhimurium</i> CECT 443	17 h	No	0,108	0,026*
		24 h	No	1,000	0,202
	<i>S.typhi</i> CECT 725	17 h	No	0,016*	0,000*
		24 h	No	0,018*	0,021*
		17 h	Si	0,888	0,376
		24 h	Si	0,017*	0,018*
	<i>S.typhimurium</i> CECT 4594	17 h	No	0,834	0,438
		24 h	No	0,476	0,027*

*p< 0,05, inhibición significativa del crecimiento

Tabla 20. Diferencias de porcentaje del área bajo la curva de crecimiento en la evaluación de los efectos del sobrenadante de la bacteria probiótica *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, sobre el crecimiento de las bacterias patógenas: *Salmonella typhimurium* CECT 443, *Salmonella typhi* CECT 725 y *Salmonella typhimurium* CECT 4594.

Sobrenadante	Bacteria enteropatógena	Tiempo de cultivo	Neutralizado	Porcentaje	
				1%	4%
<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034	<i>S.typhimurium</i> CECT 443	17 h	No	-20,90%	-28,76%*
		24 h	No	-16,07%	-26,17%
	<i>S.typhi</i> CECT 725	17 h	No	-23,00%*	-40,43%*
		24 h	No	-25,22%*	-22,82%*
		17 h	Si	-7,86%	-11,82%
		24 h	Si	-23,57%*	-23,41%*
	<i>S.typhimurium</i> CECT 4594	17 h	No	-20,32%	+4,51%
		24 h	No	-18,44%	-39,46%*

* $p < 0,05$, inhibición significativa del crecimiento

En las tablas 21 y 22 se resumen los efectos del sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035. Esta tabla muestra los valores de significación estadística (P) y las diferencias de porcentajes para las curvas de crecimiento de las bacterias patógenas *Salmonella typhimurium* CECT 443, *Salmonella typhi* CECT 725, *Escherichia coli* EPEC CECT 727, *Escherichia coli* EPEC CECT 729 y *Escherichia coli* EPEC CECT 742. El sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, inhibió el crecimiento de *Salmonella typhi* CECT 725 cuando se encuentra tanto neutralizado como no neutralizado. Sin embargo, las bacterias *Salmonella typhimurium* CECT 443 y *Escherichia coli* EPEC CECT 742, experimentaron un estímulo del crecimiento cuando el sobrenadante se encuentra neutralizado. En la tabla 22 se observa que el sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 solo inhibió el crecimiento de *Salmonella typhi* CECT 725 (15%-48%), ya que frente a las demás bacterias estudiadas se apreció que el sobrenadante estimula el crecimiento.

Tabla 21. Valores de significación estadística (P), para los efectos del sobrenadante de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, sobre el crecimiento de las bacterias patógenas: *Salmonella typhimurium* CECT 443, *Salmonella typhi* CECT 725, *Escherichia coli* EPEC CECT 727, *Escherichia coli* EPEC CECT 729 y *Escherichia coli* EPEC CECT 742.

Sobrenadante	Bacteria enteropatógena	Tiempo de cultivo	Neutralizado	Significación p<	
				1%	4%
<i>B.breve</i> CNCM I-4035	<i>S. typhimurium</i> CECT 443	24 h	Si	0,010#	1,000
		17 h	No	0,000*	0,000*
	24 h	No	0,000*	0,000*	
	17 h	Si	0,001*	0,000*	
	24 h	Si	0,000*	0,039*	
	<i>E.coli</i> EPEC CECT 727	24 h	No	0,595	1,000
		24 h	Si	1,000	0,363
	<i>E.coli</i> EPEC CECT 729	24 h	No	0,365	1,000
		24 h	Si	1,000	1,000
	<i>E.coli</i> EPEC CECT 742	24 h	No	1,000	0,120
		24 h	Si	0,066	0,003#

*p< 0,05 inhibición significativa del crecimiento; # p< 0,05 estimulación del crecimiento.

Tabla 22. Diferencias de porcentaje del área bajo la curva de crecimiento en la evaluación de los efectos del sobrenadante de la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, sobre el crecimiento de las bacterias patógenas: *Salmonella typhimurium* CECT 443, *Salmonella typhi* CECT 725, *Escherichia coli* EPEC CECT 727, *Escherichia coli* EPEC CECT 729 y *Escherichia coli* EPEC CECT 742.

Sobrenadante	Bacteria enteropatógena	Tiempo de cultivo	Neutralizado	Porcentaje	
				1%	4%
<i>B.breve</i> CNCM I-4035	<i>S.typhimurium</i> CECT 443	24 h	Si	+46,75%#	+5,57%
		17 h	No	-36,59%*	-43,80%*
	24 h	No	-33,86%*	-48,29%*	
	17 h	Si	-25,15%*	-28,98%*	
	24 h	Si	-33,83%*	-14,83%*	
	<i>E.coli</i> EPEC CECT 727	24 h	No	+17,13%	+4,98%
		24 h	Si	+8,78%	+21,72%
	<i>E.coli</i> EPEC CECT 729	24 h	No	+8,08%	-2,64%
		24 h	Si	+9,03%	+4,25%
	<i>E.coli</i> EPEC CECT 742	24 h	No	-1,58%	+7,41%
		24 h	Si	+7,01%	+11,56%#

*p< 0,05 inhibición significativa del crecimiento; # p< 0,05 estimulación del crecimiento.

En las tablas 23 y 24 se resumen los efectos del sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036. La tabla muestra los valores de significación estadística (P) y las diferencias de porcentajes para las curvas de crecimiento de las bacterias patógenas *Salmonella typhimurium* CECT 4594, *Salmonella typhi* CECT 725, *Escherichia coli* EPEC CECT 729, *Escherichia coli* EPEC CECT 742, *Escherichia coli* ETEC CECT 501 y *Escherichia coli* ETEC CECT 515. El sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, inhibió el crecimiento de todas las bacterias enteropatógenas estudiadas, principalmente cuando se utilizó a una concentración de 4% y cuando no estaba neutralizado. Por el contrario, las bacterias *Salmonella typhimurium* CECT 4594, *Escherichia coli* EPEC CECT 742 y *Escherichia coli* ETEC CECT 515 experimentaron crecimiento. En la tabla 24 se puede observar que los valores de inhibición se encuentran entre 25% y 55%.

Tabla 23. Valores de significación estadística (P), para los efectos del sobrenadante de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, sobre el crecimiento de las bacterias patógenas: *Salmonella typhimurium* CECT 4594, *Salmonella typhi* CECT 725, *Escherichia coli* EPEC CECT 729, *Escherichia coli* EPEC CECT 742, *Escherichia coli* ETEC CECT 501 y *Escherichia coli* ETEC CECT 515.

Sobrenadante	Bacteria enteropatógena	Tiempo de cultivo	Neutralizado	Significación p<	
				Porcentaje	
				1%	4%
<i>L.rhamnosus</i> CNCM I-4036	<i>S. typhimurium</i> CECT 4594	17 h	No	0,211	0,034#
		24 h	No	0,000#	0,186
		17 h	Si	1,000	0,035#
		24 h	Si	1,000	0,000*
	<i>S. typhi</i> CECT 725	17 h	No	1,000	0,000*
		24 h	No	0,131	0,000*
		17 h	Si	1,000	1,000
		24 h	Si	0,650	1,000
	<i>E.coli</i> EPEC CECT 729	17 h	No	1,000	0,005*
		24 h	No	1,000	0,203
		17 h	Si	0,364	0,329
		24 h	Si	1,000	0,847
	<i>E.coli</i> EPEC CECT 742	17 h	No	1,000	1,000
		24 h	No	1,000	0,241
		17 h	Si	0,101	0,000#
		24 h	Si	1,000	0,000*
<i>E.coli</i> ETEC CECT 501	17 h	No	1,000	0,000*	
	24 h	No	0,970	0,000*	
	17 h	Si	1,000	0,732	
	24 h	Si	1,000	0,456	

<i>E.coli</i> ETEC CECT 515	17 h	No	1,000	0,006*
	24 h	No	0,014#	0,002*
	17 h	Si	1,000	1,000
	24 h	Si	0,066	1,000

*p< 0,05 inhibición significativa del crecimiento; # p< 0,05 estimulación del crecimiento.

Tabla 24. Diferencias de porcentaje del área bajo la curva de crecimiento en la evaluación de los efectos del sobrenadante de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, sobre el crecimiento de las bacterias patógenas: *Salmonella typhimurium* CECT 4594, *Salmonella typhi* CECT 725, *Escherichia coli* EPEC CECT 729, *Escherichia coli* EPEC CECT 742, *Escherichia coli* ETEC CECT 501 y *Escherichia coli* ETEC CECT 515.

Sobrenadante	Bacteria enteropatógena	Tiempo de cultivo	Neutralizado	Porcentaje	
				1%	4%
<i>L.rhamnosus</i> CNCM I-4036	<i>S.typhimurium</i> CECT 4594	17 h	No	+6,87%	+10,28%#
		24 h	No	+42,20%#	-10,56%
		17 h	Si	-0,64%	+18,94%#
		24 h	Si	+1,33%	-37,35%*
	<i>S.typhi</i> CECT 725	17 h	No	-2,34%	-55,20%*
		24 h	No	-7,25%	-28,59%*
		17 h	Si	+0,21%	+1,67%
		24 h	Si	+2,25%	+1,15%
	<i>E.coli</i> EPEC CECT 729	17 h	No	-2,62%	-27,30*
		24 h	No	-1,28%	-12,25%
		17 h	Si	-8,69%	-8,87%
		24 h	Si	+5,88%	+6,39%
	<i>E.coli</i> EPEC CECT 742	17 h	No	-0,89%	+9,16%
		24 h	No	+8,23%	-15,71%
		17 h	Si	+18,81%	+51,94%#
		24 h	Si	+4,07%	-49,84%*
<i>E.coli</i> ETEC CECT 501	17 h	No	-2,18%	-40,42%*	
	24 h	No	+3,34%	-24,64%*	
	17 h	Si	+0,40%	+2,11%	
	24 h	Si	-1,2%	+4,72%	
<i>E.coli</i> ETEC CECT 515	17 h	No	+5,41%	-28,92%*	
	24 h	No	+23,88%#	-31,42%*	
	17 h	Si	+1,52%	+4,01%	
	24 h	Si	+15,53%	+3,66%	

*p< 0,05 inhibición significativa del crecimiento; # p< 0,05 estimulación del crecimiento.

EFFECTO DE LOS SOBRENADANTES O DE LAS BACTERIAS PROBIÓTICAS SOBRE LA ADHESIÓN DE BACTERIAS PATÓGENAS A CÉLULAS CACO-2

Se comprobó la eficiencia de todas las parejas de oligonucleótidos para las diferentes especies de bacterias ensayadas, proporcionando resultados satisfactorios para poder efectuar las pruebas de inhibición (>90%).

Las pruebas de adhesión se realizaron exclusivamente en aquellas bacterias patógenas en las que se observó un efecto inhibitorio de los sobrenadantes probióticos según los resultados anteriores y se utilizó solo al 4% de sobrenadante en el medio de cultivo de las Caco-2 durante 4 horas. Además, se utilizó una relación de bacteria patógena/bacteria probiótica 1/1. Para todos aquellos resultados donde se observó algún grado de inhibición de la adhesión, se repitió la prueba en triplicado y de forma independiente, para poder realizar el tratamiento estadístico de los resultados.

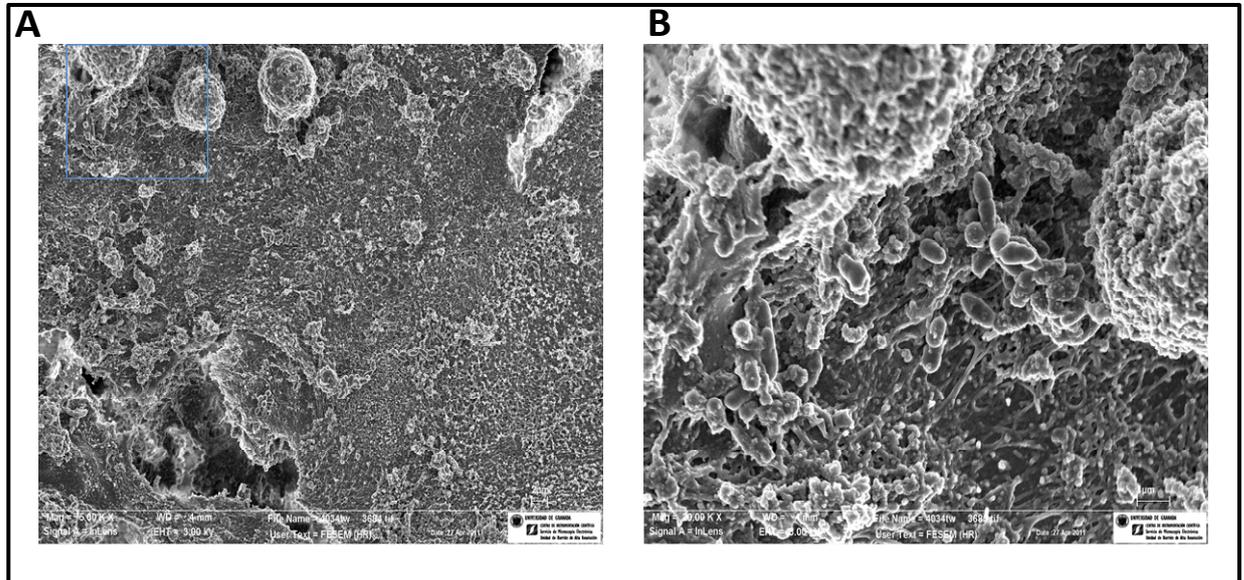


Figura 54. Microfotografías efectuadas con microscopía de barrido de la bacteria *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 adheridas a células epiteliales intestinales Caco-2.

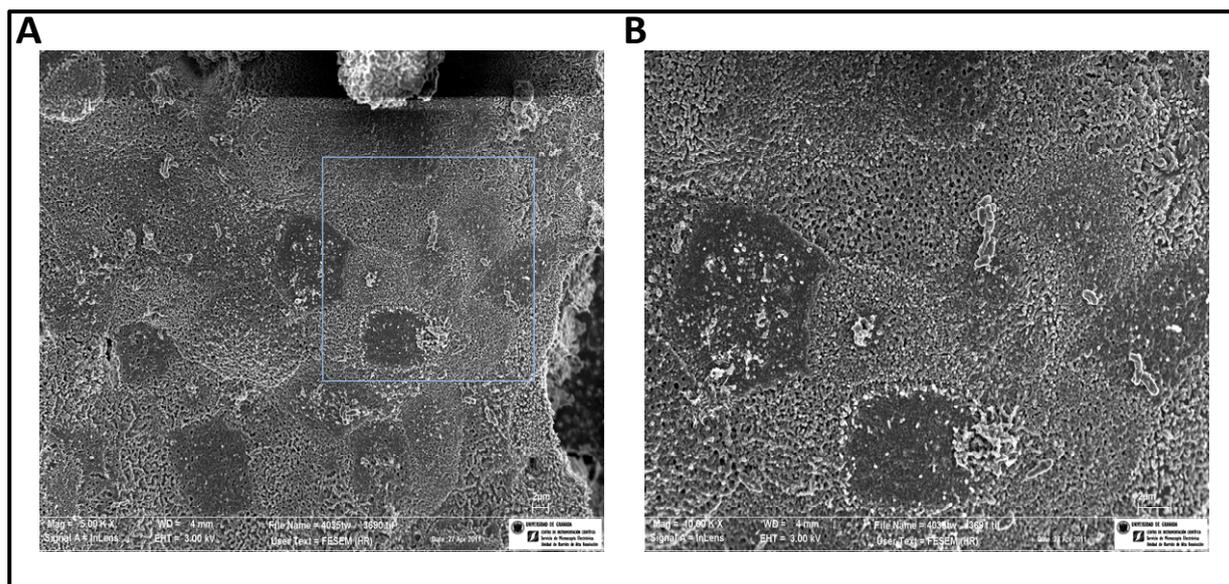


Figura 55. Microfotografías efectuadas con microscopía de barrido de la bacteria *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 adheridas a células epiteliales intestinales Caco-2.

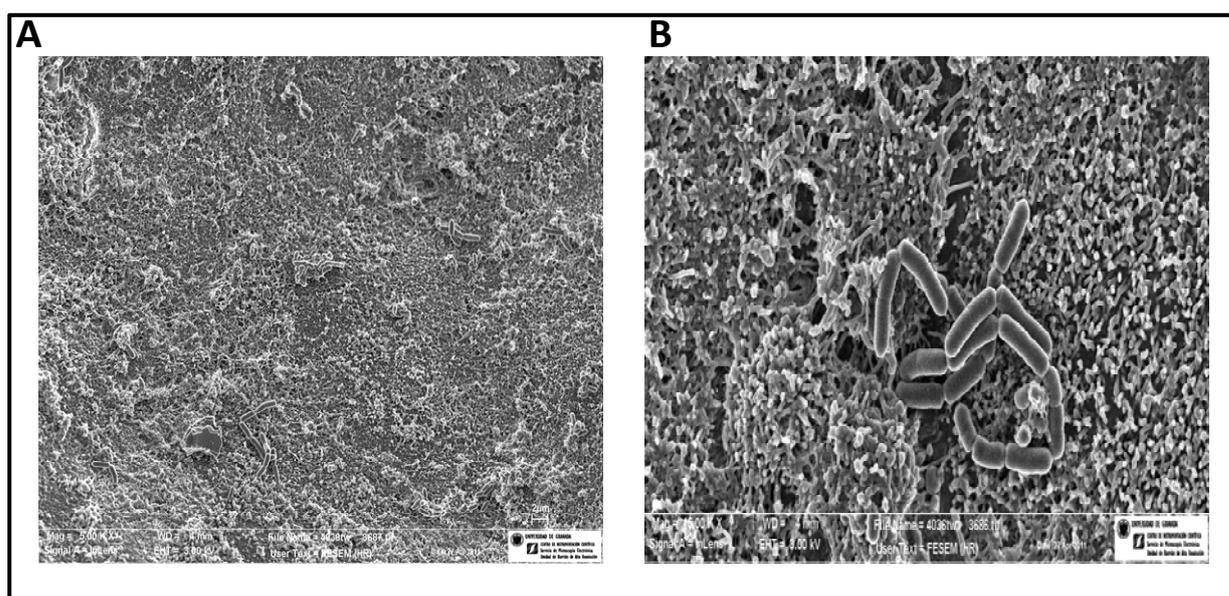


Figura 56. Microfotografías efectuadas con microscopía de barrido de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 adheridas a células epiteliales intestinales Caco-2.

En las figuras 54 a 56, se observan microfotografías de las bacterias probióticas aisladas adheridas a células epiteliales intestinales Caco-2 durante el ensayo de adhesión.

Los resultados se expresaron en porcentaje con respecto a la cantidad de DNA total de bacterias enteropatógenas incubadas con Caco-2.

La adhesión de la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725 se vio afectada solo en presencia de sobrenadante de 17 horas de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 se encontrase o no neutralizado. Por el contrario, no ocurrió lo mismo si se utilizó sobrenadante de 24 horas. Por otra parte, la presencia del probiótico no afectó la adhesión de *Salmonella typhi* CECT 725 (Figura 57). Además, la adhesión de las bacterias patógenas *Salmonella typhimurium* CECT 4594 y *Escherichia coli* EPEC CECT 729, no se vieron afectadas por la presencia de las bacterias probióticas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (Figuras 58 y 59).

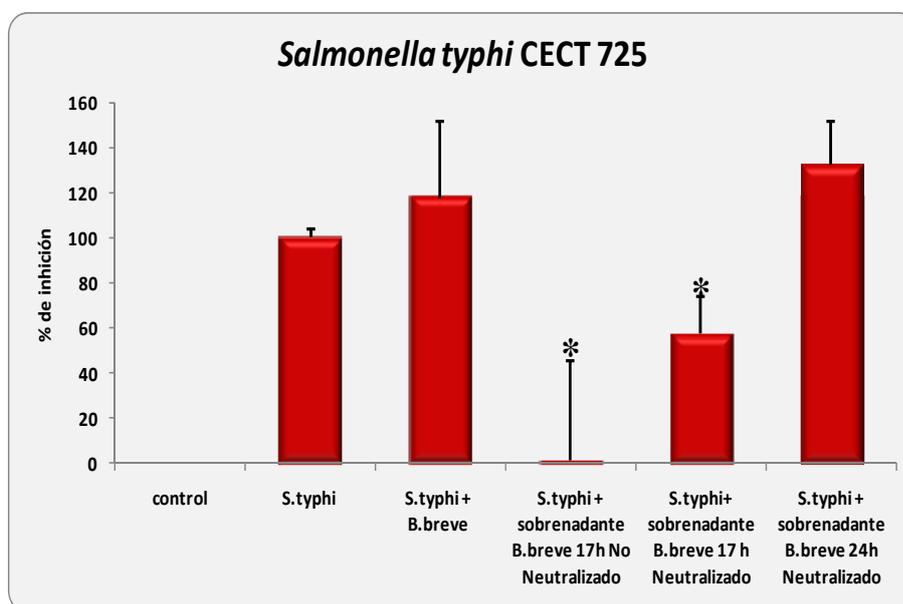


Figura 57. Porcentajes de inhibición de adhesión de *Salmonella typhi* CECT 725 (mediante PCR a tiempo real) adheridas a la monocapa de células epiteliales intestinales Caco-2, después de 4 horas de incubación en presencia del sobrenadante de 17 y 24 horas (10X) al 4% o la bacteria probiótica *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035. Se expresa en % con respecto al DNA total de *S.typhi* en incubación con Caco-2. Para la comparación entre los valores de cada tratamiento (diferencia significativa, * $P < 0.001$) se utilizó el modelo ANOVA de un factor.

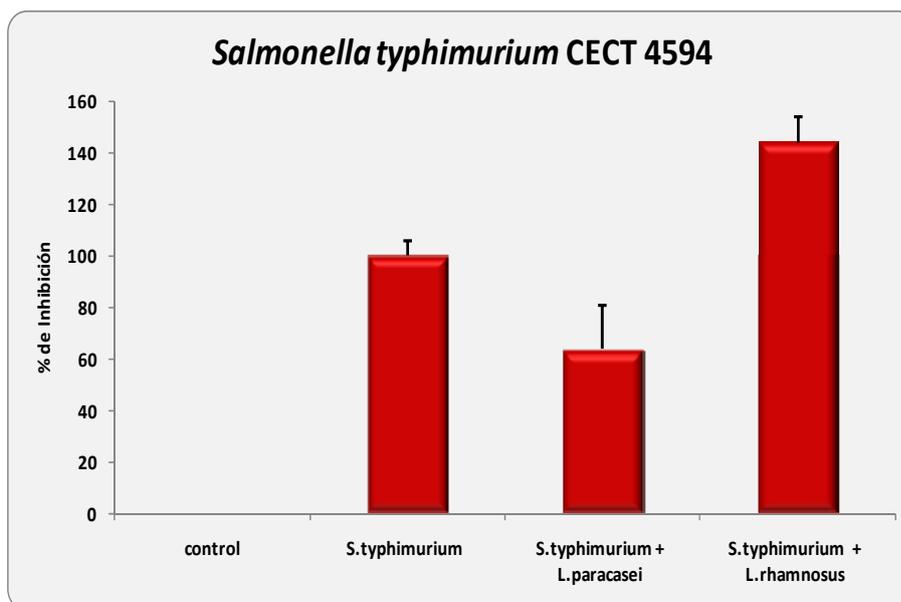


Figura 58. Concentraciones de DNA de *Salmonella typhimurium* CECT 4594 (mediante PCR a tiempo real) adheridas a la monocapa de células epiteliales intestinales Caco-2, después de 4 horas de incubación en presencia de las bacterias probióticas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036. Se expresa en % con respecto al DNA total de *S.typhimurium* en incubación con Caco-2.

