

Universidad de Granada  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Farmacología



# Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune

Tesis Doctoral  
M<sup>a</sup> Belén Arribas Arribas

Editor: Editorial de la Universidad de Granada  
Autor: María Belén Arribas Arribas  
D.L.: GR. 2019-2009  
ISBN: 978-84-692-1876-1



Universidad de Granada  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Farmacología



# Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune

Tesis Doctoral para aspirar al Grado de Doctor en Farmacia presentada por

M<sup>a</sup> Belén Arribas Arribas

2009



D. Julio Gálvez Peralta, Profesor Titular y Director del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada,

Certifica: Que el trabajo de Tesis Doctoral titulado: “Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune” ha sido realizado por la Licenciada en Farmacia M<sup>a</sup> Belén Arribas Arribas en los laboratorios de este departamento.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a veinte de Enero de 2009.

Dr. Julio Gálvez Peralta



D. Antonio Zarzuelo Zurita, Profesor Catedrático del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, D. Julio Gálvez Peralta, Profesor Titular del Departamento de Farmacología de la Universidad de Granada, y Dña. M<sup>a</sup> Elena Rodríguez Cabezas, Doctora en Farmacia por la Universidad de Granada, como directores

Certifican: Que la Tesis Doctoral titulada: “Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune” presentada por la Licenciada en Farmacia M<sup>a</sup> Belén Arribas Arribas, ha sido llevada acabo bajo su dirección y reúne todos y cada uno de los requisitos necesarios para ser defendida y optar al grado de Doctor.

Y a los efectos legales se firma la siguiente constancia en Granada, a veinte de Enero de 2009.

Dr. Antonio Zarzuelo Zurita

Dr. Julio Gálvez Peralta

Dra. M<sup>a</sup> Elena Rodríguez



*Índice*

---



<b>Índice de tablas .....</b>	<b>19</b>
<b>Índice de figuras.....</b>	<b>21</b>
<b>Introducción .....</b>	<b>25</b>
1. Flora intestinal.....	27
2. Probióticos .....	30
2.1. Evolucion histórica y concepto de probiótico.....	30
2.2. Microorganismos probióticos .....	33
2.3. Acciones sobre la funcionalidad del tracto gastrointestinal .....	34
2.3.1. Competición con bacterias patógenas .....	35
2.3.2. Mejora de la función de la barrera intestinal.....	36
2.3.3. Producción de nutrientes importantes para la función intestinal .....	37
2.3.4. Inmunomodulación .....	38
2.4. Efecto de los probióticos en distintas patologías.....	43
2.4.1. Diarrea.....	43
2.4.2. Intolerancia a la lactosa.....	47
2.4.3. Enfermedad inflamatoria intestinal .....	49
2.4.3.1. Colitis ulcerosa.....	51
2.4.3.2. Enfermedad de Crohn.....	52
2.4.3.3. Pouchitis.....	53
2.4.4. Úlcera gastroduodenal .....	54
2.4.5. Cáncer .....	55
2.4.6. Alergias.....	58
2.4.7. Vaginitis .....	61
<b>Objetivos.....</b>	<b>63</b>

<b>Material y métodos .....</b>	<b>67</b>
1. Ensayos <i>in vivo</i> .....	69
1.1. Inducción de colitis experimental mediante ácido trinitrobencenosulfónico y administración de probióticos.....	69
1.1.1. Probióticos .....	69
1.1.2. Animales de experimentación .....	69
1.1.3. Inducción de la colitis experimental .....	70
1.1.4. Diseño experimental .....	79
1.1.5. Valoración del proceso inflamatorio intestinal.....	72
1.2. Inducción de shock séptico mediante lipopolisacárido y administración de probióticos .....	75
1.2.1. Probióticos .....	75
1.2.2. Animales de experimentación .....	75
1.2.3. Inducción del shock séptico .....	75
1.2.4. Diseño experimental .....	76
1.2.5. Sacrificio de los animales.....	77
1.3. Determinación de parámetros bioquímicos.....	77
1.3.1. Determinación de la actividad mieloperoxidasa.....	77
1.3.2. Determinación del contenido hepático de glutatión total.....	78
1.3.3. Determinación de la biosíntesis colónica de LTB <sub>4</sub> , TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ .....	80
1.3.4. Determinación de proteínas. Método del ácido bicinchonínico (BCA) ....	80
1.3.5. Determinación de la expresión de óxido nítrico sintasa inducible.....	81
2. Ensayos <i>ex vivo</i> .....	82
2.1. Extracción de linfocitos de bazo de ratón.....	82
2.2. Extracción y cuantificación de ARN .....	83
2.2.1. Extracción y cuantificación de ARN total .....	83
2.2.2. Determinación de la concentración de ARN .....	84
2.2.3. Transcripción inversa (RT).....	84

2.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) .....	84
2.2.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa .....	86
<b>Resultados.....</b>	<b>67</b>
1. Actividad antiinflamatoria intestinal de los probióticos en el modelo de colitis experimental inducida mediante TNBS en ratas .....	89
1.1. Parámetros generales .....	90
1.2. Parámetros macroscópicos .....	92
1.3. Estudio histológico.....	93
1.4. Estudio bioquímico .....	97
2. Actividad de los probióticos en el modelo de shock séptico inducido mediante LPS en ratones .....	102
2.1. Elección de la dosis de lipopolisacárido .....	103
2.2. Administración de probióticos e inducción del shock séptico .....	103
2.3. Estudio macroscópico.....	104
2.4. Estudio bioquímico .....	105
<b>Discusión.....</b>	<b>121</b>
1. Efecto de los distintos probióticos en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas .....	124
2. Efecto de los distintos probióticos en el modelo de shock séptico inducido por LPS en ratones .....	141
<b>Conclusiones.....</b>	<b>161</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>165</b>
<b>Abreviaturas .....</b>	<b>209</b>



## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Efecto inmunomodulador de varios probióticos. <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
<b>Tabla 2.</b> Escala de valoración del índice de daño macroscópico descrito por Bell <i>et al.</i> , (1995) en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas. <b>¡Error! Marcador no definido.</b>	
<b>Tabla 3.</b> Escala de valoración del daño histológico descrita por Stucchi <i>et al.</i> , (2000) en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas.....	74
<b>Tabla 4.</b> Secuencias de oligonucleótidos, número de ciclos de ampliación, temperatura de hibridación y pares de bases de cada uno de los parámetros ampliados mediante PCR. ....	85
<b>Tabla 5.</b> Efecto de los probióticos sobre la relación peso/longitud en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas. ....	93
<b>Tabla 6.</b> Efecto de la administración de TNBS en la síntesis colónica de MPO, LTB <sub>4</sub> , TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$ en el modelo de colitis experimental en ratas.....	98
<b>Tabla 7.</b> Peso de distintos órganos de ratones sanos y ratones a los que se les indujo el shock séptico mediante LPS. ....	105
<b>Tabla 8.</b> Producción de TNF $\alpha$ en plasma y en pulmón, en ratones a los que se les indujo el shock séptico mediante LPS. ....	106
<b>Tabla 9.</b> Actividad mieloperoxidasa en pulmón y en colon, y producción de glutathion hepático, en ratones a los que se les indujo el shock séptico mediante LPS.....	108
<b>Tabla 10.</b> Producción de IL-2 e IL-5 en esplenocitos de ratón estimulados durante 48 horas con Concanavalina A. ....	112

<b>Tabla 11.</b> Producción de IL-10 en esplenocitos de ratón sin estimular y estimulados durante 48 horas con Concanavalina A.....	115
<b>Tabla 12.</b> Producción de IgG en esplenocitos de ratón estimulados durante 72 horas con LPS y en plasma.....	118
<b>Tabla 13.</b> Estudios clínicos realizados con distintos probióticos en la inducción de la remisión de la pouchitis. ....	126
<b>Tabla 14.</b> Estudios clínicos realizados con distintos probióticos en la inducción y el mantenimiento de la remisión de la colitis ulcerosa. ....	127
<b>Tabla 15.</b> Estudios clínicos realizados con distintos probióticos en la inducción y el mantenimiento de la remisión de la enfermedad de Crohn. ....	128
<b>Tabla 16.</b> Efectos beneficiosos de algunos probióticos en varios modelos experimentales de inflamación intestinal. ....	129
<b>Tabla 17.</b> Resumen de los resultados obtenidos con los distintos probióticos en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas. ....	140

---

**ÍNDICE DE FIGURAS**

<b>Figura 1.</b> Microorganismos que se encuentran en los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal.....	29
<b>Figura 2.</b> Mecanismos de acción ejercidos por las bacterias probióticas.....	35
<b>Figura 3.</b> Compartimentos que integran el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal.....	39
<b>Figura 4.</b> Esquema de la fisiopatología de los trastornos intestinales que originan diarrea.....	44
<b>Figura 5.</b> Diseño experimental en el modelo del TNBS.....	71
<b>Figura 6.</b> Diseño experimental en el modelo del LPS.....	76
<b>Figura 7.</b> Evolución del peso corporal de los animales durante el estudio.....	91
<b>Figura 8.</b> Incidencia de diarrea tras 24 horas de la inducción del daño mediante TNBS.....	91
<b>Figura 9.</b> Índice de daño macroscópico en ratas sanas y colíticas, con y sin tratamiento probiótico.....	92
<b>Figura 10.</b> Cortes histológicos de colon teñidos con hematoxilina-eosina.....	94
<b>Figura 11.</b> Índice de daño microscópico en ratas sanas y colíticas, con y sin tratamiento probiótico.....	97
<b>Figura 12.</b> Efecto de los probióticos sobre la actividad mieloperoxidasa colónica en el modelo de colitis inducido por TNBS en ratas.....	98
<b>Figura 13.</b> Efecto de los probióticos sobre la síntesis colónica de LTB <sub>4</sub> en el modelo de colitis inducido por TNBS en ratas.....	99

<b>Figura 14.</b> Efecto de los probióticos sobre la síntesis colónica de TNF $\alpha$ en el modelo de colitis inducido por TNBS en ratas.....	101
<b>Figura 15.</b> Efecto de los probióticos sobre la síntesis colónica de IL-1 $\beta$ en el modelo de colitis inducido por TNBS en ratas.....	101
<b>Figura 16.</b> Efecto de los probióticos sobre la producción de TNF $\alpha$ en pulmón y en plasma, en ratones a los que se les indujo el shock séptico mediante LPS.....	107
<b>Figura 17.</b> Efecto de los probióticos sobre la actividad mieloperoxidasa en pulmón y en colon, en ratones a los que se les indujo el shock séptico mediante LPS.....	109
<b>Figura 18.</b> Efecto de los probióticos sobre la producción de glutatión hepático total, en ratones a los que se les indujo el shock séptico mediante LPS.....	110
<b>Figura 19.</b> Efecto de los probióticos sobre la expresión de iNOS en colon mediante Western blot, en ratones a los que se les indujo el shock séptico mediante LPS.....	111
<b>Figura 20.</b> Efecto de los probióticos sobre la producción de IL-2 mediante ELISA, en esplenocitos de ratones estimulados durante 48 horas con Concanavalina A.....	113
<b>Figura 21.</b> Efecto de los probióticos sobre la producción de IL-5 mediante ELISA, en esplenocitos de ratones estimulados durante 48 horas con Concanavalina A.....	114
<b>Figura 22.</b> Efecto de los probióticos sobre la producción de IL-10 mediante ELISA, en esplenocitos de ratón sin estimular y estimulados durante 48 horas con Concanavalina A.....	116

**Figura 23.** Efecto de *L. salivarius* y *L. fermentum* sobre la expresión de IL-2, IL-5 e IL-10 mediante RT-PCR, en esplenocitos de ratón estimulados con Concanavalina A..... 117

**Figura 24.** Efecto de los probióticos sobre la producción de IgG mediante ELISA, en esplenocitos de ratón estimulados durante 72 horas con LPS y en plasma..... 119

**Figura 25.** Alteración producida por el TNBS tras su administración intracolónica en el modelo de colitis experimental inducido en ratas..... 134

**Figura 26.** Vía de señalización del receptor del LPS. .... 145



*Introducción*

---



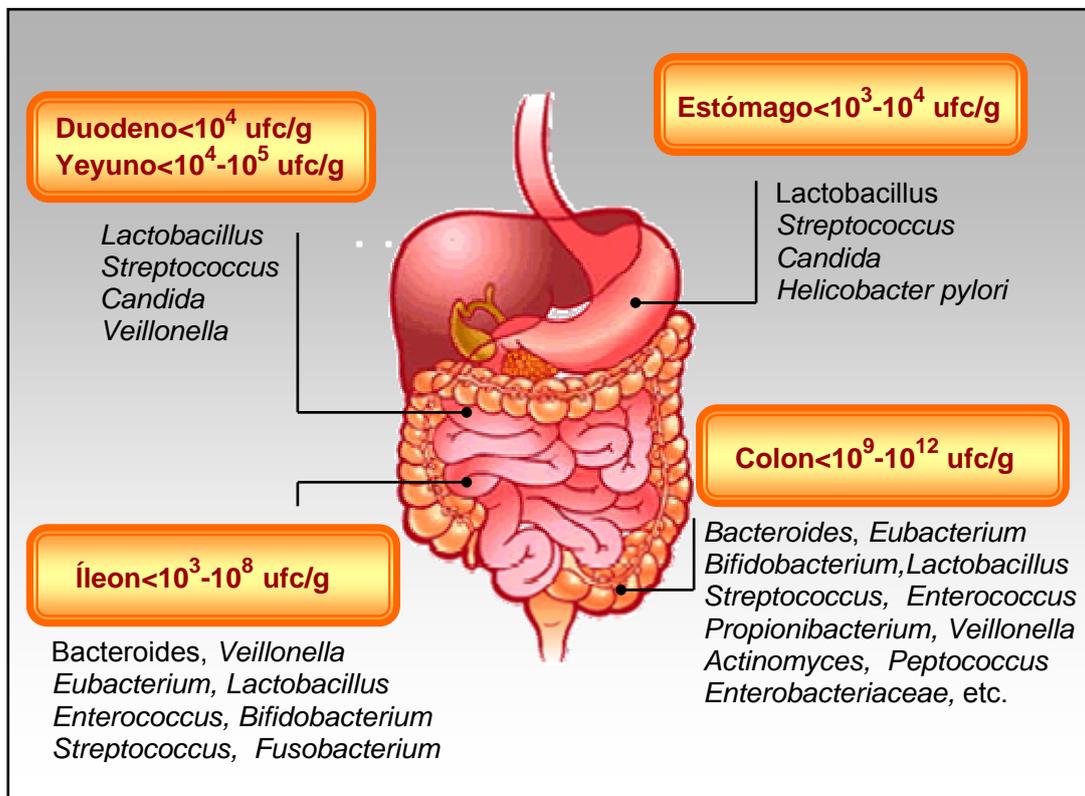
## 1. FLORA INTESTINAL

El tracto gastrointestinal humano constituye un complejo ecosistema en continuo contacto con el medio externo, siendo el hábitat natural de un gran número de bacterias, que han evolucionado y se han adaptado desde hace milenios a su entorno. Este ecosistema incluye numerosos microorganismos necesarios para el mantenimiento de la homeostasis intestinal que son capaces de promover efectos beneficiosos para la salud, pero también contiene otros considerados como potenciales patógenos por su capacidad de invadir al hospedador. Se pueden diferenciar entre dos tipos de flora intestinal: la residente o autóctona y la pasajera o transitoria. La primera se adhiere a las células epiteliales de la mucosa, la forman microorganismos fijos que se multiplican con rapidez, se encuentran bien adaptados, son inocuos y estables. La flora pasajera no se fija al epitelio, ni se establece en el intestino, está constituida por los microorganismos no patógenos procedentes de la porción superior del tubo digestivo, los alimentos y el medio ambiente (Suarez *et al.*, 1994).

Antes del nacimiento, el tracto gastrointestinal es estéril, siendo distintos los acontecimientos que pueden determinar la colonización inicial. Ésta tiene lugar durante el parto, en el cual se produce la primera exposición microbiana del recién nacido por la flora fecal y vaginal de la madre, habiéndose observado diferencias entre niños nacidos por cesárea o por vía vaginal (Adlerberth *et al.*, 1991; Gronlund *et al.*, 1999; Harmsen *et al.*, 2000). En los meses siguientes se establece una flora comensal estable (Fanaro *et al.*, 2003), planteándose que la lactancia materna promueve una composición bacteriana diferente a la nutrición mediante leches artificiales. Así, el recién nacido se caracteriza por la inmadurez de su sistema inmune, y se ha propuesto que el equilibrio ideal consiste en que la madre transfiera sus propias bacterias a la vez que confiere mecanismos de defensa frente

a esos mismos gérmenes mediante la lactancia materna (anticuerpos específicos, moléculas de inmunidad innata, etc.). En este sentido, se ha propuesto que la disparidad entre la adquisición de bacterias y la transmisión de elementos de defensa inmunitaria en estas etapas iniciales podría jugar un papel relevante en la patogénesis de algunas enfermedades inmunoinflamatorias de la vida adulta (Murch 2001). Se considera que es a la edad de dos años cuando la composición y el metabolismo de la microflora intestinal de un niño se asemejan a la de un adulto (Guérin *et al.*, 1997). Es interesante resaltar que si bien hay modificaciones transitorias derivadas del uso de antibióticos o de tipo dietético, éstas suelen ser reversibles, de modo que cada individuo mantiene una flora predominante relativamente estable durante toda su vida.

Inicialmente, diversos géneros de bacterias aerobias colonizan el tubo digestivo, sobre todo enterobacterias como *Escherichia coli* junto con diversas especies del género *Lactobacillus*. Éstas consumen el oxígeno del ambiente y progresivamente se establece un microsistema en el que hay un mayor predominio de especies anaerobias obligadas, como *Bacteroides*, *Clostridia*, *Eubacterias* y *Bifidobacterium*. Mientras que el tracto gastrointestinal superior contiene relativamente pocas bacterias ( $10^3$  ufc/g), este número se incrementa progresivamente conforme se avanza distalmente, siendo máximo en el colon, en donde residen un total de  $10^{14}$  bacterias vivas ( $10^{11}$  bacterias por gramo de contenido intestinal), constituidas por aproximadamente 400 especies distintas (Figura 1).



**Figura 1.** Microorganismos que se encuentran en los diferentes segmentos del tracto gastrointestinal.

Es destacable el hecho de que la diversa microflora intestinal establece una relación simbiótica con el individuo. Así, en el lumen intestinal, las bacterias se benefician de un constante flujo de nutrientes, de una temperatura estable y de un buen nicho donde desarrollarse. De igual manera, el hospedador se beneficia de las bacterias por su capacidad de sintetizar vitamina K, obtener energía de los nutrientes no absorbidos en forma de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), inhibir el crecimiento de microorganismos potencialmente patógenos y mantener la integridad y funcionalidad de la mucosa. De hecho, hay estudios en animales libres de gérmenes que revelan que la ausencia total de microflora intestinal provoca

alteraciones significativas en la estructura y función intestinal, como son una reducción del número de vellosidades y desarrollo de criptas poco profundas, junto con un bajo recuento de leucocitos (Sharma *et al.*, 1995; Szentkuti *et al.*, 1990), y una disminución del número y la densidad de las placas de Peyer (Maeda *et al.*, 2001).

En su convivencia con las bacterias, los vertebrados desarrollan en algunas de sus células, como son las células epiteliales intestinales, receptores de reconocimiento de componentes específicos de bacterias, hongos y virus. Estos receptores incluyen los TLR (*toll- like receptor*) y los NOD (dominios de oligomerización de unión de nucleótidos), que son imprescindibles para el inicio de la respuesta inmunitaria innata y cuya activación genera diferentes cascadas de señalización intracelular que acaban en la producción de citoquinas proinflamatorias (Sansonetti 2004). De esta forma se enlazan la respuesta inmunológica innata y adaptativa, ya que la primera acaba en la maduración de las células dendríticas, que activan la respuesta inmunológica adaptativa (Medzhitov 2001). Una de las características más importantes de la flora comensal es su incapacidad para atravesar la barrera epitelial; sin embargo, si alguna de estas bacterias la atraviesa, son fagocitadas rápidamente por los macrófagos de la mucosa del individuo sano, evitándose la activación de la respuesta inmune intestinal (tolerancia), en contraposición con lo que ocurriría si fuera un microorganismo patógeno (Macpherson *et al.*, 2000).

## **2. PROBIÓTICOS**

### **2.1. EVOLUCION HISTÓRICA Y CONCEPTO DE PROBIÓTICO**

En la última década del siglo XX comenzaron a desarrollarse nuevos conceptos en nutrición, como fruto de los nuevos estilos de vida en la sociedad desarrollada y la preocupación por una elevada calidad de vida, lo que promovió la

aparición del término “alimento funcional”. Éste se puede definir como aquel *producto, alimento modificado o ingrediente alimentario, que puede proveer beneficios a la salud superiores a los ofrecidos por los alimentos tradicionales* (Diplock *et al.*, 1991). El efecto positivo de un alimento funcional puede ser tanto en el mantenimiento del estado de salud, como en la reducción del riesgo de padecer una enfermedad. De esta forma, los alimentos que sean capaces de modificar la flora intestinal, derivándose consecuencias positivas en la salud del individuo, pueden considerarse como funcionales.

La modulación de la microflora intestinal para mejorar la salud se ha efectuado empíricamente desde tiempos ancestrales, existiendo noticias del empleo de leche fermentada para el tratamiento de infecciones gastrointestinales ya en el año 76 a. C. No obstante, no fue hasta el siglo XX cuando se empezó a sugerir que la Humanidad no sólo había hecho uso inadvertido de una multitud de microorganismos para la elaboración y/o conservación de numerosos alimentos, sino que además existían algunas bacterias que ejercían efectos beneficiosos para la salud de los hospedadores que las consumían. En 1906, Cohendy tras administrar leche fermentada por *Lactobacillus bulgaricus* (actualmente *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus*) a pacientes con alteraciones en sus “fermentaciones intestinales”, observó una notable mejoría tras 8-12 días de tratamiento. Paralelamente, Tissier no sólo había descubierto la existencia de bifidobacterias en el tracto intestinal de lactantes alimentados exclusivamente con leche materna, sino que había demostrado los beneficios clínicos derivados de la modulación de la microflora intestinal de niños con infecciones intestinales (Tissier 1906).

Dos años después, el premio Nóbel ruso Elie MetchniKoff publicó un libro, titulado *Prolongation of Life*, que tuvo una gran influencia en la comunidad científica.

En él postulaba que el consumo de las bacterias que intervenían en la fermentación del yogur contribuía al mantenimiento de la salud mediante la supresión de las bacterias putrefactivas de la microbiota intestinal y que ésta era la causa de la longevidad de los campesinos búlgaros, grandes consumidores de yogur. En 1909, Isaac Carasso fundó su primer establecimiento de yogures (Danone) en Barcelona, contribuyendo decisivamente al prestigio de un producto que, durante varias décadas, sólo se podía adquirir en farmacias y que se empleaba para prevenir o aliviar trastornos tan diversos como diarrea, estreñimiento, colitis mucosa, colitis ulcerativa crónica, cistitis o dermatitis.

Posiblemente el término “probiótico”, que etimológicamente procede del griego “pro bios” (por la vida), fue empleado por primera vez por Vergio en 1954, cuando comparaba los efectos adversos que los antibióticos ejercían sobre la microbiota intestinal con las acciones beneficiosas ejercidas por otros factores que no pudo determinar. Una década más tarde, Lilly y Stillwell (1965) se referían a los probióticos como microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos. Fuller (1989) redefinió a los probióticos como “aquellos suplementos alimenticios integrados por microorganismos vivos que afectan beneficiosamente al hospedador que los consume mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal”. Recientemente, la OMS ha revisado su definición y los considera como “organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador”.

No obstante, esta definición está en continua evolución en un intento de adaptarse a los nuevos conocimientos que surgen de los trabajos de investigación con probióticos. En este sentido, varios científicos han demostrado que algunos microorganismos inactivados, e incluso sus componentes celulares, pueden ejercer un efecto beneficioso en la salud (Ouwehand y Salminen, 1998; Isolauri *et al.*, 2002), por lo

que todos estos hallazgos deberán considerarse en futuras revisiones del concepto de probiótico.

## 2.2. MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS

De acuerdo con lo comentado anteriormente, los probióticos son microorganismos que promueven la salud de quienes los ingieren, y para que puedan considerarse como tales es necesario que cumplan una serie de características, entre las que se incluyen:

- 1) Ser de origen humano, ya que, en teoría, las cepas aisladas de seres humanos sanos van a presentar una mayor facilidad para colonizar el intestino humano y probablemente no sean patógenas, habiéndose utilizado para definir esta característica el acrónimo inglés “GRAS” (“generally recognized as safe”). No obstante, también se han utilizado probióticos de origen no humano, como *Saccharomyces cerevisiae*, demostrándose su seguridad tras el consumo regular por el hombre.
- 2) Deben poseer tolerancia a las condiciones ambientales del tracto gastrointestinal, ya que si los microorganismos probióticos han de llegar viables al intestino, es preciso que resistan el pH gástrico, las enzimas digestivas y la acción detergente e inhibidora de las sales biliares.
- 3) Han de ser capaces de colonizar el intestino, con un tiempo corto de replicación, y de adherirse a la mucosa intestinal para que tenga lugar la modulación de la respuesta inmune, así como la exclusión de microorganismos patógenos, si bien en esto último puede deberse también a su capacidad de producir compuestos antimicrobianos.

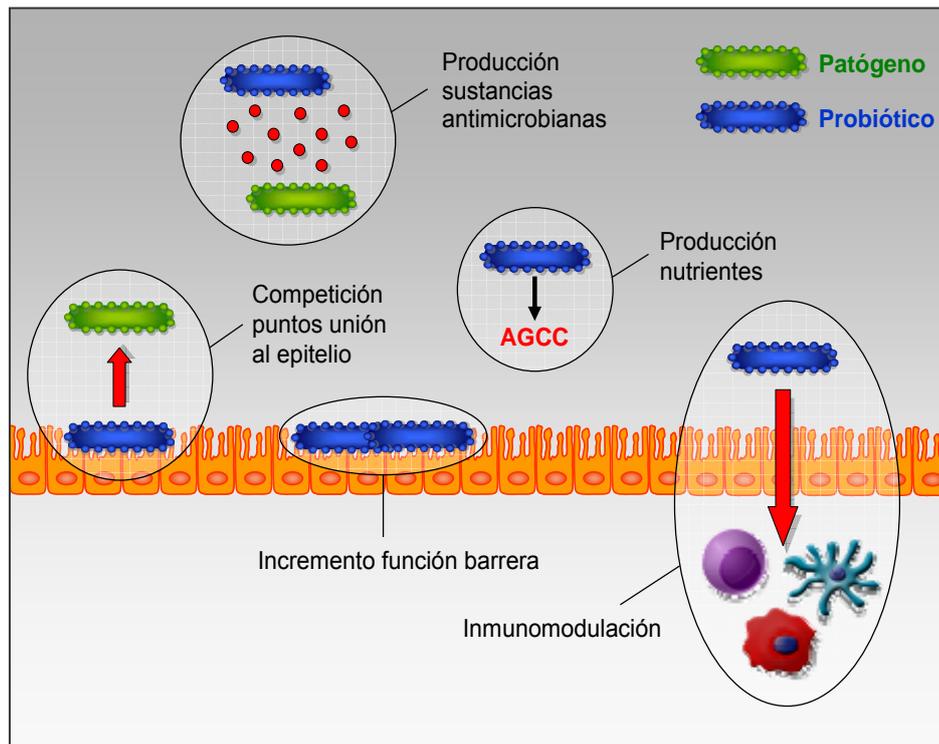
Entre los microorganismos utilizados como probióticos, las bacterias lácticas y las bifidobacterias ocupan el lugar más destacado, pero también se utilizan con este fin bacterias que pertenecen a otros géneros, como *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*, así como levaduras, principalmente *Saccharomyces cerevisiae* (Shortt 1998; Vaughan *et al.*, 2002). Dentro de las bacterias lácticas se incluyen bacilos o cocos Gram-positivos de los géneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Weissella*, *Oenococcus*, *Atopobium*, *Alloicoccus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus* y *Carnobacterium* (Holzapfel y Wood, 1995; Schleifer y Ludwig 1995), cuya característica común es la de ser productores de ácido láctico como principal producto final de su metabolismo. El género *Bifidobacterium* no está relacionado filogenéticamente con las bacterias lácticas, pero comparte con ellas diversas propiedades fisiológicas, bioquímicas y ecológicas (Aguirre y Collins, 1993).

### **2.3. ACCIONES SOBRE LA FUNCIONALIDAD DEL TRACTO GASTROINTESTINAL**

Clásicamente se ha atribuido el efecto de los probióticos a su capacidad de modificar la composición de la microflora intestinal de potencialmente dañina a beneficiosa para el hospedador. Sin embargo, el mejor conocimiento de estos microorganismos ha permitido establecer diferentes acciones a través de las cuales ejercen efectos beneficiosos (Figura 2):

1. Competición con bacterias nocivas por:
  - desplazamiento de su sitio de unión al epitelio.
  - inhibición de su crecimiento y/o muerte mediante la producción de compuestos antibacterianos o reducción del pH.
2. Mejora de la función de barrera intestinal.

3. Producción de nutrientes importantes para la función intestinal.
4. Inmunomodulación.



**Figura 2.** Mecanismos de acción ejercidos por las bacterias probióticas.

### 2.3.1. Competición con bacterias patógenas

Como se ha comentado anteriormente, los probióticos son bacterias sin capacidad patógena, capaces de prevenir la adherencia, establecimiento, replicación y/o la acción de las bacterias patógenas. Entre los posibles mecanismos se incluye una modificación del pH en el lumen intestinal, debido fundamentalmente

a la producción de ácidos orgánicos, principalmente lactato y los ácidos grasos de cadena corta acetato, propionato y butirato, como consecuencia de su capacidad fermentativa sobre la fibra dietética (Le Blay *et al.*, 1999; Morrison *et al.*, 2006).

Otro mecanismo involucrado es la producción de compuestos antibacterianos como pueden ser bacteriocinas o peróxido de hidrógeno (Jack *et al.*, 1995; Liévin *et al.*, 2000). Por ejemplo, *Lactobacillus salivarius ssp. salivarius* UCC118 inhibe el crecimiento de microorganismos patógenos, como *Listeria monocytogenes* o *Staphylococcus aureus* resistentes a la metilina, como consecuencia de su capacidad de producir el factor antimicrobiano ABP118 (Dunne *et al.*, 1999).

Sin embargo, el desplazamiento de bacterias nocivas no necesariamente implica actividad bacteriostática o bactericida, sino que puede ser consecuencia de la competición física por unirse al epitelio, consumiendo también los sustratos disponibles para las bacterias patógenas. Así, distintos ensayos *in vitro* e *in vivo* han demostrado el efecto competitivo ejercido por *Bifidobacterium infantis* sobre el crecimiento de *Bacteroides vulgatus* (Shiba *et al.*, 2003).

### **2.3.2. Mejora de la función de la barrera intestinal**

El tracto gastrointestinal, al tratarse de la mayor superficie del cuerpo en continuo contacto con el medio externo, cuenta con distintos mecanismos que tratan de prevenir la entrada de compuestos o agentes potencialmente lesivos para el organismo. Para este cometido, la monocapa epitelial y el revestimiento de moco que la recubre, junto con las uniones estrechas que mantienen unidos a los enterocitos, forma una barrera física que previene la entrada a la lámina propia de microorganismos potencialmente patógenos y de antígenos lumbinales. Por otro lado, la inmunoglobulina (Ig) A secretada por el intestino, además de bloquear la unión de microorganismos patógenos al epitelio, evitando por tanto su posterior acceso a la

lámina propia intestinal, es también capaz de aglutinar bacterias y virus en unos grandes complejos que son atrapados en la barrera de moco y eliminados en las heces.

Un ejemplo de la importancia del mantenimiento de la función de barrera del intestino, lo constituye la enfermedad inflamatoria intestinal, en donde se ha descrito que la integridad de la barrera epitelial está comprometida, lo que permite el paso de antígenos lumenales a la lámina propia, que pueden desencadenar una respuesta inmune exagerada y contribuir de forma clave en la perpetuación del proceso inflamatorio en el intestino (Teahon *et al.*, 1992; Plevy 2002). Se ha postulado que los probióticos podrían facilitar la reversión de esta situación y normalizar la permeabilidad intestinal incrementada, mejorando así la respuesta inflamatoria intestinal. Apoyando esto, se ha descrito que *Lactobacillus casei* y *Clostridium butyricum* promueven la proliferación de las células epiteliales intestinales en rata (hasta un 200% en el colon), mejorando de esta forma la protección del tejido intestinal (Ichikawa *et al.*, 1999).