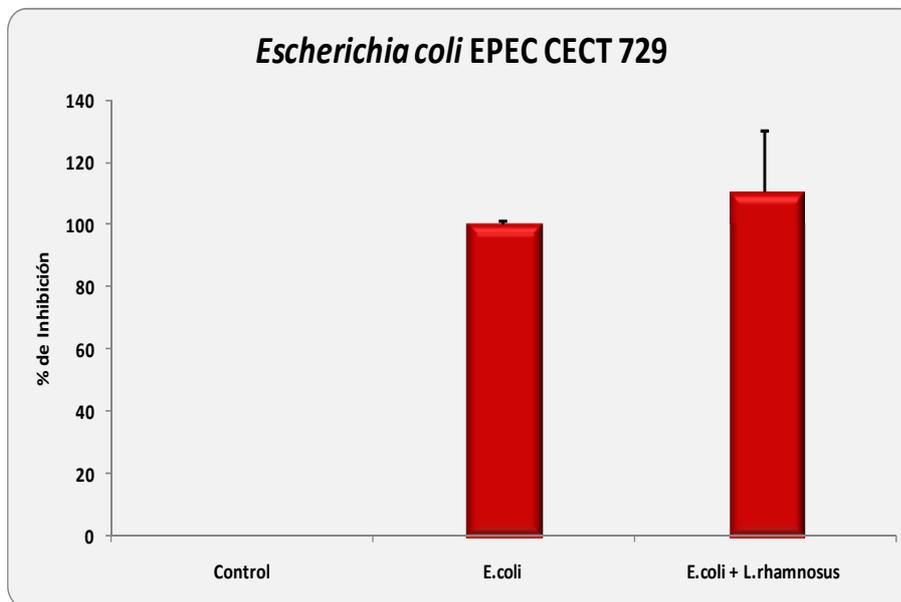


Figura 59. Concentraciones de DNA de *Escherichia coli* EPEC CECT 729 (mediante PCR a tiempo real) adheridas a la monocapa de células epiteliales intestinales Caco-2, después de 4 horas de incubación en presencia de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036. Se expresa en % con respecto al DNA total de *E.coli* en incubación con Caco-2.

La tabla 25 muestra los valores significativos de inhibición de *Salmonella typhi* CECT 725, frente al sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035. Se puede observar que la presencia de cualquiera de las bacterias probióticas no fue capaz de inhibir la adhesión de las bacterias enteropatógenas estudiadas.

Tabla 25. Valores de significación estadística (P), para la inhibición de adhesión de la bacteria patógena *Salmonella typhimurium* CECT 4594, *Salmonella typhi* CECT 725, *Salmonella typhimurium* CECT 4594 y *Escherichia coli* EPEC CECT 729 frente a la presencia de los probióticos *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036

Sobrenadante	Bacteria enteropatógena	Tiempo de cultivo	Neutralizado	Significación p<	
				Sobrenadante	Probiótico
<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034	<i>S.typhimurium</i> CECT 4594	17 h	No	0,000*	0,603
		17 h	Si	0,000*	
<i>B.breve</i> CNCM I-4035	<i>S.typhi</i> CECT 725	24 h	Si	0,738	0,236
<i>L.rhamnosus</i> CNCM I-4036	<i>S.typhimurium</i> CECT 4594				0,563
		<i>E.coli</i> EPEC CECT 729			

PRODUCCIÓN DE IL-8 Y TNF- α DE LAS CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES CACO-2 EN PRESENCIA DE LOS PROBIÓTICOS AISLADOS Y DE BACTERIAS ENTEROPATÓGENAS

Se determinaron las concentraciones de IL-8 y TNF- α después de 4 horas de incubación o co-incubación, de bacterias enteropatógenas y/o de las bacterias probióticas aisladas. Se efectuaron los ensayos exclusivamente en aquellas bacterias patógenas en las que se observó algún efecto inhibitorio de los probióticos en pruebas previas. Para todos aquellos resultados donde se observó algún grado de inhibición de la secreción de IL-8 y TNF- α , fueron repetidas en triplicado y de forma independiente, para poder realizar el tratamiento estadístico de los datos.

Los resultados se expresaron en porcentaje con respecto a la cantidad producida por el estímulo producido por las bacterias enteropatógenas. Para cada ensayo se obtuvieron los porcentajes de inhibición y se realizó un análisis estadístico comparativo.

Las tablas 28 a 34 muestran los valores de significación estadística y los porcentajes de inhibición, con respecto al estímulo de cada bacteria enteropatógena, de la producción de IL-8 y TNF- α por las bacterias probióticas.

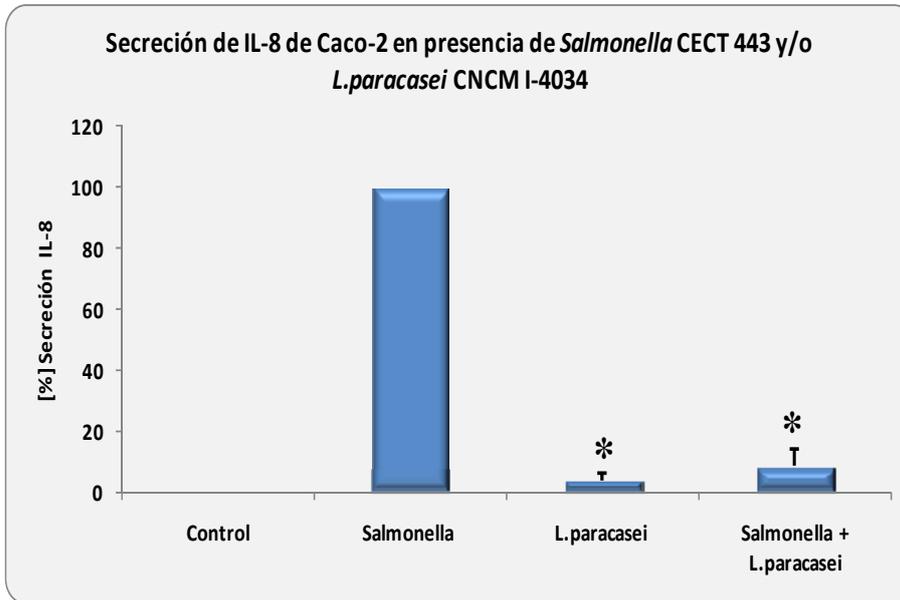
La producción de IL-8 de las células epiteliales aumentó cuando fueron estimuladas por bacterias enteropatógenas; sin embargo, cuando fueron estimuladas por bacterias probióticas la producción de IL-8 disminuyó casi completamente, a excepción de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035. De hecho, la producción de TNF- α de esta cepa probiótica es similar a la de la enteropatógena, siendo mayor cuando el estímulo de estas bacterias es simultáneo (Figura 66).

La producción de IL-8 disminuyó drásticamente a niveles casi basales cuando se estimularon las células epiteliales con *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034. Así mismo, cuando fueron estimuladas simultáneamente con las bacterias enteropatógenas *Salmonella typhimurium* CECT 443, *Salmonella typhimurium* CECT 4594 y *Salmonella typhi* CECT 725, la producción de IL-8 generada por las bacterias enteropatógenas se inhibió casi por completo (Figuras 60, 61 y 66). La producción de TNF- α , se inhibió en 62% cuando las células epiteliales fueron estimuladas de forma simultánea con *Salmonella typhi* CECT 725 (Figura 66).

La estimulación de las células epiteliales con *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 generó una cantidad de IL-8 significativamente menor, que la producida por las bacterias enteropatógenas. La estimulación simultánea de las células epiteliales con el probiótico y las bacterias enteropatógenas, *Escherichia coli* ETEC CECT 501, *Escherichia coli* ETEC CECT 515, *Escherichia coli* EPEC CECT 729 y *Salmonella typhi* CECT 725 inhibió casi por completo la producción de IL-8 generada por las bacterias enteropatógenas (Figuras 62, 63, 64 y 66). Así mismo, no fue capaz de inhibir la producción de IL-8 generada por la estimulación simultánea de *Salmonella typhimurium* CECT 4594 y *Escherichia coli* EPEC CECT 742 (Figuras 61 y 65). Por otro lado, la producción de TNF- α , solo fue inhibida por la estimulación conjunta de dicho probiótico

y *Escherichia coli* ETEC CECT 501 (88%), *Escherichia coli* ETEC CECT 515 (59%) y *Salmonella typhi* CECT 725 (76%) (Figuras 62, 63 y 66).

A



B

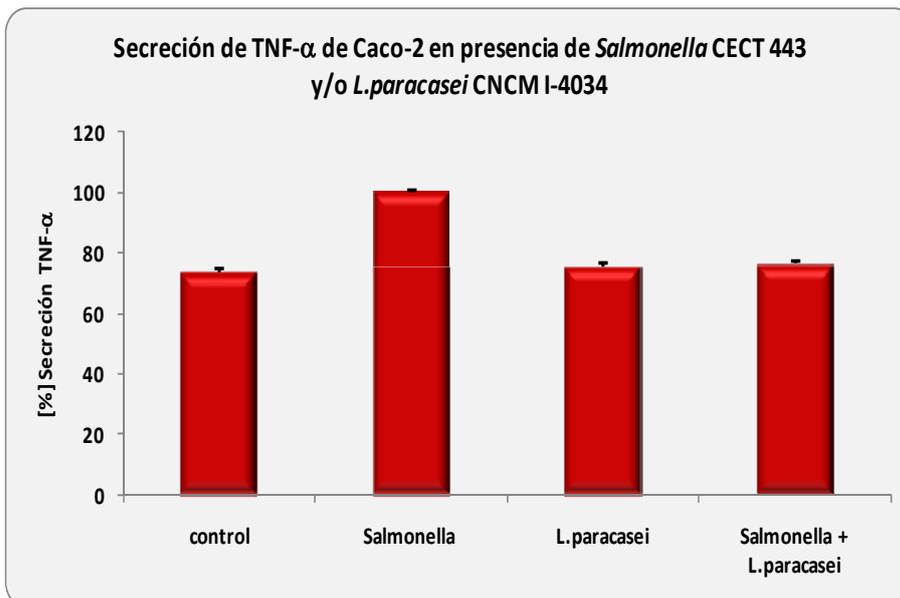
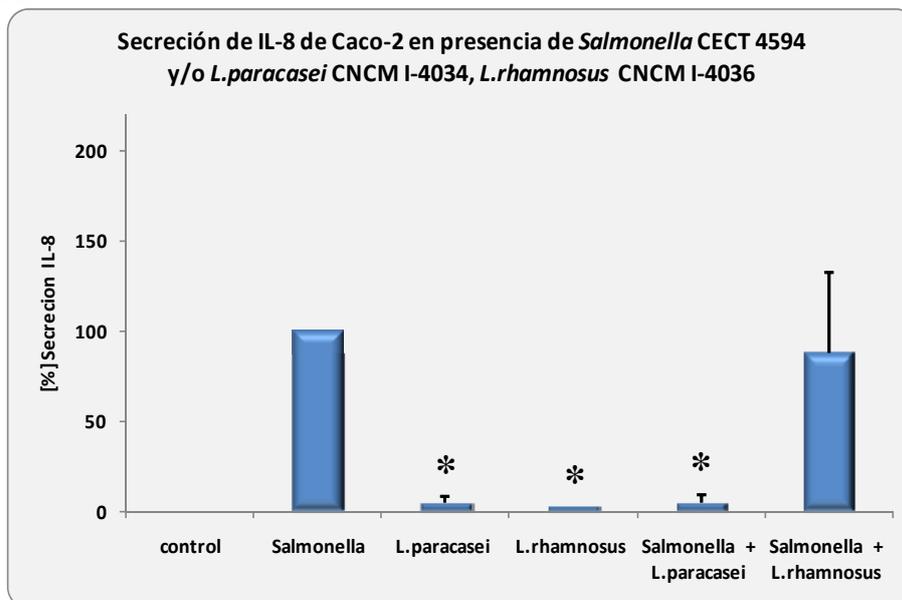


Figura 60. Porcentaje de secreción de IL-8 (A) y TNF-α (B), después de incubación y co-incubación de Caco-2 con *Salmonella* CECT 443 y/o cepa probiótica. El resultado de la incubación con *Salmonella* CECT 443 se considera como 100%. (*, $p < 0,05$; en comparación con *Salmonella* CECT 443).

A



B

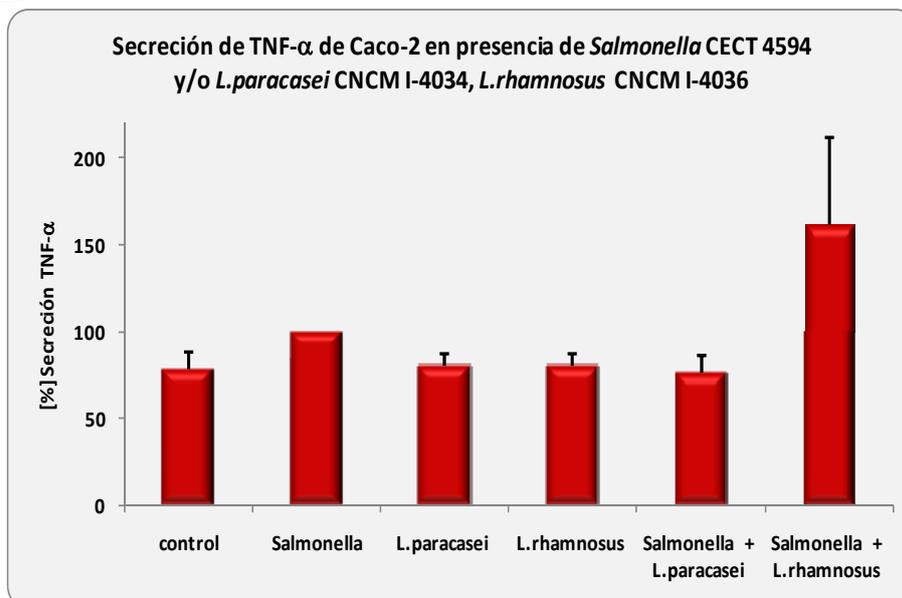
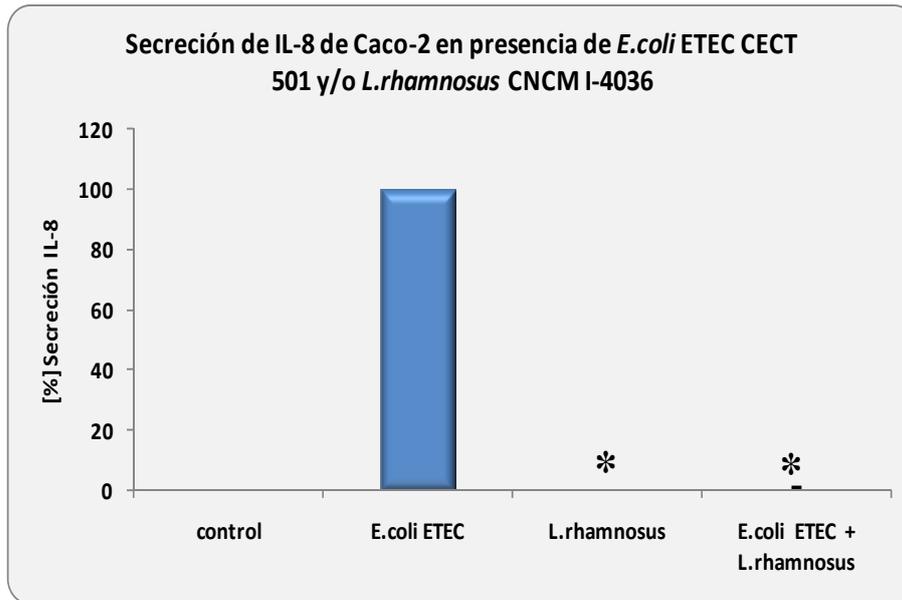


Figura 61. Porcentaje de secreción de IL-8 (A) y TNF- α (B), después de incubación y co-incubación de Caco-2 con *Salmonella* CECT 4594 y/o cepas probióticas. El resultado de la incubación con *Salmonella* CECT 4594 se considera como 100%. (*, $p < 0,05$; en comparación con *Salmonella* CECT 4594).

A



B

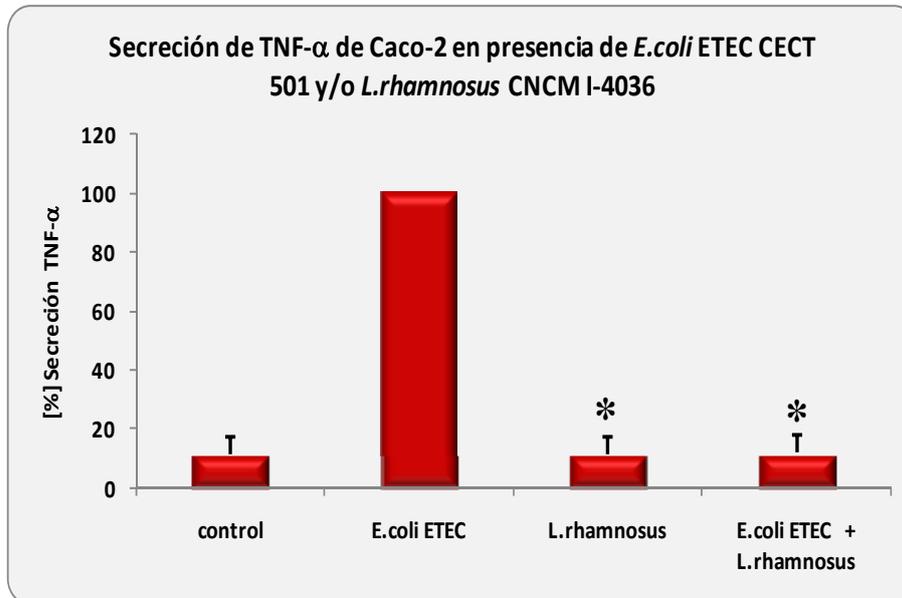
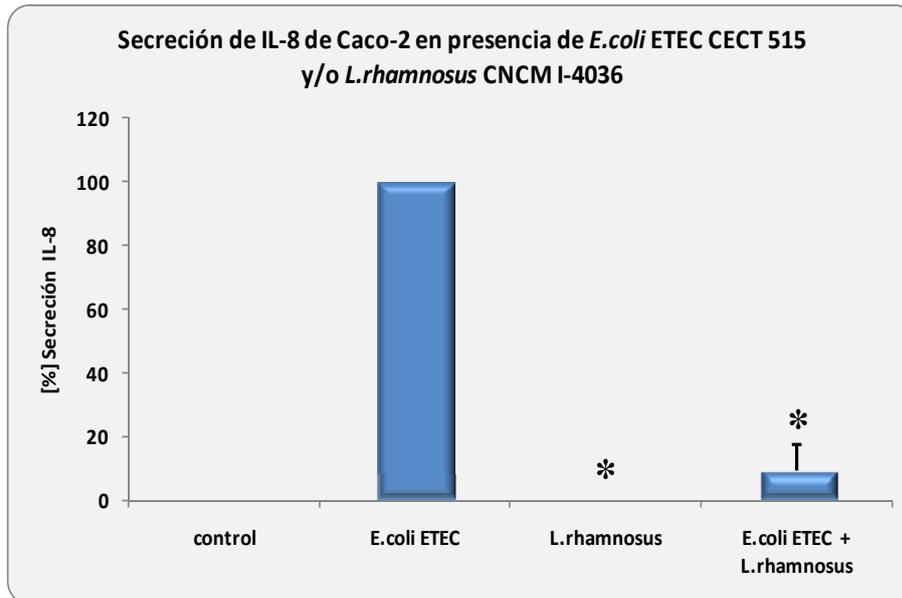


Figura 62. Porcentaje de secreción de IL-8 (A) y TNF-α (B), después de incubación y co-incubación de Caco-2 con *E.coli* ETEC CECT 501 y/o cepa probiótica. El resultado de la incubación con *E.coli* ETEC CECT 501 se considera como 100%.(*, $p < 0,05$; en comparación con *E.coli* ETEC CECT 501).

A



B

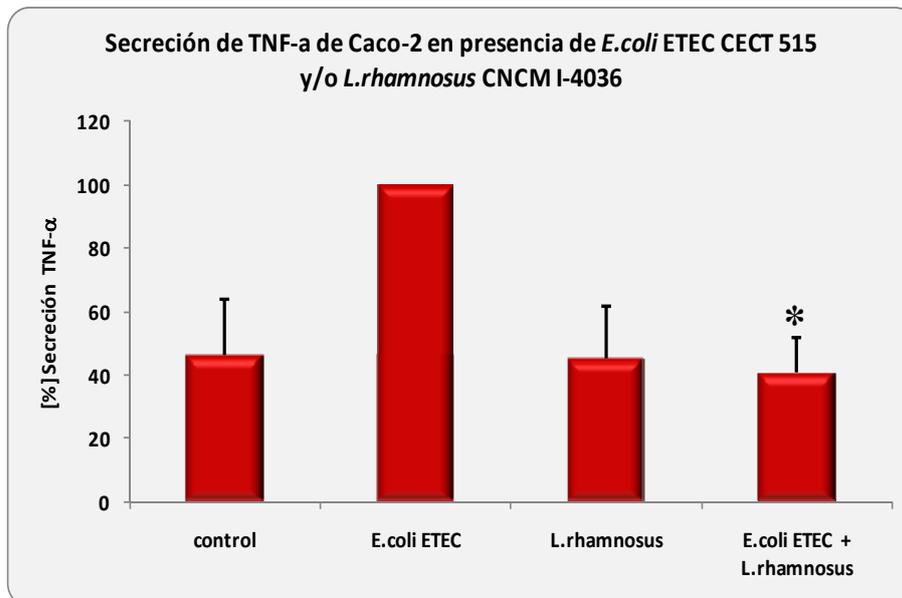
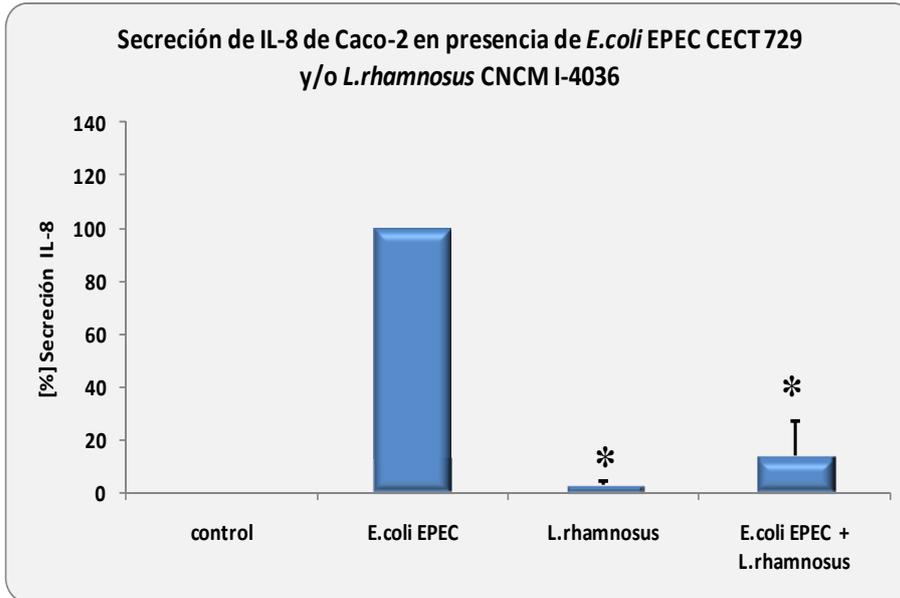


Figura 63. Porcentaje de secreción de IL-8 (A) y TNF- α (B), después de incubación y co-incubación de Caco-2 con *E.coli* ETEC CECT 515 y/o cepa probiótica. El resultado de la incubación con *E.coli* ETEC CECT 515 se considera como 100%.(*, $p < 0,05$; en comparación con *E.coli* ETEC CECT 515).

A



B

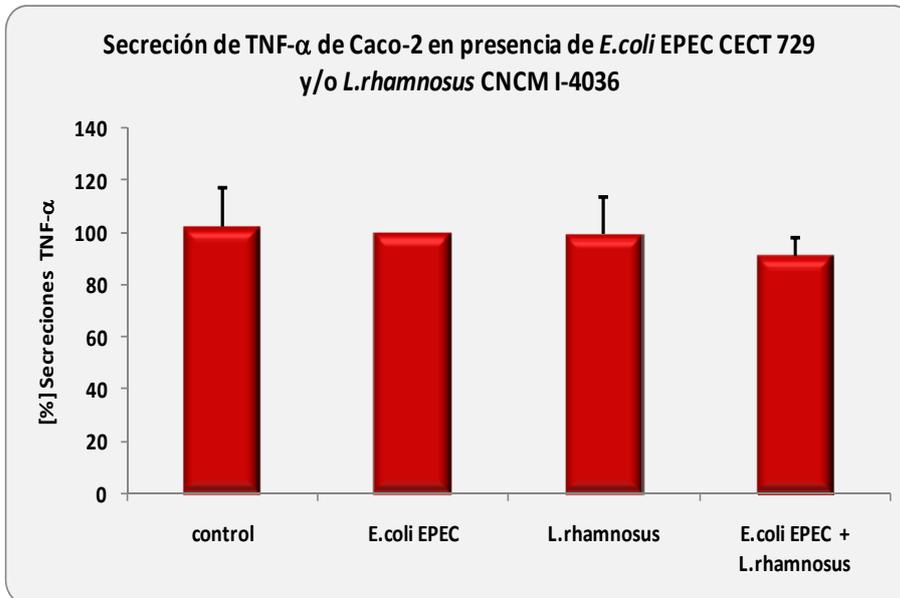


Figura 64. Porcentaje de secreción de IL-8 (**A**) y TNF-α (**B**), después de incubación y co-incubación de Caco-2 con *E.coli* EPEC CECT 729 y/o cepa probiótica. El resultado de la incubación con *E.coli* EPEC CECT 729 se considera como 100%.(*, $p < 0,05$; en comparación con *E.coli* EPEC CECT 729).

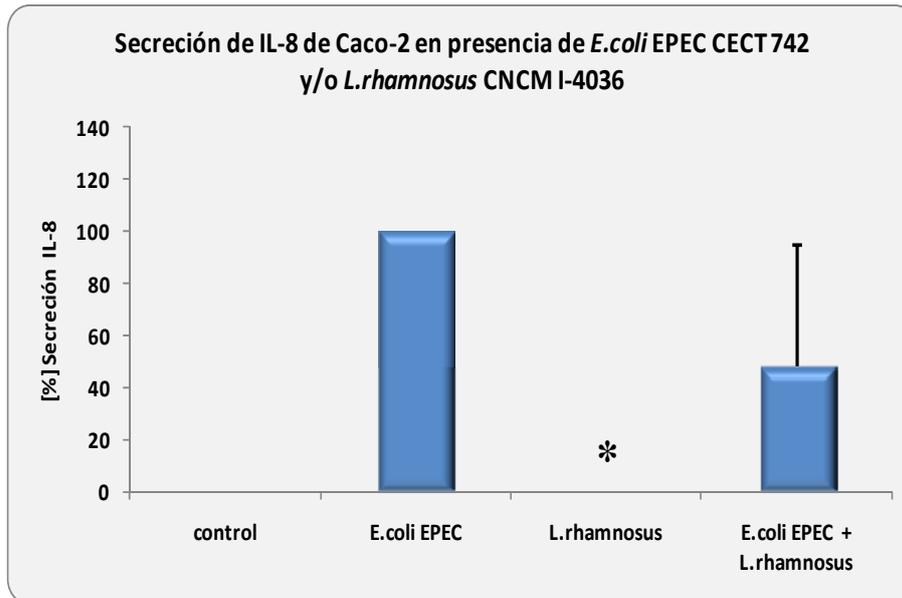
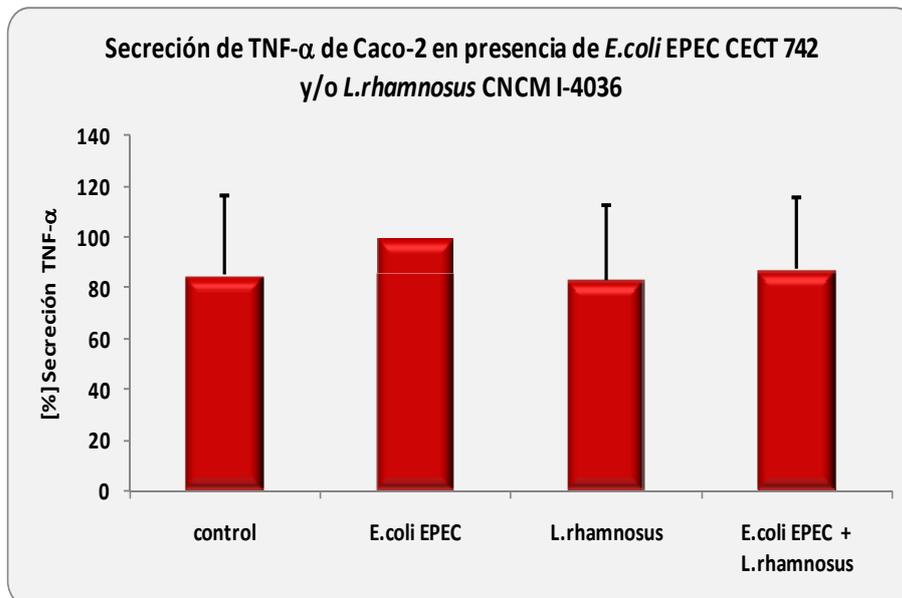
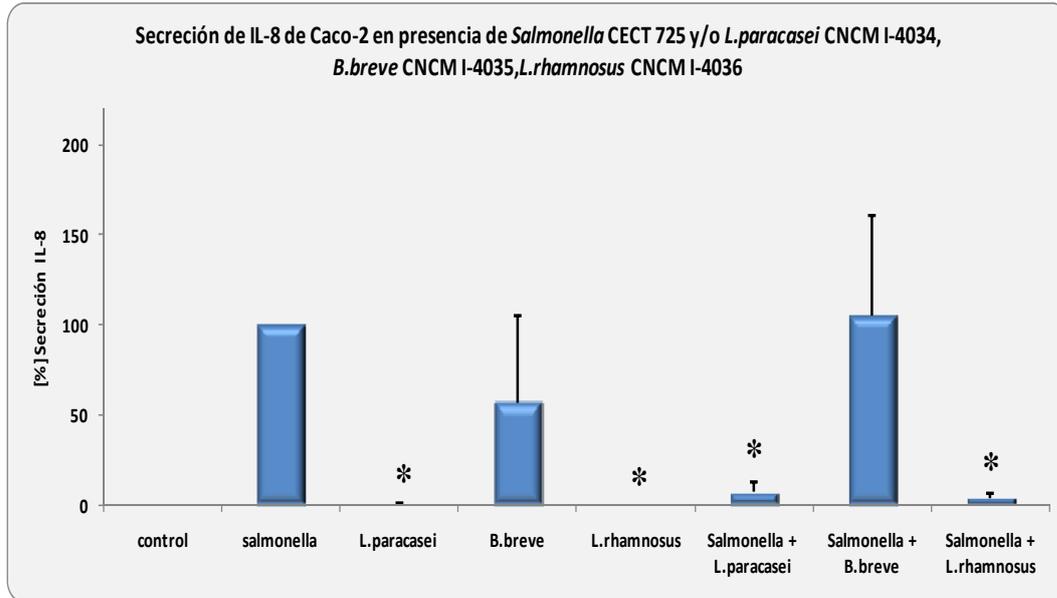
A**B**

Figura 65. Porcentaje de secreción de IL-8 (A) y TNF- α (B), después de incubación y co-incubación de Caco-2 con *E.coli* EPEC CECT 742 y/o cepa probiótica. El resultado de la incubación con *E.coli* EPEC CECT 742 se considera como 100%. (*, $p < 0,05$; en comparación con *E.coli* EPEC CECT 742).

A



B

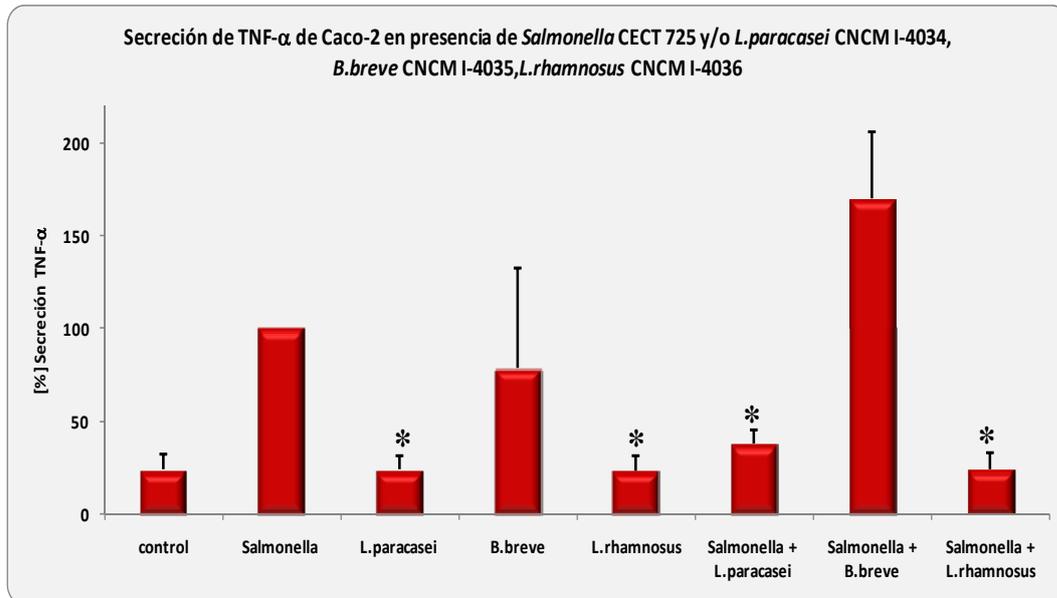


Figura 66. Porcentaje de secreción de IL-8 (A) y TNF- α (B), después de incubación y co-incubación de Caco-2 con *Salmonella typhi* CECT 725 y/o cepas probióticas. El resultado de la incubación con *Salmonella typhi* CECT 725 se considera como 100%.(*, $p < 0,05$; en comparación con *Salmonella typhi* CECT 725).

Discusión

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Los probióticos se definen como “microorganismos vivos que, que ingeridos en cantidades adecuadas, resultan beneficiosos para la salud” (FAO/WHO, 2001). Muchos de ellos, cuando se ingieren de forma habitual, modifican la ecología intestinal y son al menos transeúntes de la microbiota colónica. Los probióticos son principalmente bacterias, aunque también hay algunas levaduras, y la mayoría de ellas pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Sus efectos beneficiosos se ejercen a través de diversos mecanismos: producción de nutrientes, competitividad con patógenos intestinales por la adhesión al epitelio intestinal y nutrientes lumbinales, estimulación de la función de barrera del epitelio intestinal, producción y secreción de sustancias antimicrobianas, y una gran variedad de acciones sobre el sistema inmunitario. Los probióticos se consideran ingredientes de los denominados “alimentos funcionales” y en la actualidad existen muchos alimentos que los incluyen en sus formulaciones. Aunque los probióticos están siendo extensa e intensamente estudiados, aún no se conocen con detalle los mecanismos de acción por los que generan sus efectos beneficiosos.

Uno de los hallazgos principales de este estudio ha sido el aislamiento e identificación de tres cepas de bacterias procedentes de heces de lactantes, que se han considerado cepas innovadoras y que han sido depositadas en el Institut Pasteur con las siguientes denominaciones: *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036. Además, estas cepas presentan actividad probiótica ya que son capaces de inhibir el crecimiento de enteropatógenos en medio líquido, disminuir su adhesión y modular la respuesta inmunitaria de células intestinales de origen humano.

Aislamiento de bacterias probióticas

Una cepa con actividad probiótica debe cumplir ciertas características, entre ellas sobrevivir al paso a través del tracto gastrointestinal, resistiendo la acidez del estómago (pH 2,5-pH 3,5) (Holzapfel *et al.*, 1998), la presencia de sales biliares en el intestino delgado para alcanzar el colon (Ogles *et al.*, 2003) y la adhesión a células epiteliales intestinales, la cual es importante para la potencial colonización de las bacterias probióticas (Forestier *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003).

Resistencia a medios ácidos

En la evaluación de nuevas cepas se utilizan sistemas *in vitro* como incubaciones en sistemas de jugos gástricos reales o simulados (pH 2.0-4.0; 70-180 minutos) (Takahashi *et al.*, 2004). En el presente estudio las bacterias se incubaron a pH 3,0 durante 180 minutos, aunque la literatura habitualmente describe que 90 minutos debieran ser suficientes para simular el tiempo en que las bacterias transitan a través del estómago (Jin *et al.*, 1998). La justificación de utilizar 180 minutos, fue con el objeto de seleccionar cepas muy resistentes a las condiciones ambientales del sistema gastrointestinal, lo cual *a priori*, podría condicionar una amplia colonización.

Las cepas aisladas y los controles utilizados en este estudio presentaron una viabilidad cercana al 100% a pH 3,0. Sin embargo, cuando la exposición se realizó a pH 2.5 y 2.0, los microorganismos controles no presentaron viabilidad alguna, y solo la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 presentó una viabilidad cercana al 80%.

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Takahashi *et al.* (2004), en donde se describe que las bifidobacterias son muy sensibles a pH bajo y que su tolerancia al medio ácido varía enormemente dependiendo de la especie y cepa. Estos autores mostraron valores de resistencia a pH 3.0, durante 2 horas, inferiores al 10% para determinadas cepas de *B.infantis*, *B.breve*, *B.bifidum*, *B.adolescentis* y *B.longum*. Por otro lado, se ha descrito que cepas de bifidobacterias que presentan una alta viabilidad a pH 3.0 durante 3 horas, si son expuestas a pH 2.0 su viabilidad disminuye de forma importante después de 1 hora. (Matsumoto *et al.*, 2004). Estos antecedentes respaldan nuestros resultados, en donde observamos un viabilidad en torno al 100% para *B.longum* Rossel 71, *B.breve* CNCM I-4035 y cercana a 50% para *B.bifidum* BB536. Sin embargo, la viabilidad cayó a 0% cuando el pH disminuyó a 2.5 y 2.0.

En el caso de los lactobacilos, existen antecedentes que describen que estos presentan una mayor resistencia a las condiciones gastrointestinales, especialmente frente a la acidez y a las sales biliares (Ross *et al.*, 2005). Bolados-Martinez *et al.* (2009), estudiaron la resistencia a pH de 20 cepas de *Lactobacillus reuteri* mostrando valores entre 2 y 100% para incubaciones de 1 hora a pH 3,0. Otros estudios muestran que incubaciones de 1 hora a pH 2,5 de 27 *Lactobacillus* aislados de diferentes orígenes en su mayoría no presentan viabilidad (Klingberg *et al.*, 2005). En nuestro estudio hemos

observado que la cepa *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 presenta una viabilidad superior a 100% a pH 3,0, muy similar a la de los microorganismos controles comerciales utilizados.

Las bacterias poseen diversos mecanismos de adaptación, entre ellos existe la respuesta de tolerancia al ácido (ATR), un mecanismo en donde las bacterias se adaptan a los pH más letales (Samelis *et al.*, 2003). Esta característica puede generar que las cepas bacterianas presenten diferentes valores de viabilidad dependiendo del ambiente al que hayan sido expuestas previamente. Por ejemplo, se ha descrito que la supervivencia de *B. lactis* en medios ácidos (pH 3,5) puede aumentar si previamente han sido expuestas a pH 5,2 durante 30 o 60 minutos (Maus e Ingham, 2003). De hecho, se pueden obtener bifidobacterias mutantes ácido-resistentes con un fenotipo estable después de largas exposiciones en medios ácidos (16 h a pH 2,0) (Collado y Sanz, 2007).

Esta característica no ha sido estudiada en las cepas aisladas por nosotros, sin embargo, podría ser de gran interés, especialmente cuando interesa introducir cepas en alimentos fermentados. No obstante, estos procedimientos deberían ser considerados con cautela, ya que este tipo de adaptación podría producir importantes cambios en la sensibilidad a antibióticos de cepas de bifidobacterias (Collado y Sanz, 2007). De este modo, se ha descrito que diferentes cepas de bifidobacterias que han sido expuestas previamente a condiciones severas de acidez (pH 2,0, 60 minutos) aumentan su resistencia frente a aminoglucósidos, cloranfenicol, eritromicina y tetraciclina (Kheadr *et al.*, 2007).

El hecho de que las bacterias probióticas sean resistentes al medio ácido es una característica importante para la industria alimentaria, especialmente para el diseño de alimentos funcionales, ya que las bacterias pueden enfrentarse a condiciones ácidas durante periodos prolongados; esto es particularmente notable en el caso de productos fermentados donde una post-acidificación afecta negativamente a la viabilidad bacteriana (Jayamanne y Adams, 2006).

Resistencia a sales biliares

La tolerancia a las sales biliares también es otro criterio de selección *in vitro* de bacterias probióticas, ya que las primeras presentan una importante función en facilitar la

digestión de compuestos lipofílicos y son un potente agente antimicrobiano, influyendo directamente sobre el establecimiento de la microbiota intestinal. Algo muy parecido a lo que sucede con la tolerancia al ácido ocurre en el caso de resistencia a las sales biliares; así, los valores de resistencia para bifidobacterias y lactobacilos son muy variables dependiendo de la especie y de las cepas (Mainville *et al.*, 2005). Klingberg *et al.* (2005), han demostrado que concentraciones de 0,3% de ácidos biliares son muy bien toleradas por las bacterias; estas presentan resistencias de hasta 4 horas e incluso algunas crecen durante este periodo. Estos resultados coinciden con los del presente estudio; a igual concentración de ácidos biliares, las cepas aisladas y los controles muestran una buena resistencia a sales biliares. Incluso a concentraciones superiores (0,7%), las tres cepas aisladas crecen en un porcentaje superior al 100%.

La adaptación a sales biliares se ha relacionado con cambios en el perfil de fermentación de hidratos de carbono, actividad de glicosidasas (Ruas-Madiedo *et al.*, 2005), producción de exopolisacáridos (Ruas-Madiedo *et al.*, 2009; Burns *et al.*, 2010), cambios en la composición de ácido grasos y proteínas de membrana (Ruiz *et al.*, 2007), aumento de la adhesión al mucus humano (Gueimonde *et al.*, 2005) e inhibición de adhesión de patógenos (Gueimonde *et al.*, 2007). Se ha publicado la presencia de hidrolasas de las sales biliares (BSH) en cepas de lactobacilos y bifidobacterias (Begley *et al.*, 2006; Patel *et al.*, 2010), las cuales actúan como un mecanismo de resistencia contra la presencia de sales biliares. Análisis estadísticos no muestran una correlación entre la tolerancia a la sales biliares y BSH (Moser y Savage, 2001); sin embargo, la capacidad de las bacterias probióticas para desconjugar las sales biliares ha generado mucho interés desde que la ingesta de algunas de ellas se han relacionado con una disminución de los niveles de colesterol plasmático (Kumar *et al.*, 2011).

Adhesión a células epiteliales intestinales

Otro aspecto que es muy importante para el ingreso de los probióticos en la microbiota intestinal es la capacidad de adhesión sobre las células epiteliales intestinales, que evitaría que las cepas sean eliminadas debido a los movimientos peristálticos. Además, la adhesión es el primer paso para la colonización y es probablemente un pre-requisito para: la exclusión competitiva de enteropatógenos (Forestier *et al.*, 2001; Lee *et al.*, 2003), inmunomodulación del huésped (Ouweland *et al.*, 1999; Plant y Conway,

2002, Boesten y Vos, 2008) y antagonismo frente a patógenos (Collado *et al.*, 2010). Los valores de adhesión presentados por lactobacilos y bifidobacterias son muy variables (Klingberg *et al.*, 2005); por otro lado, existen diferentes métodos *in vitro* para estudiar esta variable, los cuales usualmente generan diferentes valores (Laparra y Sanz, 2009).

Entre los modelos *in vitro*, el uso de líneas celulares de epitelio intestinal humanas presenta importantes ventajas, ya que forman una monocapa homogénea celular que se asemeja al intestino (Lenaerts *et al.*, 2007). En nuestro caso, las propiedades de adhesión de las cepas se estudiaron utilizando las células HT-29. En este modelo, los controles de lactobacilos presentaron una adhesión (4%) que corresponde a la mitad de la que presentan los controles para bifidobacterias (8%), sin embargo, las cepas aisladas presentan una adhesión mayor que sus controles, llegando casi a duplicar los valores en ambas especies. Esta capacidad de adhesión a las células epiteliales intestinales, es muy importante, ya que, como se ha indicado anteriormente, está estrechamente relacionada con la capacidad de exclusión de las bacterias patógenas del epitelio intestinal.

Identificación de bacterias probióticas

Existen diferentes técnicas moleculares disponibles para la identificación, composición y enumeración del total de la comunidad bacteriana del intestino; la mayoría de ellas se basan en el estudio del gen 16S RNA ribosomal (rRNA). Durante la última década, el gen 16s rRNA ha revolucionado la manera de como los taxonomistas han clasificado e identificado las bacterias. El gen 16s rRNA comprende desde regiones altamente variables a altamente conservadas y las diferencias de secuencias se usan para determinar las relaciones filogenéticas y distinguir bacterias desde especies a cepas. Existen bases de datos disponibles con más de 200.000 genes 16s rRNA, por ejemplo NCBI/BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), *ribosomal database project*-RPD (<http://rpd.cme.msu.edu/html>) y EMBL (<http://www.embl-heidelberg.de/>), que comparan las secuencias del gen 16s rRNA existentes, con nuevas secuencias obtenidas.