### **2.3.3. Producción de nutrientes importantes para la función intestinal**

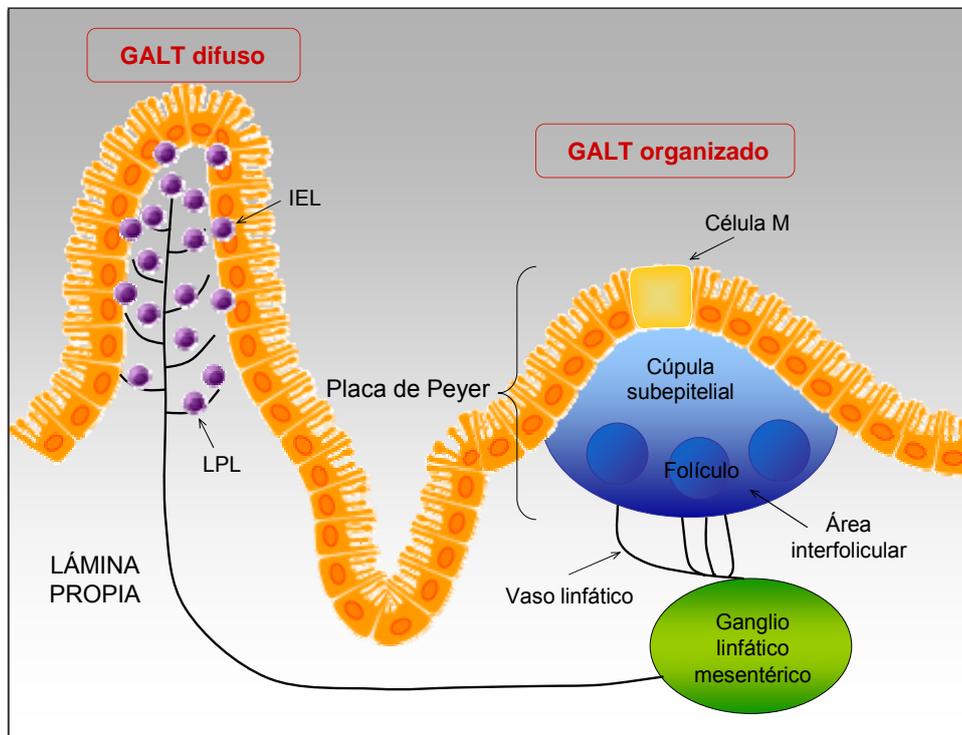
Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acetato, propionato y butirato, generados principalmente en el intestino grueso, son los productos finales en la fermentación llevada a cabo por la flora bacteriana comensal de los carbohidratos procedentes de la dieta que no han sido digeridos en el intestino delgado. Son la principal fuente de energía para los colonocitos, regulando su desarrollo y diferenciación (Cummings 1981). Además, y en íntima relación con su capacidad de colaborar en la función de barrera intestinal, tienen efectos tróficos sobre el epitelio intestinal, lo que es de gran importancia para la recuperación de la integridad del epitelio en caso de daño y para la reducción del riesgo de translocación bacteriana, que puede tener lugar en situaciones de alteración de la

barrera intestinal como en la enfermedad inflamatoria intestinal (Urao *et al.*, 1999). En concreto, el butirato tiene la capacidad de inducir enzimas (por ejemplo transglutaminasas) que tiene un papel fundamental en la restauración de la mucosa dañada (D'Argenio *et al.*, 1999).

#### **2.3.4. Inmunomodulación**

El sistema inmunitario intestinal constituye la parte más extensa y compleja del sistema inmunitario, ya que al estar en contacto con el exterior, recibe diariamente una enorme carga antigénica, debiendo distinguir entre potenciales patógenos y antígenos inoocuos como son las proteínas de la dieta y las bacterias comensales. El principal componente del sistema inmunitario intestinal está constituido por el tejido linfoide asociado al intestino (GALT, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*), en el que se puede distinguir dos compartimentos (Mowat 2003; Figura 3):

- a) GALT organizado, constituido por folículos linfoides aislados, folículos linfoides asociados o placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos. Estos tejidos son considerados como los principales sitios de inducción de la respuesta inmunitaria intestinal.
  
- b) GALT difuso, integrado por poblaciones de linfocitos dispersas a lo largo del epitelio y de la lámina propia del intestino. Es en este compartimento donde se lleva a cabo la fase efectora de la respuesta inmunitaria intestinal.



**Figura 3.** Compartimentos que integran el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (GALT): GALT organizado (placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos) y GALT difuso (linfocitos intraepiteliales o IEL y linfocitos de la lámina propia o LPL). Figura adaptada de Mowat 2003.

Dada su localización intestinal y la posibilidad de interactuar con el epitelio de la mucosa, es evidente que los probióticos actúan tanto sobre la inmunidad intestinal específica como inespecífica, y que este hecho está íntimamente relacionado con sus efectos beneficiosos sobre el hospedador. Diversos estudios han puesto de manifiesto que numerosos lactobacilos pueden alertar al sistema inmune intestinal, y secundariamente favorecer el rechazo de microorganismos infecciosos potencialmente lesivos, esto lo pueden realizar mediante la producción

de inmunoglobulinas específicas de tipo A (Kaila *et al.*, 1992; Rinne *et al.*, 2005), o la activación de células K (“natural killer”) (Gill *et al.*, 2001; Ogawa *et al.*, 2006; Sheih *et al.*, 2001). Otros efectos inmunomoduladores de estos probióticos se derivan de su capacidad para incrementar la actividad fagocítica de leucocitos intestinales, promover una mayor proliferación de linfocitos B junto con un aumento en la secreción de inmunoglobulinas (A y G), y estimular la producción de citoquinas como interleuquina (IL)-2, IL-6 o factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$  (Tabla 1). Otros probióticos, como *E. coli* no patógeno o *Lactobacillus sakei*, tienen la capacidad de aumentar la producción de citoquinas antiinflamatorias como IL-10 o factor de crecimiento transformante (TGF)- $\beta$  y al mismo tiempo reducir las de carácter proinflamatorio, por ejemplo TNF- $\alpha$ , interferon (IFN)- $\gamma$  o IL-8 (Haller *et al.*, 2000; Maassen *et al.*, 2000; Madsen *et al.*, 1999; Morita *et al.*, 2002). Estas propiedades inmunomoduladoras también se han puesto de manifiesto en estudios llevados a cabo en humanos con patologías intestinales. Así, cuando se administró una mezcla probiótica a pacientes con anastomosis ileoanal, se pudo observar una disminución en los niveles de ácido ribonucleico mensajero (RNAm) de IL-1 $\beta$ , IL-8 e IFN- $\gamma$ , así como en el número de células polimorfonucleares, en comparación con los pacientes que recibieron el placebo (Lammers *et al.*, 2005). Ulisse *et al.*, (2001), describieron una reducción de la expresión de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-1 $\alpha$  y de la actividad óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en biopsias de pacientes con pouchitis tratados con probióticos. En explantes de la mucosa de íleon procedentes de pacientes con enfermedad de Crohn, el tratamiento con *L. casei* y con *L. bulgaricus* redujo la liberación de TNF- $\alpha$  y el número de células CD4 (Borrueal *et al.*, 2002).

**Tabla 1.** Efecto inmunomodulador de varios probióticos.

<b>Autor</b>	<b>Probiótico</b>	<b>Efecto</b>
Kitazawa <i>et al.</i> , 2001	<i>Lactobacillus gasseri</i>	↑ Proliferación células B
Sheih <i>et al.</i> , 2001	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HN001	↑ Capacidad fagocítica
Gill <i>et al.</i> , 2001	<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019	↑ Capacidad fagocítica
Arunachalam <i>et al.</i> , 2000	<i>Bifidobacterium lactis</i> HN019	↑ Capacidad fagocítica
Yasui <i>et al.</i> , 1999	<i>Bifidobacterium breve</i>	↑ Proliferación células B con aumento IgA
Marin <i>et al.</i> , 1998	<i>Streptococcus thermophilus</i>	↑ IL-6, TNF $\alpha$
Zalashko <i>et al.</i> , 1997	<i>Lactobacillus acidophilus</i> Ke-10	↑ IL-2
Isolauri <i>et al.</i> , 1995	<i>Lactobacillus casei</i> GG	↑ Células secretoras IgG

A pesar del gran número de estudios, en la actualidad no se conoce con exactitud cómo interaccionan los probióticos con las células linfoides del intestino para conseguir la activación del sistema inmunitario intestinal. En este sentido, se ha propuesto que los lactobacilos pueden modificar la producción de citoquinas mediante la participación de algún componente de su pared celular que no ha sido totalmente caracterizado (Solis-Pereyra 1997; Rangavajhyala *et al.*, 1997).

Es importante destacar que el efecto de los probióticos sobre la respuesta inmune no se limita a una actuación sobre el tejido intestinal, pudiendo afectar a la inmunidad sistémica, con claros efectos beneficiosos en diferentes afecciones de

alta prevalencia, especialmente en la población infantil, como son el eczema atópico y las alergias en general (Majamaa e Isolauri, 1997).

Por último, es interesante comentar que no todos los probióticos ejercen los mismos efectos, existiendo una gran variabilidad inmunológica entre especies, e incluso entre cepas pertenecientes a la misma especie. Por ejemplo, mientras que *L. acidophilus* aumenta la proliferación *ex vivo* de linfocitos en el bazo del ratón, otras especies de *Lactobacillus* como *casei*, *gasseri* y *rhamnosus* la inhiben, demostrando efectos sobre linfocitos T y B que son específicos de la cepa (Kirjavainen *et al.*, 1999). Por otro lado, se ha observado que unas cepas de lactobacilos tienen capacidad de estimular principalmente respuestas humorales y otras promueven la inmunidad celular e inhiben la producción de anticuerpos. Así ocurre al comparar los efectos de la administración oral de *Bifidobacterium breve* YIT4064 y *Lactobacillus casei* Shirota, respectivamente (Yasui *et al.*, 1999).

De todo lo anteriormente expuesto, el uso de probióticos se asocia en la actualidad con un gran número de efectos beneficiosos en humanos, muchos de ellos establecidos de forma empírica, como la mejora de la intolerancia a la lactosa, la modulación del sistema inmunitario, la reducción de la hipercolesterolemia y la protección frente a enfermedades infecciosas, inflamatorias y alérgicas (Gill 2003). Sin embargo, no se debe asumir, que todos los probióticos posean las mismas propiedades beneficiosas. De igual manera, cuando se adscribe un efecto beneficioso a una cepa, como se ha dicho anteriormente, éste no se puede extrapolar a las restantes cepas de la misma especie. Incluso el efecto que una cepa puede presentar depende de las condiciones de su empleo y, muy particularmente, de la dosis. La concentración de probióticos viables que se considera que debe llegar al intestino para producir un efecto beneficioso es  $\geq 10^6$  ufc/ml en el intestino delgado y  $\geq 10^8$  ufc/g en el colon (Marteau y Shanahan, 2003).

Existen evidencias de la eficacia de las bacterias probióticas en ciertas áreas, y suficientes estudios experimentales en otras para justificar posibles mecanismos de acción que faciliten el desarrollo de microorganismos más efectivos, así como para definir los límites de su efectividad. En base a esto, pasamos a detallar algunos de los efectos beneficiosos atribuidos a los probióticos, con distinto grado de apoyo experimental.

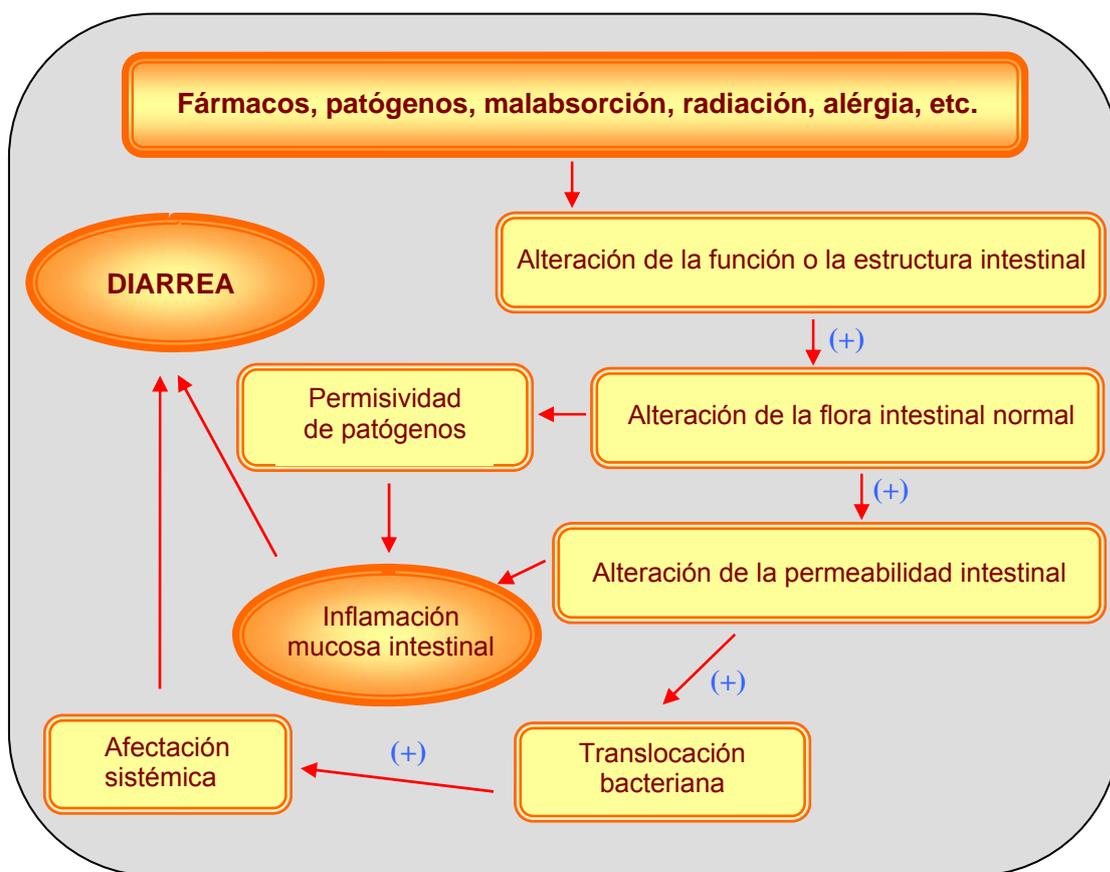
## **2.4. EFECTO DE LOS PROBIÓTICOS EN DISTINTAS PATOLOGÍAS**

Si tenemos en cuenta que los probióticos son principalmente consumidos por vía oral, es lógico pensar que sus efectos beneficiosos se pusieran de manifiesto fundamentalmente en patologías intestinales. Sin embargo, y como se ha comentado anteriormente, la posibilidad de modular la respuesta inmune de tipo sistémica hace que los probióticos también presenten efectos positivos en otras alteraciones extraintestinales, mediante administración oral o tópica. Son diferentes las patologías intestinales frente a las que los probióticos se han propuesto presentar efectividad: diarrea, intolerancia a la lactosa, enfermedad inflamatoria intestinal, úlcera gastroduodenal, e incluso cáncer. En relación con las afecciones sistémicas en las que los probióticos pueden presentar un efecto beneficioso se incluyen distintos fenómenos de tipo alérgico. Más recientemente se ha propuesto el efecto terapéutico que pueden presentar los probióticos en el tratamiento de la vaginitis, tras su administración local.

### **2.4.1. Diarrea**

La diarrea se define como un síndrome caracterizado por un incremento en la frecuencia, el peso y/o el contenido de agua en las heces. De forma general, se trata de una respuesta inespecífica del intestino ante diferentes situaciones (Figura 4), incluyendo la presencia en el lumen intestinal de toxinas o microorganismos patógenos (diarrea del viajero, infección intestinal por Rotavirus y toxiinfecciones

alimentarias); falta de absorción de sustancias osmóticamente activas (malabsorción de lactosa); consumo de fármacos (diarrea postantibiótica); así como por lesiones en la mucosa intestinal (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y síndrome del intestino irritable).



**Figura 4.** Esquema de la fisiopatología de los trastornos intestinales que originan diarrea. Con el símbolo (+) se indican los puntos potenciales de prevención y tratamiento con probióticos.

A pesar de los recientes avances en el conocimiento de la patogénesis de los procesos diarreicos, la diarrea aguda de tipo infeccioso constituye una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo. No obstante, la relevancia de la diarrea va a variar en función de la población que se vea afectada. Mientras que en los países desarrollados la diarrea generalmente supone un problema de tipo socioeconómico, por el gasto sanitario y de absentismo laboral que conlleva, en los países subdesarrollados se trata de un grave problema de salud, siendo una de las principales causas de muerte en niños, fundamentalmente por deshidratación. En relación con la incidencia y mortalidad, en países en vías de desarrollo se ha establecido que los menores de cinco años presentan aproximadamente 6 cuadros de diarrea al año, originando una tasa de mortalidad de 1.600/100.000 niños; por el contrario, en los países desarrollados, como España, se ha descrito menos de un episodio al año para la población infantil menor de dos años, con una tasa de mortalidad de 2,3/1.000.000 niños.

Entre los mecanismos por los que los probióticos podrían prevenir o aminorar la diarrea se incluyen:

- Competición con virus o bacterias patógenas por sus sitios de unión a las células epiteliales (DeSimone 1986; O'Sullivan *et al.*, 1992). De este modo impedirán la alteración de la permeabilidad intestinal, así como la consiguiente translocación bacteriana.
- Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas debido a la producción de bacteriocinas (del Miraglia y De Luca 2004). El efecto beneficioso de *L. acidophilus* vendría dado por la producción de sustancias antimicrobianas que podrían neutralizar a las enterotoxinas de *E. coli* (Rani y Khetarpaul, 1998).

- Mejora de los mecanismos de defensa del tracto gastrointestinal, como pueden ser un posible aumento en la secreción de IgA, así como en la producción de moco (Tomioka *et al.*, 1992; Wagner *et al.*, 1997; Steidler *et al.*, 2000; Walker 2000).

Probióticos como *Lactobacillus rhamnosus* GG (Saavedra 2000; Marteau *et al.*, 2001), *Lactobacillus reuteri* (Saavedra 2000), *Saccharomyces boulardii* (Marteau *et al.*, 2001; Guandalini 2006) y *Bifidobacterium spp.* (Saavedra 2000) han mostrado eficacia en estudios llevados a cabo en procesos diarreicos en humanos. Un caso especial de diarrea aguda es la denominada como “diarrea del viajero”, que afecta principalmente a los viajeros procedentes de países desarrollados que visitan lugares con una deficiente higiene. En esta situación los probióticos también han demostrado un efecto beneficioso (Hilton *et al.*, 1977), se ha descrito que cepas de *L. acidophilus* (Katelaris *et al.*, 1995; Floch y Hong-Curtiss 2001) o leche fermentada con *L. casei*, pueden reducir a la mitad la incidencia de este tipo de diarrea.

En las diarreas ocasionadas por rotavirus se ha observado que los probióticos que más prometen en su tratamiento son *Lactobacillus rhamnosus* GG (Tabbers y Benninga 2007), *Sacc. boulardii* (Gaón *et al.*, 2003), *Bifidobacterium spp.* (Nopchinda *et al.*, 2002) y *Strep. thermophilus* (Nopchinda *et al.*, 2002).

La diarrea asociada al tratamiento con antibióticos puede ser de carácter agudo o de curso crónico y se deriva de una modificación en la composición de la microflora intestinal, habiéndose descrito una reducción en el número de lactobacilos y bifidobacterias (Black *et al.*, 1991). Varios estudios han demostrado la capacidad de las leches fermentadas con *B. longum* o con *L. casei* de disminuir la incidencia de diarrea asociada con el empleo de ampicilina o eritromicina. Por otra

parte, la administración de *L. casei* (Gorbach 2000), *Lactobacillus* GG (Pochapin 2000) o *Saccharomyces boulardii* (Surawicz *et al.*, 1989), suprimen la reactivación de la diarrea debida a la sobreinfección por *Clostridium difficile* tras el uso de antibióticos, sobre todo en ancianos, diabéticos, malnutridos y pacientes con insuficiencia renal crónica o inmunodepresión. En el caso de *S. boulardii*, se demostró que, aunque no previene la infección por *Clostridium difficile*, la administración de la levadura reduce la recidiva pos-tratamiento del 22% al 9%.

El empleo de probióticos en el tratamiento de la diarrea y la distensión abdominal asociada al síndrome del intestino irritable (SII) es controvertido (Marteau *et al.*, 2001), debido a que los ensayos clínicos se han hecho con un número de pacientes demasiado reducido como para tener suficiente potencia estadística (Thompson 2001). De todas formas, se ha demostrado una significativa reducción del dolor abdominal y del meteorismo en 60 pacientes con SII tras el empleo de *L. plantarum* (Nobaek *et al.*, 2000), y más recientemente una reducción del dolor y la distensión abdominal tras la administración del mismo probiótico en un grupo de 40 enfermos (Niedzielin *et al.*, 2001). O'Sullivan y O'Morain (2000), en un grupo de 24 pacientes tratados con *L. casei* frente a placebo, sólo encontraron mejoría del dolor abdominal y la distensión en el grupo de pacientes con diarrea, en el que hubo además una reducción en el número de deposiciones, por lo que se sugiere que serían estos pacientes con diarrea los que más parecen beneficiarse.

#### **2.4.2. Intolerancia a la lactosa**

La lactosa es el principal azúcar en la leche de los mamíferos, siendo digerida por la enzima lactasa presente en el intestino delgado. La intolerancia a la lactosa es una situación en la que existe una deficiencia de esta enzima, lo que hace que este disacárido pase inalterado al intestino grueso, donde es fermentado por la flora intestinal, con la consiguiente producción de agua, ácidos grasos y gases, que

ocasionan síntomas como diarrea, dolor abdominal o distensión por gases. Cerca del 70% del total de la población mundial presenta intolerancia a la lactosa, mientras que en España esta intolerancia la presenta el 30% de la población total, y dentro de ésta, el 50% son ancianos. Entre las causas que pueden generar intolerancia a la lactosa se incluyen la alteración en la mucosa intestinal (enfermedad de Crohn), la infección por bacterias o parásitos, el SII..., y posiblemente la alteración en la composición de la flora intestinal.

La eficacia de los probióticos en el tratamiento de los signos y síntomas que acompañan a la intolerancia de la lactosa vendría dada por:

- Un incremento de la actividad lactasa en el intestino delgado por parte de las bacterias productoras de ácido láctico (Alm 1982; Gilliland y Kim 1984; Fernandes *et al.*, 1987; Marteau *et al.*, 1990).
- La fermentación de azúcares, principalmente lactosa, en ácidos orgánicos como el ácido láctico y el acético (Jiang y Savaiano, 1997). Así, en pacientes con deficiencia de lactasa el proceso de digestión de la leche se desarrolla perfectamente al consumir yogur y otras leches fermentadas. Esto también puede ser debido a que la consistencia de las leches fermentadas produce un aumento en el tiempo de tránsito intestinal, favoreciendo de esta forma la digestión de la lactosa (Vesa *et al.*, 2000).

Se ha podido comprobar que el consumo de yogur con *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus bulgaricus* reduce los síntomas de intolerancia a la lactosa, aunque es necesario que la concentración bacteriana en el yogur sean superiores a  $10^8$  ufc/ml de yogur (Salminen *et al.*, 1996; Gorbach 2000). De Vrese *et al.*, establecen que estos efectos son debidos fundamentalmente a la presencia de la enzima beta-galactosidasa de origen microbiano en el yogur, que se encuentra protegida de la secreción gástrica por la pared bacteriana y que es

posteriormente liberada en el intestino delgado donde ejerce su acción. Estos mismos autores proponen que la mayor eficacia que puede presentar el yogur frente a los otros probióticos podría explicarse en función de su necesidad de colonizar el colon, lugar en donde estas bacterias sí que podrían aliviar la sintomatología asociada a la presencia de lactosa sin digerir (de Vrese *et al.*, 2001).

### **2.4.3. Enfermedad inflamatoria intestinal**

Bajo el término de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) quedan englobadas la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). Ambas patologías se caracterizan por su evolución crónica, así como por presentar alternancia entre períodos de exacerbación y de remisión de los síntomas. La EC puede afectar a cualquier segmento del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano, si bien es más frecuente en la región ileocecal (Gassull y Cabre, 1994). La inflamación se propaga a través de toda la pared intestinal, originando la aparición de perforaciones, estenosis y fístulas en órganos adyacentes (Gasche 2000; Levine 1994). Las lesiones afectan de forma discontinua y simultánea a cualquier zona del tubo digestivo, es decir, pueden aparecer intercaladamente segmentos inflamados con otros que no lo están. En contraste con la EC, la afectación de la CU se limita al colon, fundamentalmente a la región distal (recto/ano), y se extiende progresivamente en dirección proximal. La inflamación afecta predominantemente a las capas superficiales de la pared intestinal, normalmente mucosa y submucosa, y se caracteriza por la infiltración de neutrófilos, eosinófilos y células plasmáticas, con formación frecuente de abscesos de las criptas (Obrador y Riera, 1994; Stenson y McDermott, 1991). Dentro del proceso inflamatorio intestinal también se encuentra la “pouchitis” (o reservoritis), ésta surge en el 35%-40% de los pacientes a los que se les ha realizado una proctocolectomía.

En general, las tasas más altas de incidencia y prevalencia para la EC y para la CU se han descrito en el norte de Europa, Reino Unido y Norteamérica, que son regiones geográficas asociadas históricamente a la EII, habiéndose descrito que son 2,2 y 1,4 millones de personas las que sufren estas enfermedades en Europa y Estados Unidos respectivamente (Loftus 2004). Sin embargo, existe una incidencia y prevalencia crecientes en otras áreas como el sur y centro de Europa, Asia, África y Latinoamérica.

Aunque la etiología de la EII no se conoce en su totalidad, la hipótesis más aceptada establece que en un individuo genéticamente predispuesto interactúan determinados factores ambientales, originándose una respuesta inmune exagerada frente a un antígeno presente en el lumen intestinal, respuesta que no es convenientemente abolida por los mecanismos responsables de este cometido, y que promueve la aparición y mantenimiento del proceso inflamatorio (Podolsky 2002).

Para explicar el posible efecto antiinflamatorio intestinal de los probióticos se han propuesto la participación de varios mecanismos, entre los que se incluyen:

- Competición con bacterias nocivas por el sitio de fijación al epitelio. *E. coli* Nissle 1917 es capaz de reducir la invasión de *E. coli* enteroinvasivo en un 97% (Malchow 1997; Rembacken *et al.*, 1999). La fijación de bacterias al epitelio intestinal hace que se vea disminuida la permeabilidad intestinal, lo que impide el paso de antígenos lumbales a la lámina propia (Plevy 2002).
- Inhibición del crecimiento de bacterias patógenas y/o inducción de su muerte mediante la producción de compuestos antibacterianos o la reducción del pH.

- Producción de nutrientes importantes para la función intestinal. Se ha postulado que la deficiencia de ácidos grasos de cadena corta puede estar relacionada con la aparición de la EII (Roediger 1980) y los probióticos, gracias a su actividad metabólica, pueden revertir esta situación.
- Modulación de la respuesta inmune de la mucosa del hospedador.

#### **2.4.3.1. Colitis ulcerosa**

El primer estudio que evaluó la eficacia de los probióticos en la EII se realizó en pacientes con CU, en donde se evaluó la actividad de *E. coli* Nissle 1917 en comparación con bajas dosis de mesalamina. Los resultados obtenidos revelaron que la relación remisión/recaídas (en porcentaje) en el caso del probiótico fue del 16/67 frente al 11/73 de la mesalamina (Kruis *et al.*, 1997). En el 2004 se ampliaron estos estudios, valorando la efectividad de una preparación oral de *E. coli* Nissle frente a mesalamina en un estudio aleatorio a doble ciego con 327 pacientes durante 12 meses, obteniendo igualmente la ausencia de diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento, siendo el porcentaje de las recaídas del 36,4% en el grupo de pacientes tratados con probiótico, y del 33,9% en el grupo tratado con mesalamina (Kruis *et al.*, 2004). Otro estudio realizado con la mezcla de probióticos denominada VSL#3 (*L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *B. longum*, *B. breve* y *B. infantis*) demostró que fue útil en el mantenimiento de remisión de los síntomas en 15 de 20 pacientes, que no sufrieron recaídas durante 1 año (Venturi *et al.*, 1999). Más recientemente, Zocco *et al.*, (2006), estudiaron la eficacia de la asociación de *L. rhamnosus* GG con mesalamina en el mantenimiento de la remisión de la CU en comparación con mesalamina y con *L. rhamnosus* GG administrados por separado, no obteniendo diferencias entre los tres grupos en el número de recaídas después de 6 y de 12

meses de tratamiento; sin embargo, sí se obtuvieron diferencias en el tiempo de remisión, que fue mayor en ambos grupos tratados con el probiótico.

La eficacia del tratamiento probiótico también se evaluó en la colitis ulcerosa activa, demostrándose la equivalencia entre *E. coli* Nissle 1917 y mesalamina en la inducción de la remisión de la CU (Rembacken *et al.*, 1999).

Entre los estudios que apoyan el efecto beneficioso de los probióticos en la colitis ulcerosa se encuentra el publicado por Ishikawa *et al.*, (2003), en el que se ensayó la eficacia de una leche fermentada con bifidobacterias en el tratamiento de la colitis ulcerosa durante 1 año y se comprobó que se produjo una exacerbación de los síntomas en sólo 3 de 11 pacientes tratados con la leche fermentada, reducción que fue significativa en comparación con el grupo control sin tratamiento probiótico, en donde recidivaron 9 de los 10 pacientes incluidos en este grupo; sin embargo, no se observaron diferencias en el índice de la actividad endoscópica de la enfermedad. Posteriormente se realizó otro estudio con esta misma leche fermentada con *Bifidobacterium* en pacientes con colitis ulcerosa activa, utilizando un grupo control que recibió placebo. Transcurridas 2 semanas se pudo observar una reducción significativa tanto del daño histológico como del índice de actividad endoscópica en los pacientes tratados con leche, en comparación con el grupo control (Kato *et al.*, 2004).

#### **2.4.3.2. Enfermedad de Crohn**

No existe un gran número de trabajos que describan el uso de probióticos en la prevención y tratamiento de la enfermedad de Crohn. Guslandi *et al.*, (2000), llevaron a cabo un ensayo en el que se probó la eficacia de *Saccharomyces boulardii* cuando se asociaba a mesalamina en el mantenimiento de la remisión de la EC, comprobando que a los 6 meses, la incidencia de recaídas era del 37,5% en

el grupo al que se le administró solamente mesalamina, y del 6,3% en el grupo tratado conjuntamente con mesalamina y el probiótico. En otro estudio, McCarthy *et al.*, (2001), mostraron que la administración oral de *Lactobacillus salivarius* UCC118 reducía de manera significativa el índice de la enfermedad en pacientes con EC de carácter leve o moderado. Aunque estos resultados pueden ser considerados como prometedores, es importante indicar la existencia de otros estudios en los que los probióticos no han demostrado tener eficacia. En un estudio randomizado controlado por placebo en 98 pacientes, se mostró que *L. johnsonii* LA1 no prevenía la recurrencia de EC postoperatoria (Marteau *et al.*, 2006). De igual manera, *L. rhamnosus* GG tampoco la previno, en pacientes con EC post-operatoria y resección intestinal (Prantera *et al.*, 2002).

#### **2.4.3.3. Pouchitis**

Es en esta patología donde los probióticos han demostrado un beneficio indiscutible, al comprobarse en distintos estudios que estos son capaces de mantener la remisión inducida con antibióticos en pacientes con pouchitis crónica, tras la resección del colon debido a una colitis ulcerosa refractaria. En este sentido, Gionchetti *et al.*, (2000), realizaron ensayos utilizando la mezcla probiótica VSL#3 en pacientes con pouchitis crónica recurrente, y pudieron comprobar una reducción en la incidencia de recaídas tras 9 meses a un 15%, frente al 100% del grupo placebo. Otro estudio con los mismos grupos, también demostró que tras un año, sólo desarrollaron pouchitis un 10% frente a un 40% del grupo placebo tras la cirugía por colitis ulcerosa (Gionchetti *et al.*, 2003). También se llevó a cabo un estudio aleatorio a doble ciego, en 20 pacientes tratados con *L. rhamnosus* GG durante 3 meses, utilizando un placebo como control (Kuisma *et al.*, 2003). Sin embargo, en contraste con los estudios realizados con la mezcla VSL#3, no se observaron diferencias significativas en la pouchitis crónica durante el tratamiento con este probiótico.

#### 2.4.4. Úlcera gastroduodenal

La úlcera gastroduodenal es la pérdida de tejido que ocurre en aquellas partes del tracto digestivo expuestas a la acción del ácido y de la pepsina secretados por el estómago. Los factores más importantes implicados en la etiología son el uso de antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y la infección por *Helicobacter pylori*. Se trata de una patología bastante frecuente en el mundo occidental (Oeste de Europa, Norteamérica y Australia) ya que afecta a una media del 10% de la población en algún momento de su vida, oscilando la prevalencia entre el 6 y el 15%.

La infección por *H. pylori* debilita el revestimiento mucoso que protege el estómago y el duodeno, y permite que el ácido afecte a la superficie sensible que se encuentra debajo de este revestimiento. Esta bacteria puede sobrevivir en el ácido del estómago porque secreta enzimas que lo neutralizan, mecanismo que facilita que la bacteria se abra paso hasta la capa mucosa protectora, y una vez allí, su forma de espiral le ayuda a perforarla. Por tanto, debido al efecto de los jugos gástricos y a las bacterias, esa superficie delicada se irrita, ocasionando la aparición de la úlcera. Se ha demostrado que *H. pylori* necesita cierto tiempo para entrar en contacto con el epitelio (Isogai *et al.*, 1997), habiéndose propuesto que los probióticos pueden impedir su colonización mediante:

- Producción de ácidos orgánicos, como acético o láctico.
- Desplazamiento de *H. pylori* de sus sitios de unión al epitelio.

Además, se ha comprobado que en pacientes con úlcera gastroduodenal existe una deficiencia de lactobacilos o de bifidobacterias, que puede incluso asociarse con el simultáneo aumento de enterobacterias oportunistas lo que puede producir un cambio en la inmunidad local del tracto gastrointestinal afectado por la úlcera (Lykova *et al.*, 1996).

*L. salivarius* es capaz de producir elevadas cantidades de ácido láctico, y éste puede producir una inhibición en el crecimiento de *H. pylori* (Aiba *et al.*, 1998). Estudios llevados a cabo en animales de experimentación han demostrado que *H. pylori* no pudo colonizar el estómago de ratones Balb/c gnotobióticos tratados con *L. salivarius*, mientras que sí que colonizó el estómago de aquellos animales que no recibieron el probiótico. Además, se observó que *L. salivarius* administrado tras la implantación de *H. pylori* podría desplazar a éste de sus puntos de unión al epitelio (Kabir *et al.*, 1997). La inhibición del crecimiento de *H. pylori* también se ha observado en personas que consumen *L. johnsonii* (Michetti *et al.*, 1999; Marteau *et al.*, 2001).

Sin embargo, estos resultados no han sido consistentes con los realizados con otros probióticos. En este sentido, estudios *in vivo* han descrito que *L. acidophilus* no inhibe el crecimiento de *H. pylori*, posiblemente debido a su baja producción de ácido láctico, como consecuencia de su escasa colonización y crecimiento en el estómago (Bazzoli *et al.*, 1992). Por el contrario, Midolo *et al.*, (1995), demostraron que seis cepas de *L. acidophilus* y una cepa de *L. casei* subsp. *rhamnosus* inhibían el crecimiento de *H. pylori*, mientras que *B. bifidus*, *Pediococcus pentosaceus* y *L. bulgaricus* no producían esta inhibición.