Las cepas aisladas en nuestro estudio presentaron una alta homología con *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* y *Bifidobacterium breve*, lo que es consistente con los antecedentes que muestran que niños alimentados con leche materna presentan elevados recuentos de bifidobacterias en heces, entre 40-60% del total de la microbiota y donde *Bifidobacterium breve* se encuentra en porcentaje importante

(Harmsen *et al.*, 2000). También, existe un alto porcentaje de lactobacilos, principalmente *L.casei*, *L.paracasei*, *L.acidophilus*, entre otros (Heiling *et al.*, 2002, Satokari *et al.*, 2002).

El porcentaje de homología del gen 16s rRNA de las cepas aisladas es de 99-100%, de acuerdo con la base de datos NCBI/BLAST. Los fragmentos del gen 16s rRNA son de aproximadamente 1.4 kb, y los fragmentos secuenciados varían entre 1474bp para *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, 1274bp para *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 y 1118bp para *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035. Precisamente este último presenta una homología de 100% con *Bifidobacterium breve* ATCC 15700 y un clon no cultivable de *Bifidobacterium*. No se pudo obtener un fragmento más amplio debido a que los oligonucleótidos 27F y 1492R, que amplifican un fragmento de aproximadamente 1400bp, no fueron capaces de amplificar el gen 16s rRNA de la cepa aislada *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035. Por ello se utilizaron otros oligonucleótidos universales que amplifican fragmentos más pequeños, como son 39F y 1391R.

Los fragmentos secuenciados del gen 16s rRNA de las cepas de lactobacilos aisladas, presentan para una de ellas, homología del 99% con un grupo de *Lactobacillus rhamnosus*. Para la otra cepa aislada, existe una homología de 100% con una gran variedad de *Lactobacillus paracasei* y con un pequeño número de *Lactobacillus casei*. Para ampliar la información genómica de las cepas bacterianas estudiadas, se amplificó el espacio intergénico que está presente entre el gen 16s y 23s, el cual es conocido por presentar una gran variabilidad de tamaño (Barry *et al.*, 1991; Navarro *et al.*, 1992), y porque permite diferenciar especies de procariontes (Barry *et al.*, 1991). Los fragmentos del espacio intergénico de las cepas aisladas, muestran diferentes longitudes: 579bp *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, 512bp *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 y 182bp *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035. Los fragmentos intergénicos 16s-23s, se compararon con los que se encuentran en la base de datos del NCBI/BLAST, y los resultados mostraron una homología de 100% para la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 con *Lactobacillus rhamnosus* isolated TS1 y *Lactobacillus rhamnosus* PS1. Las bacterias que presentaban una mayor homología del gen 16s rRNA de la cepa *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, no coincidían con los obtenidos para el fragmento intergénico 16s-23s. Esto es debido a que están depositados en la base de

datos del NCBI/BLAST las secuencias del gen 16s rRNA y no las del fragmento intergénico 16s-23s y viceversa.

Con respecto a la cepa *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, los fragmentos del gen 16s rRNA y espacio intergénico 16s-23s mostraron en ambos casos una homología del 100% con *Lactobacillus casei* ATCC 334. En este caso, la base de datos NCBI/BLAST contiene el genoma completo de *Lactobacillus casei* ATCC 334, por lo que existe una probabilidad que la cepa que aislamos coincida realmente con *L.casei* ATCC 334. Muy recientemente, durante el transcurso de redacción de la presenta memoria, por parte de la empresa Biópolis SA, se ha llevado a cabo la secuenciación completa de la cepa *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 comprobándose que se trata de una cepa única (Ramón D, Biopolis S.A. Comunicación Personal 2011).

En el caso de la cepa de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 el fragmento intergénico 16s-23s amplificado fue bastante pequeño. Asimismo, se amplificó el de los controles, lo que dio como resultado: 165bp para *Bifidobacterium longum* y 298bp para *Bifidobacterium bifidum*. Esto ratifica la existencia de una gran variabilidad en el tamaño del fragmento intergénico entre diferentes especies y cepas de las bifidobacterias. Posteriormente, se alinearon las cepas controles para bifidobacterias, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y la cepa *B.breve* strain Y8 (99% de homología). Como resultado de esta alineación, se observa una gran diferencia entre los controles y las cepas de *Bifidobacterium breve*. Sin embargo, solo hay una base de diferencia entre nuestra cepa y la que presenta una homología del 99% (*Bifidobacterium breve* 16S-23S internal transcribed spacer (ITS), strain Y8). No obstante, esta cepa es totalmente diferente a la cepa *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, que muestra una homología de 100% para el 16s rRNA.

Una de las desventajas de la secuenciación del 16s rRNA es que esta se encuentra muy conservada a nivel de especies y subespecies, por lo que diferentes especies de bacterias ácido lácticas han mostrado compartir prácticamente idéntica secuencia (Lorca y Font de Valdez, 2009). Por tanto, la mejor forma de clasificar taxonómicamente a las bacterias es utilizando la secuenciación del genoma completo; sin embargo, la secuencia de genomas disponibles de lactobacilos y bifidobacterias son muy escasos, aunque muchos se están desarrollando actualmente (www.genomesonline.org).

En nuestro estudio, también se utilizaron dos kits para el análisis de especies, uno de fermentación de hidratos de carbono (API 50CH) y otro de actividad enzimática (API ZYM). Estos constituyen un método rápido y teóricamente reproducible para la identificación fenotípica de cultivos bacterianos puros. Estos tests han sido utilizados para la caracterización e identificación de lactobacilos en leche (Medina *et al.*, 2001), yogur y otros productos fermentados lácteos (Andrighetto *et al.*, 1998, Bouton *et al.*, 1998 y De Angelis *et al.*, 2001). Inicialmente fueron desarrollados para identificar cepas de lactobacilos de uso clínico, aunque la base de datos del fabricante no está actualizada para algunas especies de lactobacilos (Andrighetto *et al.*, 1998 y Collins *et al.*, 1993); sin embargo, proporcionan una información valiosa para caracterizar fenotípicamente las cepas aisladas.

Los resultados muestran que las cepas aisladas *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 presentan una alta actividad de α -galactosidasa. Esto puede considerarse un hecho importante, ya que la hidrólisis de azúcares específicos como α -D-galactosil-oligosacáridos, muchos de ellos presentes en leche materna (Ninonuevo *et al.*, 2006), permite una proliferación selectiva de bifidobacterias en el tracto intestinal (Gopal *et al.*, 2001; Gulewicz *et al.*, 2002). De hecho, hay pocas cepas de otros orígenes y género incluidos los lactobacilos que presenten esta capacidad (Gopal *et al.*, 2001). Por otro lado, las cepas de lactobacilos y bifidobacterias aisladas, al igual que los controles, no presentan actividad β -glucuronidasa, lo cual sería una característica favorable, ya que ésta enzima es producida por bacterias fecales que también tienen actividades nitroreductasa y azoreductasa, que convierten numerosos pro-carcinógenos en carcinógenos (Kurman, 1988). Nanno *et al.* (1986), demostraron que extractos de bacterias con actividad β -glucuronidasa, aumentan la activación mutagénica de metabolitos biliares de benzopireno, mientras que extractos de bacterias sin actividad β -glucuronidasa no presentan esta activación. En resumen, se puede afirmar que las bacterias aisladas en nuestro estudio, al presentar baja actividad frente a otras fuentes de carbono como son manosa, fucosa y glucurónidos, prefieren la lactosa y glucosa como fuentes de carbono para su metabolismo, aunque la cepa aislada *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, también presenta una actividad enzimática para la fermentación de la α -fucosa. En este sentido es importante señalar que una gran parte de los oligosacáridos neutros presentes en la leche materna contienen fucosa; de hecho el

oligosacárido más abundante de la leche humana es el 2'-fucosil-lactosa (Newburg *et al.*, 2004).

Con respecto a los resultados de fermentación de hidratos de carbono, el perfil de los controles lactobacilos es muy parecido al de las cepas aisladas, y al que presentan otros lactobacilos (Charteris *et al.*, 2001). Las bacterias aisladas, producen fermentación frente a L-rhamnosa, resultados que coinciden con los mostrados por algunos *L.rhamnosus* y *L.paracasei* (Charteris *et al.*, 2001). Otro aspecto que merece la atención es la capacidad de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 de fermentar inulina, actividad que no presentan sus controles. Este polisacárido clasificado como prebiótico es utilizado en productos comerciales, y ha demostrado incrementar el número de bifidobacterias en el colon (Meyer y Stasse-Wolthuis, 2009; Roberfroid *et al.*, 1998; Van Loo *et al.*, 1999). Ciertas cepas de lactobacilos, como *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus paracasei*, son capaces de crecer en presencia de estos prebióticos, lo cual no es una propiedad común entre los lactobacilos (Cebeci y Gurakan, 2003; Makras *et al.*, 2005). Para confirmar la capacidad de las cepas aisladas de utilizar la inulina o α -fucosa como fuente de energía habrá que hacer en el futuro un estudio más específico, ya que se ha encontrado que el patrón de fermentación de algunos lactobacilos no siempre es el típico, y esta variación podría resultar de la pérdida o ganancia de plásmidos, llevando a una inconsistencia en el perfil metabólico, ya que la mayoría de las proteínas involucradas en la fermentación de hidratos de carbono se encuentran codificadas en plásmidos (Arhné *et al.*, 1989).

Efecto sobre el crecimiento de bacterias patógenas

Una parte fundamental de este estudio ha sido evaluar la actividad probiótica de las tres cepas aisladas frente a enterobacterias. Estos patógenos son responsables de la diarrea infecciosa, una de las principales causas de muerte infantil en países en desarrollo y que se acentúa durante el primer año de vida. Además, el género *Salmonella* puede producir un amplio rango de enfermedades, desde gastroenteritis hasta fiebres tifoideas (Holoda *et al.*, 2005; Köhler *et al.*, 2003). Asimismo, las cepas patógenas de *E.coli* tienen especial interés ya que son la mayor causa de diarrea en humanos y animales (Vu-Khac *et al.*, 2004).

Las cepas probióticas producen una gran variedad de compuestos antibacterianos, como ácidos orgánicos (ácido láctico, acético y fenil-láctico), y otras sustancias como peróxido de hidrógeno y ácidos grasos (Wohlgemuth *et al.*, 2010). Los ácidos orgánicos se producen mayoritariamente durante el crecimiento de los probióticos y por su naturaleza ácida provocan una disminución de pH en el tracto gastrointestinal que posee un efecto bactericida o bacteriostático. Estas sustancias tienen la capacidad de afectar a bacterias enteropatógenas (Forestier *et al.*, 2001; O'hara *et al.*, 2007), por lo que utilizar el sobrenadante del crecimiento de bacterias probióticas, donde se puede encontrar este tipo de sustancias puede tener efectos sobre el crecimiento de las bacterias enteropatógenas (Fukuda *et al.*, 2011; Miyazaky *et al.*, 2010).

Un importante hallazgo de este trabajo es que los sobrenadantes de las cepas probióticas aisladas son capaces de inhibir el crecimiento de enteropatógenos en medio líquido con un efecto cepa-específico. El sobrenadante de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 inhibió el crecimiento de las cepas *Salmonella* ensayadas. Este efecto se debió principalmente al sobrenadante no neutralizado, lo que sugiere que la producción de ácidos u otros compuestos procedentes de la fermentación limitan el crecimiento de los patógenos.

Para *Salmonella typhi* CECT 725, el efecto inhibitorio del sobrenadante de *L.paracasei* CNCM I-4034 se observó tanto a concentración 1% como a 4%, independientemente de la neutralización del sobrenadante. Los resultados muestran una inhibición que varía de 23% a 40%, dependiendo del sobrenadante utilizado. Estos resultados concuerdan con los descritos por Jankowska *et al.* (2008), que muestran que *Lactobacillus paracasei* tiene efectos sobre *Salmonella enterica*, a través de la síntesis de algún péptido antimicrobiano o debido a la sinergia generada entre la producción de ácido láctico y alguna sustancia de naturaleza proteica (Jankowska *et al.*, 2008). Así, de este modo, las sustancias ácidas no parecen ser necesariamente las causantes de tal inhibición, por lo que nuestros datos sugieren que *Lactobacillus paracasei* produce algún tipo de bacteriocina u otro factor de naturaleza desconocida que estaría ejerciendo este efecto sobre el patógeno.

El sobrenadante de la bacteria *B.breve* CNCM I-4035 inhibe el crecimiento de *Salmonella typhi* CECT 725 entre 15 y 48%, bajo cualquier condición (17 y 24 h de crecimiento; neutralizado y no neutralizado; 1% y 4%). Se ha descrito que varias cepas

del género *Bifidobacterium* sintetizan sustancias antimicrobianas, distintas a los ácidos orgánicos (Collado *et al.*, 2005). Estos compuestos, presentes en el sobrenadante concentrado de las bifidobacterias son muy activos frente a bacterias patógenas. Así, se ha comprobado que cepas del género *Bifidobacterium* muestran una potente actividad frente a enteropatógenos como *Salmonella typhimurium* y *E.coli*, atribuida a la producción de moléculas lipofílicas de bajo peso molecular (Liévin *et al.*, 2000).

Varios autores apuntan a que la producción de ácidos orgánicos es el mecanismo por el cual las bifidobacterias son capaces de inhibir enteropatógenos (Makras y de Vuyst, 2006; Morita *et al.*, 2002). Esta generación de ácido no sólo tiene un efecto antipatogénico, sino que posee un papel fundamental en el mantenimiento de la ecología microbiana y la funcionalidad de los colonocitos (Stratiki *et al.*, 2007). Incluso se ha relacionado directamente la producción de acetato de la bifidobacteria con la protección frente a infecciones enteropatógenas (Fukuda *et al.*, 2011).

Por otra parte, en el sobrenadante de la bacteria *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 se apreció una inhibición (10% y 50%) significativa del crecimiento de todos los grupos de enteropatógenos ensayados. Este efecto se observó principalmente con el sobrenadante no neutralizado, lo que sugiere que esta actividad se debe a los productos ácidos derivados de la fermentación que limitan el crecimiento de los patógenos (Lima *et al.* 2007). De Keersmaecker *et al.* (2006), han propuesto que la producción de ácido láctico es el responsable del efecto inhibitorio de *Lactobacillus rhamnosus* sobre *Salmonella typhimurium*. Asimismo, no se descarta que este efecto sea la suma de la producción de ácidos orgánicos y de bacteriocinas, que solo sean activas a pH ácido. Por ejemplo, *L.rhamnosus* GG produce una bacteriocina a pH 3.0-5.0, con fuerte actividad antibacteriana frente a microorganismos *Gram* positivos y *Gram* negativos (Lin *et al.*, 2007).

En el caso de *E. coli* EPEC CECT 742 y *Salmonella typhimurium* CECT 4594 se observó que estas fueron inhibidas por el sobrenadante neutralizado. Este efecto puede ser atribuido, como en casos anteriores, a la presencia de algún tipo de factor o bacteriocina, procedente del medio de crecimiento de la bacteria probiótica. Existen dos mecanismos de acción por los que las bacteriocinas son capaces de destruir a los patógenos: permeabilizando las membranas de las bacterias patógenas o interfiriendo con enzimas esenciales (Bierbaum y Sahl, 2009).

Nuestros datos demuestran que el efecto inhibitorio es altamente específico y depende de la cepa, tanto de la probiótica como del patógeno. Resultados similares han sido descrito por otros autores (Gueimonde *et al.*, 2006; Salminen *et al.*, 2010).

Por otra parte cabe destacar, que en algunos casos, el crecimiento de la bacteria patógena se ve favorecido de forma significativa en presencia del sobrenadante de la bacteria probiótica. Probablemente, esto se deba a los nutrientes que aporta el sobrenadante, que enriquecen el medio de cultivo, lo cual hace que las bacterias patógenas presenten un crecimiento mayor. También, se han descrito que algunas cepas de *Propionibacterium* producen un sustancias estimuladoras del crecimiento (Kouya *et al.*, 2007).

Inhibición de la adhesión a células epiteliales intestinales de enterobacterias mediada por los probióticos

Otro propósito de este estudio fue la búsqueda de nuevas metodologías que permitiesen valorar la adhesión e inhibición de las bacterias patógenas y probióticas a células epiteliales intestinales con mayor precisión. Hasta ahora, esta determinación se realiza por metodologías convencionales. El método de dilución en placa es una técnica tediosa, requiere días para conocer el resultado y no es reproducible. Además, subestima el número real de bacterias, debido a daños celulares o a fenómenos de agregación. Por otro lado, en el caso de bacterias anaerobias estrictas, el oxígeno presente en el aire reduce considerablemente la viabilidad mientras se siembra la placa y esto constituye otra variable que afecta al recuento y al número real de la población bacteriana. Siguiendo con la metodología clásica, otros autores tiñen las bacterias con Giemsa y observan al microscopio cuantas se tiñeron antes y después de la administración del probiótico. Es un método sencillo, pero sometido a numerosos errores de carácter subjetivo. Como técnicas alternativas a la metodología tradicional se propuso la posibilidad de utilizar la técnica de PCR cuantitativa.

La técnica de la PCR cuantitativa tiene alta precisión y reproductibilidad. Es capaz de detectar una única copia de un fragmento del DNA problema (Klein, 2002), que se puede guardar hasta su análisis sin sufrir alteración (Castillo *et al.*, 2006). Asimismo, es una técnica muy rápida, ya que en tres horas se obtienen resultados (Matijašić *et al.*, 2010). Como es un sistema cerrado, el riesgo de contaminación es mínimo, y al no

requerir pasos posteriores, tampoco existe la posibilidad de contaminación cruzada (Espy *et al.*, 2006). Con esta metodología puesta a punto, se observa que la población del patógeno respecto a la inicial se reduce considerablemente en presencia de uno de los sobrenadantes de la bacteria probiótica, lo que sugiere que esta técnica es adecuada para la determinar la adhesión.

Existen varios trabajos recientes en los que se utiliza la PCR cuantitativa como una alternativa a la metodología convencional, tanto para detectar y determinar microorganismos viables, como para cuantificar el porcentaje de adhesión (Matijašić *et al.*, 2010; Candela *et al.*, 2008). McGuinness *et al.* (2009), han descrito el uso de esta técnica como una alternativa a la metodología tradicional para la detección de patógenos (*Salmonella*) en alimentos.

El sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 de 17 horas, neutralizado o no, inhibe la adhesión de *Salmonella typhi* CECT 725. Sin embargo, no observamos una disminución significativa de la adhesión cuando utilizamos directamente la cepa *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 frente a los patógenos. La inhibición producida por el sobrenadante se puede deber a que algún componente de este afecta la capacidad de adhesión de la *Salmonella typhi* CECT 725, ya que se ha descrito que la presencia de diferentes sustancias como calcio o exopolisacáridos producidos por bacterias probióticas pueden modificar la adhesión al mucus intestinal (Ruas-Madiedo *et al.*, 2006; Larsen *et al.*, 2007).

Existen varios estudios *in vitro* que describen inhibición en diferentes modelos y que incluso utilizan este tipo de técnica para valorar la adhesión de *Bifidobacterium* a células epiteliales intestinales (Liu *et al.*, 2010). Más aún, otros investigadores han comprobado con esta metodología que distintos probióticos como *Bifidobacterium longum* o *Lactobacillus plantarum* son capaces de inhibir la adhesión de *Salmonella* (Candela *et al.*, 2008). Por ello consideramos que la causa por la que las bacterias aisladas en algunos casos no inhiben la adhesión es debido a que no intervienen sobre los factores de adhesión de las bacterias patógenas, más que por un problema de la técnica en sí.

Probablemente, nuestro modelo experimental sea susceptible de modificar, ya que posiblemente la relación utilizada de bacterias probióticas y patógenas (1/1) pudiera no

representar un modelo fisiológico, debido a que las bacterias patógenas llegan a un ambiente donde la microbiota se encuentra establecida, por lo que quizás una relación bacteria probiótica/bacteria patógena de 10/1 o 100/1 pudiera ser más real. De hecho, recientemente se han descritos modelos experimentales que utilizan esta relación para desarrollar estudios de adhesión, en los que se observan diferencias sustanciales (Ostad *et al.*, 2009). Por otro lado, también existe la posibilidad de utilizar otras líneas celulares como HT29-MTX, las cuales producen mucus y podrían imitar mejor las condiciones del intestino (Collado *et al.*, 2010).

Inmunomodulación

Las comunidades de bacterias que existen en el intestino, forman uno de los hábitats más densamente poblados por microorganismos conocidos en biología. El epitelio intestinal y su sistema inmunitario asociado son la primera línea de defensa. Más aún, el sistema inmunitario intestinal es la parte más amplia y compleja del sistema inmunitario global (Mowat, 2003). En una situación de constante estimulación inmunológica, la conservación de un equilibrio homeostático entre tolerancia e inmunidad plantea un desafío para el sistema inmunitario mucoso. La alteración de este balance puede contribuir a la patogénesis de numerosas situaciones inflamatorias, incluyendo alergias alimentarias, enfermedades inflamatorias intestinales y cáncer intestinal (Artis, 2008). Se ha demostrado que la homeostasis intestinal está regulada por una interrelación entre los enterocitos y las células del sistema inmunitario, especialmente por las células dendríticas (Zoumpapoulou *et al.*, 2008).

Las células epiteliales intestinales que inicialmente fueron consideradas solo como una barrera física para el medio ambiente externo, hoy en día se consideran parte integral de: la discriminación entre bacterias patógenas y comensales, y de la regulación posterior de la respuesta inmune (Artis, 2008).

Nuestros resultados muestran claramente que el modelo de células epiteliales intestinales Caco-2 responde de forma diferencial en la producción de citoquinas frente a bacterias patógenas y probióticas. En nuestro caso se utilizó una proporción de 1/10 patógeno/probiótico. Los resultados obtenidos, muestran que la presencia de las cepas probióticas *L.paracasei* CNCM I-4034 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036 inhiben la producción de IL-8 y TNF- α de las células Caco-2, inducidas por enterobacterias. El

estimulo de la producción de IL-8 de las células Caco-2, es significativamente menor cuando se incuban de forma separada con cada una de las bacterias probióticas aisladas que cuando se incuban conjuntamente con enteropatógenas. En algunos casos la producción de IL-8 es menor a 1% del estímulo que producen las enteropatógenas. Esto refleja una respuesta inmunitaria diferente de las células epiteliales, probablemente a través del sistema inmune innato. Las moléculas de la pared celular de bacterias probióticas y enteropatógenas son diferentes, siendo ligandos para los receptores del sistema inmunitario innato que desencadenan una señalización intracelular; este fenómeno probablemente permite al sistema inmunitario discriminar entre bacterias probióticas y enteropatógenas (Lebeer *et al.*, 2010).

La respuesta de las células epiteliales frente a las co-incubaciones de bacterias enteropatógenas y probióticas depende del tipo de cepa. La cepa *L.paracasei* CNCM I-4034, inhibe la producción de IL-8 en la co-incubación con *Salmonella* CECT 443 (-76%), *Salmonella* CECT 4594 (-95%), e inhibe la producción IL-8 y TNF- α frente a *Salmonella* CECT 725 (-93% y -62%, respectivamente).

La cepa *L.rhamnosus* CNCM I-4036 muestra efectos inhibitorios frente a mayor número de enteropatógenos. Inhibe la producción de IL-8 en la co-incubación frente a *E.coli* EPEC CECT 729 (-86%), e inhibe IL-8 y TNF- α frente a *E.coli* ETEC CECT 501 (-99%; -88%), *E.coli* ETEC CECT 515 (-90%; -59%) y *Salmonella* CECT 725 (-96%; -76%, respectivamente).

En el caso de la cepa *B.breve* CNCM I-4035, esta no muestra efectos inhibitorios sobre IL-8 y TNF- α frente a ninguna bacteria enteropatógena.

Nuestros resultados muestran de forma global que las cepas aisladas provocan una muy importante inhibición de la secreción de IL-8 y TNF- α de las células epiteliales intestinales cuando son expuestas de forma simultánea con bacterias enteropatógenas. Este efecto, una vez más, es específico de cada cepa. La secreción de IL-8 se ve más afectada y en mayor magnitud que TNF- α , situación que puede deberse a que, a pesar que ambas están involucradas en procesos inflamatorios, los componentes del sobrenadante probablemente afectan más la vía secretora relacionada con IL-8 que con TNF- α .

Es bien conocido que la IL-8 secretada por células epiteliales intestinales atrae y activa neutrófilos, basófilos, linfocitos y monocitos en la lámina propia (Beutler, 2004; Campbell *et al.*, 2001). Así mismo, la producción de una potente citoquina pro-inflamatoria como es TNF- α , produce un estado pro-inflamatorio cuando las células epiteliales intestinales son infectadas por bacterias enteropatógenas. Este estado puede ser revertido por la presencia de bacterias probióticas, como ocurre en nuestro estudio, lo cual podría modular la respuesta inflamatoria. Además esta respuesta probablemente podría regular la expresión de ciertos receptores del sistema inmunitario innato, como los TLRs (Vizoso Pinto *et al.*, 2009).

La relación entre inflamación crónica y cáncer está bien establecida (Aggarwal *et al.* 2006). Los efectos anti-cancerígenos de *L.helveticus* son mediados por una disminución de la producción de citoquinas proinflamatorias, en particular de IL-6 (de Moreno de LeBlanc *et al.*, 2006; Rachid *et al.*, 2006). Estudios que utilizan modelos similares a los de este estudio, también, han descrito que lactobacilos y bifidobacterias suprimen la producción de IL-8 (Bai *et al.*, 2006; Ma *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2005). Borrueal *et al.* (2002), mostraron una inhibición de la producción de TNF- α en muestras obtenidas de pacientes con enfermedad de Crohn tratados *ex vivo* con lactobacilos, sin embargo, no sucedió lo mismo en las muestras control. Por otro lado, se ha descrito que los efectos antiinflamatorios de *L.casei* estarían mediados por la señalización de NF κ B (Tien *et al.*, 2006).

Estos resultados proporcionan una importante información para describir la actividad inmunomoduladora y anticancerígena de los probióticos; sin embargo, este efecto está altamente relacionado con el tipo de cepa, observándose diferentes respuestas frente a diferentes cepas enteropatógenas. En el caso de *B.breve* CNCM I-4035 no obtuvimos ninguna variación sobre la producción de citoquinas pro-inflamatorias estimuladas por bacterias enteropatógenas. Una variable que puede ser de importancia es la relación enterobacteria/probiótico 1/10 utilizada. Quizás la relación 1/100 influya favorablemente sobre la respuesta que las bacterias probióticas generan sobre las células epiteliales, y esto se asemeje mas a una condición real, donde una bacteria patógena llega al intestino ya colonizado (Stöber *et al.*, 2010; Ostad *et al.*, 2009).

La secreción de estas dos citoquinas pro-inflamatorias en nuestro modelo, es de gran utilidad para poder evaluar uno de los mecanismos por los cuales se les ha atribuido a los probióticos sus efectos beneficiosos sobre la salud humana, como es la inmunomodulación. Sin embargo, esto no es suficiente para poder entender los mecanismos involucrados en la respuesta inmunitaria e inflamatoria, por lo que es necesario efectuar estudios que puedan incluir no solo secreción de citoquinas, si no también, expresión de proteínas involucradas en las cascadas intracelulares y en el sistema inmune innato, tales como aquellas relacionadas con los TLR, proteína de diferenciación mieloide 88 (MYD88), proteínas quinasas asociadas a IL-1R (IRAKs), y NF- κ B (Rahman y Mc Fadden, 2011).

A modo de resumen se puede indicar que en el presente estudio se han aislado tres cepas de bacterias probióticas, las cuales han superado los criterios de una bacteria potencialmente probiótica (FAO/WHO, 2002). Estas han mostrado tener actividad antibacteriana frente a enteropatógenos: inhibiendo su crecimiento e inhibiendo su adhesión a células epiteliales intestinales. Por otra parte, presentan actividad inmunomoduladora, disminuyendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias de las células epiteliales intestinales.

Es necesario llevar a cabo estudios más amplios para dilucidar los mecanismos involucrados en los efectos probióticos. Profundizar en los mecanismos de inmunomodulación y de tolerancia está siendo foco de atención en esta área de estudio. Utilizar técnicas moleculares para estudiar la expresión génica de las proteínas involucradas en la cascada inflamatoria, utilizando modelos *in vitro* que puedan integrar más células responsables de la respuesta inmunitaria, como pueden ser células dendríticas o células T, las cuales en conjunto con las epiteliales, pueden generar más información sobre la orquestación de la respuesta inmunitaria frente a bacterias probióticas y patógenas, representan, sin duda, los estudios futuros a realizar, parte de los cuales se están desarrollando actualmente por nuestro grupo de investigación.

Conclusiones

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1) Se han aislado tres cepas de bacterias lácticas a partir de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna que presentan una alta resistencia a pHs ácidos y a las sales biliares, así como una adherencia relativamente elevada a células epiteliales intestinales HT-29. Las cepas aisladas se consideran únicas por sus características genéticas y metabólicas, y han sido depositadas y codificadas por el INSTITUT PASTEUR como: *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036.
- 2) Los sobrenadantes de las cepas probióticas aisladas inhiben el crecimiento de bacterias enteropatógenas en medio líquido de manera específica:
 - a) El sobrenadante ácido de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 inhibe el crecimiento de *Salmonella typhimurium* CECT 443 y CECT 4594, y de *Salmonella typhi* CECT 725, y el sobrenadante neutralizado el de *Salmonella typhi* CECT 725.
 - b) El sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 inhibe el crecimiento de *Salmonella typhi* CECT 725, se encuentre o no neutralizado.
 - c) El sobrenadante ácido de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 inhibe el crecimiento de *Salmonella typhi* CECT 725, *Escherichia coli* ETEC CECT 501 y CECT 515, y *Escherichia coli* EPEC CECT 729, y el sobrenadante neutralizado el de *Escherichia coli* EPEC CECT 742 y *Salmonella typhimurium* CECT 4594.
- 3) El sobrenadante de *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 inhibe la adhesión de la bacteria enteropatógena *Salmonella typhi* CECT 725 a células epiteliales intestinales Caco-2.
- 4) Las cepas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 inhiben la producción de IL-8 y TNF- α de células epiteliales intestinales estimuladas por bacterias enteropatógenas:
 - a) *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 inhibe casi por completo la producción de IL-8 de las células Caco-2 estimuladas por *Salmonella typhimurium* CECT 443, *Salmonella typhimurium* CECT 4594 y *Salmonella typhi* CECT 725 y además, inhibe la producción de TNF- α estimulada por *Salmonella typhi* CECT 725.

- b) *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 inhibe casi por completo la producción de IL-8 de las células Caco-2 estimulada por *Escherichia coli* ETEC CECT 501, *Escherichia coli* ETEC CECT 515, *Escherichia coli* EPEC CECT 729 y *Salmonella typhi* CECT 725. Además, inhibe la producción de TNF- α estimulada por *Escherichia coli* ETEC CECT 501, *Escherichia coli* ETEC CECT 515 y *Salmonella typhi* CECT 725.

Bibliografía

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Adlerberth I, Cerquetti M, Poilane I, Wold A, Cillignon A. Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. *Microl Ecol Health Dis.* 2000;11:223–39.
- Adlerberth I, Jalil F, Carlsson B, Mellander L, Hanson LA, Larsson P. High turn over rate of *Escherichia coli* strains in the intestinal flora of infants in Pakistan. *Epidemiol Infect.* 1998;121:587–98.
- Adlerberth I, Lindberg E, Aberg N, Hesselmar B, Saalman R, Strannegard IL. Reduced enterobacterial and increased staphylococcal colonization of the infantile bowel: an effect of hygienic lifestyle? *Pediatr Res.* 2006;59:96–101.
- Adlerberth I, Strachan DP, Matricardi PM, Ahrné S, Orfei L, Aberg N, et al. Gut microbiota and development of atopic eczema in 3 European birth cohorts. *J Allergy Clin Immunol.* 2007;120:343–50.
- Adlerberth I, Wold AE. Establishment of the gut microbiota in Western infants. *Acta Paediatr.* 2009;98:229–38.
- Adolfsson O, Meydani SN, Russell RM. Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr.* 2004;80:245–256.
- Agarwal BB, Shishodia S, Ashikawa K, Bharti AC. The role of TNF and its family members in inflammation and cancer: lessons from gene deletion. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy.* 2002;1:327–41.
- Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer: how hot is the link? *Biochem Pharmacol* 2006;72:1605–1621.
- Akalin AS, Gonc S, Duzel S. Influence of yogurt and acidophilus yogurt on serum cholesterol levels in mice *J Dairy Sci.* 1997;80:2721–25.
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell.* 2006;124:783–801.
- Alemka A, Clyne M, Shanahan F, Tompkins T, Corcionivoschi N, Bourke B. Probiotic Colonization of the Adherent Mucus Layer of HT29MTXE12 Cells Attenuates *Campylobacter jejuni* Virulence Properties. *Infect Immun.* 2010;78:2812–22.
- Andrighetto C, De Dea P, lombardi A, Neviani E, Rossetti L, Giraffa G. Molecular identification and cluster analysis of homofermentative thermophilic lactobacilli isolated from dairy products. *Res Microbiol* 1998; 149:631–643.

- Aranceta J, Gil A. Alimentos funcionales y salud en las etapas infantil y juvenil. Ed Panamericana 2010.
- Archer SY, Meng S, Shei A, et al. P21(WAFI) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998;95:6791-96.
- Arhné S, Molin G, Stahl S. Plasmids in *Lactobacillus* strain isolated from meat and meat products. *Syst Appl Microbiol* 1989; 11:320-325.
- Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev* 2008;8:411-420.
- Auty MA, Gardiner GE, McBrearty SJ, O'Sullivan EO, Mulvihill DM, Collins JK, et al. Direct in situ viability assessment of bacteria in probiotic dairy products using viability staining in conjunction with confocal scanning laser microscopy. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:420-5.
- Backhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004;101:15718–15723.
- Backhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005;307:1915-1920.
- Bai AP, Ouyang Q, Xiao XR, Li SF. Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. *Int J Clin Pract* 2006;60:284-288.
- Banerjee P, Merkel GJ, Bhunia AK. *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* B-30892 can inhibit cytotoxic effects and adhesion of pathogenic *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. *Gut Pathog*. 2009;1:8.
- Barry T, Colleran G, Glenon M, Dunican L, Gannon F. The 16S/23S ribosomal spacer as a target for DNA probes to identify eubacteria. *PCR Methods Appl* 1991;1:51-56.
- Beerens. Detección de bifidobacteria by using propionic acid as a selective agent. *Appl Env Microbio*. 1991;57:2418-19.
- Begley M, Hill C, Gahan CG. Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1729-38.
- Bengmark S. Colonic food. Pre-and probiotics. *Am J Gastroenterol*. 2000;95 (Supl.):5-7.
- Bengmark S. Ecological control of the gastrointestinal tract: the role of probiotic microbiota *Gut*. 1998;42:2-7.
- Berg RD. Probiotics, prebiotics or “conbiotics.” *Trends Microbiol*. 1998;6:89–92.

- Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. Lactobacillus acidophilus LA-1 binds to cultured human intestinal cell-lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *Gut*. 1994;35:483–9.
- Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol. Immunol* 2004;40:845–859
- Bezirtzoglou E. The intestinal microflora during the first weeks of life. *Anaerobe*. 1997;3:173-177.
- Bierbaum G, Sahl HG. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol* 2009;10:2-18
- Bjorksten B, Sepp E, Julge K, Voor T, Mikelsaar M. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:516–520.
- Björkstén B. The intrauterine and postnatal environments. *J Allergy Clin Immunol*. 1999;104:1119-27.
- Black FT, Andersen PL, Orskov J, Gaarslev K, Lauand S. Prophylactic efficacy of lactobacilli on traveler’s diarrhea. *Travel Med*. 1989;7:333-5.
- Boesten RJ, de Vos WM. Interactomics in the human intestine: Lactobacilli and Bifidobacteria make a difference. *J Clin Gastroenterol* 2008;42 Suppl 3:S163-7.
- Bolados-Martínez E, Pérez-Morales R, Acedo-Féli E. an alternative method for evaluation of resistance to low ph and bile salts in probiotic characterization of lactobacillus reuteri strains. a technical note. *Revista Científica FCV-LUZ* 2009;1:93-96.
- Borrueal N, Carol M, Casellas F, Antolin M, de Lara F, Espin E, et al. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn’s disease can be down-regulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* 2002;51:659-664.
- Bouton Y, Guyot P, Grappin R. Preliminary characterization of microflora of comte cheese. *J Appl Microbiol* 1998; 85:123-131.
- Brownlee IA, Havler ME, Dettmar PW, Allen A, Pearson JP. Colonic mucus: secretion and turnover in relation to dietary fibre intake. *Proc Nutr Soc*. 2003;62:245-249.
- Brugman S, Klatter FA, Visser JT, Wildeboer-Veloo AC, Harmsen HJ, Rozing J, Bos NA. Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia*. 2006;49:2105–2108.

- Budde BB, Rasch M. A comparative study on the use of flow cytometry and colony forming units for assessment of the antibacterial effect of bacteriocins. *Int J Food Microbiol.* 2001;63:65-72.
- Burns P, Sánchez B, Vinderola G, Ruas-Madiedo P, Ruiz L, Margolles A, et al. Inside the adaptation process of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* to bile. *Int J Food Microbiol* 2010;142:132-41.
- Butler M, Ng C, van Heel D, Lombarda G, Lechler R, Playford R, Ghosh S. Modulation of dendritic cell phenotype and function in an in vitro model of the intestinal epithelium. *Eur j Immunol.* 2006;36:864-74.
- Buts JP, De Keyser N. Effects of *saccharomyces boulardii* on intestinal mucosa. *Dig Dis Sci.* 2006;51:1485-92.
- Buts JP, DeKeyser N, Marandi S, Hermans D, Chae YHE, Lambotte L, et al. *Saccharomyces boulardii* up-grades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. *Gut.* 1999;45:89-96.
- Cammarota M, De Rosa M, Stellavato A, Lamberti M, Marzaioli I, Giuliano M. In vitro evaluation of *Lactobacillus plantarum* DSMZ 12028 as a probiotic: emphasis on innate immunity. *Int J Food Microbiol.* 2009;135:90-8.
- Campbell JJ, Qin S, Unutmaz D, Soler D, Murphy KE, Hodge MR, Wu L, Butcher EC. Unique subpopulations of CD56+ NK and NK-T peripheral blood lymphocytes identified by chemokine receptor expression repertoire. *J Immunol* 2001;166:6477-6482.
- Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P, et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol.* 2008;125:286-92.
- Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance *Diabetes* 2007;56:1761-1772.
- Cani PD, Delzenne NM. The role of the gut microbiota in energy metabolism and metabolic disease. *Curr Pharm Des.* 2009;15:1546-58.
- Castagliuolo I, Riegler MF, Valenick L, LaMont JT, Pothoulakis C. *Sacharomyces boulardii* protease inhibits the effects of *Clostridium difficile* toxins A and B in human colonic mucosa. *Infect Immu.* 1999;67:302-7.

- Castillo M, Martín-Orúe SM, Manzanilla EG, Badiola I, Martín M, Gasa J. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. *Vet Microbiol* 2006; 114:165-70.
- Cebeci A, Gurakan C. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiol* 2003; 20:511-518.
- Cetina-Sauri G, Sierra Basto G. Evaluation thérapeutique de *Saccharomyces boulardii* chez des enfants souffrant de diarrhée aiguë. *Ann Pediatr.* 1994 ;41:397-400.
- Chai F, Evdokiou A, Young GP, Zalewski PD. Involvement of p21 (Waf1/Cip1) and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate. *Carcinogenesis.* 2000;21:7-14.
- Charteris W, Kelly P, Morelli L, Collins J. Quality control *Lactobacillus* strains for use with the API 50CH and API ZYM systems at 37 °C. *J. Basic Microbiol.* 2001;41:241–251.
- Chu H, Kang S, Ha S, Cho K, Park SM, Han KH, et al. *Lactobacillus acidophilus* expressing recombinant K99 adhesive fimbriae has an inhibitory effect on adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol.* 2005;49:941-8.
- Clements ML, Levine MM, Black RE, Robins-Browne RM, Cisneros LA, Drusano GL, et al. *Lactobacillus* prophylaxis for diarrhea due to enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1981;20:104-8.
- Coconnier MH, Klaenhammer TR, Kernéis S, Bernet MF, Servin AL. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl Environ Microbiol.* 1992;58:2034-9.
- Coconnier MH, Lievin V, Bernet-Camard MF, Hudault S, Servin A. Antibacterial effect of the adhering human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41:1046-52.
- Coconnier MH, Lievin V, Lorrot M, Servin AL. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* serovar typhimurium infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66:1152–7.
- Coeuret V, Dubernet S, Bernardeau M, Gueguen M, Vernoux JP. Isolation, characterisation and identification of lactobacilli focusing mainly on cheeses and other dairy products. *Lait.* 2003;83:269–306.

- Collado MC, Gueimonde M, Salminen S. Probiotics in Adhesion of Pathogens: Mechanisms of Action. In: Watson RR, Preedy VR, editores. *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*. Elsevier; 2010. p. 353-369.
- Collado MC, Hernández M, Sanz Y. Production of bacteriocin-like inhibitory compounds by human fecal Bifidobacterium strains. *J Food Prot.* 2005;68:1034-40.
- Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. In vitro analysis of probiotic strains combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Res Int.* 2007;40:629–36.
- Collado MC, Sanz Y. induction of acid resistance in bifidobacterium: a mechanism for improving desirable traits of potentially probiotic strains. *J Appl Microbiol* 2007;103:1147-1157.
- Collins M, Samelis J, Metaxopoulos J, Wallbanks S. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus Weissella for the Leuconostoc paramesenteroides group of species. *J Appl Bacteriol* 1993;75:595-603.
- Coronen R, Korpela R, Moilanen E. Signalling mechanisms involved in the induction of inducible nitric oxide synthase by Lactobacillus rhamnosus GG, endotoxin, and lipoteichoic acid. *Inflammation.* 2002;26:207-14.
- Corr SC, Gahan CG, Hill C. Impact of selected Lactobacillus and Bifidobacterium species on Listeria monocytogenes infection and the mucosal immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2007;50:380–388.
- Corrêa NB, Péret Filho LA, Penna FJ, Lima FM, Nicoli JR. A randomized formula controlled trial of Bifidobacterium lactis and Streptococcus thermophilus for prevention of antibiotic-associated diarrhea in infants. *J Clin Gastroenterol.* 2005;39:385-9.
- Cremonini F, Di Caro S, Nista EC, Bartolozzi F, Capelli G, Gasbarrini G, et al. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002;16:1461-67.
- Crociani J, Grill JP, Huppert M, Ballongue J. Adhesion of different bifidobacteria strains to human enterocyte-like Caco-2 cells and comparison with in vivo study. *Lett Appl Microbiol.* 1995;21:146-8.

- Cui H, Chen CL, Wang JD, Yang UJ, Cun Y, Wu JB, et al. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World j Gastroenterol.* 2004;10:1521-25.
- D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ.* 2002;324:1361.
- Danielson AD, Peo ER Jr, Shahani KM, Lewis AJ, Whalen PJ, Amer MA. Anticholesteremic property of *Lactobacillus acidophilus* yogurt fed to mature boars. *J Anim Sci.* 1989;67:966-74.
- De angelis M, Corsetti A, Tosti N, Rossi J, Corbo M, Gobbetti M. Characterization of non-starter lactic acid bacteria from italian ewe cheese based on phenotypic, genotypic, and cell wall protein analyses. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:2010-20.
- De Keersmaecker SC, Verhoeven TL, Desair J, Marchal K, Vanderleyden J, Nagy I. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol Lett.* 2006;259:89-96.
- De Man JC, Rogosa M, Sharpe MT. A medium for the cultivation of lactobacilli. *J Appl Bacteriol.* 1960;23:130-5.
- De Moreno de LeBlanc A, Matar C, Farnworth E, Perdigon G. Study of cytokines involved in prevention of a murine experimental breast cancer by kéfir Cytokine 2006;34:1-8.
- De Prete V, Hamer HM, Windey K, Verbeke K. The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: Does it affect human health? *Mol Nutr Food Res.* 2010;55:46-57.
- De Vrese M, Rautenberg P, Laue C, Koopmans M, Herremans T, Schrezenmeir J. Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination. *Eur J Nutr.* 2005;44:406-13.
- De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics--compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr.* 2001;73:421S-429S.
- Deplancke B, Gaskins H. Microbial modulation of innate defense: Goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr.* 2001;73:1131S-1141S.
- Di Caro S, Tao H, Grillo A, Elia C, Gasbarrini G, Sepúlveda AR, Gasbarrini A. Effects of *Lactobacillus* GG on genes expression pattern in small bowel mucosa. *Dig Liver Dis.* 2005;37:320-29.

- Di Sabatino A, Ciccocioppo R, Luinetti O, et al. Increased enterocyte apoptosis in inflamed areas of Crohn's disease. *Dis Colon Rectum*. 2003;46:1498-1507.
- Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, et al. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 1999;76:279-92.
- Eaden JA, Abrams KR, Matberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut*. 2001;48:526-535.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science*. 2005;308:1635–1638.
- El Mohandes AE, Keiser JF, Johnson LA, Refat M, Jackson BJ. Aerobes isolated in fecal microflora of infants in the intensive care nursery: relationship to human milk use and systemic sepsis. *Am J Infect Control*. 1993;21:231–4.
- Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:165-256.
- Ewaschuk JB, Diaz H, Meddings L, Diederichs B, Dmytrash A, Backer J, et al. Secreted bioactive factors from *Bifidobacterium infantis* enhance epithelial cell barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008;295:G1025–G1034.
- Fabia R, Ar'Rajab A, Johansson M, Andersson R, Willen R, Jeppsson B, et al. Impairment of bacterial flora in human ulcerative colitis and experimental colitis in the rat *Digestion*. 1993;54:248-255.
- Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Rev*. 1998;62:1157-70.
- Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al.; and Other Members of the INFABIO Team. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;51:77-84.
- FAO/WHO 2001 Working group. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on avaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including poder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, Argentina (Octubre 1-4, 2001).
- FAO/WHO 2002 Working Group. Report of a Joint FAO/WHO on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Ontario, Canada (Abril 30-mayo 2, 2002).