#### **2.4.5. Cáncer**

En países desarrollados, el cáncer colorrectal es el segundo en frecuencia entre las mujeres (tras el cáncer de mama) y el tercero entre los hombres (tras los tumores de pulmón y próstata), con aproximadamente un millón de nuevos casos al año en todo el mundo. Son numerosos los factores que pueden promover la aparición de este tipo de cáncer, si bien aproximadamente el 70% de los cánceres de colon y recto están asociados a factores ambientales, fundamentalmente a la dieta. Un papel destacado es desempeñado por la generación en el lumen intestinal

de sustancias carcinógenas tras el metabolismo de algunos microorganismos que forman parte de la flora microbiana del tracto gastrointestinal (Elmer 2001).

Actualmente se desconocen los mecanismos específicos por los que los probióticos pueden ejercer un efecto beneficioso frente al cáncer colorrectal. Diversos estudios *in vivo* llevados a cabo en animales de experimentación, así como estudios *in vitro*, han permitido postular distintos mecanismos (Hirayama y Rafter, 2000; Brandy *et al.*, 2000):

- Unión o adsorción de carcinógenos (aminas heterocíclicas, aflatoxina B1 y benzopirenos), disminuyendo el riesgo de mutagenicidad que estos compuestos pueden inducir.
- Inhibición en la producción de metabolitos potencialmente carcinógenos, bien porque facilitan los procesos reductores de este tipo de metabolitos que pueden ser generados por algunas especies bacterianas del lumen intestinal, o bien porque inhiben las enzimas bacterianas que se supone que están implicadas en la síntesis o activación de carcinógenos, mutágenos y otros promotores de tumores ( $\alpha$ -glucuronidasa,  $\beta$ -glucuronidasa, nitrato-reductasas y amoníaco) (Goldin y Gorbach, 1984).
- Estimulación de las enzimas del huésped implicadas en la inactivación de compuestos pro-cancerígenos, y que participan en los mecanismos de protección celular frente a la lesión inducida por carcinógenos.
- Alteración de la apoptosis (muerte celular programada) e inhibición de la proliferación celular descontrolada.
- Modulación de la respuesta inmunológica/inflamatoria, que se ha descrito que se encuentra alterada en procesos tumorales.

Diversos estudios han demostrado que la administración oral de lactobacilos reduce las lesiones inducidas por carcinógenos químicos en la mucosa gastrointestinal de ratas. Así, Pool-Zobel *et al.*, (1996), señalaron que *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri*, *L. confusus*, *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium breve* y *B. longum* actúan como antigenotóxicos frente a la N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NNG). Goldin *et al.*, (1996), mostraron que *L. rhamnosus* GG, puede interferir en la iniciación del tumor intestinal inducido por 1,2-dimetilhidrazina (DMH), y que este efecto es más pronunciado en animales alimentados con una dieta alta en grasa. En otro estudio anterior, Kohwi *et al.*, (1978), demostraron que *B. infantis* y *B. adolescentis*, inyectadas de forma subcutánea o intraperitoneal a ratones Balb/c inhibían los tumores inducidos por 3-metil-colantreno.

Igualmente, se ha podido constatar la actividad antitumoral de probióticos en ensayos en los que se implantaron células tumorales en animales de experimentación. En concreto, se ha demostrado que la alimentación con leche o cultivos fermentados que contienen lactobacilos inhibe el crecimiento de células tumorales (sarcoma-180) inyectadas a ratones (Friend *et al.*, 1982; Kato *et al.*, 1981).

Desgraciadamente, y hasta el momento, existen pocos estudios epidemiológicos que asocien el consumo de probióticos con el cáncer colorrectal en humanos, aunque algunas investigaciones sugieren que el consumo de grandes cantidades de productos lácteos fermentados con lactobacilos o bifidobacterias puede relacionarse con una menor incidencia del cáncer de colon (Shahani y Ayebo, 1980). Un primer estudio epidemiológico realizado en Finlandia demostró que, a pesar del alto consumo de productos grasos, la incidencia de cáncer de colon era menor que en otros países debido al gran consumo de leche, yogur y otros productos lácteos (Malhotra 1977). Sin embargo, estudios posteriores no han

permitido proporcionar ninguna evidencia de que el consumo de este tipo de productos contribuya de forma relevante en la disminución del riesgo de cáncer de colon en humanos (Kampman *et al.*, 1994).

#### **2.4.6. Alergias**

Es un hecho bien constatado el que la prevalencia de las enfermedades alérgicas ha aumentado en los últimos 35-40 años, especialmente en las poblaciones occidentales. La “hipótesis de la higiene” pretende justificar esta observación, que se atribuye al drástico cambio que ha existido desde un estilo de vida con alta exposición a los microorganismos, a otro actual con una exposición baja (Wills-Karp *et al.*, 2001). Cambios ambientales tales como una mejor vivienda, nutrición, alimentos y agua, así como más higiene y sanidad, o el uso de antibióticos, han conducido a un descenso de enfermedades infecciosas, aunque a expensas de un paralelo aumento de enfermedades alérgicas y autoinmunes, probablemente como resultado de un desarrollo inadecuado y la maduración incompleta del sistema inmune en edades tempranas, al no existir un contacto adecuado con agentes potencialmente infecciosos (Bach 2002).

Aunque se están estudiando los efectos preventivos y terapéuticos que ejercen los probióticos sobre estas patologías, hasta el momento, los resultados son controvertidos y no se conocen con exactitud los mecanismos de acción por los que pueden actuar. Entre los mecanismos propuestos se incluyen:

- Efecto inmunomodulador, de forma que los probióticos dificultarían o incluso impedirían el desarrollo de la respuesta de tipo alérgico y, en consecuencia, la aparición de alergia (Cross *et al.*, 2001). Uno de los principales efectos inmunomoduladores de los probióticos es el aumento de la producción de IFN- $\gamma$  a nivel sistémico, este mecanismo podría servir

para regular el desequilibrio Th2 característico de la respuesta alérgica (Cross *et al.*, 2001). Este efecto se ha podido comprobar en modelos experimentales de alergia en animales, de forma que la administración de *L. casei* Shirota a ratones, suprime la producción de IgE *in vivo* al promover una respuesta de tipo Th1 mediada por IL-12 (Shida *et al.*, 2002). Además, en niños con dermatitis atópica a los que se les administró *L. rhamnosus* GG se pudo observar un aumento en la producción de citoquinas antiinflamatorias, como la IL-10. (Pessi *et al.*, 2000).

- Mejora de la función de barrera intestinal, habiéndose sugerido que la utilización de probióticos podría producir una competencia por los sitios de unión de los potenciales alérgenos a los enterocitos, aumentando el efecto barrera y produciendo una disminución en la inflamación intestinal local que se puede generar, lo que resultaría un instrumento útil en el tratamiento de alergias alimentarias (MacFarlane y Cummings, 2002; Kalliomaki e Isolauri, 2004; del Miraglia y De Luca, 2004). Apoyando esta posibilidad, algunos estudios han demostrado que *L. rhamnosus* GG aumenta los mecanismos de barrera endógenos en pacientes con dermatitis atópica y alergias alimentarias, y produce una disminución de la inflamación intestinal (Majamaa e Isolauri, 1997). Cuando se sustituye la leche de vaca en niños alérgicos, por una fórmula de suero hidrolizado suplementada con *L. casei* GG, se detecta una disminución de TNF- $\alpha$  en heces, lo que podría deberse a una potenciación del efecto barrera del intestino frente a la entrada de compuestos extraños. Además, la intensidad del eczema fue menor en niños lactantes cuyas madres consumían *Lactobacillus* GG (Majamaa e Isolauri, 1997).
- Capacidad de los probióticos para producir hidrólisis enzimática de las moléculas alérgicas, por ejemplo en procesos alérgicos asociados a las

proteínas de la leche, en donde posiblemente actúen degradando estas proteínas en pequeños péptidos y aminoácidos (Majamaa e Isolauri, 1997).

En estudios realizados en humanos, se ha demostrado que la ingestión de 200 g al día de yogur durante un año, en una población de 42 jóvenes y 56 adultos, promueve una mayor remisión de síntomas alérgicos de tipo nasal en comparación con el correspondiente grupo control (Van de Water *et al.*, 1999). Sin embargo, no se sabe cuales podrían ser los mecanismos implicados, puesto que no se han encontrado diferencias significativas en cuanto a los parámetros inmunológicos.

En un estudio en adultos asmáticos a los que se les administró leche fermentada, dos veces al día durante un mes, con y sin *L. acidophilus*, se observó que el grupo que consumió leche fermentada con *L. acidophilus*, disminuyó la eosinofilia y presentó además una tendencia a aumentar los niveles de IFN- $\gamma$  (Wheeler *et al.*, 1997a). No obstante, no aparecieron diferencias significativas en cuanto a la clínica de los pacientes, ni en su calidad de vida. Del mismo modo, cuando se estudiaron en pacientes atópicos los efectos del yogur, fermentado con *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, no se observó ninguna mejoría significativa en los parámetros inmunológicos estudiados (función fagocítica y respuesta inmune humoral y celular) (Wheeler *et al.*, 1997b).

Además de aliviar los síntomas en las enfermedades atópicas, también es posible que los alimentos fermentados que contienen lactobacilos puedan servir para reducir su aparición durante el desarrollo perinatal (Matricardi *et al.*, 1999). En este sentido, se ha observado que el consumo de probióticos ( $2 \times 10^{10}$  de *L. rhamnosus*) en 159 mujeres embarazadas de familias con antecedentes de enfermedad atópica, desde las cuatro semanas antes del parto y durante los tres

meses siguientes al parto durante la lactancia, confiere protección en los niños frente al eczema atópico (Rautava *et al.*, 2002).

De igual forma, en otro estudio en el que se administró *Lactobacillus* GG a un grupo de madres gestantes de familias alérgicas durante dos a cuatro semanas antes del parto, así como a sus hijos durante los primeros seis meses de vida, reveló que la proporción de niños que presentaron dermatitis atópica en los dos primeros años de vida fue de un 23% en aquellos que recibieron los lactobacilos, frente a un 46% en el grupo placebo (Kalliomaki *et al.*, 2001). Es de destacar que el grupo de niños en el que se obtuvieron mejores efectos beneficiosos fue en el de aquellos que presentaban en la sangre del cordón niveles más elevados de IgE.

#### **2.4.7. Vaginitis**

Las infecciones del tracto genitourinario son una de las patologías más frecuentes que afectan a las mujeres, con una incidencia estimada de más de 300 millones de casos al año. Entre ellas, la vaginitis, sea cual sea su origen, es una de las patologías que más destaca por su frecuencia y morbilidad. Ésta puede ser causada por múltiples factores, entre los que se encuentran: bacterias, hongos, virus, medicamentos, cambios hormonales, falta de higiene o el uso de sustancias irritantes.

La presencia dominante de *Lactobacillus* *sp.* en la microflora urogenital de mujeres sanas (Hayatsu y Hayatsu, 1993; McLean y Rosenstein, 2000; Reid y Bruce, 2001b; Cadieux *et al.*, 2002) y su implicación en caso de infecciones locales han motivado el que se preste especial atención al papel de los probióticos (y en concreto a los lactobacilos) en la prevención de infecciones vaginales (Reid 2000). El posible mecanismo de acción por el que pueden actuar las bacterias probióticas está basado:

- En su capacidad para adherirse y colonizar el tracto urogenital, previniendo e inhibiendo el crecimiento de gérmenes patógenos, hasta que la flora fisiológica habitual pueda ser restablecida.
- Producción de un ambiente ácido, que impide el crecimiento de otras especies bacterianas.

Recientemente, los lactobacilos se han establecido como un método natural, barato y alternativo para la protección del tracto genitourinario frente a la infección local bacteriana o candidiásica. Tanto la administración oral, como los supositorios vaginales con probióticos, han mostrado que producen una reducción en la incidencia de infecciones del tracto urinario (McLean y Rosenstein, 2000). Se ha demostrado que la toma diaria de yogures con *L. acidophilus* durante seis meses, disminuye tanto la colonización como la infección vaginal por *Candida* sp., al parecer el probiótico tiene un efecto directo sobre el crecimiento y la supervivencia de esta levadura (Hilton *et al.*, 1992).

En un estudio en el que se aislaron cultivos bacterianos en mujeres con episodios recurrentes de vaginitis, se pudo observar que cuatro cepas diferentes de *Lactobacillus* inhibían la actividad de las especies bacterianas aisladas, posiblemente debido a la producción de un medio ácido (McLean y Rosenstein, 2000).

*Objetivos*

---



La denominada “hipótesis de la higiene” intenta explicar el incremento gradual en la incidencia de enfermedades de tipo inmune que se viene observando en los países desarrollados. Así, los cambios en el hábito de vida, los avances sanitarios y el empleo de antibióticos han provocado un descenso de las enfermedades infecciosas, aunque a expensas de un aumento de enfermedades alérgicas y autoinmunes, debido a una maduración inadecuada del sistema inmune. Asimismo, se ha postulado que estas alteraciones inmunológicas se deben a importantes modificaciones de la microbiota intestinal. En consecuencia, con el objetivo de restablecer una flora bacteriana adecuada, resulta interesante la administración de bacterias probióticas.

Los probióticos se definen como organismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren efectos beneficiosos al hospedador, entre los que se incluyen un efecto inmunomodulador. Se ha postulado que para ejercer su acción deben colonizar el tracto gastrointestinal, actuando preferentemente en situaciones en las que existe una alteración de la función inmune en el intestino. Podríamos plantearnos si estas acciones se restringen al intestino o si sus efectos pueden tener una repercusión sistémica. Además, a esto habría que añadir el hecho constatado de que no todos los probióticos presentan eficacia frente a una patología determinada, habiéndose incluso descrito diferencias entre cepas de una misma especie bacteriana. Por estos motivos, resulta interesante evaluar de forma simultánea, y en las mismas condiciones de trabajo, el efecto de diferentes probióticos en modelos experimentales que ponen de manifiesto la existencia de una respuesta inmune alterada, tanto de carácter local (inflamación intestinal) como de tipo sistémico (shock séptico), pudiendo determinar cuál es el perfil de actuación idóneo del probiótico (o probióticos) frente a estas patologías. Con esta doble finalidad se plantearon los siguientes objetivos:

## Objetivos

---

1. Evaluar el efecto antiinflamatorio intestinal ejercido por distintos probióticos en el modelo de colitis experimental inducido mediante ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en ratas. Para ello se utilizaron los siguientes probióticos:

- *L. salivarius* CECT5713
- *L. fermentum* CECT5716
- *L. reuteri* ATCC55730
- *B. longum* HA-135
- *B. bifidum* HA-132
- *E. coli* Nissle 1917

2. Valorar el efecto sistémico ejercido por estos mismos probióticos en el modelo de shock séptico inducido en ratones mediante lipopolisacárido (LPS).

3. Analizar el comportamiento de cada probiótico en función del modelo experimental.

*Material y métodos*

---



## 1. ENSAYOS *IN VIVO*

Estos estudios se realizaron de acuerdo con las directivas de la *Convención para la protección de los animales vertebrados usados en experimentación y con otros fines científicos* establecidas por la Unión Europea (85/ETS123; 86/609/EEC).

### 1.1. INDUCCIÓN DE COLITIS EXPERIMENTAL MEDIANTE ÁCIDO TRINITROBENCENOSULFÓNICO Y ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS

#### 1.1.1. Probióticos

Los probióticos utilizados en este ensayo fueron suministrados por Puleva Biotech (Granada, España): *Lactobacillus salivarius* CECT5713 y *Lactobacillus fermentum* CECT5716, y por Casen-Fleet, S.L.U., (Zaragoza, España): *Lactobacillus reuteri* ATCC55730, *Bifidobacterium longum* HA-135, *Bifidobacterium bifidum* HA-132 y *Escherichia coli* Nissle 1917. Se suspendieron en PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2-7,4) estéril (10<sup>9</sup> ufc/ml) y se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

#### 1.1.2. Animales de experimentación

Los animales utilizados en este estudio fueron ratas albinas hembra de la cepa Wistar de 180-200 gramos de peso, suministradas por el Servicio de Animales Experimentación de la Universidad de Granada. Se mantuvieron en el estabulario del laboratorio al menos 7 días antes de iniciar los experimentos, a una temperatura de 22±2 °C y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Las ratas fueron alojadas individualmente en cubetas de makrolon con lecho de viruta, dispuestas en estantes de acero inoxidable. Durante las dos semanas previas a ser sometidas al proceso

colítico, fueron alimentadas con la correspondiente dieta para roedores y agua corriente *ad libitum*.

### **1.1.3. Inducción de la colitis experimental**

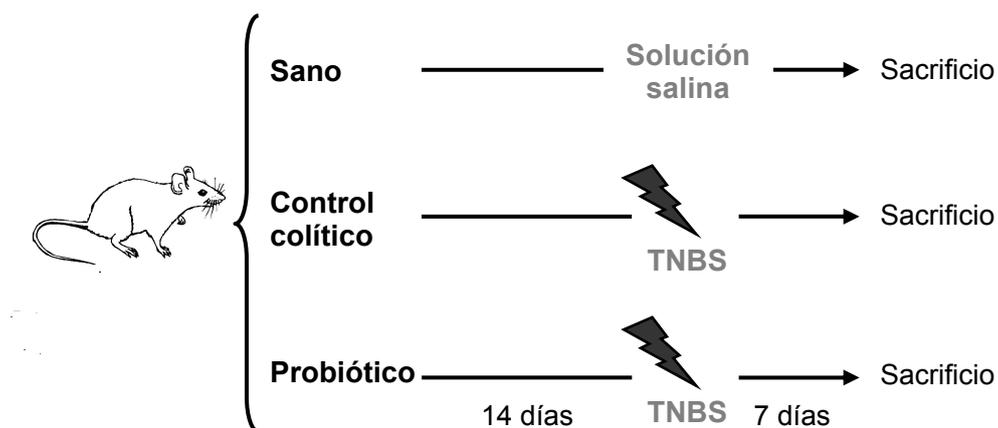
La colitis se indujo utilizando el método descrito por Morris *et al.* (1989) con algunas modificaciones incorporadas por nuestro grupo de investigación. Los animales fueron sometidos a un período de ayuno de 24 horas, después del cual fueron anestesiados ligeramente con halotano y se procedió a la administración rectal de 0,25 ml de una solución de 10 mg de ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS) en etanol al 50 % (v/v). La instilación se realizó introduciendo un catéter de teflón (2 mm de grosor) 8 cm desde el ano, manteniendo a los animales en posición supina hasta la recuperación de la anestesia. La solución de TNBS se preparó a partir de un liofilizado de la solución comercial de origen, consistente en una solución acuosa al 5 % p/v. Dado que se han descrito variaciones en la respuesta en función del lote comercial de TNBS (Yamada *et al.*, 1992), todos los experimentos se realizaron con TNBS de un mismo lote.

### **1.1.4. Diseño experimental**

Los animales se distribuyeron de modo aleatorio en diferentes grupos (Figura 5):

- grupo sano (n=9): se le administró por vía rectal 0,25 ml de solución salina isotónica de ClNa (0,9%), y recibió diariamente 1 ml de PBS (vehículo) mediante sonda gastroesofágica.
- grupo control colítico (n=9): se le indujo la colitis con TNBS y también recibió 1 ml de PBS mediante sonda gastroesofágica.

- grupos colícticos tratados con probióticos (n=9): se les administró por vía oral el probiótico correspondiente a cada uno de los grupos en una concentración de  $10^9$  ufc/ml. Esta administración se realizó mediante sonda gastroesofágica durante los catorce días previos a la inducción del proceso inflamatorio intestinal con TNBS, así como durante los siete días posteriores.



**Figura 5.** Diseño experimental en el modelo del TNBS.

Durante el desarrollo de esta experiencia se controló diariamente el peso corporal y el consumo de agua y de comida de los animales, así como la aparición de diarrea por visualización de restos perianales (Bell *et al.*, 1995). Todos los animales fueron sacrificados a los siete días de la administración del agente inflamatorio intestinal.

### 1.1.5. Valoración del proceso inflamatorio intestinal

Una vez sacrificados los animales mediante dislocación cervical, se les extrajo el colon en su totalidad, observándose la existencia o no de adhesiones entre el intestino grueso y los órganos adyacentes. Seguidamente, se procedió a la limpieza de éste, retirando los restos de grasa y las adhesiones mesentéricas, sobre una placa Petri con hielo. El colon se abrió longitudinalmente, se extrajeron los contenidos colónicos, se lavó con solución salina isotónica y se determinó su peso y su longitud bajo una tensión constante de 2 gramos. Posteriormente, un observador ajeno al desarrollo del experimento valoró el daño macroscópico de acuerdo con el criterio descrito por Bell *et al.*, (1995), poniéndose de manifiesto la presencia o no de las distintas características del proceso inflamatorio (Tabla 2).

En todos los casos se tomaron muestras transversales del tejido colónico (0,5 cm de longitud) para la realización de los correspondientes estudios histológicos. Para ello, las muestras obtenidas se fijaron durante tres días en una solución tamponada de formaldehído (al 4% en tampón fosfato, pH 7,2). Posteriormente se deshidrataron con etanol en concentraciones crecientes hasta alcohol absoluto, se incluyeron en parafina, y con ayuda de un microtomo se obtuvieron cortes de 3-5  $\mu\text{m}$  de grosor que fueron teñidos con hematoxilina-eosina, para su evaluación histológica mediante microscopía óptica, siguiendo el criterio establecido por Stucchi *et al.*, (2000) (Tabla 3).

**Tabla 2.** Escala de valoración del índice de daño macroscópico (IDM) descrito por Bell *et al.*, (1995) en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas.

IDM	Daño colónico
0 Puntos	Colon normal
1 Punto	Hiperemia localizada, sin úlceras
2 Puntos	Ulceración sin hiperemia ni engrosamiento en la pared intestinal
3 Puntos	Ulceración con un punto de inflamación
4 Puntos	Dos o más puntos de ulceración e inflamación
5 Puntos	Grandes zonas de daño, inflamación y ulceración con una extensión mayor de 1 cm
6-10 Puntos	Grandes zonas de daño tisular con una extensión mayor de 2 cm, añadiéndose 1 punto (hasta 10) por cada cm adicional de daño

**Tabla 3.** Escala de valoración del daño histológico descrita por Stucchi *et al.*, (2000) en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas.

---

---

<b>Epitelio de la mucosa</b>	Ulceración: ninguna (0), leve (1), moderada (2), intensa transmural (3)
<b>Criptas</b>	Actividad mitótica en: tercio inferior (0), tercio medio leve (1), tercio medio moderada (2), tercio superior (3) Infiltrado leucocitario Depleción de moco
<b>Lámina propia</b>	Infiltrado plasmocítico Infiltrado leucocitario Vascularización
<b>Deposición de fibrina</b>	Ninguna (0), mucosa (1), submucosa (2), transmural (3)
<b>Submucosa</b>	Infiltrado leucocitario Edema

---

---

Escala de valoración: 0, ninguno; 1, leve; 2, moderado; 3, severo. Puntuación máxima: 30.

Por último, el colon se dividió en distintos fragmentos longitudinales, uno ellos fue congelado a -80°C, para la posterior determinación de mieloperoxidasa (MPO). El resto de los fragmentos fueron procesados en el momento de su obtención, y mediante ensayo de inmunoenzima se midió LTB<sub>4</sub> y citoquinas como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

## **1.2. INDUCCIÓN DE SHOCK SÉPTICO MEDIANTE LIPOPOLISACÁRIDO Y ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS**

### **1.2.1. Probióticos**

Para la realización de este estudio se utilizaron los mismos probióticos que en el ensayo de colitis inducida por TNBS en ratas. Fueron disueltos en PBS estéril ( $10^9$  ufc/ml) y congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

### **1.2.2. Animales de experimentación**

Los animales de experimentación utilizados fueron ratones machos Balb/c de 22-25 g de peso, suministrados por el Servicio de Animales de Experimentación de la Universidad de Granada. Se mantuvieron en el estabulario del laboratorio al menos 7 días antes del inicio de los experimentos, a una temperatura de  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$  y con un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas. Los ratones fueron alojados en cubetas de makrolon con lecho de viruta, dispuestas en estantes de acero inoxidable y alimentados con la correspondiente dieta para roedores.

### **1.2.3. Inducción del shock séptico**

El shock séptico se indujo mediante la inyección intraperitoneal de 20mg/Kg del lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* 055:B5 (Sigma, España). La solución de LPS se preparó a partir de un liofilizado en solución salina estéril (CINa 0,9%). Dado que existen diferencias en las unidades de endotoxina en función del lote comercial de LPS, todos los experimentos se llevaron a cabo con el mismo número de lote.



### **1.2.5. Sacrificio de los animales**

Antes del sacrificio de los animales, éstos fueron anestesiados con halotano con el objetivo de obtener una muestra de sangre del seno orbital del globo del ojo con ayuda de una pipeta Pasteur, previamente heparinizada. Seguidamente, se obtuvo el plasma mediante la centrifugación de la sangre a 3000 G durante 10 minutos a 4°C y se almacenó a -80°C para posteriores determinaciones de TNF $\alpha$  e IgG mediante kits comerciales de enzimoimmunoensayo (ELISA), siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Bethyl, Estados Unidos y Biosource, Bélgica, respectivamente).

Una vez sacrificados los animales mediante exanguinación, se les extrajeron varios órganos: intestino delgado, colon, pulmones, hígado y bazo. El colon fue abierto y dividido en tres tiras longitudinales, que fueron congeladas a -80°C para la posterior determinación de parámetros bioquímicos. Del bazo se extrajeron los esplenocitos, éstos fueron incubados con Concanavalina A (48 horas) y LPS (72 horas) y posteriormente se midieron varias citoquinas e IgG mediante kits de ELISA, según las indicaciones del fabricante.

## **1.3. DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS BIOQUÍMICOS**

### **1.3.1. Determinación de la actividad mieloperoxidasa**

La determinación de la actividad mieloperoxidasa (MPO) en colon y en pulmón se realizó por el método descrito por Krawisz *et al.*, (1984). Esta enzima se utiliza como marcador de la infiltración de neutrófilos, aunque no es una enzima estrictamente específica de estos fagocitos.

Los fragmentos de colon y pulmón fueron dispuestos sobre una placa Petri enfriada con hielo y picados con tijeras durante aproximadamente 15 segundos. A continuación, se homogeneizaron en tampón de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB) al 0,5% (p/v) en tampón fosfato salino (50 mM, pH=6,0), con una dilución final de 1:20 (p/v) en un homogeneizador Heidolph hasta obtener un aspecto uniforme. El HTAB actúa como detergente, lo que facilita la liberación de la enzima MPO de los gránulos azurófilos de los neutrófilos, donde se encuentra almacenada. Seguidamente, el homogenado se sonicó durante 10 segundos y se sometió a un triple proceso de congelación-descongelación que facilitó la ruptura de estructuras celulares, favoreciendo también la liberación de la enzima. Tras la última descongelación se centrifugó el homogenado a 7000 G durante 10 minutos a 4°C y se procedió a la determinación de la actividad MPO siguiendo la cinética de la reacción frente al agua oxigenada. Para ello, en una placa de 96 pocillos se añadieron 50 µl del sobrenadante a 150 µl del reactivo de coloración preparado de forma extemporánea, y compuesto por clorhidrato de o-dianisidina (0,167 mg/ml) y peróxido de hidrógeno al 0,066% en tampón fosfato (50 mM, pH=6,0). El incremento de absorbancia se determinó a 450 nm en un espectrofotómetro Microplate Reader (Bio-Rad). La actividad MPO se calculó por interpolación en una curva patrón, realizada con mieloperoxidasa procedente de neutrófilos humanos. Una unidad de MPO (U) se define como la cantidad necesaria para degradar 1mmol/minuto de peróxido de hidrógeno a 25°C. Los resultados se expresan como U/g tejido fresco.

### **1.3.2. Determinación del contenido hepático de glutathion total**

La determinación del contenido hepático de glutathion total se realizó de acuerdo con el método de la reducción cíclica del DTNB-GSSG (Akerboom y Sies, 1981). Se basa en la oxidación del glutathion reducido (GSH) presente en una

muestra a su forma oxidada (GSSG) mediante incubación con el ácido 5,5'-ditiobisnitrobenzoico (DTNB), el cual es reducido y adquiere una coloración amarillenta que puede ser determinada espectrofotométricamente. El GSSG generado es reducido por acción de la enzima glutation reductasa (GSSGrd) en presencia de (NADPH). El GSH resultante se oxida de nuevo, dando lugar a un ciclo continuo en el cual la velocidad de reducción del DTNB (con el consiguiente incremento de la absorbancia) es proporcional a la cantidad total de glutation.

Para efectuar esta determinación se utilizaron fragmentos de hígado congelados en solución de TCA al 5% (p/v). Se picaron con tijeras durante 15 segundos aproximadamente sobre una placa Petri con hielo y posteriormente se homogeneizaron en la solución de TCA en una proporción 1:20 (p/v) en un homogeneizador automático Heidolph. A continuación, se centrifugó el homogenado a 2000 G durante 5 minutos a 4°C, se recogió el sobrenadante y se realizó otra dilución con TCA (1:6), que se sometió a una segunda centrifugación a 10000 G durante 5 minutos a 4°C. Para la determinación del glutation total se mezclaron, por este orden, 20 µL de sobrenadante, 5 µL de tampón fosfato salino (*phosphate buffer saline*, PBS) con ácido etilendiaminotetraacético (*ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) (PBS-EDTA) (solución acuosa de fosfato sódico 143 mM y EDTA 6,3 mM, pH 7,5), 140 µL de solución de β-NADPH (0,298 mM) en PBS-EDTA y 20 µL de DTNB (6 mM) en PBS-EDTA, en una placa de 96 pocillos, que se incubó a 30°C durante 5 minutos. Tras adicionar 15 µL de solución de GSSGrd (Boehringer-Mannheim, Barcelona) (266 UI/mL) en PBS-EDTA, se agitó y se registró el incremento de absorbancia a 412 nm en un dispositivo Microplate Reader (Bio-Rad). La concentración de glutation se calculó por interpolación en la curva patrón realizada con GSH. Los resultados se expresan como nanomoles de glutation total/g de tejido fresco.

### 1.3.3. Determinación de la biosíntesis colónica de LTB<sub>4</sub>, TNF $\alpha$ e IL-1 $\beta$

Para la determinación de estos parámetros bioquímicos se realizó un procedimiento simple de extracción de forma inmediata (<1 h) a la obtención del órgano (McCafferty *et al.*, 1992). Los fragmentos de colon se picaron con unas tijeras sobre una placa Petri con hielo durante 15 segundos y fueron incubados en tampón fosfato sódico (10 mM, pH 7,4) en proporción 1:5 (p/v) a 37°C durante 20 minutos con agitación constante. A continuación las muestras fueron centrifugadas a 9000 G durante 5 minutos a 4°C y se congeló el sobrenadante obtenido a -80°C. Para la determinación de la concentración de LTB<sub>4</sub>, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se utilizaron kits comerciales de ELISA suministrados por Amersham Biosciences, Reino Unido (LTB<sub>4</sub>) y R&D Systems, Reino Unido (TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ). Los resultados se expresan como pg/g de tejido fresco.

### 1.3.4. Determinación de proteínas. Método del ácido bicinchonínico (BCA)

En este caso se siguió la técnica descrita por Smith *et al.*, (1985). Este método se utiliza cuando en el tampón de homogeneización puede haber agentes detergentes o de otro tipo, que presentan reacciones de interferencia con el reactivo azul Coomassie del método convencional de Bradford. El fundamento de la técnica se basa en la capacidad de las proteínas para reducir el Cu<sup>2+</sup> a Cu<sup>1+</sup>, de forma que el Cu<sup>1+</sup> reacciona con el ácido bicinchonínico formando un complejo púrpura con un máximo de absorbancia a 562 nm.

En este método se emplea un colorante que se obtiene mezclando dos reactivos A y B en proporción 50:1 (v/v). El reactivo A consiste en una disolución acuosa de ácido bicinchonínico (25,8 mM) en forma de sal sódica (ácido 4,4'-dicarboxi-2,2'-biquinolínico), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O (0,16 M), tartrato sódico-potásico (5,7 mM), NaOH (0,1 M) y NaHCO<sub>3</sub> (0,11 M) (pH 11,25). El reactivo B es una disolución

acuosa al 40% de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ . Ambos reactivos son estables a temperatura ambiente de forma indefinida. Para realizar la determinación, se añadieron a 2  $\mu\text{L}$  del homogenado 200  $\mu\text{L}$  del reactivo de coloración y, tras incubar a 37°C durante 30 minutos, se procedió a la lectura espectrofotométrica a 560 nm. El cálculo del contenido de proteínas se realizó por interpolación en una curva patrón de albúmina sérica bovina fracción V.

### **1.3.5. Determinación de la expresión de óxido nítrico sintasa inducible**

La determinación de la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) se realizó en colon mediante Western blot. Para ello, se utilizaron los fragmentos de colon que previamente habían sido congelados a -80 °C, éstos fueron descongelados, picados y homogeneizados en proporción 1:5 (p/v) durante 1 minuto en PBS con dodecil sulfato sódico (*sodium dodecyl sulfate*, SDS) al 0,1%, desoxicolato sódico al 0,1% y Tritón X-100 al 1%, conteniendo inhibidores de proteasas (aprotinina, 1,10-fenantrolina, iodoacetamida, fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Seguidamente, los homogenados fueron centrifugados a 10000 G durante 10 minutos. Tras determinar el contenido en proteínas por el método del BCA, los sobrenadantes (100  $\mu\text{g}$ ) fueron hervidos durante 4 minutos en tampón de carga Laemli 5x (Tris-HCl 0,2 M, pH 6,8, SDS 5%, 2-mercaptoetanol 8,8% (v/v), glicerol 37,5%, azul de bromofenol 60  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) y sometidos a electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 6%. Como indicadores del peso molecular, se utilizó una mezcla de proteínas previamente marcadas con un colorante (Bio-Rad, Hercules, CA, EEUU). Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (PROTAN®, Schlecher & Schuell, Germany), que posteriormente fue bloqueada durante al menos una hora a temperatura ambiente con leche desnatada al 5% (p/v) en tampón Tris salino (*tris buffer saline*, TBS) conteniendo Tween-20 al 0,1% (v/v) (TBS-T). Transcurrido el bloqueo, las

membranas se sometieron a tres lavados con TBS-T durante 5 minutos, y fueron expuestas a las correspondientes diluciones de anticuerpo incorporado en albúmina de suero bovino al 5% (p/v) en TBS-T. La incubación con un anticuerpo primario (1:2000) frente a iNOS (Transduction Laboratories, Becton Dickinson Biosciences, Madrid, España), se realizó durante toda una noche a 4°C. Un anticuerpo primario frente a  $\beta$ -actina se empleó como control de carga. Tras tres lavados de 5 minutos con TBS-T, las membranas fueron incubadas con anticuerpo conjugado con peroxidasa IgG anti-conejo (1:3000) durante 1 hora. Las bandas resultantes fueron detectadas por quimioluminiscencia (NEM Life Science Products, Zaventem, Bélgica) y cuantificadas por densitometría mediante el programa informático Scion Image (Scion Corporation, U.S.A.).

## **2. ENSAYOS *EX VIVO***

### **2.1. EXTRACCIÓN DE LINFOCITOS DE BAZO DE RATÓN**

Tras el sacrificio de los ratones se procedió a la extracción del bazo con cuidado de no romper la membrana externa que lo envuelve. En condiciones estériles, se colocó el bazo en una placa de cultivo con 5 ml de medio DMEM suplementado con un 1% de mezcla antibiótica (penicilina/estreptomicina), anfotericina y glutamina. Con ayuda de unas pinzas se presionó el bazo contra la propia placa hasta que el órgano quedó transparente y todas las células que contenía pasaron al medio. A continuación, con ayuda de una aguja y una jeringa estériles, se homogeneizó la suspensión de células y se pasó a un tubo de 15 ml. Tras una centrifugación de 5 minutos a 2000 rpm, el precipitado resultante se resuspendió en 5 ml de tampón de lisis de hematíes ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0,17M,  $\text{KHCO}_3$  0,12M, EDTA 0,9 mM, pH 7,3) y se mantuvo a 4°C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se centrifugó la suspensión, que contenía principalmente linfocitos y

macrófagos, a 2000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se desechó el sobrenadante, al pellet se le añadieron 5 ml de medio DMEM con un 10% de suero bovino fetal inactivado (30 minutos a 56°C) y se llevó a cabo el recuento de las células obtenidas.

A continuación, se incubaron las células en una placa de seis pocillos, con un inóculo inicial de  $10^7$  células por pocillo en un volumen de 3 ml de medio DMEM suplementado con suero. Estas células se dividieron en tres alicuotas, una basal que fue incubada a 37°C durante 48 horas, otra que fue estimulada durante 48 horas con Concanavalina A (5 µg/ml) y una tercera que fue incubada y estimulada con LPS (50 µg/ml) durante 72 horas.

Una vez transcurridos los tiempos correspondientes de incubación, los cultivos fueron pasados a tubos de 15 ml y se centrifugaron a 2000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente, se recogieron los sobrenadantes y se procedió a la determinación de varias citoquinas mediante kits de ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Reino Unido). A los precipitados se les añadió 1 ml de Trizol<sup>®</sup>, se dejaron 5 minutos a temperatura ambiente y se procedió a la extracción y cuantificación de ARN.

## **2.2. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE ARN**

### **2.2.1. Extracción y cuantificación de ARN total**

A cada muestra de células procedentes de bazo de ratón disueltas en 1ml Trizol<sup>®</sup>, se le añadió 0,2 ml de cloroformo, se agitaron durante unos segundos, se dejaron a temperatura ambiente durante 3 minutos, en los que se separan en varias fases y seguidamente, se centrifugaron a 11000 rpm durante 15 minutos. En la fase superior resultante se encontraba el ARN total. A dicha fracción de

aproximadamente 0,5 ml se le añadió la misma cantidad de isopropanol con la finalidad de precipitar el ARN. Tras una incubación de 10 minutos a temperatura ambiente, se procedió a una centrifugación a 14000 rpm durante 15 minutos a 4°C. El precipitado resultante se lavó con etanol al 75% y se dejó secar. Por último, el ARN extraído se disolvió en agua de grado molecular, y se mantuvo a -80°C hasta su posterior cuantificación y retrotranscripción.

### **2.2.2. Determinación de la concentración de ARN**

La concentración de ARN se cuantificó espectrofotométricamente determinando la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm frente a un blanco de agua de grado molecular. La concentración de ARN se calculó con respecto al valor estándar de absorbancia a 260 nm que corresponde a 1 para una solución de 40 µg/ml de ARN. Asimismo, se consideró la ratio A260/A280 para estimar el grado de pureza de las muestras, de forma que un valor superior a 2 se consideró indicador de contaminación por ADN e inferior a 1,6 se consideró indicativo de contaminación por proteínas y/o fenol.

### **2.2.3. Transcripción inversa (RT)**

2 µg del ARN extraído se retrotranscribieron a ADN complementario (ADNc), mediante una transcriptasa inversa M-MLV. Esta técnica se realizó con productos suministrados por Promega Biotech Ibérica, siguiendo las instrucciones del fabricante. Las muestras de ADN obtenido se mantuvieron a -20°C hasta su amplificación.

### **2.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

El ADNc resultante de la transcripción inversa se sometió a una reacción de PCR con el fin de ampliar moléculas con regiones homólogas entre los cebadores

(o *primers*) de los parámetros a estudiar. Las secuencias de los oligos empleadas se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla 4.** Secuencias de oligonucleótidos, número de ciclos de ampliación, temperatura de hibridación y pares de bases de cada uno de los parámetros ampliados mediante PCR.

Gen	Primers	Ciclos	T <sup>a</sup>	Tamaño
IL-2	5'-CTTCAAGCTCCACTTCAAGCT-3' 5'-CCATCTCCTCAGAAAGTCCACC-3'	32	62°C	512pb
IL-5	5'-TCAGGGAATAGGCACACTGG-3' 5'-CTCCGTCTTTCTTCTCCACAC-3'	35	60°C	129pb
IL-10	5'-TGCCTGCTCTTACTGACTGG-3' 5'-TCATTTCCGATAAGGCTTGG-3'	35	55°C	235pb
β-actina	5'-AATCGTGCGTGACATCAAAG-3' 5'-ATGCCACAGGATTCCATACC-3'	25	55°C	201pb

La reacción en cadena de polimerasa se realizó en un volumen final de 25 µl, de los cuales 2 µl correspondían a ADNc y 23 µl a una mezcla que contenía: desoxinucleótido trifosfato (dNTP) (0,2 mM), par de oligos (0,5 µM), tampón 10X, magnesio ((2 mM) y Taq polimerasa (0,5 unidades). La PCR se llevó a cabo en un termociclador con un programa de desnaturalización a 94 °C 1 minuto, hibridación de 55-62 °C 45 segundos, dependiendo de los oligos, y extensión a 72 °C 1 minuto. La ampliación se llevó a cabo durante 25-35 ciclos, tal y como se especifica en la tabla nº 4, y se completó con una extensión final de 10 minutos a 72 °C.

### **2.2.5. Electroforesis de ADN en gel de agarosa**

Las muestras de ADN amplificado mediante RT-PCR se mezclaron con un tampón de carga (glicina al 87% (v/v) y azul bromofenol), se cargaron en los pocillos de un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio, con tampón TBE (89 mM Tris(hidroximetil)animometano (Tris Base), 89 mM H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 2 mM EDTA, pH 8) y se procedió a la electroforesis a 70V, utilizando como marcador 100bp DNA ladder (Invitrogen). Por último, se observaron las bandas en un transiluminador con luz ultravioleta y el gel se fotografió con una cámara Kodak DC120 y su paquete informático, suministrado por Sigma.

*Resultados*

---



## **1. ACTIVIDAD ANTIINFLAMATORIA INTESTINAL DE LOS PROBIÓTICOS EN EL MODELO DE COLITIS EXPERIMENTAL INDUCIDA MEDIANTE TNBS EN RATAS**

El modelo de colitis experimental descrito inicialmente por Morris *et al.*, (1989) consiste en la inducción del daño colónico mediante la administración de una dosis única de 30 mg de ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) en etanol al 50%. En el presente estudio hemos reducido la dosis a 10 mg, con el objeto de que el proceso inflamatorio inducido sea más fácil de modular mediante el tratamiento probiótico. De hecho, en comparación con los resultados previos de nuestro grupo de investigación y con los obtenidos por otros autores, la administración de 10 mg de TNBS desarrolló un daño colítico cualitativamente similar al inducido con 30 mg, aunque cuantitativamente menor (Morris *et al.*, 1989; Cruz *et al.*, 1998).

El proceso inflamatorio intestinal se evaluó mediante parámetros de carácter general como el peso de los animales, el consumo diario de comida, así como la consistencia de las heces y la presencia de sangre en éstas. Tras el sacrificio, se realizó un estudio macroscópico del daño colónico, estableciendo la relación entre el peso y la longitud del colon, y la asignación de un índice de daño macroscópico (IDM), siguiendo el criterio descrito inicialmente por Bell *et al.*, (1995); (Tabla 2). Además, el estudio microscópico permitió observar los cambios histológicos inducidos por el TNBS en el tejido colónico. Finalmente, también se evaluó el daño bioquímicamente mediante la evolución de la actividad mieloperoxidasa (MPO), y la determinación de mediadores proinflamatorios como leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ .

## 1.1. PARÁMETROS GENERALES

Los probióticos fueron administrados durante las dos semanas previas a la inducción del proceso inflamatorio intestinal. Durante este tiempo se controló diariamente el peso de todos los animales (tanto sanos como tratados con probióticos), así como el consumo de comida y la consistencia de las heces, sin observarse efectos tóxicos en ninguno de los grupos tratados con las bacterias probióticas, de forma similar a lo observado en trabajos anteriores (Peran *et al.*, 2005; Peran *et al.*, 2007).

La evolución del proceso inflamatorio intestinal durante la semana siguiente a la inducción de daño se caracterizó por una disminución progresiva del peso corporal en todos los grupos de animales colícticos, hasta el momento del sacrificio (Figura 7). Esta pérdida de peso generalizada se puede explicar por la anorexia sufrida por los animales, manifestada por un descenso en el consumo de comida, en comparación con el grupo de animales sanos.

Otra característica del proceso inflamatorio es la aparición de diarrea, ésta se evidenció en el 67% de los animales del grupo control tras 24 horas de la inducción de la colitis, observándose presencia de sangre en heces en el 11% de estos animales. En la mayoría de los grupos colícticos tratados con probióticos la aparición de diarrea fue menor a las 24 horas, y no se observó sangre en heces, excepto en el grupo tratado con *B. longum*, en el que se apreciaron heces blandas y sanguinolentas en un 67% y 33% respectivamente (Figura 8). La diarrea fue disminuyendo durante los días posteriores a la administración del TNBS, llegando a desaparecer a partir del quinto día en todos los grupos colícticos.

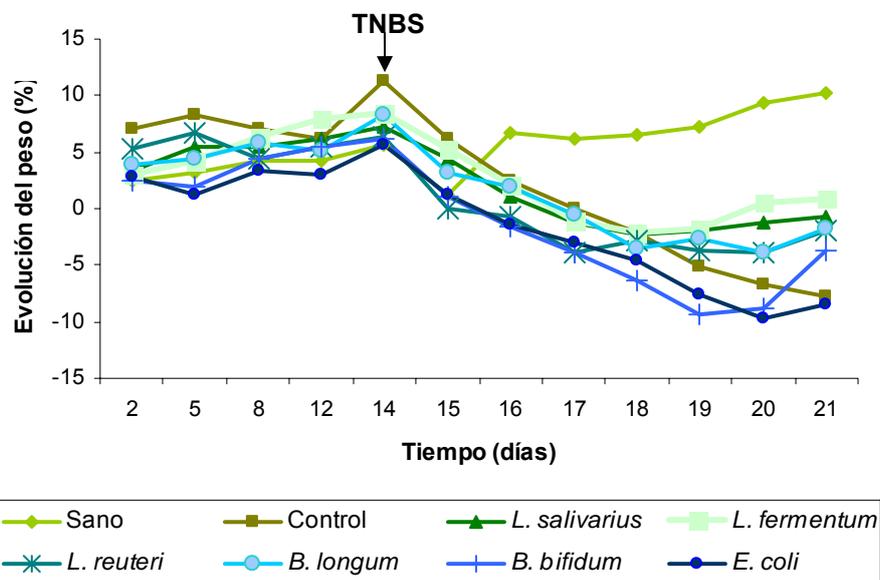


Figura 7. Evolución del peso corporal de los animales durante el estudio (n=9).

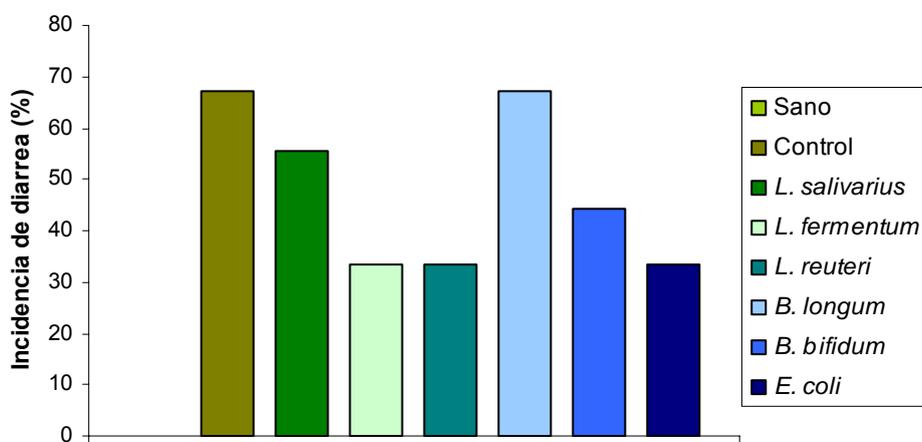
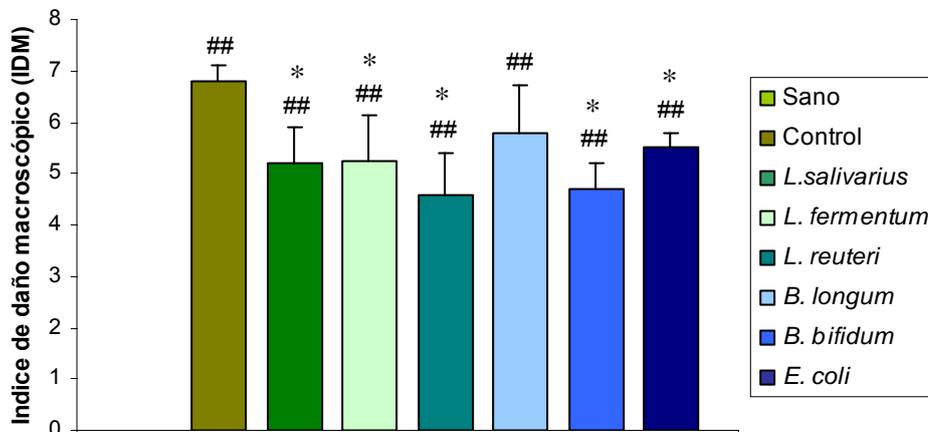


Figura 8. Incidencia de diarrea tras 24 horas de la inducción del daño mediante TNBS (n=9).

## 1.2. PARÁMETROS MACROSCÓPICOS

Tras el sacrificio de los animales una semana después de la administración del TNBS, el examen macroscópico mostró en el grupo de animales control un engrosamiento de la pared del intestino que se vio reflejado en un aumento en la relación peso/longitud en el grupo de animales control, con respecto al grupo de animales sanos (Tabla 5). El tejido colónico mostró zonas de ulceración y necrosis de aproximadamente 4 cm de longitud, lo que se tradujo en un IDM de 6,8. El pretratamiento de los animales con los distintos probióticos produjo un efecto antiinflamatorio intestinal que se manifestó mediante una modificación significativa en la extensión del segmento colónico afectado, con una disminución del IDM en todos los grupos tratados ( $p < 0,05$ ), salvo en el grupo al que se le administró *B. longum* (Figura 9), y mediante una reducción significativa en la relación peso/longitud del colon ( $p < 0,01$ ), excepto en los grupos tratados con *B. longum* y *E. coli* Nissle 1917 (Tabla 5).



**Figura 9.** Índice de daño macroscópico (IDM) en ratas sanas y colícticas, con y sin tratamiento probiótico, basado en el criterio descrito en la tabla nº 2.  $n=9$ , \* $p < 0,05$  vs grupo control; ## $p < 0,01$  vs grupo sano.

**Tabla 5.** Efecto de los probióticos sobre la relación peso/longitud en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas.

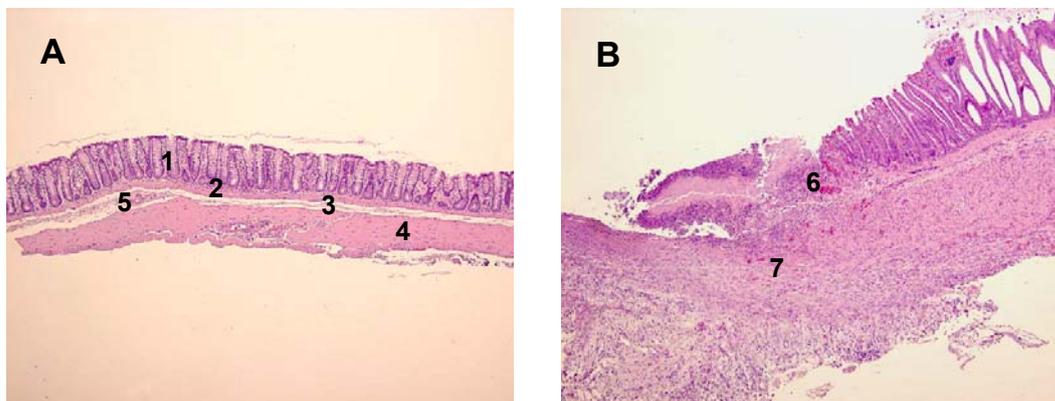
Grupo	Extensión daño (cm)	Peso/longitud (mg/cm)
Sano	0 ± 0	68 ± 3,0
Control colítico	4,2 ± 0,3	247 ± 21,0
<i>L. salivarius</i>	2,7 ± 0,4**	160 ± 13,6**
<i>L. fermentum</i>	2,7 ± 0,2**	156 ± 13,9**
<i>L. reuteri</i>	2,3 ± 0,4**	154 ± 23,0**
<i>B. longum</i>	3,0 ± 0,6	188 ± 27,0
<i>B. bifidum</i>	2,6 ± 0,2**	152 ± 19,0**
<i>E. coli</i> Nissle 1917	2,8 ± 0,3**	209 ± 21,0

Los valores están expresados como la media aritmética ± error estándar de la media. n=9, \*\*p<0,01 vs grupo control. Todos los grupos colíticos muestran diferencias significativas en relación al grupo sano (p<0,01).

### 1.3. ESTUDIO HISTOLÓGICO

El análisis microscópico de las muestras procedentes de animales del grupo control reveló profundos cambios en su histología, en comparación con el grupo de animales sanos. En condiciones normales, la mucosa colónica está constituida por un epitelio y unas criptas que incluyen abundantes células caliciformes con gran contenido en mucopolisacáridos (Figura 10A). En el grupo de animales a los que se les administró TNBS estas criptas desaparecieron como consecuencia del proceso inflamatorio intestinal, y aparecieron ulceraciones en el epitelio de la mucosa, así

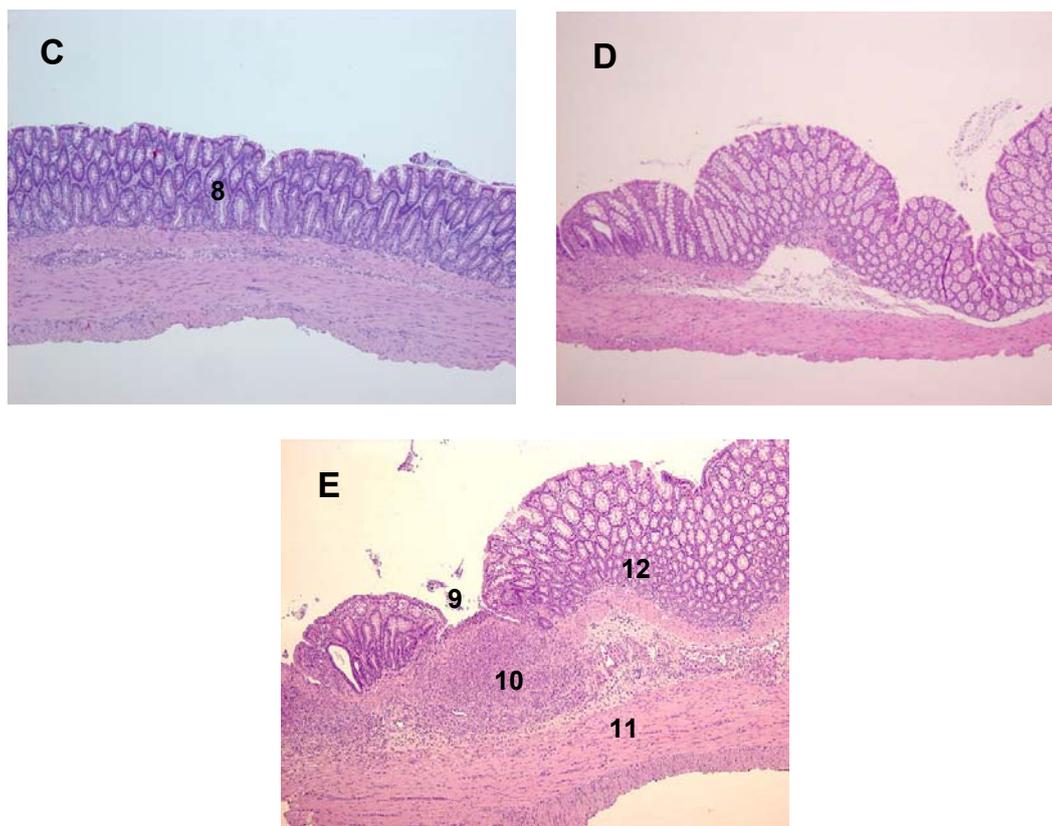
como infiltrados inflamatorios que se extendieron hasta la submucosa y las capas musculares (Figura 10B).



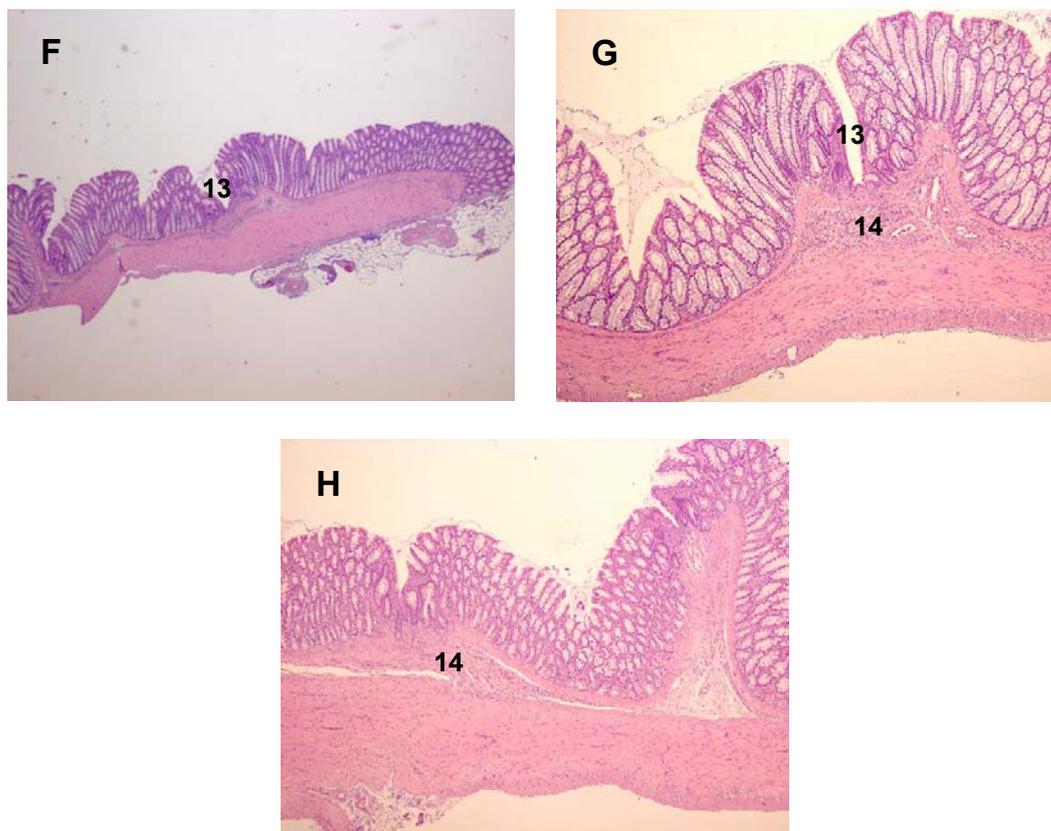
**Figura 10.** Cortes histológicos de colon teñidos con hematoxilina-eosina. **A)** Grupo sano: se observa una disposición normal de la arquitectura del colon, en la que podemos apreciar la capa mucosa (1), la muscular de la mucosa (2), la submucosa (3), la muscular (4) y una placa de Peyer (5) (X5). **B)** Grupo colítico por instilación de TNBS, con ulceración del epitelio de la mucosa (6) e infiltración a lo largo de la pared intestinal (7) (X5).

La actividad antiinflamatoria intestinal de los probióticos manifestada en los parámetros macroscópicos, también se pudo comprobar microscópicamente a través del estudio histológico, en el que se observó una recuperación del daño colónico. En la mayoría de los animales tratados con los distintos probióticos el infiltrado inflamatorio observado en la lámina propia fue de carácter focal, y no se apreció ulceración del epitelio de la mucosa (Figura 10C, 10D y 10H). A pesar de que se mantuvo una depleción de las células caliciformes, las criptas mostraron una hiperplasia de las células basales, lo que indicó un inicio de recuperación de la inflamación; también se pudieron observar dilataciones de las criptas. En la submucosa, el infiltrado inflamatorio se localizó únicamente en aquellas zonas en las que las criptas no habían recuperado aún la morfología previa al daño (Figura

10E y 10G). En cuanto a la afectación de la capa muscular, ésta sólo se vio alterada de forma focal y muy leve como una extensión del daño de la superficie intestinal, en aquellos casos en los que se produjo ulceración de la mucosa (Figura 10E).



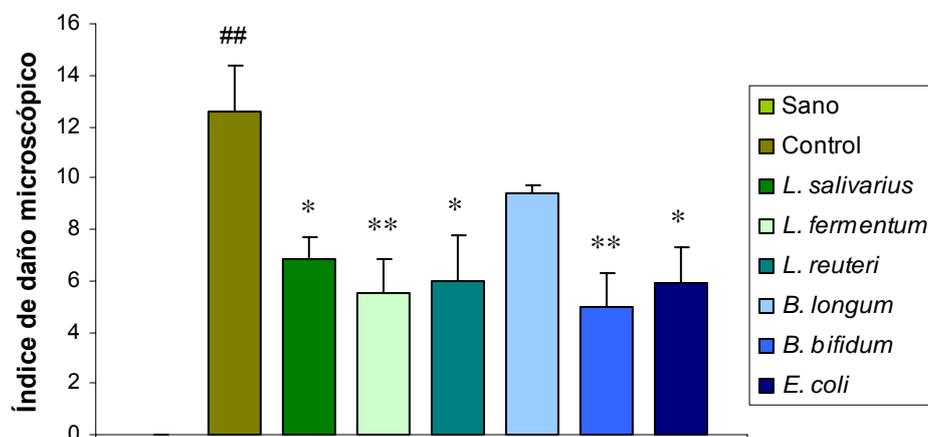
**Figura 10 continuación.** Cortes histológicos de colon teñidos con hematoxilina-eosina. Grupos colícticos tratados con *L. fermentum* (C) y *B. bifidum* (D) en los que se aprecia una recuperación del proceso inflamatorio intestinal y una restauración de la mucosa con abundante presencia de células caliciformes (8) (X5). Grupo colíctico tratado con *B. longum* (E) en el que se puede observar ulceración de la mucosa (9) con un infiltrado celular severo en la lámina propia y la submucosa (10) y más leve en la capa muscular (11), aunque la hiperplasia de las criptas indica una recuperación de la integridad de la mucosa (12) (X5).



**Figura 10 continuación.** Cortes histológicos de colon teñidos con hematoxilina-eosina. Grupos colícticos tratados con *L. salivarius* (F), *L. reuteri* (G) y *E. coli* Nissle 1917 (H) en los que se observa una disminución del proceso inflamatorio, sólo se distinguen ulceraciones de tipo focal (13) y pequeños infiltrados en la lámina propia y la submucosa (14) (X5).

Mediante la valoración microscópica de los cortes histológicos, según el criterio descrito por Stucchi *et al.*, (2000), se apreciaron diferencias significativas en los grupos tratados con *L. fermentum*, *B. bifidum* ( $p < 0,01$ ), *L. salivarius*, *L. reuteri* y

*E. coli* ( $p < 0,05$ ), en relación al grupo control; estas diferencias no se observaron en el grupo tratado *B. longum* (Figura 11).



**Figura 11.** Índice de daño microscópico en ratas sanas y colíticas, con y sin tratamiento probiótico.  $n=9$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  vs grupo control; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  vs grupo sano. Todos los grupos colíticos muestran diferencias significativas en relación al grupo sano.

#### 1.4. ESTUDIO BIOQUÍMICO

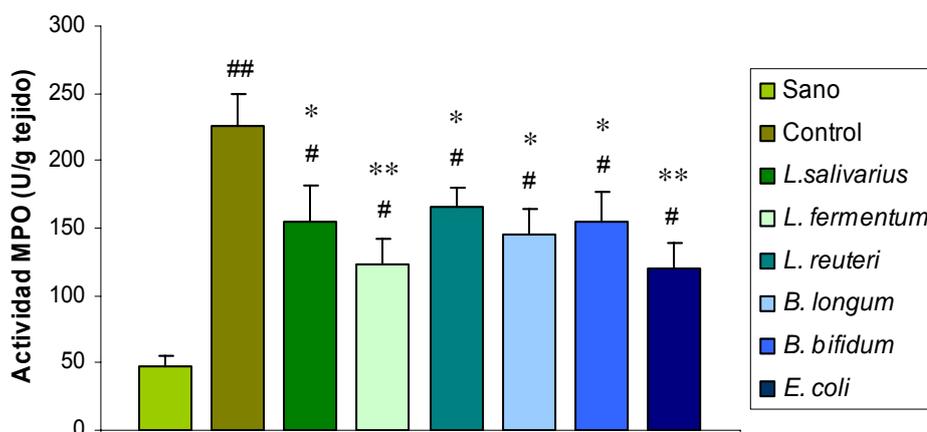
Desde un punto de vista bioquímico, el daño inflamatorio inducido por el TNBS se caracterizó en el grupo control por un incremento de casi 5 veces de la actividad mieloperoxidasa (MPO) colónica, en relación con el grupo de animales sanos (Tabla 6). Este parámetro es un buen marcador de la infiltración granulocítica, y ha sido ampliamente utilizado para evaluar el daño intestinal (Krawisz *et al.*, 1984; Morris *et al.*, 1989; Sanchez de Medina *et al.*, 1996). Así, el efecto beneficioso mostrado por los distintos probióticos tras el análisis histológico, en el que se observó una disminución en la infiltración leucocitaria, se puede ver reflejado por el descenso significativo de la actividad MPO en los grupos tratados con probióticos,

en relación al grupo control ( $p < 0,05$ ), siendo esta disminución aún más notable en los grupos de animales tratados con *L. fermentum* y *E.coli* ( $p < 0,01$ ); (Figura 12).

**Tabla 6.** Efecto de la administración de TNBS en la síntesis colónica de MPO, LTB<sub>4</sub>, TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en el modelo de colitis experimental en ratas.

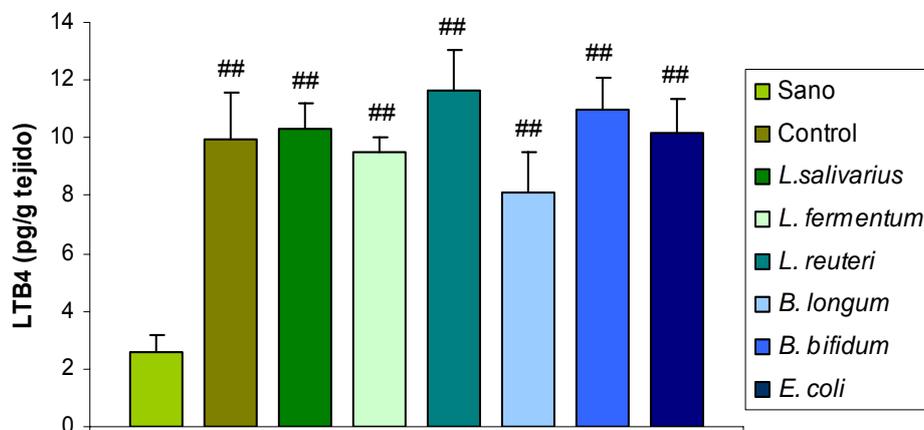
Grupo	MPO (U/g tejido)	LTB <sub>4</sub> (pg/g tejido)	TNF $\alpha$ (pg/g tejido)	IL-1 $\beta$ (pg/g tejido)
Sano	48,2 $\pm$ 8,6	2,6 $\pm$ 0,6	365 $\pm$ 39	188,7 $\pm$ 18
Control	226,1 $\pm$ 23 <sup>##</sup>	9,95 $\pm$ 2,06 <sup>##</sup>	1321 $\pm$ 138 <sup>##</sup>	1325 $\pm$ 177 <sup>##</sup>

Los valores están expresados como la media aritmética  $\pm$  error estándar de la media. n=9, <sup>##</sup>p<0,01 vs grupo sano.