- Favier C, Neut C, Mizon C, Cortot A, Colombel J, Mizon j. Fecal beta-D-galactosidase production and Bifidobacteria are decreased in Crohn's disease. *Dig Dis Sci.* 1997;42:817-822.
- Feder ME, Hofmann GE. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and ecological physiology. *Annu Rev Physiol.* 1999;61:243–282
- Felis GE, Dellaglio F. Taxonomy of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2007;8:44-61.
- Floch MH, Binder HJ, Filburn B, Gershengoren W. The effect of bile acids on intestinal micromicrobiota. *Am J Clin Nutr.* 1972;25:1418–26.
- Forestier C, de Champs C, Valtoux C, Joly B. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: in vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res microbial.* 2001;152:167-173.
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007;104:13780–13785.
- Frick JS, Schenk K, Quitadamo M, Kahl F, Koberle M, Bohn E, et al. *Lactobacillus fermentum* attenuates the proinflammatory effect of *Yersinia enterocolitica* on human epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis.* 2007;13:83–90.
- FuFoSe. Scientific concepts of functional foods in Europe. *Br J Nutr.* 1999;81:s1-27.
- Fukuda S, Toh H, Hase K, Oshima K, Nakanishi Y, Yoshimura K. et al. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature* 2011;469:543-549.
- Fukushima M, Nakano M. Effects of a mixture of organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on cholesterol metabolism in rats fed on a fat- and cholesterol-enriched diet. *Br j Nutr.* 1996;76:857-67.
- Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* 1989;66:365-78.
- Fuller R., ed. Probiotics: the scientific basis. London: Chapman & Hall, 1992
- Gardiner GE, Casey PG, Casey G, Lynch PB, Lawlor PG, Hill C, et al. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70:1895–906.

- Garrity GM, Bell JA, Lilburn TG. Taxonomic Outline of the prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edn.2004, release 5.0 Springer-Verlag, New York. 401 pages, doi:<http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200405>.
- Gebbers JO, Laissue JA. Immunologic structures and functions of the gut. *Schweiz Arch Tierheilkd*. 1989;131:221–238.
- Gil A, Rueda R. Modulation of intestinal microflora by specific dietary components. *Microbiol Ecol Health Dis*. 2000;(Supl. 2):31-9.
- Gil A. Modulation of the immune response mediated by dietary nucleotides. *Eur J Clin Nutr* 2002;56 Suppl 3:S1-4.
- Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol*. 1985;49:377-81.
- Girard P, Pansart Y, Lorette I, Gillardin JM. Dose-response relationship and mechanism of action of *Saccharomyces boulardii* in castor oil-induced diarrhea in rats. *Dig Dis Sci*. 2003;48:770-774.
- Givan AL. Principles of flow cytometry: an overview. *Methods Cell Biol*. 2001;63:19-50.
- Goldin BR, Gorbach SL. Probiotics for humans. In: Fuller R, ed. *Probiotics, the scientific basis*. London: Chapman and Hall, 1992;355–76.
- Gómez-Llorente C, Muñoz S, Gil A. Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Proc Nutr Soc*. 2010;69:381-9.
- Gopal P, Prasad J, Smart J, Gill H. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int j Food Microbiol*. 2001;67:207-216.
- Gopal P, Sullivan P, Smart J. Utilisation of galacto-oligosaccharides as selective substrate for growth by lactic acid bacteria including *Bifidobacterium lactis* DR 10 and *Lactobacillus acidophilus* DR 20. *Int Dairy J*. 2001;11:19-25.
- Gordon JI, Hooper LV, McNevin MS, Wong M, Bry L. Epithelial cell growth and differentiation.III. promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium, and diffuse GALT. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 1997;273:G565-G70.
- Greene JD, Klaenhammer TR. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol*. 1994;60:4487-94.

- Gronlund MM, Lehtonen OP, Enrola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal microbiota after caesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1999;28:19-25.
- Grupa P, Andrew H, Kirschner BS, et al. Is *Lactobacillus GG* helpful in children with Crohn's disease? Results of preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;31:453-457.
- Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet.* 2003;361:512-9.
- Gueimonde M, Jalonen L, He F, et al. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Res Int.* 2006;39:467-71.
- Gueimonde M, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG, Salminen S. Competitive exclusion of enteropathogens from human intestinal mucus by *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol* 2007;113:228-232.
- Gueimonde M, Noriega L, Margolles A, de los Reyes-Gavilan CG, Salminen S. Ability of *Bifidobacterium* strains with acquired resistance to bile to adhere to human intestinal mucus. *Int J Food Microbiol* 2005;101:341-6.
- Gulewicz P, Szymaniec S, Bubak B, Frias J, Vidal-Valverde C, Trajanowska K, Gulewicz K. Biological activity of a-galactoside preparations from *Lupinus angustifolius* L. And *Pisum sativum* L. Seeds. *J Agr food chem* 2002;50:384-389.
- Haarman, M., and J. Knol. Quantitative real-time PCR assays to identify and quantify fecal *Bifidobacterium* species in infants receiving a prebiotic infant formula. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:2318-2324.
- Hallstrom M, Eerola E, Vuento R, Janas M, Tammela O. Effects of mode of delivery and necrotising enterocolitis on the intestinal microflora in preterm infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2004;23:463-70.
- Hammes FA, Egli T. New method for assimilable organic carbon determination using flow-cytometric enumeration and a natural microbial consortium as inoculum. *Environ Sci Technol.* 2005;39:3289-94.
- Hammes WP, Hertel C. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: the Prokaryotes: An evolving electronic resource for the microbiological community, 3rd edition, release 3.15, 15 december 2003, Springer-Verlag, New York, <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125/>

- Hanson L, Korotkova M, Telemo E. Breast feeding, infant formulas, and immune system. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2003;90(Supl.):59-63.
- Harms HK, Bertele-Harms RM, Bruer-Kleis D. Enzyme-substitution therapy with the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in congenital sucrase-isomaltase deficiency. *N Engl J Med.* 1987;316:1306-9.
- Harmsen HJ, Wildeboer-Veloo AC, Raangs GC, Wagendorp AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:61-67.
- Heerdt BG, Houston MA, Augenlicht LH. Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function. *Cell Growth Differ.* 1997;8:523-532.
- Heikkilä MP, Saris PEJ. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol.* 2003;95:471–478.
- Heiling HG, Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteu P, Akkermans AD, and de Vos WM. Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. And other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:114-123.
- Henriksson A, Khaled AKD, PL Conway. *Lactobacillus* colonization of the gastrointestinal tract of mice after removal of the nonsecreting stomach region. *Microb Ecol Health Dis.* 1999;11:96–9.
- Herzenberg LA, Tung J, Moore WA, Herzenberg LA, Parks DR. Interpreting flow cytometry data: a guide for the perplexed. *Nat Immunol.* 2006;7:681-5.
- Hilton E, Kolakowski P, Singer C, Smith M. Efficacy of *Lactobacillus* GG as a Diarrheal Preventive in Travelers. *J Travel Med.* 1997;4:41-43.
- Hoarau C, Lagaraine C, Martin L, Velge-Roussel F, Lebranchu Y. Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J Allergy Clin Immunol* 2006;117:696–702.
- Höchter W, Chase D, Hegenhoff G. *Saccharomyces boulardii* in treatment of acute adult diarrhoea. Efficacy and tolerance of treatment. *Münch Med Wochen.* 1990;132:188-92.
- Holoda E, Vu-Khac H, Andrasková S, Chomová Z, Wantrubová A, Krajnák M, Pilipčinec E. PCR assay for detection and differentiation of K88ab(1), K88ab(2),

- K88ac, and K88ad fimbrial adhesins in *E. coli* strains isolated from diarrheic piglets. *Folia Microbiol* 2005;50:107-12.
- Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr*. 2001;73:365S–73S.
- Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol*. 1998;41:85-101.
- Hongoh, Y., Ohkuma, M. and Kudo, T. Molecular analysis of bacterial microbiota in the gut of the termite *Reticulitermes speratus* (Isoptera; Rhinotermitidae). *FEMS Microbiol Ecol*. 2003;44:231-242.
- Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*. 2010;10:159-69.
- Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr*. 2002;22:283-307.
- Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science*. 2001;291:881–884.
- Hooper LV. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nat Rev Microbiol*. 2009;7:367–374.
- Hooper LV, Gordon JI. Commensal host bacterial relationships in the gut. *Science*. 2001;292:1115-18.
- Hörmannspurger G, Haller D. Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol* 2010;300:63-73.
- Huang SH, He L, Zhou Y, Wu CH, Jong A. *Lactobacillus rhamnosus* GG Suppresses Meningitic *E. coli* K1 Penetration across Human Intestinal Epithelial Cells In Vitro and Protects Neonatal Rats against Experimental Hematogenous Meningitis. *Int J Microbiol*. 2009;2009:647862.
- Inoue R, Ushida K. Vertical and horizontal transmission of intestinal commensal bacteria in the rat model. *FEMS Microbiol Ecol*. 2003;46:213-9.
- Isaacs CE. Human milk inactivates pathogens individually, additively, and synergistically. *J Nutr*. 2005;135:1286-1288.
- Isolauri E, Salminen S. Probiotics, gut inflammation and barrier function. *Gastroentero Clin North Am*. 2005; 34:437-450.

- Iwamoto M, Koji T, Makiyama K, et al. Apoptosis of crypt epithelial cells in ulcerative colitis. *J Pathol.* 1996;180:152-159.
- Izquierdo E, Medina M, Ennahar S, Marchioni E, Sanz Y. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains. *Curr Microbiol.* 2008;56:613–8.
- Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Microbiol Rev.* 1995;59:171-200.
- Jacobs DM, Gaudier E, van Duynhoven J, Vaughan EE. Non-digestible food ingredients, colonic microbiota and the impact on gut health and immunity: a role for metabolomics. *Curr Drug Metab.* 2009;10:41-54.
- Jacobsen C, Nielsen V, Hayford A, Møller P, Michaelsen K, Pærregaard A, et al. 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 Humans. *Appl Environ Microbiol.* 1999;65:4949-4956.
- Jankowska A, Laubitz D, Antushevich H, Zabielski R, Grzesiuk E. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for Adhesion to Caco-2 Cells. *J Biomed Biotechnol* 2008;doi:10.1155/2008/357964.
- Jayamanne VS, Adams MR. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Lett Appl Microbiol* 2006;42:189-194.
- Jin LZ, Ho WY, Abdullah N, Jalaludin S. Acid and bile tolerance of *Lactobacillus* isolated from chicken intestine. *Lett. Appl. Microbiol.* 1998;27:183-185.
- Jobin C, Sartor RB. The I κ B/NF- κ B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2000;278:C451-C462.
- Johnston BC, Supina AL, Vohra S. Probiotics for pediatric antibiotic-associated diarrhea: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *CM Aj.* 2006;175:377-83.
- Kalliomaki MA, Isolauri E. Probiotics and down-regulation of the allergic response. *Immunol Allergy Clin North Am.* 2004;24:739-752.
- Kelsall B, Biron C, Sharma O, Kaye P. Dendritic cells at the host-pathogen interface. *Nat immunol.* 2002;3:699-702.
- Kheadr E, Dabour N, Le Lay C, Lacroix C, Fliss I. Antibiotic Susceptibility Profile of Bifidobacteria as Affected by Oxgall, Acid, and Hydrogen Peroxide Stress. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:169-174.

- Klaenhammer TR. Genetics of bacteriocins produced by acid lactic bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 1993;12:39-85.
- Kleessen B, Bezirtzoglou E, Mättö J. Culture based knowledge on biodiversity development and stability of human gastrointestinal microflora. *Microb Ecol Health Dis.* 2000;(Suppl):53-63.
- Klein D. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations. *Trends Mol Med.* 2002;8:257-60.
- Klingberg T, Axelsson L, Naterstad K, Elsser D, Budde B. Identification of potential probiotic starter cultures for Scandinavian-type fermented sausages. *Int j Food Microbiol.* 2005;105:419-431.
- Klingberg TD, Budde BB. The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *Int J Food Microbiol.* 2006;109:157–9.
- Klingberg TD, Pedersen MH, Cencic A, Budde BB. Application of measurements of transepithelial electrical resistance of intestinal epithelial cell monolayers to evaluate probiotic activity. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:7528–7530.
- Ko JS, Yang HR, Chang JY, Seo JK. *Lactobacillus plantarum* inhibits epithelial barrier dysfunction and interleukin-8 secretion induced by tumor necrosis factor- α . *World J Gastroenterol.* 2007;13:1962-65.
- Kollaritsch H, Holst H, Grobara P, et al. Prophylaxe der reisediarrhoe mit *Saccharomyces boulardii*. *Forst Chr Med.* 1993;111:152-56.
- Koshiji M, Adachi Y, Sogo S. Apoptosis of colorectal adenocarcinoma (COLO201) by tumour necrosis factor alpha (TNF- α) and/or interferon γ (IFN- γ), resulting from down-regulation of Bcl-2 expression. *Clin Exp Immunol.* 1998;111:211-218.
- Kouya T, Misawa K, Horiuchi M, Nakayama E, Deguchi H, Tanaka T, et al. Production of extracellular bifidogenic growth stimulator by anaerobic and aerobic cultivations of several propiobacterial strains. *J Biosci Bioeng* 2007;103:464–71.
- Kulkarni N, Zang E, Kelloff G. Effect of the chemopreventive agents piroxicam and D,L-alpha-difluoromethylornithine on intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 1992;13:995-1000.

- Kumar R, Grover S, Batish VK. Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase-producing *Lactobacillus plantarum* strains in Sprague-Dawley rats. *Br J Nutr* 2011;105:561-73.
- Kurmann J. Started for fermented milk: Started with selected intestinal bacteria. *Bull Int Dairy Fed* 1988;227:41-45.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, p. 115–175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. Wiley & Sons, Chichester, United Kingdom.
- Laparra JM, Sanz Y. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett Appl Microbiol* 2009;49:695-701.
- Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, Rodríguez J, Boza J y Xaus J. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br j Nutr*. 2007;98Suppl:S96-S100.
- Larsen N, Nissen P, Willats WG. The effect of calcium ions on adhesion and competitive exclusion of *Lactobacillus* ssp. and *E. coli* O138. *Int J Food Microbiol* 2007;114:113-9.
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8:171-84.
- Lee YK, Puong KY, Ouwehand AC, Salminen S. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J Med Microbio* 2003;52:925-930.
- Lee Y-K, Salminen S. The coming age of probiotics. *Trends Food Sci Technol*. 1995;6:241-5.
- Lenaerts K, Bouwman FG, Lamers WH, Renes J, Mariman EC. Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Genomics*. 2007;8:91.
- Lewis R, Gorbach S. Modification of bile acids by intestinal bacteria. *Arch Intern Med*. 1972;130:545-9.
- Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:11070–11075.
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006;124:837–848.

- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006;444:1022–1023.
- Liévin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000;47:646-52.
- Lievin-Le Moal V, Servin AL. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota. *Clin Microbiol Rev*. 2006;19:315–337.
- Lima ET, Andreatti Filho RL, Okamoto AS, Noujaim JC, Barros MR, Crocci AJ. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. *Can J Vet Res* 2007;71:103-7.
- Lin MY, Yen CL, Chen SH. Management of lactose maldigestion by consuming milk containing lactobacilli. *Dig Dis Sci*. 1998;43:133-7.
- Lin PW, Nasr TR, Berardinelli AJ, Kumar A, Neish AS. The probiotic *Lactobacillus* GG may augment intestinal host defense by regulating apoptosis and promoting cytoprotective responses in the developing murine gut. *Pediatr Res*. 2008;64(5):511-6.
- Lin SY, Ayres JW, Winkler W, Sandine WE. *Lactobacillus* effects on cholesterol: in vitro and in vivo results. *J Dairy Res*. 1989;72:885-9.
- Lin WH, Yu B, Jang SH, Tsen HY. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe* 2007;13:107–13.
- Liu C, Zhang ZY, Dong K, Guo XK. Adhesion and immunomodulatory effects of *Bifidobacterium lactis* HN019 on intestinal epithelial cells INT-407. *World J Gastroenterol* 2010;16:2283-2290.
- Liu Q, Duan ZP, Ha DK, Bengmark S, Kurtovic J, Riordan SM. Synbiotic modulation of gut flora: effect on minimal hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. *Hepatology*. 2004;39:1441–1449.
- Lodemann U. Effects of Probiotics on Intestinal Transport and Epithelial Barrier Function. En Watson RR, Preedy VR, Editores. *Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics*. Elsevier; 2010.p.303-303.
- Lorca GL, Font de Valdez G. *Lactobacillus* stress response. In: Ljungh A, Wadström T, editores. *Lactobacillus Molecular biology*. Norfolk:Caister Academic Press; 2009.p.115-138.

- Lorenzo-Zuniga V, Rodriguez-Ortigosa CM, Bartoli R, Martinez-Chantar ML, Martinez-Peralta L, Pardo A, et al. Insulin-like growth factor I improves intestinal barrier function in cirrhotic rats. *Gut*. 2006;55:1306-1312.
- Lutgendorff F, Akkermans LM, Soderholm JD. The role of microbiota and probiotics in stress-induced gastrointestinal damage. *Curr Mol Med*. 2008;8:282–298.
- Ma D, Forsythe P, Bienenstock J. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect Immun* 2004;72:5308-5314.
- Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut*. 2003;52:827–833.
- Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr*. 1999;69(Suppl):1035-45.
- Madsen K, Cornish A, Soper P, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*. 2001;121:580-591.
- Mahé S, Marteau P, Huneau JF, Thuillier F, Tomé D. Intestinal nitrogen and electrolyte movements following fermented milk ingestion in man. *Br J Nutr*. 1994;71:169-80.
- Mainville I, Arcand Y, Farnworth ER. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probióticas. *Int J Food Microbiol* 2005;99:287–296.
- Makras L, de Vuyst L. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. *Int Dairy JI* 2006;16:1049-57.
- Makras L, Van Acker G, De Vuyst L. *Lactobacillus paracasei* subsp. *Paracasei* 8700:2 degrades inulin-type fructans exhibiting different degrees of polymerization. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:6531-6537.
- Malorny B, Tassios PT, Radström P, Cook N, Wagner M, Hoorfar J. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol*. 2003;83:39–48.
- Marini M, Bamias G, Rivera-Nieves J. TNF- α neutralization ameliorates the severity of murine Crohn's-like ileitis by abrogation of intestinal epithelial cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:8366-8371.

- Marteau P, Flourie B, Pochart P, Chastang C, Desjeux JF, Rambaud JC. Effect of the microbial lactase (EC 3.2.1.23) activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Br J Nutr.* 1990;64:71-9.
- Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Ped.* 2003;143:754–758.
- Martin R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 2003;143:754-8.
- Matijasić BB, Obermajer T, Rogelj I. Quantification of *Lactobacillus gasseri*, *Enterococcus faecium* and *Bifidobacterium infantis* in a probiotic OTC drug by real-time PCR. *Food Control.* 2010;21:419-25.
- Matsumoto M, Ohishi H, Benno Y. H⁺-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. *Int J Food Microbiol* 2004;93:109-113.
- Maus JE, Ingham SC. Employment of stressful conditions during culture production to enhance subsequent cold- and acid-tolerance of bifidobacteria *J Appl Microbiol.* 2003;95:146-54.
- Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell.* 2005;122:107-118.
- McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Elmer GW, Moyer KA, Melcher SA, et al. Prevention of β -lactam associated diarrhoea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol.* 1995;90:439-48.
- McFarland LV. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol.* 2006;101:812-22.
- McFarlane S, Hopkins MJ, Mcfarlane GT. Bacterial growth and metabolism on surfaces in the large intestine. *Microb Ecol Health Dis.* 2000(Suppl):64-72.
- McGuinness S, McCabe E, O'Regan E, Dolan A, Duffy G, Burgess C, Fanning S, Barry T, O'Grady J. Development and validation of a rapid real-time PCR based method for the specific detection of *Salmonella* on fresh meat. *Meat Sci.* 2009;83:555-562.
- McKeever TM, Lewis SA, Smith C, Collins J, Heatlie H, Frischer M, Hubbard R. Early exposure to infections and antibiotics and the incidence of allergic disease: a birth cohort study with the West Midlands General Practice Research Database. *J Allergy Clin Immunol.* 2002;109:43–50.

- Medellin-Pena MJ, Griffiths MW. Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Appl Environ Microbiol.* 2009;75:1165–1172.
- Medina R, Katz M, Gonzalez S, Oliver G. Characterization of the lactic acid bacteria in ewe's milk and cheese from northwest Argentina. *J Food Prot* 2001;64:559-563.
- Medina V, Edmonds B, Young G, James R, Appleton S, Zalewski P. Induction of caspase-3 protease activity and apoptosis by butyrate and trichostatin A (inhibitors of histone deacetylase): Dependence on protein synthesis and synergy with a mitochondrial/cytochrome c-dependent pathway. *Cancer Res.* 1997;57:3697-3707.
- Metchnikoff E. Etudes sur la flore intestinale. *Ann. Inst. Pasteur Paris.* 1908;22:929-55.
- Metges CC. Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host. *J Nutr.* 2000;130(Supl):1857-64.
- Meyer D, Stasse-Wolthuis M. The bifidogenic effect of inulin and oligofructose and its consequences for gut health. *Eur J Clin Nutr* 2009;63:1277-1289.
- Midtvedt T, Carlstedt-Duke B, Hoverstad T, Midtvedt AC, Norin KE, Saxerholt H. Establishment of a Biochemically active intestinal ecosystem in ex-germfree rats. *Appl Environ Microbiol.* 1987;53:2866-71.
- Miwa M, Horimoto T, Kiyohara M, Katayama T, Kitaoka M, Ashida H, Yamamoto K. Cooperation of β -galactosidase and β -N-acetylhexosaminidase from bifidobacteria in assimilation of human milk oligosaccharides with type 2 structure. *Glycobiology.* 2010;20:1402-1409.
- Miyazaki Y, Kamiya S, Hanawa T, Fukuda M, Kawakami H, Takahashi H, Yokota H. Effect of probiotic bacterial strains of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Enterococcus* on enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Infect Chemother* 2010;16:10-18.
- Mollet B, Rowland I. Functional foods: at the frontier between food and pharma. *Curr Opin in Biotechnol.* 2002;13:483-5.
- Morita H, Hashimoto H, Hosoda M, Kurisaki J, Ouwehand AC, Isolauri E, Benno Y, Salminen S. Intestinal *Bifidobacterium* species induce varying cytokine production. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:1035–1036.
- Moser SA, Savage DC. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:3476-80.

- Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nature Rev* 2003;3:331-341.
- Musch MW, Sugi K, Straus D, Chang EB. Heat-shock protein 72 protects against oxidant-induced injury of barrier function of human colonic epithelial Caco2/bbe cells. *Gastroenterology*. 1999;117:115–122.
- Nanno M, Morotomi M, Takayama H, Kuroshima T, Tanaka R, Mutai M. Mutagenic activation of biliary metabolites of benzo(a)pyrene by b-glucuronidase-positive bacteria in human faeces. *J Med Microbiol* 1986;22:351.
- Navarro E, Simonet P, Normard P, Bardin R. Characterization of natural populations of *Nitrobacter* spp. using PCR/RFLP analysis of the ribosomal intergenic spacer. *Arch Microbiol* 1992;157:107-115.
- Nebra Y, Blanch AR. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl Environ Microbiol*. 1999;65:5173-6.
- Nesser JR, Granato D, Rouvet M, et al. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology*. 2000;10:1193–9.
- Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, Meinzen-Derr J, Guerrero Mde L, et al. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiology* 2004;3:253-63.
- Ng DK, Lee SYR, Leung LCK, Wong SF, Ho JCS. Bacteriological screening of expressed breast milk revealed a high rate of bacterial contamination in Chinese women. *J Hospital Infect*. 2004;58:146–150.
- Niedergang F, Kweon M. New trends in antigen uptake in the gut mucosa. *Trends Microbiol*. 2005;13:485-90.
- Ninonuevo MR, Park Y, Yin H, Zhang J, Ward RE, Clowers BH, et al. A strategy for annotating the human milk glycome. *J Agric Food Chem*. 2006;54:7471-7480.
- Ninonuevo MR, Park Y, Yin H, Zhang J, Ward RE, Clowers BH, German JB, Freeman SL; Killen K, Grimm R, Lebrilla CB. A strategy for annotating the human milk glycome. *J Agric Food Chem* 2006;54:7471-7480.
- Noverr MC, Huffnagle GB. The “microflora hypothesis” of allergic diseases. *Clin Exp Allergy*. 2005;35:1511–1520.

- O'Flaherty S, Ross RP, Meaney W, Fitzgerald GF, Elbreki MF, Coffey A. Potential of the polyvalent anti-Staphylococcus bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. *Appl Environl Microbiol.* 2005;71:1836–42.
- O'Hara AM, O'Regan P, Fanning A, O'Mahony C, MacSharry J, Lyons A, et al. Functional modulation of human intestinal epithelial cell responses by *Bifidobacterium infantis* and *Lactobacillus salivarius*. *Immunology.* 2006;118:202-15.
- O'Hara AM, Shanahan F. Gut microbiota: mining for therapeutic potential. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2007;5:274–84.
- O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006;7:688–693.
- Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S, Lara-Villoslada F, Fonollá J, Navas M, et al. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition.* 2007;23:254-60.
- Ostad SN, Salarian AA, Ghahramani MH, Fazeli MR, Samadi N, Jamalifar H. Live and heat-inactivated lactobacilli from feces inhibit *Salmonella typhi* and *Escherichia coli* adherence to Caco-2 cells. *Folia Microbiol* 2009;54:157-60.
- Otles S, Cagindi O & Akcicek E Probiotics and health. *Asian Pac J Cancer Prev* 2003;4:369–372.
- Ouwehand AC, Parhiala R, Salminen S, et al. Influence of the endogenous mucosal microbiota on the adhesion of probiotic bacteria in vitro. *Microl Ecol Health Dis.* 2004;16:202–4.
- Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C., Salminen, S. Probiotics: mechanisms and established effects. *Intern Dairy J* 1999;9:43–52.
- Parassol N, Freitas M, Thoreux K, Dalmaso G, Bourdet-Sicard R, Rampal P. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Res Microbiol.* 2005;156:256-62.
- Parret AM, Edwards CA. In vitro fermentation of carbohydrate by breast fed and formula fed infants. *Arch Dis Child.* 1997;76:249-53.
- Patel AK, Singhanian RR, Pandey A, Chincholkar SB. Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives. *Appl Biochem Biotechnol.* 2010;162:166-80.

- Pedone C, Bernabeau A, Postaire E, Bouley P. The effect of supplementation with milk fermented by *Lactobacillus casei* (strain DN-114 001) on acute diarrhoea in children attending day care centers. *Int J Clin Pract.* 1999;53:179-84.
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma F, Snijders B, Kummeling I, et al. Factor influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics.* 2006;118:511-21.
- Percy-Robb IW, Collee JG. Bile acids: a pH dependent antibacterial system in the gut? *Br Med J.* 1972;3:813-5.
- Piaia M, Antoine JM, Mateos-Guardia JA, Lepligard A, Lenoir-Wijnkoop I. Assessment of the benefits of live yogurt: methods and markers for in vivo studies of the physiological effects of yogurt cultures. *Microb Ecol Health Dis.* 2003;15:79-87.
- Pickard KM, Bremner AR, Gordon JN, et al. Microbial-gut interactions in health and disease. Immune responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004;18:271-285.
- Plant, L.J., Conway, P.L., 2002. Adjuvant properties and colonization potential of adherin gandnon-adhering *Lactobacillus* spp. Following oral administration to mice. *FEMS Immunol Med Microbio* 2002;34:105-111.
- Rachid M, Matar C, Duarte J, Perdigon G. Effect of milk fermented with a *Lactobacillus helveticus* R389(+) proteolytic strain on the immune system and on the growth of 4T1 breast cancer cells in mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2006;47:242-253.
- Rafter J, Glinghammar B. Interactions between the environment and genes in the colon. *Eur J Cancer Prev.* 1998;7:S69-72.
- Rahman MM, McFadden G. Modulation of NF- κ B signalling by microbial pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2011;4:291-306.
- Ratajczak C, Duez C, Grangette C, Pochard P, Tonnel AB, Pestel J. Impact of lactic acid bacteria on dendritic cells from allergic patients in an experimental model of intestinal epithelium. *J Biomed Biotechnol.* 2007;1:719-21.
- Rawls JF, Mahowald MA, Ley RE, Gordon JI. Reciprocal gut microbiota transplants from zebrafish and mice to germ-free recipients reveal host habitat selection. *Cell.* 2006;127:423-433.
- Reid G, Burton J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect.* 2002;4:319-24.
- Resta SC. Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling. *J Physiol.* 2009;587:4169-74.

- Riedel C, Foata F, Philippe D, Adolfsson O, Eikmanns B, Blum S. Anti-inflammatory effects of bifidobacteria by inhibition of LPS-induced NF- κ B activation. *World J Gastroenterol*. 2006;12:3729-35.
- Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro G, et al. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat immunol*. 2005;6:507-14.
- Rioux KP, Fedorak RN. Probiotics in the treatment of inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40:260-263.
- Roberfroid M, Van Loo E, Gibson R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products, *J Nutr* 1998;128:11-19.
- Roger LC, Costabile A, Holland DT, Hoyles L, McCartney AL. Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology*. 2010;156:3329-41.
- Rogosa M, Mitchell J, Wiseman J. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J Bacteriol*. 1951;62:132-133.
- Romeo MG, Romeo DM, Trovato L, Oliveri S, Palermo F, Cota F, Betta P. Role of probiotics in the prevention of the enteric colonization by *Candida* in preterm newborns: incidence of late-onset sepsis and neurological outcome. *J Perinatol*. 2011;31:63-69.
- Ross RP, Desmond C, Fitzgerald GF, Stanton C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *J Appl Microbiol* 2005;98:1410-7.
- Rosslund E, Langsrud T, Granum PE, Sorhaug T. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *Int J Food Microbiol*. 2005;98:193–200.
- Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Arigoni F, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A. Bile affects the synthesis of exopolysaccharides by *Bifidobacterium animalis*. *Appl Environ Microbiol*. 2009;75:1204-7.
- Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A, de los Reyes-Gavilán CG, Salminen S. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J Food Prot*. 2006;69:2011-5.
- Ruas-Madiedo P, Hernández-Barranco A, Margolles A, De los Reyes-Gavilán CG. A bile salt-resistant derivative of *bifidobacterium animalis* has an altered fermentation pattern when grown on glucose and maltose a bile salt-resistant derivative of

- bifidobacterium animalis has an altered fermentation pattern when grown on glucose and maltose. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:6564-6570.
- Rueda-Cabrera R, Gil-Hernández A. Nutrición e inmunidad. En: Gil Hernández A, coordinador. *Tratado de Nutrición, tomo I; Bases Fisiológicas y Bioquímicas de la nutrición*. 2da Ed. Madrid: Editorial Medica Panamericana; 2010. p.895-924.
- Ruiz L, Sánchez B, Ruas-Madiedo P, de Los Reyes-Gavilán CG, Margolles A. Cell envelope changes in *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* as a response to bile. *FEMS Microbiol Lett* 2007;274:316-22.
- Sablon E, Contreras B, Vandamme E. Antimicrobial peptide of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2000;68:21-60.
- Salminen S, Nybom S, Meriluoto J, Collado MC, Vesterlund S, El-Nezami H. Interaction of probiotics and pathogens--benefits to human health? *Curr Opin Biotechnol*. 2010;21:157-67.
- Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol*. 2007;19:70-83.
- Samelis J, Ikeda JS, Sofos J. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* 0157:H7. *J Appl Microbiol* 2003;95:563-575.
- Samuel BS, Hansen EE, Manchester JK, Coutinho PM, Henrissat B, Fulton R, et al. Genomic and metabolic adaptations of *Methanobrevibacter smithii* to the human gut. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007;104:10643-10648.
- Sanchez B, Bressollier P, Urdaci MC. Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular crosstalking with the host. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2008;54:1-17.
- Sanz Y, Nadal I, Sanchez E. Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections. *Recent Patents Anti-Infect Drug Disc*. 2007;2:148-156.
- Sarem F, Sarem-Damerджи LO, Nicolas JP. Comparison of the adherence of three *Lactobacillus* strains to Caco-2 and Int-407 human intestinal cell lines. *Lett Appl Microbiol*. 1996;22:439-42.
- Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2008;134:577-94.

- Satokari RM, Vaughan EE, Favier C, Dore J, Edwards C, and de Vos WM. Diversity of Bifidobacterium and Lactobacillus spp. in breast-fed and formula-fed infants as assessed by 16S rDNA sequence differences. *Microbiol Ecol Health Dis* 2002;14:97-105.
- Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol.* 1977;31:107-33.
- Schloss PD, Handelsman J. Status of the microbial census. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2004;68:686–691.
- Scholz-Ahrens K, Ade P, Marten B, Weber P, Timm W, Aşil Y, et al. Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics Affect Mineral Absorption, Bone Mineral Content, and Bone Structure. *J Nutr.* 2007;137:838S-846S.
- Schwartz RF, Neu J, Schatz D, Atkinson MA, Wasserfall C. Comment on: Brugman S et al. (2006) Antibiotic treatment partially protects against type 1 diabetes in the Bio-Breeding diabetes-prone rat. Is the gut flora involved in the development of type 1 diabetes? *Diabetologia* 49: 2105–2108. *Diabetologia.* 2007;50:220–221.
- Sekirov I, Russel SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev.* 2010;90:859-904.
- Senmeir J, deVrese M. Probiotics, prebiotics, and Synbiotics, approaching a definition. *Am J Clin Nutr.* 2001;73:361S-64S.
- Sepp E, Julge K, Vasar M, Naaber P, Björkstén B, Mikelsaar M. Intestinal microflora of Estonian and Swedish infants. *Acta Paediatr.* 1997;6:956–61.
- Sepp E, Naaber P, Voor T, Mikelsaar M, Björkstén B. Development of the intestinal microflora during the first month of life in Estonian and Swedish infants. *Microbial Ecology in Health and disease.* 2000;12:22–6.
- Servin AL, Coconnier MH. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Prac Res Clin Gastroenterol* 2003;17:741–54.
- Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev.* 2004;28:405-40.
- Silva M, Jacobs NV, Deneke C, Gorbach SL. Antimicrobial substance from a human Lactobacillus strain. *Antimicrob Agents Chemother.* 1987;31:1231-33.
- Sing J, Rverson A, Tomita M, Shimamura S, Ishibashi N, Reddy B. Bifidobacterium longum, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and

- modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. *Carcinogenesis*. 1997;18:833-41.
- Sinocrope FA, Roddey G, Mc Donnell TJ. Increased apoptosis accompanies neoplastic development in the human colorectum. *Clin Cancer Res*. 1996;2:1999-2006.
- Smith K, McCoy K, Macpherson A. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol*. 2007;19:59-69
- Spinler JK, Taweechoatipatr M, Rognerud CL, Oub CN, Tumwasorn S, Versalovic J. Human-derived probiotic *Lactobacillus reuteri* demonstrate antimicrobial activities targeting diverse enteric bacterial pathogens. *Anaerobe*. 2008;14:166–71.
- Steiner TS, Nataro JP, Poteet-Smith CE, Smith JA, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J Clin Invest*. 2000;105:1769-77.
- Stewart L, Pellegrini CA, Way LW. Antibacterial activity of bile acids against common biliary tract organisms. *Surg Forum*. 1986;37:157–9.
- Stöber H, Maier E, Schmidt H. Protective effects of *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* and *Staphylococci* on the infection of cultured HT29 cells with different enterohemorrhagic *Escherichia coli* serotypes are strain-specific. *Int J Food Microbiol* 2010;144:133-40.
- Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989;299:1259–1260.
- Stratiki Z, Costalos C, Sevastiadou S, Kastanidou O, Skouroliakou M, Giakoumatou A, Petrohilou V. The effect of a bifidobacter supplemented bovine milk on intestinal permeability of preterm infants. *Early Hum Dev* 2007;83:575–579.
- Surawicz CM, Elmer GW, Speelman P, McFarland LV, Chinn J, Van Belle G. Prevention of antibiotic associated diarrhoea by *Saccharomyces boulardii*: A prospective study. *Gastroenterology*. 1989;96:981-88.
- Suzuki S, Shimojo N, Tajiri Y, Kumemura M, Kohno Y. A quantitative and relative increase in intestinal bacteroides in allergic infants in rural Japan. *Asian Pac J Allergy Immunol*. 2008;26:113–119.
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol*. 2005;11:1131–1140.

- Szajewska H, Ruszczyski M, Radzikowski A. A probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Pediatr*. 2006;149:367-72.
- Takahashi N, Xiao JZ, Miyaji K, Yaeshiima T, Hiramatsu A, Iwatsuki K, et al. Selection of acid tolerant bifidobacteria and evidence for a low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. *J Dairy Res* 2004;71:340–345.
- Tamime AY. Fermented milks: A historical food with modern applications—a review. *Eur J Clin Nutr*. 2002;56Suppl 14:S2-S15.
- Tannock G. Identification of Lactobacilli and Bifidobacteria. *Current Issues Molec Biol*. 1999;1:53-64.
- Tannock G. Molecular assessment of intestinal microbiota. *Am J Clin Nutr*. 2001;73(Suppl):410-4.
- Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, Musch MW, Alverdy JC, Schneewind O, Chang EB, Petrof EO. Soluble factors from *Lactobacillus GG* activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290:C1018–C1030.
- Tappenden KA, Deutsch AS. The physiological relevance of the intestinal microbiota-contributions to human health. *J Am Coll Nutr*. 2007;26:679S-83S.
- Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF. Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J Dairy Sci*. 1998;81:2336-40.
- Thompson-Chagoyán O, Maldonado J, Gil A. Colonization and impact of disease and other factors on intestinal microbiota. *Dig Dis Sci*. 2007;52:2069-77.
- Thompson-Chagoyan OC, Vieites JM, Maldonado J, Edwards C, Gil A. Changes in faecal microbiota of infants with cow's milk protein allergy--a Spanish prospective case-control 6-month follow-up study. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010;21:e394-400.
- Thornton GM. Probiotic bacteria. Selection of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains from the healthy human gastrointestinal tract; characterization of a novel *Lactobacillus*-derived antibacterial protein. PhD thesis. National University of Ireland, Cork, Ireland, 1996.
- Tien MT, Girardin SE, Regnault B, Le Bourhis L, Dillies MA, Coppee JY, et al. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2006;176:1228-1237.

- Todoriki K, Mukai T, Sato S, Toba T. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens on Caco-2 cells by Lactobacillus strains. *J Appl Microbiol.* 2001;91:154-9.
- Topping D, Clifton P. Short-chain fatty acids and human colonic function: roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol Rev.* 2001;81:1031–1064.
- Tsai CC, Hsieh HY, Chiu HH, Lai YY, Liu JH, Yu B, et al. Antagonistic activity against Salmonella infection in vitro and in vivo for two Lactobacillus strains from swine and poultry. *Int J Food Microbiol.* 2005;102:185–94.
- Tsai CC, Lin PP, Hsieh YM. Three Lactobacillus strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic Escherichia coli grown in vitro. *Anaerobe.* 2008;14:61-7.
- Tuomola EM, Salminen SJ. Adhesion of some probiotic and dairy Lactobacillus strains to Caco-2 cell cultures. *Int Food Microbiol.* 1998;41:45-51.
- Turck D, Bernet JP, Marx J, Kempf H, Giard P, Walbaum O, et al. Incidence and risk factors of oral antibiotic-associated diarrhea in an outpatient pediatric population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2003;37:22-6.
- Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature.* 2006;444:1027–1031.
- Ukena S, Singh A, Dringenberg U, Engelhardt R, Seidler U, Hansen W, et al. Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS ONE.* 2007;2: e1308.
- Urao M, Fujimoto T, Lane GJ, Seo G, Miyano T. Does probiotic administration decrease serum endotoxin levels in infants?. *J Pediatr Surg.* 1999;34:273-276.
- Van Loo J, Cummings J, Delzenne N, Englyst H, Franck A, Hopkins M, Kok N, Macfarlane G, Newton D, Quigley M, Roberfroid M. Functional food properties of nondigestible oligosaccharides a consensus report from the ENDO project (DGXII AI-RII-CT94-1095) *Br J Nutr* 1999;81:121-132.
- Vasiljevic T, Shah NP. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J.* 2008;18:714–28.
- Verhulst SL, Vael C, Beunckens C, Nelen V, Goossens H, Desager K. A longitudinal analysis on the association between antibiotic use, intestinal microflora, and wheezing during the first year of life. *J Asthma.* 2008;45:828–832.

- Vizoso Pinto MG, Rodriguez Gómez M, Seifert S, Watzl B, Holzapfel WH, Franz CM. Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. *Int J Food Microbiol.* 2009;133:86-93.
- Vu-Khac H, Holoda E, Majerciak M, Gaspar G, Pilipcinec E. Genotyping of fimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains isolated from Slovak piglets suffering from diarrhea. *Folia Microbiol* 2004;49:59-63.
- Walker A. Milk and two oligosaccharides. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:483
- Walker WA, Duffy LC. Diet and bacterial colonization: role of probiotics. *J Nutr Biochem.* 1998;9:668-75.
- Wallace T, Bradley S, Buckley N, Green-Johnson JM. Interactions of lactic acid bacteria with human intestinal epithelial cells: effects on cytokine production. *J food Protect.* 2003;66:466-72.
- Wang DQ, Cohen DE, Carey MC. Biliary lipids and cholesterol gallstone disease. *J Lipid Res.* 2009;50Suppl:S406–S411.
- Wang S, Ng L, Chow WL, Lee YK. Infant intestinal enterococcus faecalis down-regulates inflammatory responses in human intestinal cell lines. *World J Gastroenterol.* 2008;14:1067-76.
- Wang Y, Hammes F, De Roy K, Verstraete W, Boon N. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends Biotechnol.* 2010;28:416-424.
- Weitzman SA, Gordon LI. Inflammation and cancer: role of phagocyte-generated oxidants in carcinogenesis. *Blood.* 1990;76:655-63.
- West NP, Pyne DB, Kyd JM, Renshaw GMC, Fricker PA, Cripps AW. The effect of exercise on innate mucosal immunity. *Br J Sports Med* 2010;44:227-231.
- White JS, Hoper M, Parks RW, Clements WD, Diamond T. Patterns of bacterial translocation in experimental biliary obstruction. *J Surg Res.* 2006;132:80–84.
- Wjst M, Hoelscher B, Frye C, Wichmann HE, Dold S, Heinrich J. Early antibiotic treatment and later asthma. *Eur J Med Res.* 2001;6:263–271.
- Wohlgemuth S, Loh G, Blaut M. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *Int J Med Microbiol* 2010;300:3-10.
- Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr.* 2001;73:451S-455S.

- Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short Chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*. 2006;40:235-243.
- Xu J, Gordon JI. Inaugural article: honor thy symbionts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100:10452–10459.
- Xu J, Mahowald MA, Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Martens EC, Henrissat B, et al. Evolution of symbiotic bacteria in the distal human intestine. *PLoS Biol* 2007;5:e156.
- Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002;277:50959-50965.
- Younes H, Coudray C, Bellager J, Demigne C, Rayssiguier Y, Remesy C. Effects of two fermentable carbohydrates (inuline and resistant starch) and their combination on calcium and magnesium balance in rats. *Br J Nutr*. 2001;86:479-85.
- Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor- α -induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr* 2005;135:1752-1756.
- Zhang W, Azevedo MS, Gonzalez AM, Saif LJ, Van Nguyen T, Wen K, et al. Influence of probiotic *Lactobacilli* colonization on neonatal B cell responses in a gnotobiotic pig model of human rotavirus infection and disease. *Vet Immunol Immunopathol*. 2008;122:175-81.
- Zhao HY, Wang HJ, Lu Z, Xu SZ. Intestinal microflora in patients with liver cirrhosis. *Chin J Dig Dis*. 2004;5:64–67.
- Zhu X, Zhong T, Pandya Y, Joerger R. 16S rRNA-Based Analysis of Microbiota from the Cecum of Broiler Chickens. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:124-137.
- Zoumpapoulou G, Tsakalidou E, Dewull J, Pot B, Grangette C. Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model. *Int J Food Microbiol* 2008;131:40-51.

Anexo I

ANEXO I

Collection Nationale
de Cultures de Microorganismes

INSTITUT PASTEUR

25, Rue du Docteur Roux
F-75724 PARIS CEDEX 15

Tel : +33 1 45 68 82 50

Fax : +33 1 45 68 82 36

DR PEDRO ABELLAN BALLESTA
DIRECTOR

DR RICARDO MARTOS
PATENT AFFAIRS

HERO ESPANA S.A.
GTC INFANT NUTRITION
AVDA MURCIA 1
E-30820 ALCANTARILLA (MURCIA), SPAIN

V/R : -

N/R : CNCM-26145.0809

RE : *THREE BACTERIA DEPOSITED UNDER THE BUDAPEST TREATY:*

IDENTIFICATION REFERENCES

HERO 7
HERO 15B
HERO 22A

ACCESSION NUMBERS

CNCM I-4034
CNCM I-4035
CNCM I-4036

BY:

HERO ESPANA S.A.
GTC INFANT NUTRITION
AVDA MURCIA 1, E-30820 ALCANTARILLA (MURCIA), SPAIN

*COPY : PR ANGEL GIL HERNANDEZ AND PR ANTONIO SUAREZ GARCIA,
BIOQUIMICA DE LA NUTRICION, DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR II,
UNIVERSIDAD DE GRANADA, FACULTAD DE FARMACIA, CAMPUS CARTUJA, E-18071 GRANADA, SPAIN.*

P/J : 6

Dear Sirs,

The above-mentioned bacteria were received on 2 July 2008 for deposition under the Budapest Treaty. These bacteria are now accepted and in attestation of this, please find here enclosed :

- (1) the receipts referred to in Rule 7.1 of the Regulations under the Treaty, and
- (2) the first viability statements referred to in Rule 10.2.a)i).