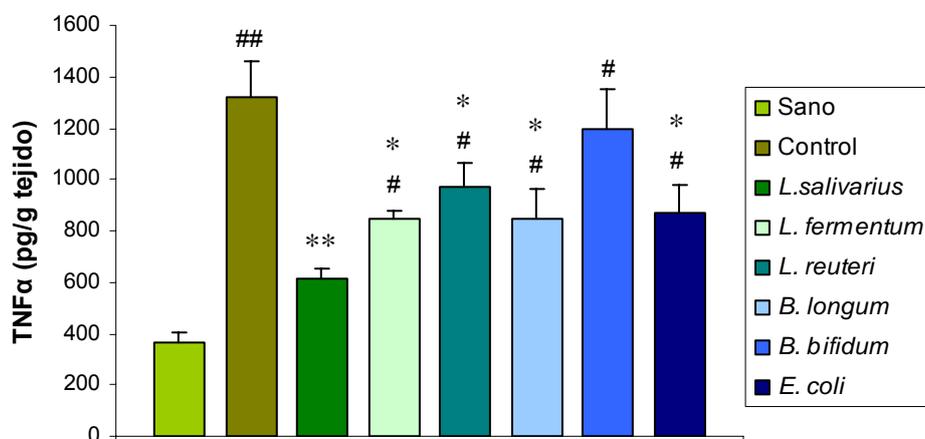
**Figura 12.** Efecto de los probióticos sobre la actividad mieloperoxidasa colónica en el modelo de colitis inducido por TNBS en ratas. n=9, \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs grupo control; #p<0,05, ##p<0,01 vs grupo sano.

Otro de los mediadores inflamatorios determinados fue el leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>). Éste posee actividad quimiotáctica y activadora de los neutrófilos (Kubes *et al.*, 1991), atribuyéndole un importante papel en la patogénesis de la EII. De hecho, se ha descrito su elevada producción en pacientes con EC y CU (Sharon y Stenson, 1984), así como en modelos de inflamación intestinal (Wallace *et al.*, 1989; Sanchez de Medina *et al.*, 1996; Galvez *et al.*, 2000a; Galvez *et al.*, 2000b). En este estudio, su producción colónica se vio incrementada casi 4 veces en los animales control en relación a los animales sanos (Tabla 6), en concordancia con la infiltración leucocitaria observada en el colon inflamado, tanto histológicamente como bioquímicamente. Igualmente, se ha demostrado que este eicosanoide ejerce acciones prosecretoras en el intestino, que contribuirían a la aparición de diarrea (Barrett 1997). Sin embargo, los probióticos administrados no disminuyeron los valores de LTB<sub>4</sub> con respecto al grupo control, manteniendo diferencias significativas en relación al grupo sano (Figura 13).

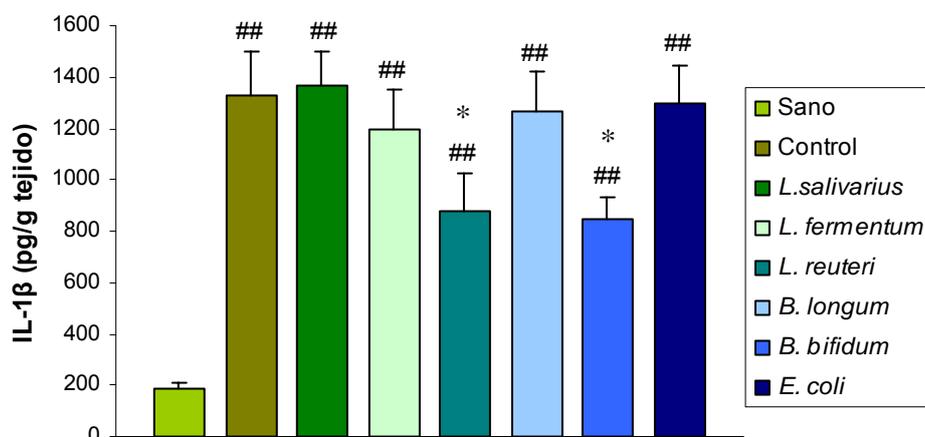


**Figura 13.** Efecto de los probióticos sobre la síntesis colónica de LTB<sub>4</sub> en el modelo de colitis inducido por TNBS en ratas. n=9, ##p<0,01 vs grupo sano.

El proceso inflamatorio colónico también estuvo asociado a un aumento en los niveles de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Ambas son citoquinas proinflamatorias que juegan un papel clave en este tipo de patologías intestinales (Ardizzone y Porro, 2002), en las que su síntesis y liberación se encuentran aumentadas por diferentes tipos celulares residentes en la mucosa inflamada, especialmente en macrófagos (Woywodt *et al.*, 1999). Confirmándose estas observaciones, la producción colónica de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  se vio incrementada en 3,5 y 7 veces respectivamente en los animales control en relación al grupo de animales sanos (Tabla 6). Estos resultados están de acuerdo con el incremento en la producción de ambos mediadores descrita tanto en modelos experimentales de inflamación (Strober *et al.*, 1998; van Dijk *et al.*, 1995; Galvez *et al.*, 2000a), como en humanos con EII (Reimund *et al.*, 1996; Mahida *et al.*, 1989; MacDonald *et al.*, 1990). En los grupos tratados con probióticos los niveles de ambos mediadores proinflamatorios se vieron modificados en distinta medida en función del probiótico administrado. De esta forma, TNF $\alpha$  disminuyó significativamente en los grupos a los que se les administró *L. salivarius* ( $p < 0,01$ ), *L. fermentum*, *L. reuteri*, *B. longum* y *E. coli* ( $p < 0,05$ ), sin observarse diferencias significativas en el grupo tratado con *B. bifidum* (Figura 14). Cuando se analizó la IL-1 $\beta$ , sólo se apreció una disminución significativa en los grupos tratados con *L. reuteri* y *B. bifidum* ( $p < 0,05$ ) en comparación con el grupo control, aunque los niveles de esta citoquina se encontraron elevados en todos los grupos, en relación al grupo de animales sanos (Figura 15).



**Figura 14.** Efecto de los probióticos sobre la síntesis colónica de TNF $\alpha$  en el modelo de colitis inducido por TNBS en ratas. n=9, \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs grupo control; # p<0,05, ## p<0,01 vs grupo sano.



**Figura 15.** Efecto de los probióticos sobre la síntesis colónica de IL-1 $\beta$  en el modelo de colitis inducido por TNBS en ratas. n=9, \*p<0,05 vs grupo control; ## p<0,01 vs grupo sano.

## **2. ACTIVIDAD DE LOS PROBIÓTICOS EN EL MODELO DE SHOCK SÉPTICO INDUCIDO MEDIANTE LPS EN RATONES**

La sepsis se caracteriza por la existencia de una respuesta inflamatoria sistémica exagerada, generalmente originada por una infección bacteriana, que puede ocasionar un fallo multiorgánico y por consiguiente la muerte del individuo. Las bacterias patógenas activan la transcripción de genes implicados en la inflamación en numerosas células inmunocompetentes, originando una excesiva y descontrolada liberación de mediadores inflamatorios entre los que se incluyen citoquinas, moléculas de adhesión y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

En este estudio, se evaluó el efecto que los distintos probióticos ensayados con anterioridad, podían ejercer sobre la respuesta inmune alterada en un modelo de sepsis en ratones, inducido mediante la inyección intraperitoneal de lipopolisacárido (LPS) procedente de *E. coli*. La evolución del proceso séptico se realizó mediante la determinación de parámetros tanto de carácter general, como macroscópicos y bioquímicos. En los primeros se evaluó la modificación del peso de los animales y su actividad motora. Como parámetros macroscópicos se estudió el impacto del shock séptico en distintos órganos, determinando la relación peso/longitud del colon y del intestino delgado, y el peso de otros órganos como el bazo y el pulmón. Por último, en los estudios bioquímicos se determinó la producción de TNF $\alpha$  en plasma y en pulmón, la actividad mieloperoxidasa (MPO) en colon y en pulmón, el contenido de glutatión hepático, y la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) en colon. También se midieron varias citoquinas (IL-2, IL-5, e IL-10) en esplenocitos de ratón estimulados con Concanavalina A (Con A), y la producción de inmunoglobulina (Ig) G en esplenocitos y en plasma.

## **2.1. ELECCIÓN DE LA DOSIS DE LIPOPOLISACÁRIDO**

La inyección intraperitoneal de LPS produce rápidamente un proceso inflamatorio de carácter grave, lo que se puede comprobar por la alta mortalidad inducida en los animales. Por este motivo, y previamente a la realización del estudio con los distintos probióticos, se realizaron ensayos preliminares para determinar la dosis de LPS con la que se llevaría a cabo el experimento. Para ello, a tres grupos de ratones (n=6) se les inyectaron distintas dosis de LPS (800 µg, 400 µg y 200 µg por ratón). Tras 24 horas de la inyección, con la dosis más elevada (800 µg) se observó una mortalidad del 66% de los animales, mientras que con las dosis inferiores (400 µg y 200 µg) no se apreció mortalidad. El grupo de ratones al que se le inyectó 400 µg de LPS mostró una mayor disminución de la actividad motora, así como una aparición de grandes exudados oculares en comparación con el grupo al que se le administró 200 µg de LPS. Por lo tanto, fue la dosis intermedia la elegida para la inducción del shock séptico y la evaluación de la actividad de los distintos probióticos.

## **2.2. ADMINISTRACIÓN DE PROBIÓTICOS E INDUCCIÓN DEL SHOCK SÉPTICO**

Se llevó a cabo un tratamiento de tipo preventivo para evaluar el efecto de los distintos probióticos. Para ello se administraron diariamente incorporados en el agua de bebida durante las dos semanas previas a la inyección del LPS y, de forma similar a lo observado en el modelo de inflamación intestinal, no mostraron efectos tóxicos ni modificaron el peso de los ratones en comparación con los grupos de animales que no recibieron el tratamiento probiótico. Transcurrido este tiempo, los ratones sanos recibieron una inyección de solución salina estéril y al resto de ratones se le indujo el shock séptico mediante la inyección intraperitoneal de 400 µg

de LPS. Ocho horas más tarde, y de acuerdo con lo descrito previamente (Leite *et al.*, 2005), los ratones mostraron claros síntomas shock séptico, como disminución en la actividad motora, pelo erizado y aparición de exudados oculares. Es interesante indicar que los ratones tratados con probióticos mostraron mejor apariencia y mayor actividad motora que los pertenecientes al grupo control sin tratamiento probiótico, aunque los signos de daño resultaron evidentes cuando fueron comparados con el grupo de animales sanos. Todos los ratones sobrevivieron tras 24 horas de la inducción del daño, momento en el que fueron sacrificados para evaluar el efecto del tratamiento sobre la respuesta inmune sistémica alterada en estos ratones.

### 2.3. ESTUDIO MACROSCÓPICO

Tras el sacrificio de los animales mediante exanguinación, el análisis macroscópico de los distintos órganos objeto de estudio puso de manifiesto el daño sistémico ocasionado por el LPS. De tal forma, se apreció un incremento significativo en la relación peso/longitud del colon y del intestino delgado, así como en el peso del bazo y de los pulmones, al comparar el grupo control con el grupo de animales sanos ( $p < 0,05$ ); (Tabla 7). El tratamiento de los animales con los probióticos no modificó la relación peso/longitud del intestino delgado en comparación con el grupo control, y en el caso del colon esta relación sólo se vio disminuida significativamente en los grupos de animales tratados con *L. salivarius* ( $p < 0,01$ ) y *L. fermentum* ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, el peso del bazo descendió significativamente en los grupos tratados con *L. fermentum*, *L. reuteri*, *B. bifidum* y *E. coli* ( $p < 0,05$ ) en relación al grupo control, mientras que *L. fermentum*, *B. longum* y *B. bifidum* redujeron significativamente el peso de los pulmones (Tabla 7).

**Tabla 7.** Peso de distintos órganos de ratones sanos y ratones a los que se les indujo el shock séptico mediante LPS.

Grupo	Intestino delgado (mg/g ratón)	Colon (mg/cm)	Bazo (mg/g ratón)	Pulmón (mg/g ratón)
Sano	24,6 ± 0,7	24,1 ± 0,8	4,3 ± 0,2	2,9 ± 0,3
Control	22,0 ± 0,8 <sup>#</sup>	31,1 ± 2,5 <sup>#</sup>	4,8 ± 0,2 <sup>#</sup>	3,9 ± 0,3 <sup>#</sup>
<i>L. salivarius</i>	19,6 ± 1,3 <sup>#</sup>	25,6 ± 1,3 <sup>**</sup>	4,5 ± 0,1	3,8 ± 0,2 <sup>#</sup>
<i>L. fermentum</i>	21,9 ± 1,1 <sup>#</sup>	27,5 ± 1,1 <sup>*</sup>	3,9 ± 0,2 <sup>*</sup>	2,9 ± 0,1 <sup>*</sup>
<i>L. reuteri</i>	21,9 ± 1,3 <sup>#</sup>	28,3 ± 1,4 <sup>#</sup>	4,4 ± 0,1 <sup>*</sup>	3,3 ± 0,3
<i>B. longum</i>	19,6 ± 1,7 <sup>#</sup>	28,0 ± 0,5 <sup>#</sup>	4,5 ± 0,2	2,8 ± 0,3 <sup>*</sup>
<i>B. bifidum</i>	19,9 ± 1,8 <sup>#</sup>	29,3 ± 1,0 <sup>#</sup>	4,1 ± 0,2 <sup>*</sup>	3,0 ± 0,3 <sup>*</sup>
<i>E. coli</i>	20,9 ± 1,3 <sup>#</sup>	29,1 ± 1,1 <sup>#</sup>	4,3 ± 0,2 <sup>*</sup>	3,0 ± 0,3 <sup>*</sup>

Los valores están expresados como la media aritmética ± error estándar de la media. n=10, \*p<0,05, \*\*p< 0,01 vs grupo control; # p<0,05 vs grupo sano.

## 2.4. ESTUDIO BIOQUÍMICO

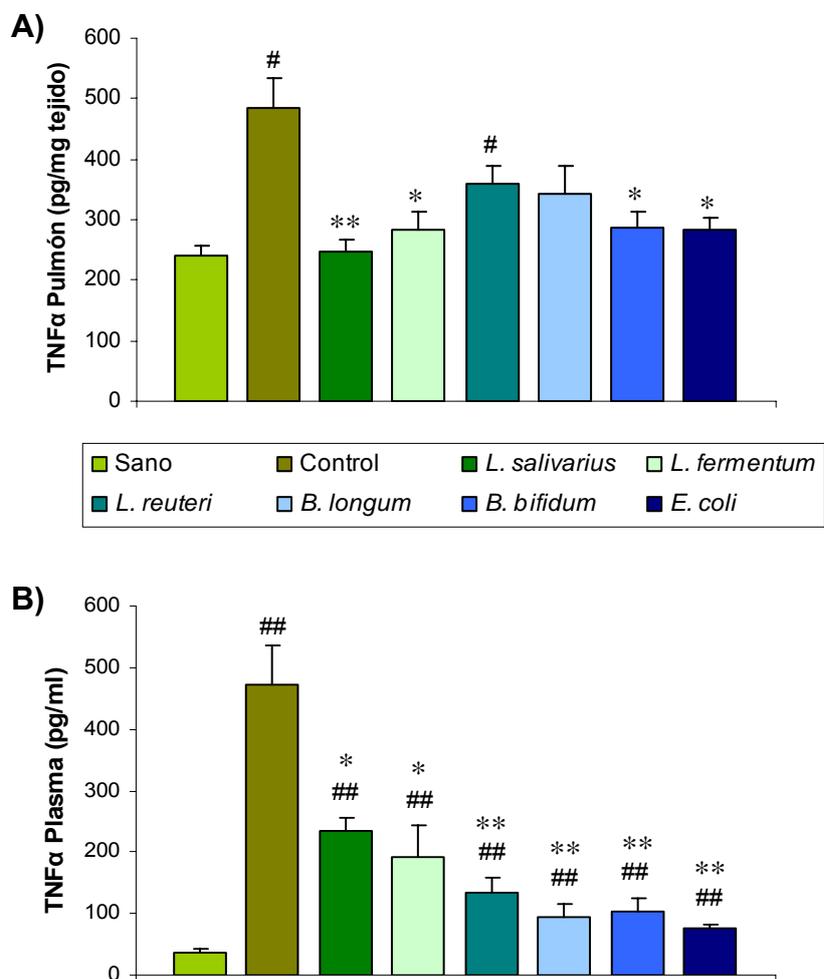
Como se podía esperar, el daño sistémico inducido por el LPS también se reflejó en modificaciones en los valores de los distintos parámetros bioquímicos. El TNF $\alpha$  es uno de los principales mediadores que intervienen en la sepsis, siendo responsable del incremento de permeabilidad vascular, así como de la coagulación intravascular causante del estado de shock (Annane *et al.*, 2005). En nuestro estudio, los niveles de TNF $\alpha$  se incrementaron significativamente 12 y 2 veces, en plasma y en pulmón respectivamente, en comparación con el grupo de animales

sanos (Tabla 8). Al evaluar el efecto de los probióticos, en el pulmón los valores de esta citoquina disminuyeron significativamente en los grupos tratados con *L. salivarius* ( $p < 0,01$ ), *L. fermentum*, *B. bifidum* y *E. coli* Nissle 1917 ( $p < 0,05$ ), en comparación con el grupo control, sin observarse diferencias con el grupo sano. Sin embargo, no se apreciaron diferencias significativas respecto al grupo control en los grupos a los que se administró *B. longum* y *L. reuteri*, aunque este último sí que las mostró en relación al grupo sano (Figura 16A). En plasma, todos los grupos tratados disminuyeron significativamente los valores de TNF $\alpha$ , en comparación con el grupo control, aunque también mostraron diferencias en relación al grupo sano (Figura 16B).

**Tabla 8.** Producción de TNF $\alpha$  en plasma y en pulmón, en ratones a los que se les indujo el shock séptico mediante LPS.

Grupo	TNF $\alpha$ Plasma (pg/ml)	TNF $\alpha$ Pulmón (pg/mg tejido)
Sano	37,7 $\pm$ 5,0	241,8 $\pm$ 16,0
Control	471,0 $\pm$ 64,0 <sup>##</sup>	483,0 $\pm$ 51,1 <sup>#</sup>

Los valores están expresados como la media aritmética  $\pm$  error estándar de la media. n=10, \* $p < 0,05$  vs grupo control; # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  vs grupo sano.



**Figura 16.** Efecto de los probióticos sobre la producción de TNF $\alpha$  en pulmón (A) y en plasma (B), en ratones a los que se les indujo el shock séptico mediante LPS. n=10, \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs grupo control; #p<0,05, ##p<0,01 vs grupo sano.

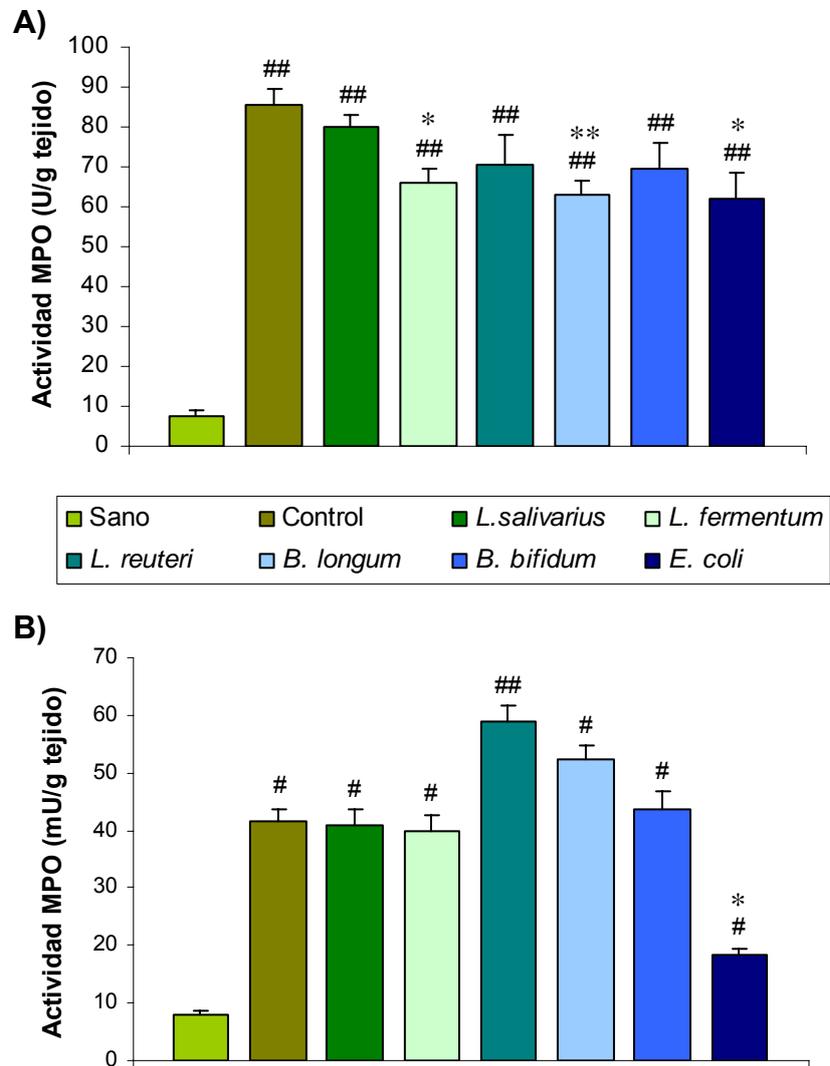
Es bien conocido, que el shock séptico también promueve la activación y migración de leucocitos en varios órganos (Annane *et al.*, 2005), mostrando gran importancia la infiltración y activación de neutrófilos en pulmón (Welbourn y Young,

1992). Así, la elevada afluencia de neutrófilos en este órgano se pudo observar mediante un incremento de la actividad MPO tras la inducción de la sepsis, siendo este aumento de aproximadamente 11 veces en comparación con el grupo sano ( $p < 0,01$ ); (Tabla 9). De forma general, el tratamiento probiótico disminuyó la actividad MPO en pulmón en relación al grupo control, observándose una reducción significativa en los grupos tratados con *L. fermentum*, *B. longum* y *E. coli*, a pesar de que en todos los grupos se comprobaron diferencias en relación al grupo sano (Figura 17A). Cuando esta enzima fue medida en colon, su valor también mostró un incremento significativo en comparación con el grupo sano (Tabla 9), indicando que este órgano también se ve afectado por la infiltración de polimorfonucleares, como consecuencia de la administración de LPS a ratones. De todos los grupos tratados con los diferentes probióticos, únicamente el grupo que recibió *E. coli* presentó una disminución significativa en relación al grupo control (Figura 17B).

**Tabla 9.** Actividad mieloperoxidasa (MPO) en pulmón y en colon, y producción de glutatión hepático, en ratones a los que se les indujo el shock séptico mediante LPS.

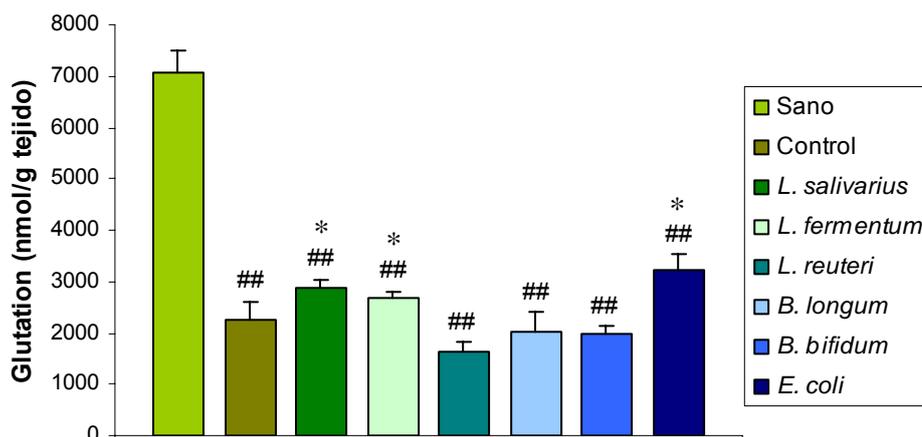
Grupo	MPO Pulmón (U/g tejido)	MPO Colon (U/g tejido)	Glutacion Hígado (nmol/ g tejido)
Sano	7,3 ± 1,8	8,1 ± 0,6	7058,1 ± 455,0
Control	85,3 ± 4 <sup>###</sup>	41,5 ± 2,2 <sup>#</sup>	2266,2 ± 318,1 <sup>###</sup>

Los valores están expresados como la media aritmética ± error estándar de la media. n=10, \* $p < 0,05$  vs grupo control; # $p < 0,05$ , ### $p < 0,01$  vs grupo sano.



**Figura 17.** Efecto de los probióticos sobre la actividad mieloperoxidasa en pulmón **(A)** y en colon **(B)**, en ratones a los que se les indujo el shock séptico mediante LPS. n=10, \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs grupo control; #p<0,05, ##p<0,01 vs grupo sano.

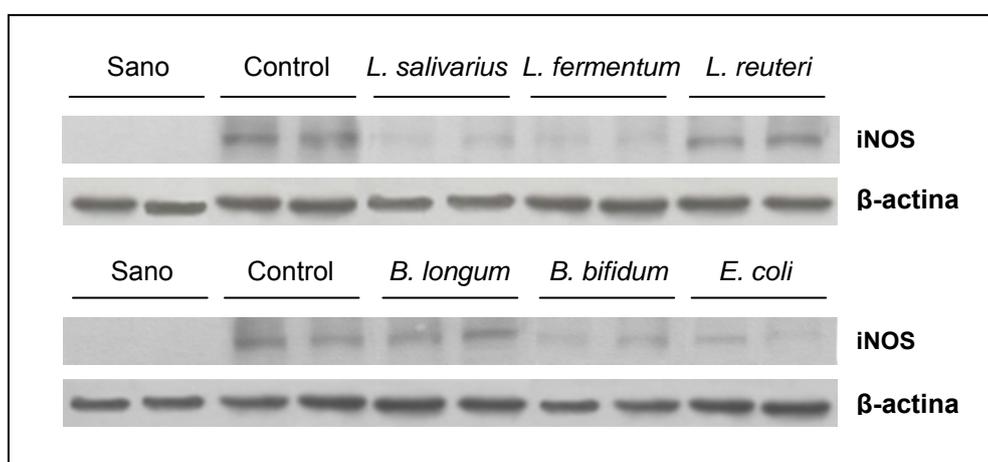
Diferentes estudios también han puesto de manifiesto que la sepsis está relacionada con un aumento en la producción de metabolitos reactivos de oxígeno, que causan una situación de daño oxidativo en varios órganos, siendo responsable de importantes disfunciones multiorgánicas (Salvemini y Cuzzocrea, 2002). En nuestro estudio, la situación de estrés oxidativo inducido tras la administración de LPS se pudo comprobar en el hígado tras la determinación de los niveles del péptido antioxidante glutatión. Así, como consecuencia del shock séptico, en el grupo control se produjo una disminución significativa del contenido de glutatión de aproximadamente 3 veces, en comparación con el grupo sano (Tabla 9). Este descenso en los niveles de glutatión se vio modificado significativamente en algunos de los grupos de animales con tratamiento probiótico, de forma que, aquellos que recibieron *L. salivarius*, *L. fermentum* y *E. coli*, mostraron un incremento significativo en relación al grupo control (Figura 18).



**Figura 18.** Efecto de los probióticos sobre la producción de glutatión hepático total, en ratones a los que se les indujo el shock séptico mediante LPS. n=10, \*p<0,05 vs grupo control; ##p<0,01 vs grupo sano.

Análogamente, el óxido nítrico (NO) también ha sido considerado como un mediador proinflamatorio importante, jugando un papel clave en la patogénesis del

shock séptico, probablemente debido al incremento de la expresión de óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Cuzzocrea *et al.*, 2006). Así, el análisis mediante Western blot en colon reveló un aumento en la expresión de esta enzima en el grupo control, en comparación con el grupo sano. En nuestro estudio, el tratamiento con *L. salivarius*, *L. fermentum*, *B. bifidum* y *E. coli* redujo la expresión colónica de iNOS en comparación con el grupo control, pero esta disminución no se observó en los grupos tratados con *L. reuteri* y *B. longum* (Figura 19).



**Figura 19.** Efecto de los probióticos sobre la expresión de iNOS en colon mediante Western blot, en ratones a los que se les indujo el shock séptico mediante LPS.

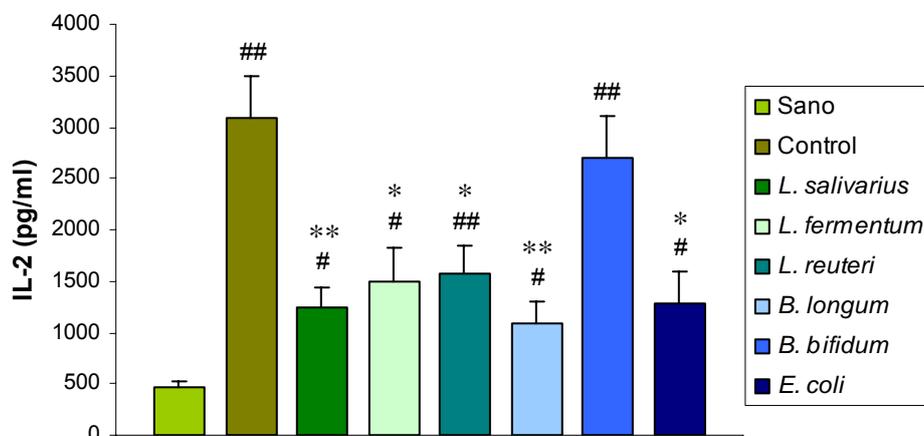
Es evidente que el shock séptico es el resultado de una alteración de la respuesta inmune sistémica, por lo que se procedió a evaluar el efecto que los probióticos podían ejercer sobre la producción de varias citoquinas proinflamatorias (IL-2 e IL-5) y antiinflamatorias (IL-10), cuya expresión se ha visto anteriormente modificada tras la administración de LPS (Kim *et al.*, 2003; Hotchkiss y Karl, 2003; Hsu *et al.*, 2006).

Es conocido que la IL-2 está implicada en la proliferación de linfocitos T (Mathew y Sharma, 2000) y que el LPS estimula la liberación de esta citoquina, aumentando así la expansión clonal de los linfocitos T estimulados (Trinchieri 1987, Ceuppens *et al.*, 1988, Abuharfeil *et al.*, 2001). En nuestro ensayo, esta citoquina fue determinada mediante ELISA en esplenocitos procedentes de ratón sometidos a shock séptico por LPS, incubados durante 48 horas con Con A con el objeto de estimular la producción de los linfocitos T. Confirmando el papel de la IL-2 en el shock séptico, se observó que los niveles de esta citoquina aumentaron casi 7 veces en el grupo control en relación al grupo de animales sanos (Tabla 10). En todos los grupos con tratamiento probiótico (salvo en el que recibió *B. bifidum*) se comprobó una disminución en los niveles de esta citoquina en relación al grupo control, mostrando también diferencias significativas en relación al grupo sano (Figura 20).

**Tabla 10.** Producción de IL-2 e IL-5 en esplenocitos de ratón estimulados durante 48 horas con Concanavalina A.

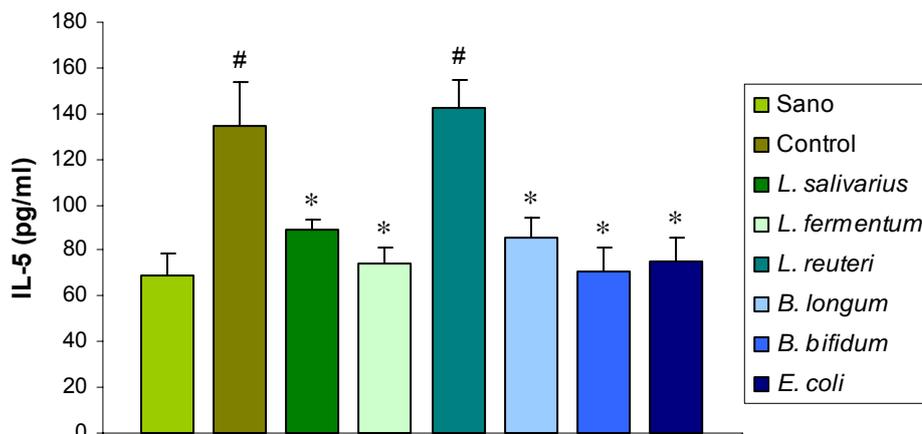
Grupo	IL-2 (pg/ml)	IL-5 (pg/ml)
Sano	457,3 ± 76,1	68,7 ± 10,3
Control	3095,0 ± 432,9 <sup>##</sup>	134,9 ± 19,3 <sup>#</sup>

Los valores están expresados como la media aritmética ± error estándar de la media. n=10, <sup>#</sup>p<0,05, <sup>##</sup>p<0,01 vs grupo sano.



**Figura 20.** Efecto de los probióticos sobre la producción de IL-2 mediante ELISA, en esplenocitos de ratones estimulados durante 48 horas con Concanavalina A. n=10, \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs grupo control; #p<0,05, ##p<0,01 vs grupo sano.

La IL-5 es una citoquina proinflamatoria que estimula la proliferación de linfocitos B y sirve de nexo entre la activación de linfocitos T y la inflamación eosinófila. En este caso, su producción se vio aumentada 2 veces en el grupo control en relación al grupo sano (Tabla 10). Todos los probióticos a excepción de *L. reuteri* fueron capaces de reducir significativamente la producción de esta citoquina en comparación con el grupo control, aunque todos mostraron diferencias significativas en relación al grupo sano (Figura 21).



**Figura 21.** Efecto de los probióticos sobre la producción de IL-5 mediante ELISA, en esplenocitos de ratones estimulados durante 48 horas con Concanavalina A. n=10, \*p<0,05, \*\*p<0,01 vs grupo control; #p<0,05, ##p<0,01 vs grupo sano.

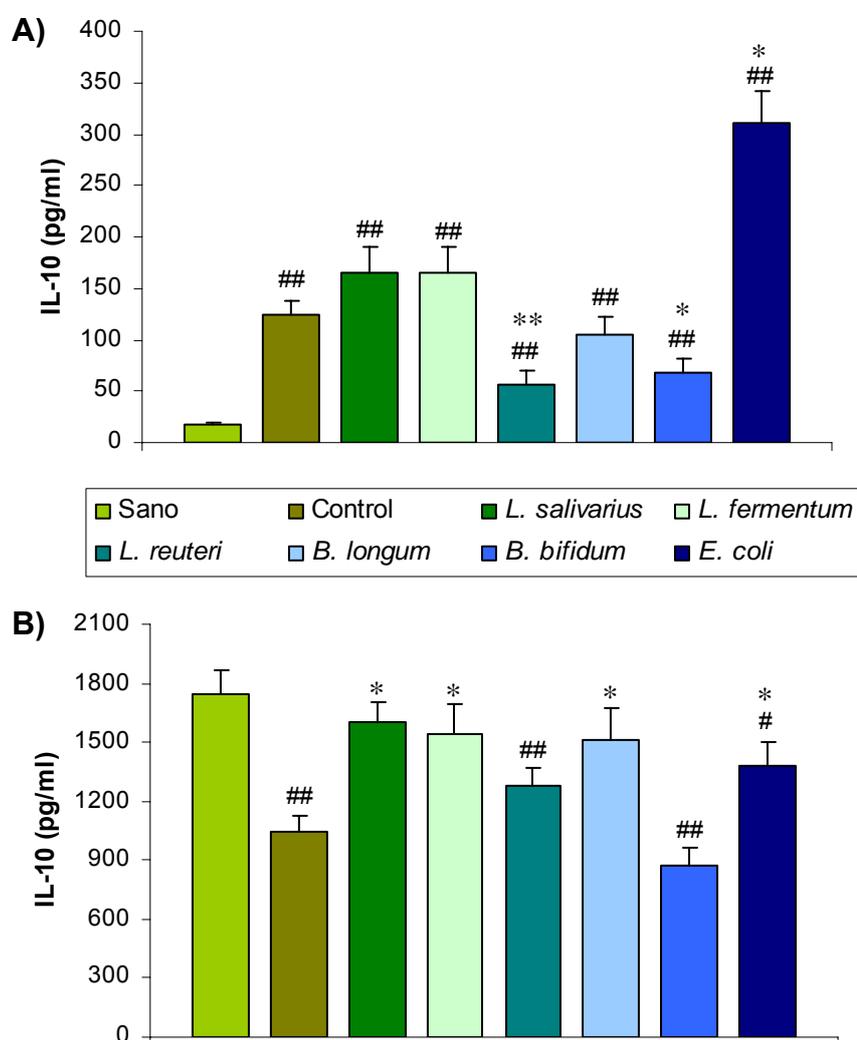
La IL-10 es una citoquina que juega un importante papel de protección en el modelo de shock séptico inducido mediante endotoxina en ratones (Howard *et al.*, 1993). Esta citoquina antiinflamatoria es producida por las células epiteliales e inmocompetentes, y se ha comprobado su incremento en estudios previos realizados en ratones a los que se les indujo el shock séptico, en un intento de contrarrestar la excesiva activación de la respuesta inmunitaria tras la administración de LPS (Marchant *et al.*, 1994). En nuestro estudio, el comportamiento en la producción de esta citoquina dependió de las condiciones del ensayo (basal y estimulado con Con A). Así, en condiciones basales, en los esplenocitos procedentes de ratones sometidos a shock séptico mediante LPS, la producción de IL-10 aumentó 7 veces en relación al grupo sano (Tabla 11). El aumento también se observó en los grupos de animales sometidos a tratamiento probiótico, siendo este incremento mayor en el grupo tratado con *E. coli* (p<0,01 vs control) (Figura 22A). Por otra parte, cuando los esplenocitos fueron incubados con

Con A, la producción de IL-10 en el grupo control se redujo 1,6 veces en relación al grupo sano (Tabla 11). El tratamiento con *L. salivarius*, *L. fermentum*, *B. longum*, y *E. coli* produjo un incremento significativo en los niveles de esta citoquina, en relación al grupo control, aunque en el caso de *E. coli* la producción fue significativamente menor que en el grupo sano ( $p < 0,05$ ); esta disminución también se observó en los grupos tratados con *L. reuteri* y *B. bifidum* (Figura 22B).

**Tabla 11.** Producción de IL-10 en esplenocitos de ratón sin estimular y estimulados durante 48 horas con Concanavalina A.

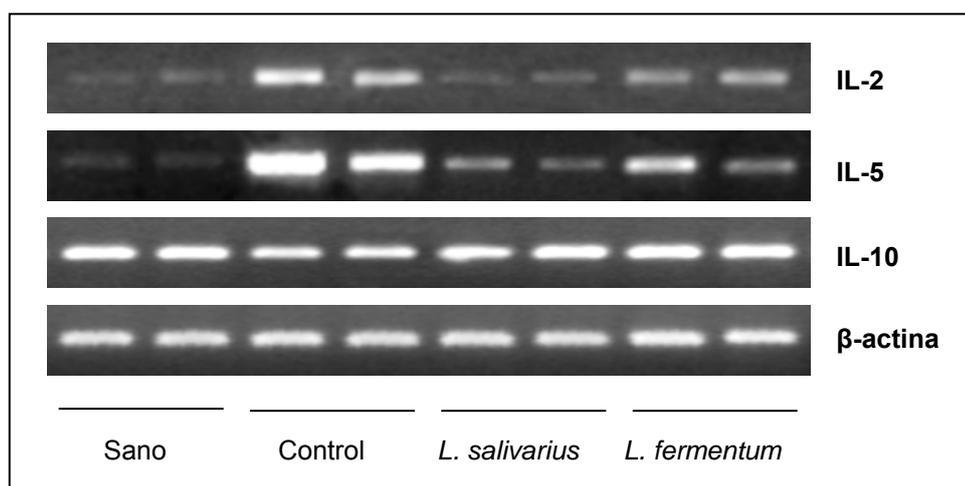
Grupo	IL-10 (pg/ml) Esplenocitos basales	IL-10 (pg/ml) Esplenocitos ConA
Sano	17,0 ± 1,8	1744,1 ± 119,8
Control	125,0 ± 13,2 <sup>##</sup>	1042,1 ± 85,7 <sup>##</sup>

Los valores están expresados como la media aritmética ± error estándar de la media. n=10, <sup>##</sup>p<0,01 vs grupo sano.



**Figura 22.** Efecto de los probióticos sobre la producción de IL-10 mediante ELISA, en esplenocitos de ratón sin estimular **(A)** y estimulados durante 48 horas con Concanavalina A **(B)**. n=10, \*\*p<0,01, \*p<0,05 vs grupo control; ##p<0,01, #p<0,05 vs grupo sano.

Con el objeto de confirmar los resultados obtenidos con anterioridad, se realizó el análisis de estas citoquinas mediante RT-PCR en los grupos tratados con *L. salivarius* y *L. fermentum*. El shock séptico efectivamente mostró una alteración en la expresión de IL-2, IL-5 e IL-10 en los esplenocitos de ratón estimulados con Concanavalina A. En el grupo control se observó un incremento en la expresión de IL-2 e IL-5 y una disminución de IL-10, en comparación con el grupo sano. El tratamiento probiótico con *L. salivarius* y *L. fermentum* redujo la expresión de ambas citoquinas proinflamatorias (IL-2 e IL-5) y además, aumentó ligeramente la expresión de IL-10 (Figura 23).



**Figura 23.** Efecto de *L. salivarius* y *L. fermentum* sobre la expresión de IL-2, IL-5 e IL-10 mediante RT-PCR, en esplenocitos de ratón estimulados con Concanavalina A.

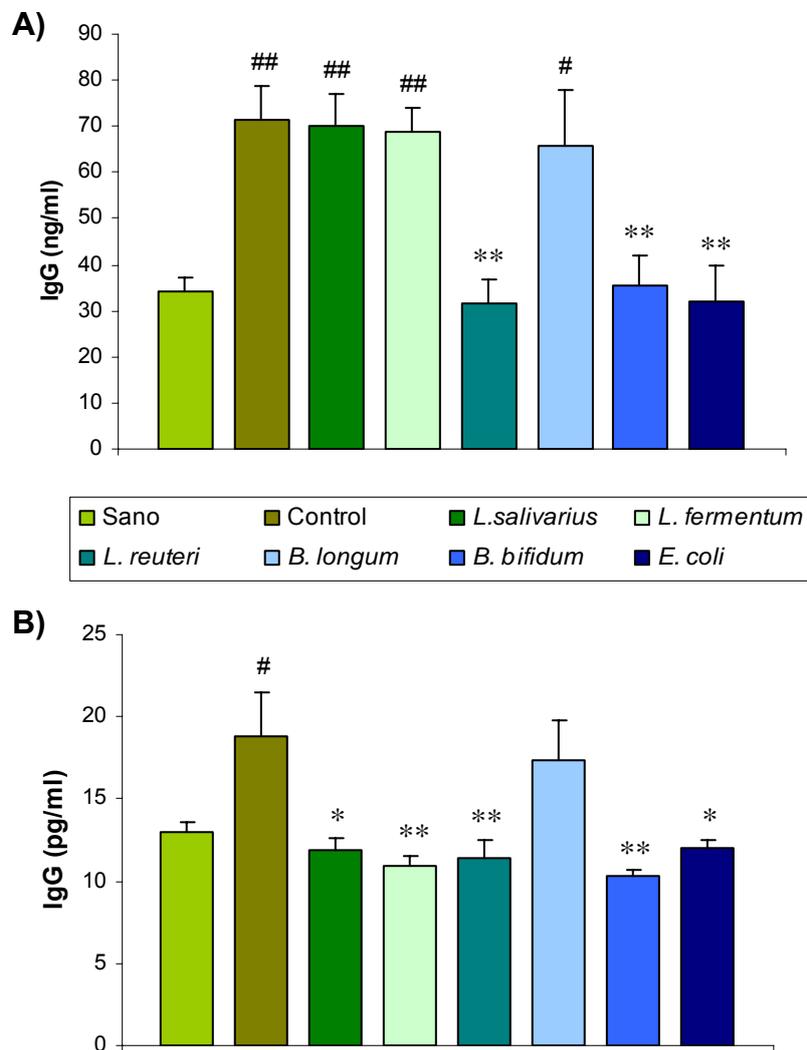
Muchas bacterias producen una respuesta de tipo Th1 que induce a los linfocitos B hacia la síntesis de isotipos de IgG, cuya función principal consiste en opsonizar a los antígenos para su posterior fagocitosis por macrófagos y neutrófilos.

Así, en nuestro estudio, los esplenocitos procedentes de ratones a los que se les indujo la sepsis con LPS, fueron diferenciados hacia linfocitos B, mediante su incubación con LPS durante 72 horas. Transcurrido este tiempo, la secreción de IgG aumentó 2 veces en el grupo control, en relación al grupo sano (Tabla 12), y el tratamiento con *L. reuteri*, *B. bifidum* y *E. coli* redujo significativamente sus niveles en relación al grupo control (Figura 24A). Los niveles de esta Ig también fueron medidos en plasma, donde se observó un incremento significativo en el grupo control en relación al grupo de animales sanos (Tabla 12). Todos los grupos tratados con los distintos probióticos (a excepción del que recibió *B. longum*) disminuyeron la producción de IgG (Figura 24B), por lo que se podría pensar en una posible implicación de las bacterias probióticas, en la modificación de la respuesta de tipo humoral en este modelo experimental.

**Tabla 12.** Producción de IgG en esplenocitos de ratón estimulados durante 72 horas con LPS y en plasma.

Grupo	IgG (ng/ml)	IgG (pg/ml)
	Esplenocitos LPS	Plasma
Sano	34,2 ± 3,0	12,94 ± 0,7
Control	71,6 ± 7,1 <sup>##</sup>	18,81 ± 2,7 <sup>#</sup>

Los valores están expresados como la media aritmética ± error estándar de la media. n=10, <sup>#</sup>p<0,05, <sup>##</sup>p<0,01 vs grupo sano.



**Figura 24.** Efecto de los probióticos sobre la producción de IgG mediante ELISA, en esplenocitos de ratón estimulados durante 72 horas con LPS **(A)** y en plasma **(B)**. n=10, \*\*p<0,01, \*p<0,05 vs grupo control; ##p<0,01, #p<0,05 vs grupo sano.



*Discusión*

---



Numerosas enfermedades surgen como consecuencia de una alteración del sistema inmune, bien por una falta de respuesta inmunológica que origina una situación de inmunodeficiencia, o por la existencia de una respuesta exagerada ante distintos estímulos, como sucede en diversas patologías entre las que se pueden incluir la inflamación intestinal, la artritis reumatoide, o el shock séptico. Sin lugar a dudas, se trata de patologías con un difícil manejo terapéutico, lo que ha propiciado la investigación y desarrollo de distintas estrategias terapéuticas cuyo objetivo es una modulación adecuada del sistema inmune. No obstante, la mayoría de los fármacos que actualmente se utilizan frente a estas patologías, aunque eficaces, muestran importantes reacciones adversas, hecho que adquiere una especial relevancia en pacientes con EII o con artritis reumatoide, dado que el tratamiento farmacológico se suele mantener durante un período prolongado (Enns y Sutherland, 1998; Stein y Hanauer, 2000; Ranganathan *et al.*, 2003). Esto justifica el importante esfuerzo que viene realizando la comunidad científica para la búsqueda de nuevas terapias que combinen eficacia con un adecuado margen de seguridad y ausencia de reacciones adversas.

Además, la incidencia de estas enfermedades de tipo inmune viene incrementándose de forma gradual en los países desarrollados en los últimos años. La denominada “hipótesis de la higiene” (Strachan 1989) intenta explicar este hecho, y establece que los avances en higiene y sanidad han provocado un descenso de las enfermedades infecciosas, aunque a expensas de un paralelo aumento de las enfermedades alérgicas y autoinmunes, como la EII, la diabetes, el asma, la rinitis alérgica... como consecuencia de una maduración inadecuada del sistema inmune del individuo. Asimismo, se ha postulado que estas alteraciones inmunológicas se asocian con importantes modificaciones de la microbiota intestinal, de ahí, que con el objetivo de restablecer una flora bacteriana adecuada, una de las estrategias que

están recibiendo una especial atención la constituye la administración de bacterias probióticas.

En este sentido, los efectos beneficiosos que ejercen los probióticos se han puesto de manifiesto en distintos ensayos clínicos en la EII. Dado que la colonización del tracto intestinal por parte del probiótico se ha considerado como un aspecto clave para poder ejercer su acción, podemos plantearnos si su efecto se restringe a situaciones en las que existe una alteración de la función inmune de tipo local en el intestino, o si sus efectos beneficiosos podrían ser ejercidos de forma sistémica. Además, habría que añadir el hecho constatado de que no todos los probióticos presentan eficacia frente a una patología determinada, habiéndose incluso descrito diferencias entre cepas de una misma especie bacteriana. Por este motivo, es muy interesante evaluar de forma simultánea, y en las mismas condiciones de trabajo, el efecto de diferentes probióticos en modelos experimentales que ponen de manifiesto la existencia de respuesta inmune alterada, tanto de carácter local (inflamación intestinal) como de tipo sistémico (shock séptico), pudiendo determinar cuál es el perfil de actuación idóneo del probiótico (o probióticos) frente a estas patologías. Con esta doble finalidad, en la presente Tesis Doctoral hemos analizado las acciones de seis probióticos que en estudios previos han presentado propiedades inmunomoduladoras con potencial aplicación terapéutica en estas situaciones.

## **1. EFECTO DE LOS DISTINTOS PROBIÓTICOS EN EL MODELO DE COLITIS EXPERIMENTAL INDUCIDO POR TNBS EN RATAS**

Aunque la etiología de la EII es todavía desconocida, está demostrado que las bacterias del lumen intervienen en su iniciación y progresión, probablemente debido

a la existencia de un desequilibrio entre las bacterias potencialmente patógenas y las bacterias protectoras (Fiocchi 1998; Shanahan 2000). En este sentido, se ha podido comprobar un descenso en el recuento de lactobacilos y bifidobacterias en pacientes con EII, y un aumento en el número de algunas bacterias perjudiciales como *E. coli* invasivo/adherente (Campieri y Gionchetti, 2001), lo que justificaría el uso de microorganismos probióticos que compitan con las bacterias potencialmente nocivas como una alternativa al tratamiento actual. De hecho, se ha comprobado que la administración de probióticos restaura la microbiota intestinal y disminuye la inflamación intestinal, avalando su eficacia en pacientes con EII (Guandalini 2002; Gionchetti *et al.*, 2000; Schultz *et al.*, 2003).

En la última década se han llevado a cabo más de 20 ensayos clínicos en los que se han obtenido distintos resultados en función de la especie bacteriana y de la patología inflamatoria a tratar (Tablas 13, 14 y 15).

**Tabla 13.** Estudios clínicos realizados con distintos probióticos en la inducción de la remisión de la pouchitis.

Probiótico	Diseño	Control	Acciones	Referencia
<b>Inducción de la remisión de la pouchitis</b>				
VSL#3	DC, R, C	Placebo	Aumento del tiempo de remisión (p< 0,001)	Gionchetti <i>et al.</i> , 2000
LGG	DC, R, C	Placebo	Sin diferencias en el IAEC	Kuisma <i>et al.</i> , 2003
VSL#3	DC, R, C	Placebo	Aumento del tiempo de remisión (p< 0,05)	Gionchetti <i>et al.</i> , 2003
VSL#3	DC, R, C	Placebo	Aumento del tiempo de remisión (p< 0,001)	Mimura <i>et al.</i> , 2004
<i>L. acidophilus</i> Y <i>B. lactis</i>	Abierto	Ninguno	Mejora del IAEC, pero sin diferencias en la histología	Laake <i>et al.</i> , 2004

DC:doble ciego; R:randomizado; C:controlado; IAEC:índice de actividad de la enfermedad de Crohn. Tabla modificada de Ewaschuk y Dieleman, 2006.

**Tabla 14.** Estudios clínicos realizados con distintos probióticos en la inducción y el mantenimiento de la remisión de la colitis ulcerosa.

Probiótico	Diseño	Control	Acciones	Referencia
<b>Inducción de la remisión de colitis ulcerosa</b>				
<i>E. coli</i> Nissle 1917	DC, R, C	Mesalamina	Tan efectivo como mesalamina en la remisión de CU	Rembacken <i>et al.</i> , 1999
<i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i>	R, C	Placebo	Disminución de la exacerbación de los síntomas (P<0,01)	Ishikawa <i>et al.</i> , 2003
<i>Bifidobacterium</i>	DC, R, C	Placebo	Reducción índice de actividad de CU	Kato <i>et al.</i> , 2004
VSL#3	Abierto	Ninguno	77 % de remisión de CU	Bibiloni <i>et al.</i> , 2005
<b>Mantenimiento de la remisión de la colitis ulcerosa</b>				
VSL#3	Abierto	Ninguno	Remisión del 75%	Venturi <i>et al.</i> , 1999
<i>E. coli</i> Nissle 1917	DC, R, C	Mesalamina	Tan efectivo como mesalamina en la remisión de CU	Kruis <i>et al.</i> , 2004
<i>L. salivarius</i> o <i>B. infantis</i>	DC, R, C	Placebo	No mejora el tiempo de remisión	Shanahan <i>et al.</i> , 2006
LGG + mesalamina	Abierto	Mesalamina	Tan efectivo como la mesalamina sola	Zocco <i>et al.</i> , 2006

DC:doble ciego; R:randomizado; C:controlado. Tabla modificada de Ewaschuk y Dieleman, 2006.

**Tabla 15.** Estudios clínicos realizados con distintos probióticos en la inducción y el mantenimiento de la remisión de la enfermedad de Crohn.

<b>Probiótico</b>	<b>Diseño</b>	<b>Control</b>	<b>Acciones</b>	<b>Referencia</b>
<b>Inducción de la remisión de la enfermedad de Crohn</b>				
LGG	Abierto	Ninguno	Mejora del IAEC en comparación con niveles basales (P<0,05)	Gupta <i>et al.</i> , 2000
<i>L. salivarius</i>	Abierto	Ninguno	Reducción de la actividad de la enfermedad comparado con niveles basales	McCarthy <i>et al.</i> , 2001
LGG	DC, R, C	Placebo	Sin diferencias en la capacidad de remisión	Schultz <i>et al.</i> , 2004
<b>Mantenimiento de la remisión de la enfermedad de Crohn</b>				
<i>E. coli</i> Nissle 1917	DC, R, C	Placebo	Sin diferencias en la remisión de los síntomas	Malchow <i>et al.</i> , 1997
VSL#3	R, C	Mesalamina	Igual eficacia que mesalamina en la prevención de recaídas	Campieri <i>et al.</i> , 2000
LGG	DC, R, C	Placebo	Sin diferencias significativas de remisión	Prantera <i>et al.</i> , 2002
LGG	DC, R, C	Placebo	Sin diferencias en el tiempo de recaídas	Bousvaros <i>et al.</i> , 2005
<i>L. johnsonii</i> LA1	DC, R, C	Placebo	Sin diferencias en las recaídas	Marteau <i>et al.</i> , 2006

DC:doble ciego; R:randomizado; C:controlado; IAEC:índice de actividad de la enfermedad de Crohn. Tabla modificada de Ewaschuk y Dieleman, 2006.

Además de estos estudios en humanos, también se han realizado distintos ensayos en modelos experimentales de inflamación intestinal, que han permitido profundizar en los mecanismos involucrados en el efecto beneficioso ejercido por los probióticos (Tabla 16).

**Tabla 16.** Efectos beneficiosos de algunos probióticos en varios modelos experimentales de inflamación intestinal.

Probiótico	Modelo	Acciones	Referencia
<i>L. reuteri</i>	Metotrexato	Recuperación del peso animal, reducción de la permeabilidad y MPO	Mao <i>et al.</i> , 1996
<i>Lactobacillus sp</i>	IL-10 KO	Prevención en el desarrollo de la colitis (algunas especies mejor que otras)	Madsen <i>et al.</i> , 1999
VSL#3	IL-10 KO	Reducción de citoquinas inflamatorias y restauración de la barrera epitelial	Madsen <i>et al.</i> , 2001
Ag solubles <i>E. coli</i> (cepa Laves)	DSS	Reducción de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ e IFN $\gamma$	Konrad <i>et al.</i> , 2003
<i>L. salivarius</i>	TNBS	Reducción de citoquinas inflamatorias, MPO, iNOS y restauración de los niveles de glutatión	Peran <i>et al.</i> , 2005
<i>L. fermentum</i>	TNBS	Reducción de citoquinas inflamatorias, MPO, iNOS y restauración de los niveles de glutatión	Peran <i>et al.</i> , 2006
<i>L. fermentum</i> vs <i>L. reuteri</i>	TNBS	<i>L. fermentum</i> ejerce mayor efecto antiinflamatorio	Peran <i>et al.</i> , 2007

Así, para explicar el efecto antiinflamatorio intestinal ejercido por los probióticos se ha propuesto la participación de distintos mecanismos, entre los que inicialmente se incluyó la competición con bacterias nocivas por el sitio de fijación al epitelio, la inhibición de su crecimiento y/o la promoción de su muerte mediante la producción de compuestos antibacterianos o la reducción del pH. Más recientemente se le está dando una gran importancia a la modulación de la respuesta inmunitaria de la mucosa del hospedador por parte de los probióticos, hecho que ha sido ratificado en distintos ensayos *in vitro*. De hecho, *L. casei* y *L. bulgaricus* son capaces de inhibir la producción de TNF $\alpha$  en explantes intestinales procedentes de individuos con enfermedad de Crohn (Borrueal *et al.*, 2002). *L. plantarum* 299v también revirtió la producción de citoquinas proinflamatorias por parte de *E. coli* enteropatógeno en la mucosa colónica de pacientes con colitis ulcerosa, y además fue capaz de inducir la producción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 por células T y macrófagos (Pathmakanthan *et al.*, 2004).

Aunque todos estos resultados son muy interesantes, todavía se está lejos de tener un conocimiento preciso de los mecanismos de acción ejercidos por las bacterias probióticas, sobre todo si se tiene en cuenta la variabilidad de la respuesta que se obtiene en función de la cepa microbiana que se considere, a lo que se debe añadir la escasa información sobre la dosis necesaria en cada caso y la duración del tratamiento. Además, y como se ha comentado anteriormente, existen algunos estudios en los que los probióticos no han demostrado efecto beneficioso alguno, tanto en ensayos clínicos como en modelos experimentales. Todo esto sugiere que la eficacia de este tipo de microorganismos en el tratamiento de estas patologías intestinales puede variar dependiendo de diferentes factores:

- Especie y cepa del probiótico, ya que el mecanismo de acción varía en función del microorganismo utilizado.

- Dosis.
- Momento de comienzo del tratamiento.
- Tipo de patología intestinal. Así, debido a la capacidad de colonización ejercida por las bacterias probióticas, los mejores resultados se han obtenido cuando éstas han sido administradas en el tratamiento de la pouchitis crónica tras la resección del colon (Gionchetti *et al.*, 2003). En pacientes con CU también han mostrado claros efectos beneficiosos (Zocco *et al.*, 2006); sin embargo, ha sido en el tratamiento de la EC donde los probióticos han manifestado una menor actividad antiinflamatoria (Marteau *et al.*, 2006), probablemente debido a su escasa colonización en las distintas secciones del tracto gastrointestinal.

En consecuencia, la valoración del efecto del tratamiento probiótico sobre la respuesta inmune alterada en un modelo experimental determinado, resultaría de gran interés para validar la utilización de los probióticos en este tipo de patologías. Igualmente, se aportaría una información valiosa sobre el perfil de actuación y los mecanismos involucrados en su efecto, lo que permitiría una adecuada selección de la cepa del microorganismo e incluso predecir una posible actuación sinérgica tras su asociación. Con este objetivo, se procedió a evaluar y comparar los efectos de varios probióticos, administrados a la misma dosis, en el modelo de colitis experimental inducido con TNBS en rata. Los probióticos seleccionados para la realización de este trabajo fueron:

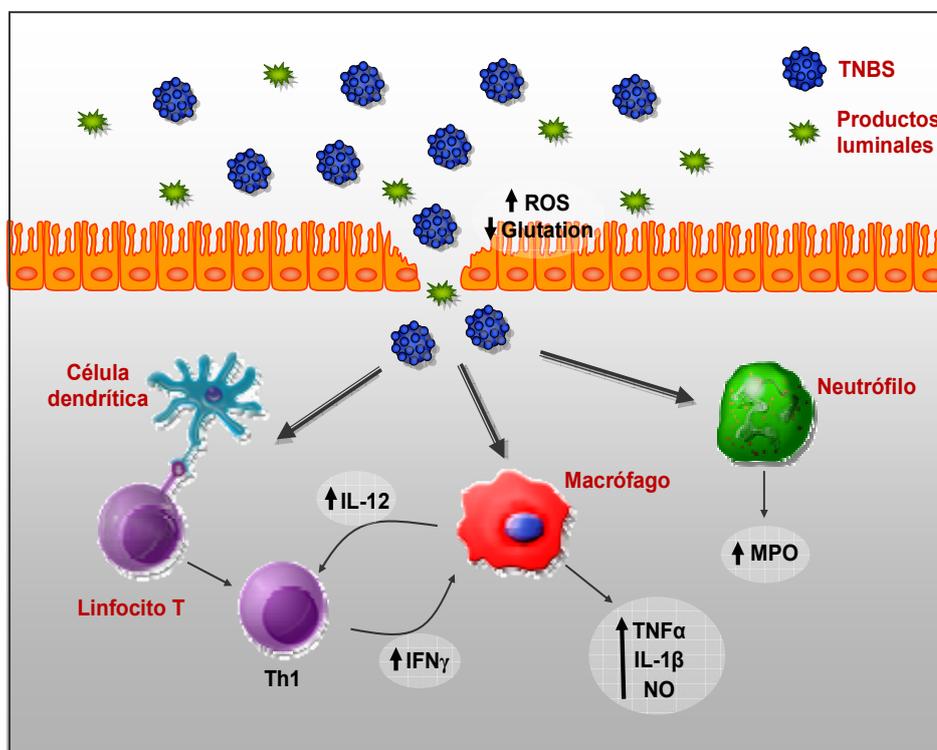
- *Lactobacillus salivarius* CECT5713 y *Lactobacillus fermentum* CECT5716, con eficacia demostrada en este mismo modelo de inflamación intestinal (Peran *et al.*, 2005; Peran *et al.*, 2006).

- *Lactobacillus reuteri* ATCC55730 y *Escherichia coli* Nissle 1917, dos probióticos con actividad antiinflamatoria intestinal tanto en humanos como en modelos experimentales (Tubelius *et al.*, 2005; Kruis *et al.*, 1997; Kruis *et al.*, 2004).
- *Bifidobacterium longum* HA-135 y *Bifidobacterium bifidum* HA-132, probióticos que no han sido evaluados previamente en el modelo de colitis experimental inducido en ratas con TNBS, aunque se han obtenido resultados positivos con otras cepas bacterianas de las mismas especies en distintos modelos de colitis experimental (Matsumoto *et al.*, 2001; Setoyama *et al.*, 2003).

Como se ha indicado anteriormente, para llevar a cabo nuestros estudios se ha seleccionado el modelo de colitis experimental inducido en rata mediante la administración de ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS). Se trata de uno de los más utilizados para valorar inicialmente nuevos tratamientos potencialmente útiles en la EII en humanos, resultando igualmente interesante para dilucidar los mecanismos involucrados en el proceso inflamatorio intestinal, al presentar muchas de las características de la EII en humanos. Además, se trata de un modelo fácilmente reproducible y de bajo coste. Consiste en la administración intracolónica de una solución de TNBS en etanol al 50%; el etanol da lugar a la ruptura de la barrera intestinal facilitando el acceso del TNBS a la mucosa, donde actúa como hapteno (Morris *et al.*, 1989) siendo el responsable de la instauración del proceso inflamatorio (Elson *et al.*, 1995). Se ha postulado que el TNBS, además de actuar como hapteno, ejerce un efecto citotóxico directo sobre el epitelio colónico, como consecuencia de su capacidad de generar especies reactivas derivadas del oxígeno tras su metabolismo por parte de los colonocitos (Grisham *et al.*, 1991), así como por producir una disminución de los niveles colónicos de glutatión (Ardite *et al.*,

2000). Estos hechos facilitarían la desorganización de la citoarquitectura colónica, el aumento de la permeabilidad intestinal y la entrada de productos lumenales, promoviendo la activación del sistema inmunológico intestinal y el incremento en la producción de numerosos mediadores de carácter proinflamatorio (Yamada *et al.*, 1992) (Figura 25). Es importante destacar que la presencia de la flora bacteriana colónica es determinante en el desarrollo del proceso inflamatorio intestinal (García-Lafuente *et al.*, 1998), de manera que, cuando el TNBS/etanol es administrado a animales libres de gérmenes (o bajo tratamiento antibacteriano), la respuesta inflamatoria obtenida es cuantitativamente inferior.

Es bien conocido que, como consecuencia del daño colónico inducido por el TNBS, inicialmente tiene lugar la activación e infiltración de neutrófilos y monocitos en la lámina propia y posteriormente la de linfocitos, que contribuyen de forma clave al daño y cronicidad del proceso inflamatorio (Palmen *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1992). Así, en distintos estudios realizados con este modelo experimental, se ha demostrado que existe una activación de células T con predominio de tipo Th1, que se caracteriza por la producción de grandes cantidades de IFN $\gamma$  y pequeñas cantidades de IL-4 (Trinchieri 1994; Neurath *et al.*, 1995; Elson *et al.*, 1996). Está descrito que este tipo de respuesta está promovida por la producción de IL-12, que actúa como un potente inductor del desarrollo de células de tipo Th1, de forma similar a lo que se ha descrito que ocurre en la EC (Breese *et al.*, 1993; Fuss *et al.*, 1996; Monteleone *et al.*, 1997; Parronchi *et al.*, 1997). Recientemente, también se ha visto que la producción de IL-17 está incrementada en este modelo de colitis experimental (Zhang *et al.*, 2006). Esta citoquina proinflamatoria es secretada por una subpoblación de linfocitos T denominada como Th17 (Langrish *et al.*, 2005), y aunque sus funciones biológicas no se conocen con claridad, se postula que debe jugar un importante papel en la patogénesis de la EII (Fujino *et al.*, 2003).



**Figura 25.** Alteración producida por el TNBS tras su administración intracolónica en el modelo de colitis experimental inducido en ratas.

El modelo descrito inicialmente por Morris *et al.*, (1989), consiste en la inducción del daño colónico mediante la administración de una dosis única de 30 mg de TNBS en etanol al 50% (v/v). En el presente estudio la dosis administrada se ha reducido a 10 mg, con el objeto de que el proceso inflamatorio inducido sea más fácil de modular mediante el correspondiente tratamiento, tal y como ha sido propuesto anteriormente (Allgayer *et al.*, 1989; Veljaca *et al.*, 1995). De hecho, en comparación con resultados previos de nuestro grupo de investigación y con los obtenidos por otros autores, la administración de 10 mg de TNBS desarrolló un

daño colónico cualitativamente similar al inducido con 30 mg, aunque cuantitativamente menor (Morris *et al.*, 1989; Camuesco *et al.*, 2005).

Los resultados obtenidos en estos ensayos revelan el efecto antiinflamatorio intestinal de los distintos probióticos en este modelo de colitis experimental, ratificando de esta forma estudios previos llevados a cabo con numerosos probióticos (Arribas *et al.*, 2008). En el presente estudio, el efecto beneficioso del tratamiento probiótico se pudo comprobar tras las primeras 24 horas de la inducción de la colitis, al observar una disminución de la incidencia de diarrea en los grupos de ratas tratados con los distintos probióticos, a excepción del grupo que recibió *B. longum*. Esto nos sugiere la capacidad de estos microorganismos de preservar la integridad de la mucosa colónica, hecho de gran importancia, ya que la alteración de la barrera conlleva un incremento en el transporte de antígenos lumenales, toxinas bacterianas y microorganismos hacia la lámina propia, estimulando los distintos tipos celulares de la misma y provocando así la inflamación del tejido (Heyman *et al.*, 1994). En este sentido, ha sido ampliamente demostrada la eficacia que presentan los probióticos en el tratamiento de la diarrea, en donde la alteración de la permeabilidad intestinal es un factor determinante (Gorbach 2000).