Sincerely yours,


Georges WAGENER

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

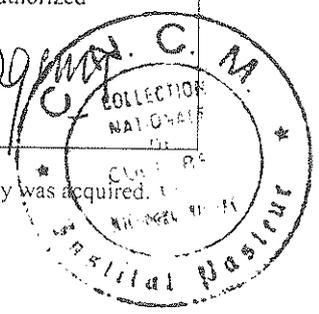
TO

**HERO ESPANA S.A.
GTC INFANT NUTRITION
AVDA MURCIA 1,
E-30820 ALCANTARILLA (MURCIA), SPAIN**

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <p align="center">HERO 7</p>	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: <p align="center">CNCM I-4034</p>
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 02 JULY 2008 (date of the original deposit). ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM) Address: INSTITUT PASTEUR 25 RUE DU DOCTEUR ROUX 75724 PARIS CEDEX 15	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s): GEORGES WAGENER Date: PARIS, 08 SEPTEMBER 2008



¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depositary authority was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO

PR ANGEL GIL HERNANDEZ AND
PR ANTONIO SUAREZ GARCIA,

BIOQUIMICA DE LA NUTRICION
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR II,
UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
CAMPUS CARTUJA
E-18071 GRANADA, SPAIN.

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO
WHOM THE VIABILITY STATEMENT IS MADE

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page

<p>I. DEPOSITOR</p> <p>Name: HERO ESPANA S.A.</p> <p>Address: GTC INFANT NUTRITION AVDA MURCIA 1, E-30820 ALCANTARILLA (MURCIA), SPAIN</p>	<p>II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</p> <p>Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: CNCM I-4034</p> <p>Date of the deposit or of the transfer ¹ : 02 JULY 2008</p>
<p>III. VIABILITY STATEMENT</p> <p>The viability of the microorganism identified under II above was tested on 02 JULY 2008 ². On that date, the said microorganism was</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> ³ viable.</p> <p><input type="checkbox"/> ³ no longer viable</p>	

¹ Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

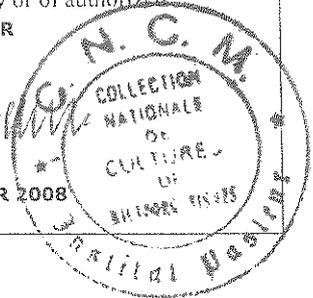
IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: **COLLECTION NATIONALE
DE CULTURES DE MICROORGANISMES
(CNCM)**
Address: **INSTITUT PASTEUR
25 RUE DU DOCTEUR ROUX
75724 PARIS CEDEX 15**

Signature(s) of person(s) having the power to represent the
International Depository Authority or of authorized
official(s): **GEORGES WAGENER**

Date: **PARIS, 08 SEPTEMBER 2008**



⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

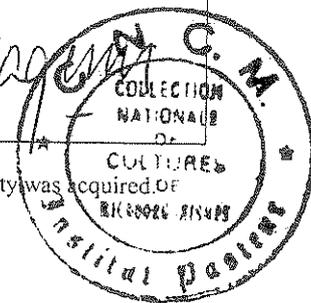
TO

**HERO ESPANA S.A.
GTC INFANT NUTRITION
AVDA MURCIA 1,
E-30820 ALCANTARILLA (MURCIA), SPAIN**

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <p align="center">HERO 15B</p>	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: <p align="center">CNCM I-4035</p>
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 02 JULY 2008 (date of the original deposit). ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM) Address: INSTITUT PASTEUR 25 RUE DU DOCTEUR ROUX 75724 PARIS CEDEX 15	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): GEORGES WAGENER Date: PARIS, 08 SEPTEMBER 2008



¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO

PR ANGEL GIL HERNANDEZ AND
PR ANTONIO SUAREZ GARCIA,

BIOQUIMICA DE LA NUTRICION
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR II,
UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
CAMPUS CARTUJA
E-18071 GRANADA, SPAIN.

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO
WHOM THE VIABILITY STATEMENT IS MADE

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page

<p>I. DEPOSITOR</p> <p>Name: HERO ESPANA S.A.</p> <p>Address: GTC INFANT NUTRITION AVDA MURCIA 1, E-30820 ALCANTARILLA (MURCIA), SPAIN</p>	<p>II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM</p> <p>Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: CNCM I-4035</p> <p>Date of the deposit or of the transfer¹ : 02 JULY 2008</p>
<p>III. VIABILITY STATEMENT</p> <p>The viability of the microorganism identified under II above was tested on 02 JULY 2008². On that date, the said microorganism was</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> ³ viable</p> <p><input type="checkbox"/> ³ no longer viable</p>	

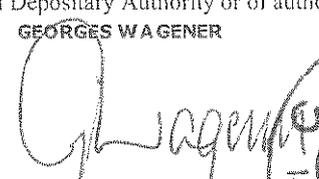
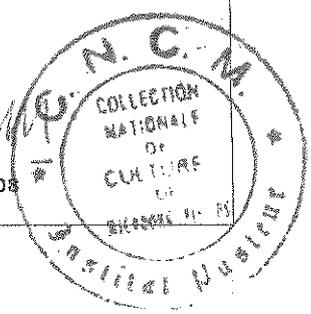
¹ Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴

V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

<p>Name: COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM)</p> <p>Address: INSTITUT PASTEUR 25 RUE DU DOCTEUR ROUX 75724 PARIS CEDEX 15</p>	<p>Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): GEORGES WAGENER</p> <p>Date: PARIS, 03 SEPTEMBER 2008</p>  
--	--

⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

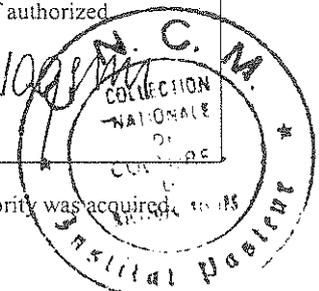
TO

**HERO ESPANA S.A.
GTC INFANT NUTRITION
AVDA MURCIA 1,
E-30820 ALCANTARILLA (MURCIA), SPAIN**

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT
issued pursuant to Rule 7.1 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified at the bottom of this page

NAME AND ADDRESS
OF DEPOSITOR

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: HERO 22A	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: CNCM I-4036
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input checked="" type="checkbox"/> a scientific description <input checked="" type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depository Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on 02 JULY 2008 (date of the original deposit). ¹	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depository Authority on _____ (date of the original deposit) and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on _____ (date of receipt of request for conversion).	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: COLLECTION NATIONALE DE CULTURES DE MICROORGANISMES (CNCM) Address: INSTITUT PASTEUR 25 RUE DU DOCTEUR ROUX 75724 PARIS CEDEX 15	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depository Authority or of authorized official(s): GEORGES W. A. GENERE Date: PARIS, 08 SEPTEMBER 2008



¹ Where Rule 6.4(d) applies, such date is the date on which the status of international depository authority was acquired.

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL
RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS
FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

TO

PR ANGEL GIL HERNANDEZ AND
PR ANTONIO SUAREZ GARCIA,

BIOQUIMICA DE LA NUTRICION
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y
BIOLOGIA MOLECULAR II,
UNIVERSIDAD DE GRANADA
FACULTAD DE FARMACIA
CAMPUS CARTUJA
E-18071 GRANADA, SPAIN.

NAME AND ADDRESS OF THE PARTY TO
WHOM THE VIABILITY STATEMENT IS MADE

VIABILITY STATEMENT
issued pursuant to Rule 10.2 by the
INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY
identified on the following page

I. DEPOSITOR	II. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM
<p>Name: HERO ESPANA S.A.</p> <p>Address: GTC INFANT NUTRITION AVDA MURCIA 1, E-30820 ALCANTARILLA (MURCIA), SPAIN</p>	<p>Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY:</p> <p style="text-align: center;">CNCM I-4036</p> <p>Date of the deposit or of the transfer ¹:</p> <p style="text-align: center;">02 JULY 2008</p>
<p>III. VIABILITY STATEMENT</p> <p>The viability of the microorganism identified under II above was tested on 02 JULY 2008 ². On that date, the said microorganism was</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> ³ viable</p> <p><input type="checkbox"/> ³ no longer viable</p>	

¹ Indicate the date of the original deposit or, where a new deposit or a transfer has been made, the most recent relevant date (date of the new deposit or date of the transfer).

² In the cases referred to in Rule 10.2(a)(ii) and (iii), refer to the most recent viability test.

³ Mark with a cross the applicable box.

IV. CONDITIONS UNDER WHICH THE VIABILITY TEST HAS BEEN PERFORMED ⁴

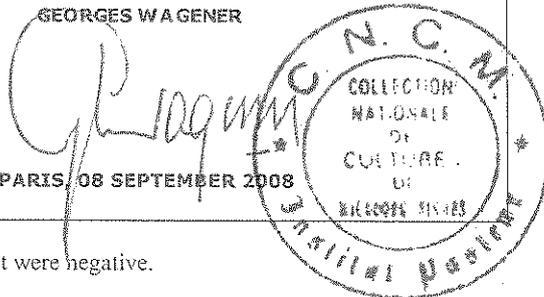
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY

Name: **COLLECTION NATIONALE
DE CULTURES DE MICROORGANISMES
(CNCM)**

Address: **INSTITUT PASTEUR
25 RUE DU DOCTEUR ROUX
75724 PARIS CEDEX 15**

Signature(s) of person(s) having the power to represent the
International Depository Authority or of authorized
official(s): **GEORGES WAGENER**

Date: **PARIS, 08 SEPTEMBER 2008**



⁴ Fill in if the information has been requested and if the results of the test were negative.

Anexo II

ANEXO II

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2010/103132 A1

(43) Fecha de publicación internacional
16 de septiembre de 2010 (16.09.2010)

PCT

- (51) Clasificación Internacional de Patentes:
C12N 1/20 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
A23C 9/127 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
A23L 1/10 (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)
A61K 35/74 (2006.01) *C12R 1/245* (2006.01)
- (21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2009/000130
- (22) Fecha de presentación internacional:
10 de marzo de 2009 (10.03.2009)
- (25) Idioma de presentación: español
- (26) Idioma de publicación: español
- (71) Solicitante (para todos los Estados designados salvo US): HERO ESPAÑA, S.A. [ES/ES]; GTC Infant Nutrition, Av, Murcia, 1, E-30820 Alcantarilla, Murcia (ES).
- (72) Inventores; e
- (75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): VIEITES FERNÁNDEZ, José María [ES/ES]; Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada-Campus de la Salud, 18071 Granada (ES). MUÑOZ QEZADA, Sergio Ignacio [CL/ES]; Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada-Campus de la Salud, 18071 Granada (ES). LLAMAS COMPANYY, Inmaculada [ES/ES]; Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada-Campus de la Salud, 18071 Granada (ES). MALDONADO LOZANO, José [ES/ES]; Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada-Campus de la Salud, 18071 Granada (ES). ROMERO BRAQUEHAIS, Fernando [ES/ES]; Hero España SA, Instituto Hero de Nutrición Infantil, Avda. Murcia 1, E-30820 Alcantarilla (Murcia) (ES). SUÁREZ GARCÍA, Antonio Francisco [ES/ES]; Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada-Campus de la Salud, 18071 Granada (ES). GIL HERNÁNDEZ, Ángel [ES/ES]; Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada-Campus de la Salud, 18071 Granada (ES).
- (74) Mandatarios: ARIZTI ACHA, Monica et al.; C/Hermosilla 3, E-28001 Madrid (ES).
- (81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Publicada:
— con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
— con la parte de lista de secuencias de la descripción (Regla 5.2(a))

(54) Title: ISOLATION, IDENTIFICATION AND CHARACTERISATION OF STRAINS WITH PROBIOTIC ACTIVITY, FROM FAECES OF INFANTS FED EXCLUSIVELY WITH BREAST MILK

(54) Título : AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD PROBIÓTICA A PARTIR DE HECES DE LACTANTES ALIMENTADOS EXCLUSIVAMENTE CON LECHE MATERNA

(57) Abstract: The invention relates to probiotic micro-organisms isolated from faeces of children exclusively fed with breast milk. Said micro-organisms are used in the food or pharmaceutical industry, especially for infant formula milk, due to their probiotic properties which have beneficial effects on the health of those ingesting them. Said micro-organisms consist of *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A (CNCM I-4036), *Lactobacillus paracasei* HERO 7 (CNCM I-4034) and *Bifidobacterium breve* HERO 15B (CNCM I-4035).

(57) Resumen: La presente invención se refiere a microorganismos probióticos aislados de heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna. Dichos microorganismos, dadas sus propiedades probióticas que confieren efectos beneficiosos en la salud de quienes los ingieren, son de aplicación en la industria alimenticia o farmacéutica, especialmente para su uso en fórmulas lácteas para la infancia. Dichos microorganismos consisten en *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A (CNCM I-4036), *Lactobacillus paracasei* HERO 7 (CNCM I-4034) y *Bifidobacterium breve* HERO 15B (CNCM I-4035).

WO 2010/103132 A1

TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES

Remitente: LA OFICINA RECEPTORA

Destinatario:
GARRIGUES IP, S.L.P
ATT. MONICA ARIZTI
HERMOSILLA, 3
28001 MADRID

PCT
 NOTIFICACIÓN DE LA RECEPCIÓN DE LOS
 DOCUMENTOS QUE CONSTITUYEN
 SUPUESTAMENTE UNA SOLICITUD
 INTERNACIONAL

(Instrucción Administrativa 301 del PCT)

Fecha de expedición
 (día/mes/año) **10 MAR 2009**

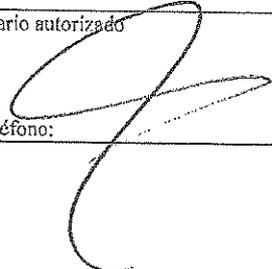
Referencia del expediente del solicitante o del mandatario
AX09006WO **NOTIFICACIÓN IMPORTANTE**

Solicitud internacional Nº
PCT/ES2009/000130 Fecha de recepción
 (día/mes/año)

Solicitante
Hero España, S.A.

Título de la invención
Aislamiento, identificación y caracterización de cepas con actividad problótica a partir de heces de lactantes alimentados exclusivamente con leche materna

1. Se notifica al solicitante que la oficina receptora ha recibido en la fecha de recepción arriba indicada, los documentos que supuestamente constituyen una solicitud internacional.
2. Se llama la atención al solicitante sobre el hecho de que la oficina receptora no ha comprobado aún si estos documentos satisfacen las condiciones del artículo 11.1), es decir si cumple los requisitos para que le sea atribuida una fecha de presentación internacional.
3. En cuanto la oficina receptora haya comprobado estos documentos, informará al solicitante en consecuencia.
4. El número de la solicitud internacional indicado más arriba ha sido otorgado provisionalmente a estos documentos. Se invita al solicitante a mencionar este número en toda la correspondencia con la oficina receptora.

Nombre y dirección postal de la Oficina receptora:  Funcionario autorizado: 

Nº de fax: Nº de teléfono:

PCT

PETITORIO

El abajo firmante pide que la presente solicitud internacional sea tramitada con arreglo al Tratado de Cooperación en materia de Patentes.

Para uso de la Oficina receptora únicamente

Solicitud internacional N°

Fecha de presentación internacional

Nombre de la Oficina receptora y "Solicitud internacional PCT"

Referencia al expediente del solicitante o del mandatario (si se desea) (como máximo, 12 caracteres) AX090006WO

Recuadro N° I TÍTULO DE LA INVENCION

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE CEPAS CON ACTIVIDAD PROBIÓTICA A PARTIR DE HECES DE LACTANTES ALIMENTADOS EXCLUSIVAMENTE CON LECHE MATERNA

Recuadro N° II SOLICITANTE

Esta persona también es inventor.

Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)

Hero España, S.A.
CTC Infant Nutrition
Av, Murcia, 1
E-30820 Alcantarilla
Murcia - España

N° de teléfono

N° de facsímil

N° de registro del solicitante en la Oficina

Autorización a utilizar el correo-e: al marcar esta casilla se autoriza a la Oficina receptora, la Administración de búsqueda internacional, la Oficina Internacional y la Administración de examen preliminar internacional a utilizar la dirección de correo-e que se indica en este recuadro para enviar con antelación, si la Oficina y la Administración así lo desean, copias de las notificaciones de la presente solicitud internacional (véanse también las notas relativas a los Recuadros N°s II y III)

Dirección de correo-e

Estado de nacionalidad (nombre del Estado):

ES

Estado de domicilio (nombre del Estado):

ES

Esta persona es solicitante para:

todos los Estados designados

todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América

los Estados Unidos de América únicamente

los Estados indicados en el recuadro suplementario

Recuadro N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja de continuación.

Recuadro N° IV MANDATARIO O REPRESENTANTE COMÚN; O DIRECCIÓN PARA LA CORRESPONDENCIA

La persona abajo identificada se nombra/ha sido nombrada para actuar en nombre del/ de los solicitante(s) ante las administraciones internacionales competentes como:

mandatario

representante común

Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país.)

Monica Arizti Acha
C/ Hermosilla, 3
28001 Madrid

N° de teléfono

+ 34 91 514 57 00

N° de facsímil

+ 34 91 514 56 02

N° de registro del mandatario en la Oficina

933/4

Autorización a utilizar el correo-e: al marcar esta casilla se autoriza a la Oficina receptora, la Administración de búsqueda internacional, la Oficina Internacional y la Administración de examen preliminar internacional a utilizar la dirección de correo-e que se indica en este recuadro para enviar con antelación, si la Oficina y la Administración así lo desean, copias de las notificaciones de la presente solicitud internacional (véanse también las notas relativas a los Recuadros N°s II y III)

Dirección de correo-e

monica.arizti.acha@garrigue
s.com

Dirección para la correspondencia: márchese esta casilla cuando no se nombre/se haya nombrado ningún mandatario o representante común y el espacio de arriba se utilice en su lugar para indicar una dirección especial a la que deba enviarse la correspondencia.

Recuadro Nº III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)

Si no se ha de utilizar ninguno de estos subrecuadros, esta hoja no debe ser incluida en el petitorio.

<p>Nombre y dirección: <i>(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</i></p> <p>José María Vieites Fernández Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada-Campus de la Salud 18071 Granada- ESPAÑA</p>	<p>Esta persona es:</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante únicamente</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> solicitante e inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor únicamente <i>(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</i></p> <p>Nº de registro del solicitante en la Oficina</p>
--	---

Estado de nacionalidad <i>(nombre del Estado):</i> ES	Estado de domicilio <i>(nombre del Estado):</i> ES
<p>Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América <input checked="" type="checkbox"/> los Estados Unidos de América únicamente <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario</p>	

<p>Nombre y dirección: <i>(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado (es decir, país) de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</i></p> <p>Sergio Ignacio Muñoz Quezada Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada-Campus de la Salud 18071 Granada - ESPAÑA</p>	<p>Esta persona es:</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante únicamente</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> solicitante e inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor únicamente <i>(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</i></p> <p>Nº de registro del solicitante en la Oficina</p>
--	---

Estado de nacionalidad <i>(nombre del Estado):</i> CL	Estado de domicilio <i>(nombre del Estado):</i> ES
<p>Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América <input checked="" type="checkbox"/> los Estados Unidos de América únicamente <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario</p>	

<p>Nombre y dirección: <i>(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</i></p> <p>Inmaculada Llamas Company Departamento de Microbiología Facultad de Farmacia, Universidad de Granada Campus de la Salud 18071 Granada - ESPAÑA</p>	<p>Esta persona es:</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante únicamente</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> solicitante e inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor únicamente <i>(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</i></p> <p>Nº de registro del solicitante en la Oficina</p>
---	---

Estado de nacionalidad <i>(nombre del Estado):</i> ES	Estado de domicilio <i>(nombre del Estado):</i> ES
<p>Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América <input checked="" type="checkbox"/> los Estados Unidos de América únicamente <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario</p>	

<p>Nombre y dirección: <i>(apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</i></p> <p>José Maldonado Lozano Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Avda de Madrid nº 11 - Universidad de Granada 18012 Granada - ESPAÑA</p>	<p>Esta persona es:</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante únicamente</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> solicitante e inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor únicamente <i>(si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</i></p> <p>Nº de registro del solicitante en la Oficina</p>
--	---

Estado de nacionalidad <i>(nombre del Estado):</i> ES	Estado de domicilio <i>(nombre del Estado):</i> ES
<p>Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América <input checked="" type="checkbox"/> los Estados Unidos de América únicamente <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario</p>	

Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en otra hoja de continuación.

Recuadro N° III OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)	
Si no se ha de utilizar ninguno de estos subrecuadros, esta hoja no debe ser incluida en el petitorio.	
<p>Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</p> <p>Fernando Romero Braquehals Hero España S.A. Instituto Hero de Nutrición Infantil Avda. Murcia 1 E-30820 Alcantarilla (Murcia) - ESPAÑA</p>	<p>Esta persona es:</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante únicamente</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> solicitante e inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor únicamente (si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</p> <p>N° de registro del solicitante en la Oficina</p>
Estado de nacionalidad (nombre del Estado): ES	Estado de domicilio (nombre del Estado): ES
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América <input checked="" type="checkbox"/> los Estados Unidos de América únicamente <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	
<p>Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado (es decir, país) de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</p> <p>Antonio Francisco Suárez García Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada-Campus de la Salud 18071 Granada- ESPAÑA</p>	<p>Esta persona es:</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante únicamente</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> solicitante e inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor únicamente (si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</p> <p>N° de registro del solicitante en la Oficina</p>
Estado de nacionalidad (nombre del Estado): ES	Estado de domicilio (nombre del Estado): ES
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América <input checked="" type="checkbox"/> los Estados Unidos de América únicamente <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	
<p>Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</p> <p>Ángel Gil Hernández Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Universidad de Granada-Campus de la Salud 18071 Granada- ESPAÑA</p>	<p>Esta persona es:</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante únicamente</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> solicitante e inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor únicamente (si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</p> <p>N° de registro del solicitante en la Oficina</p>
Estado de nacionalidad (nombre del Estado): ES	Estado de domicilio (nombre del Estado): ES
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América <input checked="" type="checkbox"/> los Estados Unidos de América únicamente <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	
<p>Nombre y dirección: (apellido seguido del nombre; si se trata de una persona jurídica, la designación oficial completa. En la dirección deben figurar el código postal y el nombre del país. El país de la dirección indicada en este recuadro es el Estado de domicilio del solicitante si no se indica más abajo el Estado de domicilio.)</p>	<p>Esta persona es:</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante únicamente</p> <p><input type="checkbox"/> solicitante e inventor</p> <p><input type="checkbox"/> inventor únicamente (si se marca esta casilla, no se debe rellenar lo que sigue.)</p> <p>N° de registro del solicitante en la Oficina</p>
Estado de nacionalidad (nombre del Estado):	Estado de domicilio (nombre del Estado):
Esta persona es solicitante para: <input type="checkbox"/> todos los Estados designados <input type="checkbox"/> todos los Estados designados salvo los Estados Unidos de América <input type="checkbox"/> los Estados Unidos de América únicamente <input type="checkbox"/> los Estados indicados en el recuadro suplementario	
<input type="checkbox"/> Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en otra hoja de continuación.	