Después del sacrificio de los animales, el efecto antiinflamatorio intestinal ejercido por los probióticos se pudo constatar macroscópicamente en los segmentos de colon procedentes de los grupos de animales colíticos tratados con *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *B. bifidum* y *E. coli* Nissle 1917, pero no en el grupo tratado con *B. longum*. Así, la extensión del daño colónico disminuyó significativamente en estos grupos, hecho que se vio reflejado en el índice de daño macroscópico, en el que se apreció una reducción significativa en relación al grupo control como consecuencia de la menor extensión del daño inducido con el TNBS. Además, la mayoría de estos probióticos, con la excepción de *E. coli* Nissle 1917,

redujeron significativamente el cociente peso/longitud del colon, indicador de edema colónico, que se encontró aumentado en el grupo colítico sin tratamiento probiótico como consecuencia del proceso inflamatorio.

El estudio microscópico de las muestras confirmó la actividad antiinflamatoria intestinal de los probióticos al promover la restauración de la mucosa dañada como consecuencia del proceso inflamatorio inducido con TNBS. Se podría destacar que el tratamiento con *L. fermentum* o con *B. bifidum* consiguió una restauración casi completa de las células caliciformes en el tejido colónico, facilitándose de esta manera la formación de mucinas que ejercen su función de defensa frente a la entrada de antígenos lumenales al tejido intestinal, lo cual contribuiría al mantenimiento del proceso inflamatorio intestinal (Teahon *et al.*, 1992; Plevy 2002). El incremento en la producción de moco constituye un mecanismo que se ha descrito puede contribuir en el efecto beneficioso presentado por otras estrategias terapéuticas en este mismo modelo de colitis experimental (González *et al.*, 2004).

Los estudios histológicos también permitieron comprobar que el tratamiento probiótico produjo, en la mayoría de los casos, una disminución significativa del infiltrado celular inflamatorio, que generalmente fue de tipo focal, observándose únicamente en aquellas zonas en las que se apreciaron pequeñas ulceraciones, en contraposición a lo observado en el grupo control en donde los infiltrados inflamatorios se apreciaron a lo largo de toda la pared intestinal. La disminución de la infiltración leucocitaria observada microscópicamente en los grupos tratados con *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *B. bifidum* y *E. coli* fue corroborada bioquímicamente mediante un descenso significativo de la actividad MPO, enzima cuya actividad se ha visto incrementa en distintos modelos de inflamación intestinal (Yamada *et al.*, 1992), contribuyendo de forma importante al daño colónico en este modelo de inflamación (Ajuebor *et al.*, 2004). Sorprendentemente, *B. longum*

también redujo significativamente esta actividad enzimática, a pesar de que los estudios histológicos no mostraron una disminución evidente de la infiltración leucocitaria ni ejerció un efecto positivo en los parámetros macroscópicos evaluados. Esto indicaría que este probiótico, aunque en menor medida, también es capaz de producir efectos beneficiosos en este modelo de inflamación intestinal, como consecuencia de la reducción en la actividad celular de neutrófilos.

El descenso de la infiltración de neutrófilos evidenciada para la mayoría de los probióticos, se acompañó generalmente por una disminución significativa en la producción colónica de TNF $\alpha$ . Esta citoquina, entre otras acciones, se comporta como un potente agente quimiotáctico, contribuyendo así al reclutamiento de neutrófilos en la mucosa intestinal (Stallmach *et al.*, 2004). Se trata de un mediador de carácter proinflamatorio sintetizado y liberado por distintos tipos celulares presentes en la mucosa intestinal inflamada, principalmente macrófagos, aunque también linfocitos T, linfocitos NK y mastocitos (Woywodt *et al.*, 1999). Son numerosos los estudios que establecen el importante papel que desempeña en la inflamación intestinal (Rutgeerts *et al.*, 2004), ya que estimula e induce la producción de otros mediadores inflamatorios como ROS, IL-6, IL-1, NO, al mismo tiempo que promueve el reclutamiento y la activación de leucocitos, ampliando así la respuesta inflamatoria (Neurath *et al.*, 1997). Este papel crucial atribuido a esta citoquina ha quedado claramente demostrado por la eficacia del tratamiento con anticuerpos frente a TNF $\alpha$ , como el infliximab y el adalimumab utilizados en la EII en humanos (van Dullemen *et al.*, 1995; Chey 2001). Análogamente, el infliximab ha demostrado su efecto beneficioso en el modelo de colitis experimental por TNBS (Triantafyllidis *et al.*, 2005), lo que sustenta la utilización de este modelo en la evaluación de terapias potencialmente aplicables en la inflamación intestinal en humanos.

La capacidad de algunos de estos probióticos para inhibir la producción de esta citoquina en situaciones de inflamación intestinal inducida por TNBS, también ha sido descrita previamente (Peran *et al.*, 2005; Peran *et al.*, 2006; Peran *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran la capacidad de *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *B. longum* y *E. coli* de reducir la producción colónica de TNF $\alpha$ , pudiéndose relacionar este descenso con la disminución de la actividad MPO observada en todos los grupos tratados con estos probióticos.

Otro mediador al que se le ha atribuido un papel clave en la patogénesis de la EII es la IL-1 $\beta$ , habiéndose comprobado que sus concentraciones se encuentran claramente incrementadas en el intestino de enfermos tanto con EC, como con CU (Mahida *et al.*, 1989), así como la disminución de su antagonista fisiológico, el IL-1ra (Ishizuka *et al.*, 2001). De hecho, algunos autores han propuesto a esta citoquina como un marcador del proceso inflamatorio intestinal (Rachmilewitz *et al.*, 1989), debido a que induce la producción de otros mediadores que amplifican la respuesta inflamatoria (Fiocchi 1992). Se trata de una citoquina producida principalmente por las células mononucleares activadas (Youngman *et al.*, 1993), y su principal función, al igual que el TNF $\alpha$ , es ser mediadora de la respuesta inflamatoria del huésped en la inmunidad innata, actuando sobre las células endoteliales y aumentando la expresión de moléculas de superficie que propician la adhesión leucocitaria y su posterior migración a la mucosa intestinal inflamada. El tratamiento de los animales colíticos con *L. reuteri* y *B. bifidum* originó una disminución significativa en la producción colónica de esta citoquina, lo que podría contribuir a su acción antiinflamatoria intestinal. De hecho, una reducción en la producción de esta citoquina se ha asociado con la mejora en el daño intestinal tras la administración de ambos probióticos. Por otra parte, también ha sido ampliamente demostrado que la síntesis de IL-1 $\beta$  a través de los macrófagos es inducida por otras citoquinas como el TNF $\alpha$ . Esto justificaría el paralelo descenso

observado en la producción de ambas citoquinas en el grupo de animales tratado con *L. reuteri*. Sin embargo, *B. bifidum* no modificó los niveles de TNF $\alpha$ , y sí los de IL-1 $\beta$ , lo que nos lleva a pensar que este probiótico podrían actuar sobre otros tipos celulares productores de IL-1 $\beta$ , como pueden ser neutrófilos, células epiteliales o células endoteliales.

Al analizar los datos obtenidos en estas experiencias, podemos concluir que todos los probióticos ensayados manifiestan actividad antiinflamatoria intestinal, existiendo diferencias en cuanto a su eficacia como a su perfil de actuación, lo que confirma la variabilidad de su acción. De todos los probióticos estudiados, *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *B. bifidum* y *E. coli* mostraron un efecto antiinflamatorio que se puso de manifiesto desde el punto de vista tanto macroscópico como histológico, así como mediante la modulación de distintos mediadores involucrados en esta patología inflamatoria. La administración de *B. longum*, a diferencia de los anteriores tratamientos, aunque no reveló una mejora de la inflamación intestinal histológicamente, sí que la evidenció bioquímicamente a través de la reducción de la actividad MPO y de la producción de TNF $\alpha$  (Tabla 17). Todos estos resultados nos sugieren que uno de los principales mecanismos involucrados en el efecto antiinflamatorio intestinal consiste en la inhibición de citoquinas proinflamatorias. Sin embargo, éste no es el único mecanismo implicado ya que probióticos como *B. longum* que disminuyen la producción de TNF $\alpha$  no presentan efecto antiinflamatorio y otros como *L. salivarius* que es el que más inhibe la producción de TNF $\alpha$  no modifica los niveles de IL-1 $\beta$ . Por lo tanto, considerando que se trata de una patología multifactorial, la mezcla probiótica, compuesta por probióticos que actúan a través de diferentes mecanismos, sería la elección terapéutica más interesante.

**Tabla 17.** Resumen de los resultados obtenidos con los distintos probióticos en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas.

Probiótico	IDM	Long. daño	Peso/Long.	Daño microscópico	MPO	LTB <sub>4</sub>	TNF $\alpha$	IL-1 $\beta$
<i>L. salivarius</i>	✓	✓✓	✓✓	✓	✓		✓✓	
<i>L. fermentum</i>	✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓✓		✓	
<i>L. reuteri</i>	✓	✓✓	✓✓	✓	✓		✓	✓
<i>B. longum</i>					✓		✓	
<i>B. bifidum</i>	✓	✓✓	✓✓	✓✓	✓			✓
<i>E. coli</i>	✓	✓✓		✓	✓✓		✓	

✓p<0,05, ✓✓p<0,01 vs grupo control

Una vez que comprobamos que todos los probióticos seleccionados en el presente estudio presentaron algún tipo de efecto beneficioso en el modelo de inflamación intestinal inducido por TNBS en rata, quisimos comprobar si este efecto se restringía a situaciones de alteración local de la respuesta inmune en el intestino o si también se pondría de manifiesto cuando existe una respuesta inmune alterada de tipo sistémico. Para ello, los mismos probióticos se ensayaron en el modelo de shock séptico inducido con LPS en ratones.

## **2. EFECTO DE LOS DISTINTOS PROBIÓTICOS EN EL MODELO DE SHOCK SÉPTICO INDUCIDO POR LPS EN RATONES**

El shock séptico se caracteriza por una respuesta inflamatoria sistémica exagerada, generalmente causada por una infección bacteriana. Los mecanismos por los que se origina no se conocen con exactitud, aunque sí está comprobado que se produce un aumento en la generación de mediadores inflamatorios, entre los que se encuentran citoquinas, quimiocinas, moléculas de adhesión y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, generados tras la activación de células que intervienen en la respuesta inmunitaria, como macrófagos o células polimorfonucleares, y que juegan un papel importante en el desarrollo de esta patología (Liu y Malik, 2006).

Esta respuesta inflamatoria sistémica se caracteriza, en líneas generales, por hipotensión, fiebre, coagulación y el denominado síndrome de disfunción orgánica múltiple (Parrillo 1993), que se asocia con el fallo en la función de numerosos órganos debido a una marcada reducción de la perfusión tisular, y que si se prolonga en el tiempo puede ocasionar la muerte. Estudios recientes han revelado que la incidencia del shock séptico está aumentando (Yende y Angus, 2007), y que la mortalidad sigue siendo muy elevada (superior al 70%), debido a la baja efectividad de los tratamientos farmacológicos (Patel *et al.*, 2003). Por esta razón, se están estudiando nuevas terapias que modifiquen la respuesta inmune alterada y eviten el desarrollo de la enfermedad. Por ello, podría resultar interesante el uso de probióticos, bien incluidos en la dieta como un hábito de vida saludable, o bien como tratamiento preventivo ante diferentes situaciones de riesgo.

En este sentido, y a pesar de las avanzadas técnicas quirúrgicas y las buenas condiciones higiénicas, los elevados casos de infecciones postoperatorias

constituyen uno de los mayores problemas tras una operación (Nimura *et al.*, 1991; Nagino *et al.*, 2001), y si no se tratan debidamente estas infecciones pueden desencadenar en un shock séptico. Existen varios estudios en los que se sugiere que la suplementación de la dieta con probióticos y prebióticos previene la translocación bacteriana (Gill *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2004). Más concretamente, un estudio realizado por Kanazawa *et al.*, (2005), mostró que la administración de simbióticos en pacientes sometidos a una resección hepatoiliar disminuyó la infección postoperatoria, principalmente debido a la corrección en el desequilibrio de la flora intestinal. Posteriormente, se realizó otro ensayo en el que los pacientes fueron tratados con simbióticos antes y después de la intervención quirúrgica, pudiéndose comprobar que el efecto de éstos era mayor en este grupo de pacientes, en relación a otro grupo que sólo recibió el tratamiento durante los días posteriores a la operación (Sugawara *et al.*, 2006).

Aunque son escasos los trabajos en los que los probióticos muestran una modulación de la respuesta inmune sistémica en animales de experimentación, en un estudio realizado en ratas a las que se les indujo el shock séptico mediante LPS y se les administró *L. rhamnosus* GG, se pudo observar que el probiótico disminuyó los niveles de varios marcadores proinflamatorios en intestino y en plasma, así como en hígado y pulmón (Zhang *et al.*, 2006).

Los probióticos juegan un papel importante a nivel de la respuesta inmunitaria intestinal, pero también pueden originar un efecto sistémico independiente de la interacción con la mucosa intestinal. En este sentido, resulta interesante mencionar un estudio en el que se administró por vía subcutánea *L. salivarius* a ratones deficientes en IL-10 (*knock out*) y se observó una disminución de la colitis, similar a la observada en el grupo de animales al que se le administró el probiótico por vía oral (Sheil *et al.*, 2004). También, el grupo liderado por Shanahan describió la

capacidad de una cepa de *L. salivarius* de modular la respuesta inmúnológica alterada en un modelo experiemetal de artritis reumatoide (Sheil *et al.*, 2004), sugiriendo el efecto inmunomodulador del probiotico. Asimismo, otros estudios llevados a cabos en modelos experimentales de artritis reumatoide también han mostrado los efectos sistémicos que pueden ejercer las bacterias probióticas (Baharav *et al.*, 2004; Sheil *et al.*, 2004).

Sin embargo, los probióticos no sólo ejercen propiedades antiinflamatorias en distintas patologías (por ejemplo en la EII), sino que en individuos sanos pueden actuar potenciando la respuesta inmunitaria. De esta forma, Sheih *et al.*, (2001), estudiaron el efecto que producían las bacterias ácido lácticas en voluntarios sanos, observando un incremento en la capacidad fagocítica de los leucocitos polimorfonucleares y en la actividad antitumoral de los linfocitos NK en la sangre. De forma similar, este aumento en la actividad de las células NK también se puso de manifiesto en otro grupo de personas sanas a las que se les administró leche fermentada con lactobacilos (Nagao *et al.*, 2000). A esto hay que añadir que los lactobacilos inducen la producción de IL-12 en los macrófagos; a su vez esta citoquina estimula a las células T para que secreten IFN- $\gamma$  (Shida *et al.*, 1998; Takagi *et al.*, 2001), y tanto IL-12 como IFN- $\gamma$  aumentan la actividad de los linfocitos NK (Nagao *et al.*, 2000). Por lo tanto, teniendo en cuenta todos estos resultados, los efectos beneficiosos detectados a nivel sistémico tras la administración oral de probióticos podrían justificarse en función de sus propiedades inmunomoduladoras.

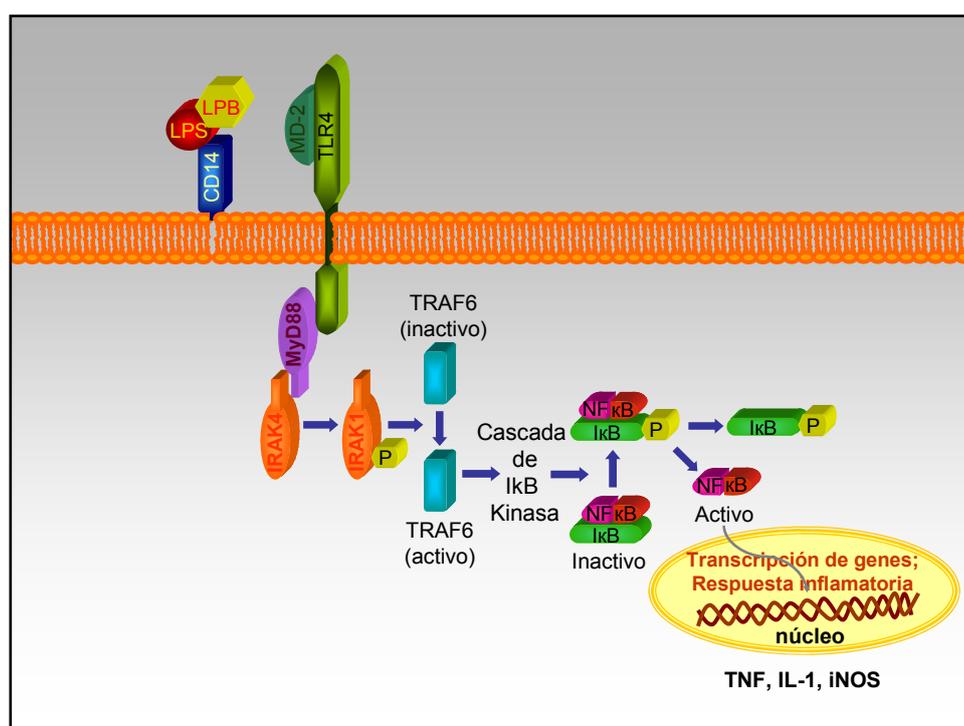
Considerando todo lo anterior, es evidente el interés que tiene la evaluación de los probióticos en el modelo experimental de shock séptico inducido en ratones mediante lipopolisacárido (LPS). Es conocido que esta endotoxina es la causa principal de shock séptico inducido por bacterias Gram negativas (Brandtzaeg 1996; Shenep 1997; Mayeux 1997) y además, a esto hay que añadir que este modelo

experimental de respuesta inmune alterada es fácilmente reproducible con bajas dosis de LPS.

El LPS consiste en un fosfolípido anclado a la membrana bacteriana (lípidio A) unido covalentemente a un heteropolisacárido hidrofílico (Raetz 1990), que le confiere actividad biológica a la molécula (Mayeux 1997). El heteropolisacárido comprende dos regiones: la cadena *O-específica* también llamada *antígeno O*, formada por unidades repetidas de oligosacáridos, y el núcleo o *core*. Éste, a su vez, se divide en *core externo* (formado por hexosas) mediante el cual se une al *antígeno O*, y en *core interno* (formado por heptosas). El lípidio A representa el componente biológicamente activo del LPS y se une al *core interno* mediante un residuo llamado KDO (ácido 2-keto-3-deoxioctanoico).

Esta endotoxina induce la activación de células inmunocompetentes gracias a su interacción con los receptores de membrana TLR4. Estos receptores son proteínas transmembrana que presentan una alta homología en la región citoplasmática con los receptores de la IL-1 (IL-1R) ya que ambos presentan unos dominios conservados denominados TIR (*Toll/IL-1R homology*). Para que se produzca el reconocimiento del LPS, y la posterior señalización intracelular por parte del receptor TLR4, es necesario que el lipopolisacárido se encuentre unido a una proteína sérica denominada LBP (*LPS-binding protein*) (Viriyakosol y Kirkland, 1995). Esta proteína circula por el torrente sanguíneo, donde reconoce y forma un complejo de alta afinidad con el LPS; por tanto, su función consiste en facilitar la unión de la endotoxina con el CD14, glicoproteína que puede encontrarse de forma soluble en el suero (fundamentalmente liberada por los monocitos), o asociada a la membrana de algunos grupos celulares como macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. El CD14 facilita la transferencia del LPS con un complejo proteico que incluye al TLR4 y una proteína accesoria denominada MD-2.

Posteriormente tiene lugar la activación de varias vías de señalización intracelular que activan al factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB), mediante la fosforilación de su inhibidor IκB (Didonato *et al.*, 1997; Zandi *et al.*, 1997). Esto permite la translocación de NF-κB al núcleo, donde regula la expresión de numerosos genes implicados en el proceso inflamatorio (Müller *et al.*, 1993) (Figura 26).



**Figura 26.** Vía de señalización del receptor del LPS.

Se ha propuesto que el efecto beneficioso que las bacterias comensales pueden ejercer en un individuo se debe a mecanismos que disminuyen o alteran la expresión de citoquinas inflamatorias, a través del bloqueo de la activación de NF-

$\kappa$ B. Por ejemplo, se ha planteado que ciertas bacterias comensales podrían activar a otras moléculas nucleares como pueden ser los receptores activadores de la proliferación de peroxisomas (PPAR, *peroxisome proliferator-activated receptors*), y bloquear así la acción del NF- $\kappa$ B (Kelly *et al.*, 2004). Otro mecanismo propuesto, aunque en este caso la controversia existente es elevada, es el papel de los receptores NOD/CARD, que podrían también actuar modulando la activación de NF- $\kappa$ B, y por tanto la respuesta inmunitaria frente a bacterias específicas (Comalada y Peppelenbosch, 2006).

Es bien conocido que la administración de LPS a ratones produce una activación exacerbada del sistema inmunitario, principalmente iniciado por las células de la inmunidad innata que expresan receptores TLR4, lo que conlleva un aumento de numerosos mediadores inflamatorios. Entre estos marcadores se encuentran citoquinas proinflamatorias como el TNF $\alpha$ . Así, y en consonancia con el importante papel que desempeña el TNF $\alpha$  en patologías de tipo inmunoinflamatorio (Ardizzone y Porro, 2002), existen varios estudios que confirman el aumento de esta citoquina en el shock séptico (Annane *et al.*, 2005). Igualmente, es evidente que al tratarse de una respuesta inflamatoria generalizada y exagerada, los linfocitos T, pertenecientes a la inmunidad adaptativa, también van a estar involucrados en esta patología. En este sentido, estudios previos han mostrado un aumento en los niveles plasmáticos de varias citoquinas implicadas en la respuesta tanto de tipo Th1 (Kim *et al.*, 2003) y Th2 (Bozza *et al.*, 2007), como Treg (Marchant *et al.*, 1994).

A todo esto hay que añadir la capacidad del LPS de activar las vías de la coagulación (Pixley *et al.*, 1993), la fibrinólisis (Suffredini *et al.*, 1989) y el complemento (De Boer *et al.*, 1993), junto con la inducción en la producción de radicales libres, incluyendo especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Liu *et al.*,

1993; Mayer 1998). En consecuencia, el conjunto de todos los procesos inducidos por esta molécula conlleva significativas alteraciones celulares, con evidentes manifestaciones patológicas sistémicas. Además, existe una gran interrelación entre las distintas moléculas y mediadores involucrados, de manera que muchas de ellas actúan de forma sinérgica e inducen la producción de otras, potenciado así la cascada de eventos que tiene lugar en el shock séptico, y aumentando la magnitud de los efectos del LPS.

En nuestro estudio, el efecto beneficioso manifestado por los distintos probióticos en este modelo de shock séptico se evidenció por una mejora del estado general de los animales y de su actividad motora en comparación con los animales del grupo control sin tratamiento; no obstante, los animales tratados con los probióticos presentaban signos evidentes de enfermedad cuando se comparaban con los animales del grupo sano. Es interesante destacar que todos los animales de los grupos tratados con probióticos sobrevivieron a las 24 horas de la administración del LPS. En consecuencia, el tratamiento de los animales con las diferentes bacterias durante las dos semanas previas a la inducción del shock séptico no presenta efecto tóxico alguno que pueda potenciar la letalidad del LPS. Esto adquiere una especial relevancia en función de los datos recientemente publicados en *The Lancet* que muestran que la suplementación de una combinación de distintos probióticos a pacientes con pancreatitis aguda puede ser perjudicial, puesto que incluso incrementaría la mortalidad (Besselink *et al.*, 2008). Sin embargo, un reciente comentario realizado por la Asociación Científica Internacional sobre Probióticos y Prebióticos y publicado en la misma revista, establece que el término de probiótico implica que el producto ha sido ensayado de forma adecuada para comprobar su seguridad, además de conferir un efecto beneficioso al hospedador que lo ingiere, y es precisamente la cuestión de seguridad en humanos la que no se ha comprobado, en función de los datos publicados en la literatura

científica, con la mezcla probiótica utilizada en el ensayo clínico con pacientes críticos con pancreatitis (Reid *et al.*, 2008).

Tras el sacrificio de los animales, se corroboró el efecto preventivo ejercido por los distintos probióticos en este modelo de shock séptico. Así, al hacer la valoración macroscópica de los distintos órganos afectados tras la administración de LPS, se pudo comprobar que algunos de los probióticos fueron capaces de revertir, al menos parcialmente, estas modificaciones. En este sentido, tanto *L. salivarius* como *L. fermentum* disminuyeron significativamente el incremento de peso del segmento colónico. Por otro lado, el incremento de peso del bazo que se observó en los animales del grupo control se vio reducido de forma significativa en la mayoría de los grupos tratados con los probióticos, no mostrando ninguno de ellos diferencias con el grupo de animales sanos. En el caso de los pulmones, con la excepción de *L. salivarius* y *L. reuteri*, los probióticos fueron capaces de reducir significativamente el incremento de peso generado tras la administración del LPS en estos órganos. Estos resultados nos indican que, aunque de forma general todos los probióticos presentan un efecto beneficioso, no todos van a actuar de la misma forma. Estas diferencias de actuación se ponen igualmente de manifiesto al evaluar los distintos parámetros bioquímicos estudiados en el presente trabajo.

Tal y como se comentó anteriormente, el TNF $\alpha$  constituye una citoquina clave en el proceso inflamatorio sistémico desarrollado en la sepsis experimental. Así, en el presente estudio pudimos comprobar que el efecto beneficioso ejercido por los distintos probióticos en este modelo se asoció con una disminución en los niveles de TNF $\alpha$  en plasma. Además, *L. salivarius*, *L. fermentum*, *B. bifidum* y *E. coli* Nissle 1917 también los redujeron en pulmón.

Es evidente que la disminución en los niveles de TNF $\alpha$  observada tras la administración de los distintos probióticos puede contribuir de forma determinante en la mejora de otros parámetros bioquímicos estudiados en este modelo de sepsis. Así, y dado que el TNF $\alpha$  promueve la activación y migración de neutrófilos en distintos órganos como el pulmón (Ito *et al.*, 2006), su disminución justificaría la menor actividad MPO en los grupos tratados con *L. fermentum* y *E.coli* Nissle 1917. Sin embargo, esto no sería válido para todos los probióticos estudiados, de forma que el tratamiento con *B. longum*, aunque no disminuyó los niveles de TNF $\alpha$ , sí que descendió la actividad MPO, lo que nos llevaría a pensar que podrían estar implicados otros mecanismos no evaluados en este trabajo. En cualquier caso, la disminución de la actividad MPO nos sugiere que el tratamiento con estos probióticos previene los daños causados por la infiltración de neutrófilos en el pulmón, y que se traduce en la mejoría macroscópica que se puede observar en este órgano en estos grupos de animales. Un aspecto interesante lo constituye el hecho que la actividad MPO colónica incrementada como consecuencia de la inducción del shock séptico, sólo es significativamente reducida en el grupo de ratones tratados con *E. coli* Nissle 1917. Esto contrasta con el claro efecto inhibitor de esta actividad enzimática observada en el intestino grueso de los animales con colitis experimental inducida con TNBS y tratados con los diferentes probióticos ensayados, sugiriendo que, aunque los procesos involucrados en la patogenia de ambos modelos experimentales tienen muchos aspectos comunes, se trata de entidades diferentes, lo que condiciona el distinto comportamiento por parte de cada probiótico en cuestión, al actuar probablemente por diferentes mecanismos en cada situación. Esto es un hecho constatable cuando se compara la terapia con anticuerpos anti-TNF $\alpha$  en distintos tipos de enfermedades inflamatorias; mientras que en la enfermedad inflamatoria intestinal y en la artritis reumatoide son considerados como tratamientos altamente eficaces (Behm y Bickston, 2008; Wong *et al.*, 2008), en el caso del shock séptico el tratamiento en pacientes críticos con

estos anticuerpos no consigue reducir de forma significativa la mortalidad, aunque el efecto beneficioso es claro en cuanto a la reducción del proceso inflamatorio (Dinarello 2001).

Como se ha indicado anteriormente, la menor actividad MPO tisular manifestada por algunos de los probióticos muestra un menor grado de infiltración de neutrófilos y, en consecuencia, una reducción de su actividad celular. Esto se traduciría en una mejora de la situación de estrés oxidativo que se asocia con el shock séptico, ya que se ha propuesto que la generación de radicales libres en un tejido inflamado origina un círculo vicioso que promueve la infiltración de neutrófilos que producen más radicales libres que participan de manera activa en la perpetuación de la respuesta inflamatoria (Cuzzocrea *et al.*, 2000; Wu *et al.*, 2008). La mejora en la situación de estrés oxidativo ejercida por los probióticos parece ser fundamental en este modelo, ya que el aumento de especies reactivas de oxígeno es determinante en la disfunción multiorgánica que acontece en la sepsis (Sener *et al.*, 2005). En nuestro estudio, la mayor producción y liberación de especies reactivas inducidas tras la administración del LPS se evidenció por un descenso significativo de los niveles de glutatión hepático en el grupo control en comparación con el grupo sano. El efecto beneficioso ejercido por *L. salivarius*, *L. fermentum* y *E. coli* Nissle 1917 se mostró tras un aumento en los valores de este péptido antioxidante. No obstante, además del efecto que los probióticos pueden ejercer sobre la producción de mediadores con propiedades quimiotácticas, otros mecanismos pueden estar relacionados. Así, se ha descrito la capacidad de *L. fermentum* de secretar el péptido antioxidante glutatión y su precursor  $\gamma$ -Glu-Cys, lo que tendría un efecto positivo preservando la depleción de glutatión que se origina en situaciones de estrés oxidativo, reduciendo así el efecto lesivo que se origina tras la producción de radicales libres, tal y como se ha demostrado previamente para este probiótico en el modelo de colitis experimental por TNBS (Peran *et al.*,

2006). Análogamente, otros compuestos con propiedades antioxidantes, entre los que se incluyen baicaleína y silimarina, han mostrado un claro efecto beneficioso en modelos experimentales de shock séptico en ratas (Cheng *et al.*, 2007; Toklu *et al.*, 2008).

El óxido nítrico (NO) también juega un importante papel en el shock séptico. Algunos efectos citotóxicos producidos por este mediador están relacionados con la producción del anión peroxinitrito ( $\text{OONO}^-$ ), compuesto altamente reactivo que proviene de la rápida reacción del NO con el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), y que contribuye de forma determinante en el drástico incremento del estado de estrés oxidativo (Cuzzocrea *et al.*, 2006). La excesiva producción de NO en la sepsis se puede atribuir a la inducción de la NO sintasa inducible (iNOS) (Cuzzocrea *et al.*, 2006). En consonancia con esto, en el presente estudio se confirmó el incremento en la expresión colónica de iNOS en el grupo de animales control en relación al grupo sano. Esta enzima es expresada por numerosos tipos celulares como macrófagos, neutrófilos, células endoteliales y células del músculo liso vascular en respuesta a muchos agentes inflamatorios, como LPS o  $\text{TNF}\alpha$  (Cuzzocrea *et al.*, 2006). En consecuencia, el descenso observado en la expresión colónica de iNOS por la mayoría de los probióticos ensayados, con la excepción de *L. reuteri* y *B. longum*, podría contribuir a su efecto preventivo en este modelo de shock séptico.

Es interesante destacar que los probióticos que inhiben la producción del  $\text{TNF}\alpha$  en tejidos como el pulmón son los que presentan esta capacidad inhibidora de la expresión de iNOS tisular. Este hecho podría ser explicado por la capacidad de los probióticos de interferir sobre la actividad de los macrófagos residentes en las mucosas, ya que estas células son la principal fuente de producción de  $\text{TNF}\alpha$  o de NO, a través del incremento de la expresión de la iNOS. En este sentido, se ha demostrado la capacidad de *L. salivarius ssp. salivarius* y de *L. fermentum* de inhibir

citocinas proinflamatorias como el TNF, IL-12 e IL-1 $\beta$  en macrófagos derivados de la médula ósea de ratón en respuesta al LPS (Peran *et al.*, 2005; Diaz Roperro *et al.*, 2007).

Sin embargo, a parte de la activación de la inmunidad innata en los tejidos, el shock séptico se caracteriza por una respuesta de tipo sistémico asociada con la activación descontrolada de la cascada inflamatoria, por lo que los linfocitos T desempeñan un importante papel en todos estos procesos. De este modo, su activación se traduce en una excesiva producción de citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-2, IL-4 e IL-5, y antiinflamatorias como IL-10 (Hotchkiss y Karl, 2003), tal y como se ha puesto igualmente de manifiesto en el presente estudio. De esta forma, la alteración de la respuesta inmune en ratones a los que se les inyectó LPS resultó evidente tras el incremento en la producción de IL-2 en esplenocitos estimulados con Con A. Esta interleuquina está implicada en una respuesta de tipo Th1, y sus valores se vieron disminuidos en todos los grupos tratados con los distintos probióticos, excepto con *B. bifidum*. Otros ensayos realizados en ratones también han puesto de manifiesto un aumento en los niveles de citoquinas de tipo Th2 en el modelo del shock séptico inducido por LPS (Hsu *et al.*, 2006). Del mismo modo, nuestros resultados mostraron en los animales del grupo control un incremento en la producción de IL-5 en esplenocitos estimulados con Con A. En este caso, todos los probióticos, salvo *L. reuteri*, redujeron los valores de esta citoquina. En consecuencia, la inhibición ejercida por la mayoría de los probióticos en la producción de ambos tipos de interleuquinas reflejaría una atenuación en la explosiva respuesta inmune desencadenada tras la administración del LPS, lo que podría claramente justificar los efectos beneficiosos observados en este modelo experimental. En concordancia con estos resultados, otros autores describen los efectos beneficiosos obtenidos tras la administración oral de *L. casei* en modelos experimentales de artritis reumatoide en ratas, y que se asociaron con un efecto

inmunomodulador por parte del probiótico caracterizado por el aumento en la producción de citoquinas antiinflamatorias (IL-10 y TGF- $\beta$ ) junto con un descenso de las de tipo proinflamatorio (IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-12, IL-17, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ). Análogamente, y junto con la supresión de la proliferación de linfocitos T, se comprobó la reducción de los niveles de IgG del tipo Th1: IgG2a e IgG2b, y por tanto la inhibición de la activación de la respuesta humoral (So *et al.*, 2008a; So *et al.*, 2008b).

En nuestro estudio, se apreció un aumento en la producción de IgG tanto en los esplenocitos de los ratones control estimulados con LPS, como en el plasma de dichos ratones. En este caso, el pretratamiento con *L. reuteri*, *B. bifidum* y *E. coli* redujo los valores de esta inmunoglobulina en los esplenocitos estimulados con LPS. Además, estos probióticos junto con *L. salivarius* y *L. fermentum* también disminuyeron sus niveles en plasma. Por lo tanto, esto nos hace pensar que los efectos inmunomoduladores de los probióticos no se restringen a una actuación sobre la respuesta inmune mediada por células T, sino que también van a afectar a la respuesta inmune de tipo humoral. No obstante, estos efectos son variables ya que cuando *L. salivarius* y *L. fermentum* son administrados oralmente a ratones Balb/c sanos, se observa que el efecto sobre la producción de inmunoglobulinas (IgA, IgG o IgE) es diferente dependiendo de la inmunoglobulina considerada así como del probiótico en cuestión (Diaz-Roperó *et al.*, 2007). Estos resultados son similares a los descritos para otros dos probióticos (*L. gasseri* y *L. coryniformis*) cuando se administraron a voluntarios sanos (Olivares *et al.*, 2006).

Sin embargo, puesto que la mucosa del tracto gastrointestinal es la principal puerta de entrada de antígenos al cuerpo humano, no es de extrañar que a este nivel se acumule la mayor proporción de células inmunitarias. En base a esto, uno de los mecanismos que parece desempeñar un papel clave es la interacción de los

probióticos con la población de linfocitos T reguladores (Treg) presentes en las mucosas. Estos linfocitos producen IL-10, citoquina antiinflamatoria que participa en el fenómeno de tolerancia oral. Éste se define como un estado de no respuesta inmunitaria a ciertos antígenos y puede ser inducida por una supresión activa mediada por células T CD4+ o CD8+ mediante la secreción de citoquinas supresoras como la IL-10 (Chen *et al.*, 1995), interleuquina que a la vez que puede inhibir la respuesta inmunitaria de tipo Th1 y Th2, también modula la expresión de IgA y por tanto puede regular la generación de procesos inflamatorios en la mucosa. Por tanto, un aumento de esta población linfocitaria o bien de la producción basal de esta citoquina anti-inflamatoria a nivel sistémico podría contribuir a la inhibición de la respuesta Th1 y Th2.

Nuestros resultados demostraron que la inducción del shock séptico se asoció con un incremento en la producción de IL-10 por parte de los esplenocitos en condiciones basales, probablemente debido a que esta citoquina antiinflamatoria intenta contrarrestar la acción de citoquinas proinflamatorias que se han generado de forma masiva tras la administración del LPS (Haveman *et al.*, 1999). De hecho, algunos estudios experimentales han revelado que la producción de IL-10 está mediada por citoquinas proinflamatorias como TNF $\alpha$  e IL-6 (Oberholzer *et al.*, 2002). Sin embargo, cuando se evaluó la producción de IL-10 en esplenocitos estimulados con Con A se observó una reducción significativa en los animales del grupo control en comparación con los del grupo sano, lo que nos sugiere que en estos animales los procesos de control fisiológicos de activación se verían comprometidos, no siendo capaces de controlar la intensa respuesta inmunitaria Th1 y/o Th2 desarrollada tras la administración del LPS.

Cuando se estudió la producción de IL-10 por los esplenocitos obtenidos de los ratones sometidos al tratamiento con los distintos probióticos, la respuesta

obtenida fue muy diversa dependiendo del probiótico considerado. En este sentido, los resultados más interesantes se obtuvieron con el tratamiento de *E.coli* Nissle 1917. En condiciones basales, los esplenocitos de los ratones tratados con este probiótico mostraron un incremento de IL-10 respecto a los ratones del grupo control. Además, *E. coli* Nissle 1917, también incrementó la producción de IL-10 en esplenocitos estimulados con Con A en este grupo de animales. Estos resultados nos sugirieron que este probiótico favorece la producción de IL-10 de forma basal y que el efecto observado a nivel sistémico podría ser un reflejo de un aumento de la tolerancia oral producida en la mucosa.

Sin embargo, los tratamientos con *L. salivarius*, *L. fermentum*, y *B. longum*, aunque fueron capaces de incrementar la producción de IL-10 en los esplenocitos estimulados con Con A en comparación con el grupo control, no llegaron a mostrar diferencias significativas con respecto a los obtenidos con el grupo sano. Además, en condiciones basales, tampoco modificaron los niveles de IL-10 observados por la administración del LPS.

Otros probióticos como *L. reuteri* y *B. bifidum*, disminuyeron los niveles de esta citoquina en relación al grupo control, y la estimulación de los esplenocitos con Con A originó una menor producción de IL-10 en comparación con el grupo sano, sin mostrar diferencias significativas con respecto al grupo control, lo que nos sugirió que sus acciones no estarían directamente relacionadas con una actuación sobre los linfocitos Treg, sino que podría interaccionar con otras poblaciones linfocitarias. Estudios previos han demostrado igualmente la capacidad de otros probióticos de interaccionar con los distintos linfocitos, poniendo de manifiesto las diferencias de comportamiento existente entre los diferentes probióticos analizados. En este sentido, Takeda *et al.*, (2006), observaron que la administración a sujetos sanos de *L. casei* Shirota originó un marcado incremento de la actividad de linfocitos

“natural killer” (NK). Análogamente, los estudios *in vitro* realizados con este probiótico han demostrado que este efecto puede estar relacionado con su capacidad de inducir la producción de IL-12 en los monocitos (Shida *et al.*, 2006).

El efecto que los probióticos pueden ejercer sobre los linfocitos T<sub>r</sub> también se ha puesto de manifiesto en diferentes estudios *in vitro*. De esta forma, se ha podido comprobar que la estimulación de células T por parte de las células presentadoras de antígeno en presencia de *L. paracasei* origina una disminución en la producción de citoquinas Th1 y Th2, mantiene los niveles de IL-10 y aumenta los de TGF- $\beta$  (von der Weid *et al.*, 2001). Otros autores, como Smits *et al.*, (2005), demostraron que algunas especies de lactobacilos, entre las que se incluyen *L. casei* y *L. reuteri*, y a diferencia de lo que ocurre con otras especies como *L. plantarum* y *E. coli* no patogénico, son capaces de inducir la producción de IL-10 cuando se cultivan con células dendríticas humanas derivadas de monocitos, lo que puede justificar los efectos supresores de la actividad de células T CD4<sup>+</sup> periféricas. Esta capacidad de modular la respuesta inmune por parte de los probióticos ha sido también descrita por Braat *et al.*, (2004). Finalmente, otro estudio demostró que las bacterias que componen la mezcla de probióticos VSL#3 promueven la producción de IL-10, al mismo tiempo que disminuyen la de IL-12, inducida por el LPS en células dendríticas procedentes de la lámina propia intestinal o de la circulación periférica, mostrando una mayor efectividad las bacterias pertenecientes al género *Bifidobacterium* (Hart *et al.*, 2004). Sin embargo, estos resultados contrastan con los publicados por Mohamadzadeh *et al.*, (2005), quienes observaron que *L. gasseri*, *L. johnsonii* y *L. reuteri* eran capaces de inducir la secreción de IL-12, pero no la de IL-10, originando de esta forma la polarización de la respuesta inmune hacia la activación Th1. Es interesante destacar las acciones contrapuestas descritas para *L. reuteri*, lo que apunta a lo complicado que resulta establecer el mecanismo involucrado en el efecto manifestado por los probióticos.

En consecuencia, otros mecanismos adicionales pueden desempeñar una función clave en la secreción por parte de los probióticos de determinados mediadores. Se ha descrito la capacidad de diferentes probióticos de generar compuestos con propiedades antimicrobianas del tipo de las bacteriocinas (del Miraglia y De Luca 2004). Pero además de esos compuestos, otros pueden ser sintetizados y secretados al lumen intestinal y posteriormente ser distribuidos a través de la circulación sistémica. En este sentido, experimentos *ex vivo* llevados a cabo con el probiótico *E. coli* Nissle 1917, han permitido comprobar como el medio en el que se ha incubado el microorganismo es capaz de ejercer un efecto variable sobre las células T dependiendo de su origen: circulantes o de localización tisular (Sturm *et al.*, 2005). Los resultados descritos en este estudio demuestran que el medio condicionado con *E. coli* Nissle 1917 no afecta a las células T localizadas en la mucosa intestinal, permitiendo de esta forma mantener la homeostasis intestinal; por el contrario, este medio de incubación con la bacteria fue capaz de inhibir el ciclo celular y su expansión de las células T de sangre periférica, efecto que se asoció a una disminución significativa en la expresión de IL-2, TNF $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , junto con un incremento en la producción de IL-10 (Sturm *et al.*, 2005). Es interesante comentar que estos resultados son similares a los descritos en el presente estudio para algunos de los probióticos ensayados, incluido el mismo *E. coli* Nissle 1917. En concordancia con todo esto, se ha descrito que el medio condicionado obtenido tras la incubación de otros probióticos como *B. breve* y *Streptococcus thermophilus* contiene algún tipo de compuesto que disminuye la producción de TNF $\alpha$  estimulada por LPS en la línea celular monocítica THP-1, habiéndose comprobado su capacidad para atravesar una monocapa de células epiteliales intestinales, lo que le permitiría acceder a la circulación sistémica y de esta forma tener la posibilidad de ejercer su acción antiinflamatoria no sólo en el tejido intestinal (Ménard *et al.*, 2004). No obstante, existen diferentes estudios que indican que estos efectos antiinflamatorios obtenidos dependerán de la cepa analizada (Lin *et al.*, 2008).

Otro posible mecanismo de actuación de los probióticos podría encontrarse en la capacidad de distintos componentes bacterianos de influir en la respuesta inmune tras su distribución sistémica desde el tracto gastrointestinal. Un trabajo pionero en esta hipótesis fue el publicado por Rachmilewitz *et al.*, (2002), que demostró que determinados componentes bacterianos, como son los oligonucleótidos inmunoestimulantes de ADN conteniendo secuencias no metiladas de CpG que actúan como agonistas del receptor TLR9, con una actividad biológica similar a los coadyuvantes inmunológicos, eran capaces de prevenir el proceso inflamatorio intestinal en un modelo de colitis experimental. Sin embargo, otros estudios *in vitro* llevados a cabo con cepas de *L. casei* y *L. reuteri*, demostraron que sus efectos sobre los linfocitos Treg no estaban relacionados con la activación de estos receptores, a diferencia de lo que ocurría con *E. coli*, microorganismo desprovisto de efecto alguno sobre este tipo de linfocitos T, pero capaz de activar la respuesta celular asociada a los TLR. Por tanto, podría pensarse que dependiendo de la cepa bacteriana, sea comensal o patógena, expresa un conjunto de moléculas específica de ese microorganismo, cada una de las cuales es reconocida de manera más o menos selectiva por uno de los diversos TLR presentes en la superficie de las células inmunitarias, y según la combinación específica de receptores que sean activados por los antígenos bacterianos, así se producirá la respuesta. Una combinación determinada de receptores activará la vía hacia la tolerancia oral, mientras que otra combinación distinta inducida en respuesta a un patógeno será responsable de inducir o no afectar a una respuesta inflamatoria.

Así, resulta evidente que intentar justificar los mecanismos involucrados en la respuesta obtenida por los probióticos en este modelo experimental es muy complicado, dada la gran cantidad de procesos que se originan de forma simultánea en los animales tras la administración del LPS. Por ejemplo, podríamos pensar que *E. coli* Nissle 1917 favorece la tolerancia oral de las mucosas, debido al

aumento observado en la producción basal de IL-10 en esplenocitos. Además, el aumento de IL-10 en la mucosa intestinal ha sido anteriormente demostrado por otros autores (Duncker *et al.*, 2006). Sin embargo, este probiótico podría actuar mediante otros mecanismos de acción como por ejemplo a través de la producción de bacteriocinas u otras sustancias que presentan efecto inmunomodulador (Altenhoefer *et al.*, 2004), o aumentando la producción de glutatión total inhibiendo así el estrés oxidativo. Lo mismo ocurre con otras bacterias como *L. fermentum* que ha demostrado tanto en estudios *in vitro* como *in vivo* su capacidad de generar glutatión total, y aunque este mecanismo explicaría la disminución de MPO en pulmón, no explica su posible efecto directo sobre los linfocitos T.

Por lo tanto, en este trabajo lo que sí podemos afirmar es que *E. coli* Nissle 1917 es el probiótico que ha mostrado mayor efecto beneficioso en este modelo de sepsis experimental; no obstante, el resto de los probióticos también han actuado modulando varios parámetros implicados en la respuesta inflamatoria sistémica, por lo que debido a los diferentes mecanismos de acción ejercidos por cada una de estas bacterias, resultaría interesante el empleo de una mezcla compuesta por varios de estos probióticos. Sin embargo, como paso previo a estos estudios, es necesario que la evaluación de una acción determinada se deba realizar de forma individualizada para cada probiótico. Igualmente, y para poder extrapolar estos resultados en humanos, se hace necesario la realización de estudios controlados que ratifiquen las conclusiones alcanzadas en modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*. En este sentido, un estudio llevado a cabo por Kopp *et al.*, (2008), comprueba la falta de correlación existente entre los efectos observados con *L. rhamnosus* cuando se ensaya *in vitro* frente a células mononucleares procedentes de cordón umbilical o de sangre periférica de mujeres embarazadas, y los resultados obtenidos en ensayos *ex vivo* con estos dos mismos tipos celulares procedentes de mujeres embarazadas que recibieron el probiótico durante el embarazo.

Así, podemos concluir que todos los probióticos ensayados presentan efecto beneficioso, en mayor o menor medida, en ambos modelos experimentales, aunque existen diferencias en cuanto a su eficacia y a su perfil de actuación en función del modelo. Esto hace que resulte difícil dilucidar el posible mecanismo de acción de cada una de estas bacterias probióticas. Por este motivo, sería interesante el empleo de una mezcla compuesta por varios probióticos dependiendo del tipo de patología.

*Conclusiones*

---



1. Todos los probióticos estudiados manifestaron actividad antiinflamatoria intestinal en el modelo de colitis experimental inducido por TNBS en ratas, ya que disminuyen varios marcadores implicados en la respuesta inflamatoria. De ellos, *L. salivarius*, *L. fermentum*, *L. reuteri*, *B. bifidum* y *E. coli* Nissle 1917 mostraron un efecto antiinflamatorio que se puso de manifiesto desde un punto de vista macroscópico e histológico, así como mediante la modulación de distintos mediadores involucrados en esta patología inflamatoria.

2. La administración oral de los probióticos ejerció un efecto antiinflamatorio sistémico en el modelo de sepsis experimental inducida mediante LPS en ratones. Esto fue evidenciado por un descenso en los niveles de varios mediadores responsables de la evolución de la patología, entre los que se incluyen TNF $\alpha$  en plasma. No obstante, *E. coli* Nissle 1917 es el probiótico que ha mostrado mayor efecto antiinflamatorio ya que mejoró la mayoría de los parámetros analizados para evaluar el desarrollo de la enfermedad.

3. Analizando globalmente los resultados obtenidos podemos concluir que la eficacia de los probióticos va a depender del modelo experimental utilizado. Posiblemente, la mejor opción terapéutica sea la asociación de varios probióticos que complementen su perfil de actuación.



## *Bibliografía*

---



Abuharfeil N, Sarsour E, Hassuneh M. The effect of sodium nitrite on some parameters of the immune system. *Food Chem Toxicol* 2001; 39: 119-124.

Adlerberth I, Carlsson B, de Man P, Jalil F, Khan SR, Larsson P, Mellander L, Svanborg C, Wold AE, Hansson LA. Intestinal colonization of entero-bacteriaceae in Pakistani and Swedish hospital delivered children. *Acta Paediatr Scand* 1991; 80: 602-610.

Aguirre M, Collins MD. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol* 1993; 75: 95-107.

Aiba Y, Suzuki N, Kabir AM, Takagi A, Koga Y. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a gnotobiotic murine model. *Am J Gastroenterol* 1998; 93: 2097-2101.

Ajuebor MN, Zagorski J, Kunkel SL, Strieter RM, Hogaboam CM. Contrasting roles for CXCR2 during experimental colitis. *Exp Mol Pathol* 2004; 76: 1-8.

Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981; 77: 373-382.

Allgayer H, Deschryver K, Stenson WF. Treatment with 16,16'-dimethyl prostaglandin E2 before and after induction of colitis with trinitrobenzenesulfonic acid in rats decreases inflammation. *Gastroenterology* 1989; 96: 1290-1300.

Alm L. Effect of fermentation on lactose, glucose and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose-deficient individuals. *J Dairy Sci* 1982; 65: 346-352.

Altenhoefer A, Oswald S, Sonnenborn U, Enders C, Schulze J, Hacker J, Oelschlaeger TA. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2004; 40: 223-229.

Anderson AD, McNaught CE, Jain PK, MacFie J. Randomised clinical trial of synbiotic therapy in elective surgical patients. *Gut* 2004; 53(2): 241-245.

Annane D, Bellissant E, Cavaillon JM. Septic shock. *Lancet* 2005; 365 : 63-78.

Ardite E, Sans M, Panes J, Romero FJ, Pique JM, Fernandez-Checa JC. Replenishment of glutathione levels improves mucosal function in experimental colitis. *Lab Invest* 2000; 80: 735-744.

Ardizzone S, Porro GB. Inflammatory bowel disease: new insights into pathogenesis and treatment. *J Intern Med* 2002; 252(6): 475-496.

Arribas B, Rodríguez ME, Camuesco D, Zarzuelo A, Gálvez J. Aplicaciones terapéuticas de los probióticos. *Ars Pharmaceutica* 2008; 49: 5-30.

Arunachalam K, Gill HS, Chandra RK. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *bifidobacterium lactis* (HN019). *Eur J Clin Nutr* 2000; 54: 263-267.

Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med* 2002; 347(12): 911-920.

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

Barret KE. Integrate regulation of intestinal epithelial transport: intracellular pathways. *Am J Physiol* 1997; 272: C1069-C1076.

Bazzoli F, Zagari RM, Fossi S. *In vivo Helicobacter pylori* clearance failure with *Lactobacillus acidophilus*. *Gastroenterology* 1992; 102: A38.

Behm BW, Bickston SJ. Tumor necrosis factor-alpha antibody for maintenance of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 23: CD006893.

Bell CJ, Gall DG, Wallace JL. Disruption of colonic electrolyte transport in experimental colitis. *Am J Physiol* 1995; 268(4 Pt 1): G622-G630.

Besselink MG, van Santvoort HC, Buskens E, Boermeester MA, van Goor H, Timmerman HM, Nieuwenhuijs VB, Bollen TL, van Ramshorst B, Witteman BJ, *et al.* Dutch Acute Pancreatitis Study Group. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 2008; 371: 651-659.

Bibiloni R, Fedorak RN, Tannock GW, Madsen KL, Gionchetti P, Campieri M, De Simone C, Sartor RB. VSL#3 probiotic mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2005; 100: 1539-1546.

Black F, Einarsson K, Lidbeck A, Orrhage K, Nord CE. Effect of lactic acid producing bacteria on the human intestinal microflora during ampicillin treatment. *Scand J Infect Dis* 1991; 23: 247-254.

Borrueal N, Carol M, Casellas F, Antolin M, de Lara F, Espin E, Naval J, Guarner F, Malagelada JR. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* 2002; 51: 659-664.

Bousvaros A, Guandalini S, Baldassano RN, Botelho C, Evans J, Ferry GD, Goldin B, Hartigan L, Kugathasan S, Levy J, Murray KF, Oliva-Hemker M, Rosh JR, Tolia V, Zholudev A, Vanderhoof JA, Hibberd PL. A randomized, double-blind trial of *Lactobacillus* GG versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 833-839.

Bozza FA, Salluh JI, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, Bozza MT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* 2007; 11(2): R49.

Braat H, van den Brande J, van Tol E, Hommes D, Peppelenbosch M, van Deventer S. *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. *Am J Clin Nutr* 2004; 80: 1618-1625.

Brandtzaeg P. Significance and pathogenesis of septic shock. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 216: 16-37.

Brandy LJ, Gallaher DD, Busta FF. The role of probiotic cultures in the prevention of colon cancer. *J Nutr* 2000; 130 (suppl. 2S): 410S-414S.

Breese E, Braegger CP, Corrigan CJ, Walker-Smith JA, MacDonald TT. Interleukin-2- and interferon-gamma-secreting T cells in normal and diseased human intestinal mucosa.

*Immunology* 1993; 78(1): 127-131.

Cadieux R, Burton J, Gardiner G. *Lactobacillus* strains and vaginal ecology. *JAMA* 2002; 287: 1940-1941.

Campieri M, Rizzello F, Venturi A. Combination of antibiotic and probiotic treatment is efficacious in prophylaxis of postoperative recurrence of Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus* GG. *Gastroenterology* 2000; 118: A781.

Campieri M, Gionchetti P. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut* 2001; 48(1): 132-135.

Camuesco D, Peran L, Comalada M, Nieto A, Di Stasi LC, Rodriguez-Cabezas ME, Concha A, Zarzuelo A, Galvez J. Preventative effects of lactulose in the trinitrobenzenesulphonic acid model of rat colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11(3): 265-271.

Ceuppens JL, Baroja ML, Lorre K, van Damme JV, Billiau A. Human T cell activation with phytohemagglutinin. The function of IL-6 as an accessory signal. *J Immunol* 1988; 141: 3868-3874.

Chen Y, Inobe J, Weiner HL. Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4+ and CD8+ cells mediate active suppression. *J Immunol* 1995; 155: 910-916.

Cheng PY, Lee YM, Wu YS, Chang TW, Jin JS, Yen MH. Protective effect of baicalein against endotoxic shock in rats in vivo and in vitro. *Biochem Pharmacol* 2007; 73: 793-804.

Chey WY. Infliximab for patients with refractory ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2001; 7 (suppl. 1): 30S-33S.

Cohendy, M. Description du ferment lactique puissant capable de s'acclimater dans l'intestine de l'homme. *C. R. Soc. Biol.* 1906b; 60: 558.

Comalada M, Peppelenbosch MP. Impaired innate immunity in crohn's disease. *Trends Mol Med* 2006; 12: 397-399.

Cross ML, Stevenson LM, Gill HS. Anti-Allergy properties of fermented foods: an important immunoregulatory mechanism of lactic acid bacteria?. *Intern Immunopharm* 2001; 1: 891-901.

Cruz T, Galvez J, Ocete MA, Crespo ME, Sanchez de Medina L-H F, Zarzuelo A. Oral administration of rutoside can ameliorate inflammatory bowel disease in rats. *Life Sci* 1998; 62(7): 687-695.

Cummings JH. Short chain fatty acids in the human colon. *Gut* 1981; 22: 763-779.

Cuzzocrea S, McDonald MC, Mazzon E, Dugo L, Lepore V, Fonti MT, Ciccolo A, Terranova ML, Caputi AP, Thiernemann C. Tempol, a membrane-permeable radical scavenger, reduces dinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis. *Eur J Pharmacol* 2000; 406: 127-137.

Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Esposito E, Macarthur H, Matuschak GM, Salvemini D. A role for nitric oxide-mediated peroxynitrite formation in a model of endotoxin-induced shock. *J Pharmacol Exp Ther* 2006; 319: 73-81.

D'Argenio G, Mazzacca G. Short-chain fatty acid in the human colon. Relation to inflammatory bowel diseases and colon cancer. *Adv. Exp. Med. Biol* 1999; 472: 149-158.

Del Miraglia GM, De Luca MG. The role of probiotics in the clinical management of food allergy and atopic dermatitis. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38: S84-S85.

DeSimone C. The adjuvant effect of yogurt on gamma interferon by Con-A stimulated human lymphocytes. *Nutr Rep Int* 1986; 33: 419-433.

De Boer JP, Creasey AA, Chang A, Roem D, Eerenberg AJ, Hack CE, Taylor FB. Activation of the complement system in baboons challenged with live *Escherichia coli*: correlation with mortality and evidence for a biphasic activation pattern. *Infect Immun* 1993; 61: 4293-4301.

De Vrese M, Stegelmann A, Richter B, Fenselau S, Laue C, Schrezenmeir J. Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am J Clin Nutr* 2001; 73 (suppl. 2): 421S-429S.

Díaz-Ropero MP, Martín R, Sierra S, Lara-Villoslada F, Rodríguez JM, Xaus J, Olivares M. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol* 2007; 102: 337-343.

DiDonato JA, Hayakawa M, Rothwarf DM, Zandi E, Karin M. A cytokine-responsive I $\kappa$ B kinase that activates the transcription factor NF- $\kappa$ B. *Nature* 1997; 388: 548-554.

Dinarello CA. Anti-cytokine therapies in response to systemic infection. *J Investig Dermatol Symp Proc* 2001; 6: 244-250.

Diplock AT, Aggett PJ, Ashweel M, Bornet F, Fern EB, Roberfroid M. Scientific concepts of functional foods in Europe consensus documents. *Br J Nutr* 1991; 81: S1.

Duncker SC, Lorentz A, Schroeder B, Breves G, Bischoff SC. Effect of orally administered probiotic *E. coli* strain Nissle 1917 on intestinal mucosal immune cells of healthy young pigs. *Vet Immunol Immunopathol* 2006;111: 239-250.

Dunne C, Murphy L, Flynn S, O'Mahony L, O'Halloran S, Feeney M, Morrissey D, Thornton G, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, Quigley EMM, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek* 1999; 76: 279-292.

Elmer GW. Probiotisc: "living drugs". *Am J Health Syst Pharm* 2001; 58: 1101-1109.

Elson CO, Sartor RB, Tennyson GS, Riddell RH. Experimental models of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 109(4): 1344-1367.

Elson CO, Beagley KW, Sharmanov AT, Fujihashi K, Kiyono H, Tennyson GS, Cong Y, Black CA, Ridwan BW, McGhee JR. Hapten-induced model of murine inflammatory bowel disease: mucosa immune responses and protection by tolerance. *J Immunol* 1996; 157(5): 2174-2185.

Enns R, Sutherland L. Adverse events in medical therapy for treatment for inflammatory bowel disease. En: Campieri M, Bianchi-Porro G, Fiocchi C, Schömerich J, eds. *Clinical challenges in inflammatory bowel diseases. Diagnosis, prognosis and treatment*. London: Kluwer Academic Publishers, 1998: 113-123.

Ewaschuk JB, Dieleman LA. Probiotics and prebiotics in chronic inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2006 ; 12(37): 5941-5950.

Fanaro S, Chierici R, Guerrini P, Vigi V. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. *Acta Paediatr* 2003; 91: 48-55.

Fernandes CF, Shahani KM, Amer MA. Therapeutic role of dietary lactobacilli and lactobacillic fermented dairy products. *FEMS Microbiol Rev* 1987; 46: 343-356.

Fiocchi C. Cytokines. En: MacDermott RP, W Stenson, eds. *Inflammatory Bowel Disease*, New York: Elseiver, 1992: 137-162.

Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998; 115(1): 182-205.

Floch MH, Hong-Curtiss J. Probiotics and functional foods in gastrointestinal disorders. *Curr Gastroenterol Reports* 2001; 3: 343-350.

Friend BA, Farmer RE, Shahani KM. Effect of feeding and intraperitoneal implantation of yogur culture cells on Ehrlich ascites tumor. *Milch Wissenschaft* 1982; 37: 708-710.

Fujino S, Andoh A, Bamba S, Ogawa A, Hata K, Araki Y, Bamba T, Fujiyama Y. Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease. *Gut* 2003; 52: 65-70.

Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989; 66: 365-367.

Fuss IJ, Neurath M, Boirivant M, Klein JS, de la Motte C, Strong SA, Fiocchi C, Strober W. Disparate CD4+ lamina propria (LP) lymphokine secretion profiles in inflammatory bowel disease. Crohn's disease LP cells manifest increased secretion of IFN-gamma, whereas ulcerative colitis LP cells manifest increased secretion of IL-5. *J Immunol* 1996; 157(3): 1261-1270.

Galvez J, Garrido M, Merlos M, Torres MI, Zarzuelo A. Intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746, a novel 5-ASA conjugate, on acute and chronic experimental colitis in the rat. *Br J Pharmacol* 2000a; 130(8): 1949-1959.

Galvez J, Sanchez de Medina F, Romero JA, Zarzuelo A. Effect of Polypodium leucotomos on acute, chronic and reactivated trinitrobenzene sulphonic acid colitis in rats. *Inflammopharmacology* 2000b; 8: 89-105.

Gaón D, García H, Winter L, Rodríguez N, Quintás R, González SN, Oliver G. Effect of *Lactobacillus* strains and *Saccharomyces boulardii* on persistent diarrhea in children. *Medicina* 2003; 63: 293-298.

Garcia-Lafuente A, Antolin M, Guarner F, Crespo E, Salas A, Forcada P, Malagelada J. Derangement of mucosal barrier function by bacteria colonizing the rat colonic mucosa. *Eur J Clin Invest* 1998; 28(12): 1019-26.

Gasche C. Complications of inflammatory bowel disease. *Hepatogastroenterology* 2000; 47(31): 49-56.

Gassull MA, Cabré E. Clinical guidelines for the diagnosis of IBD. En: Management of inflammatory bowel disease. Barcelona: *Prous Science* 1994; 7-12.

Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J Clin Immunol* 2001; 21: 264-271.

Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr* 2001; 74(6): 833-839.

Gill HS. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol* 2003; 17: 755-773.

Gilliland SE, Kim HS. Effect of viable starter culture bacteria in yogurt on lactose utilization in humans. *J Dairy Sci* 1984; 67: 1-6.

Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000; 119: 305-309.

Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Poggioli G, Miglioli M, and Campieri M. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003; 124: 1202-1209.

Goldin BR, Gorbach SL. The effect of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am J Clin Nutr* 1984; 39: 756-761.

Goldin BR, Gualtieri LJ, Moore RP. The effect of *Lactobacillus* GG on the initiation and promotion of DMH-induced intestinal tumors in the rat. *Nutr Cancer* 1996; 25: 197-204.

González R, de Medina FS, Martínez-Augustin O, Nieto A, Gálvez J, Risco S, Zarzuelo A. Anti-inflammatory effect of diosmectite in haptin-induced colitis in the rat. *Br J Pharmacol* 2004; 141: 951-960.

Gorbach SL. Probiotics and gastrointestinal health. *Am J Gastroenterol* 2000; 95 (suppl. 1): S2-S4.

Grisham MB, Volkmer C, Tso P, Yamada T. Metabolism of trinitrobenzene sulfonic acid by the rat colon produces reactive oxygen species. *Gastroenterology* 1991; 101(2): 540-547.

Gronlund MM, Lehtonen OP, Eerola E, Kero P. Fecal microflora in healthy infants born by different methods of delivery: permanent changes in intestinal flora after cesarean delivery. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1999; 28: 19-25.

Guandalini S. Use of *Lactobacillus*-GG in paediatric Crohn's disease. *Dig Liver Dis* 2002; 34 (suppl. 2): S63-S65.

Guandalini S. Probiotics for children: use in diarrhea. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 244-248.

Guérin-Danan C, Andrieux C, Popot F, Charpilienne A, Vaissade P, Gaudichon C, Pedone C, Bouley C, Szylit O. Pattern of metabolism and composition of the fecal microflora in infants 10 to 18 months old from day care centers. *Am J Pediatr Gastroenterol* 1997; 25: 281-289.

Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S. Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000; 31: 453-457.

Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000; 45: 1462-1464.

Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AM, Schiffrin EJ, Blum S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 2000; 47: 79-87.

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.

Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA, Knight SC, Stagg AJ. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 2004; 53: 1602–1609.

Haveman JW, Muller Kobold AC, Tervaert JW, van den Berg AP, Tulleken JE, Kallenberg CG, The TH. The central role of monocytes in the pathogenesis of sepsis: consequences for immunomonitoring and treatment. *Neth J Med* 1999; 55: 132-141.

Hayatsu H, Hayatsu T. Suppressing effect of *Lactobacillus casei* administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Cancer Lett* 1993; 73: 173-179.

Heyman M, Darmon N, Dupont C, Dugas B, Hirribaren A, Blaton MA, Desjeux JF. Mononuclear cells from infants allergic to cow's milk secrete tumor necrosis factor alpha, altering intestinal function. *Gastroenterology* 1994; 106: 1514–1523.

Hilton E, Kolakawaki P, Singer C, Smith M. Efficacy of *Lactobacillus* GG as a diarrhea preventive in travelers. *J Travel Med* 1977; 4: 41-43.

Hilton E, Isenberg HD, Alperstein P, France K, Borenstein MT. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for Candidal vaginosis. *Ann Int Med* 1992; 116: 353-357.

Hirayama K, Rafter J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes Infect* 2000; 2: 681-686.

Holzapel WH, Wood BJB. Lactic acid bacteria in contemporary perspective. *In The Genera of Lactic Acid Bacteria*; Chapman and Hall 1995; Londres, pp. 1-6.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 2003; 348: 138-150.

Howard M, Muchamuel T, Andrade S, Menon S. Interleukin 10 protects mice from lethal endotoxemia. *J Exp Med* 1993; 177: 1205-1208.

Hsu CS, Chiu WC, Yeh CL, Hou YC, Chou SY, Yeh SL. Dietary fish oil enhances adhesion molecule and interleukin-6 expression in mice with polymicrobial sepsis. *Br J Nutr* 2006; 96: 854-860.

Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A, Otani T. Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr* 2003; 22: 56-63.

Ishizuka K, Sugimura K, Homma T *et al.*, Influence of interleukin-10 on the interleukin-1 receptor antagonist / interleukin-1 beta ratio in the colonic mucosa of ulcerative colitis. *Digestion* 2001; 63 (suppl.1): 22-27.

Isogai H, Isogai E, Hayashi S, Kimura K, Kubota T, Fujii N, Oguma K, *et al.* Experimental *Helicobacter pylori* infection in association with other bacteria. *Microbiol Immunol* 1997; 41: 361-365.

Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 1995; 13: 310-312.

Isolauri E, Kirjavainen PV, Salminen S. Probiotics – a role in the treatment of intestinal infection and inflammation. *Gut* 2002; 50: 54-59.

Ito H, Koide N, Hassan F, Islam S, Tumurkhuu G, Mori I, Yoshida T, Kakumu S, Moriwaki H, Yokochi T. Lethal endotoxic shock using alpha-galactosylceramide sensitization as a new experimental model of septic shock. *Lab Invest* 2006; 86: 254-261.

Jack RW, Tagg JR, Ray B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol Rev* 1995; 59: 171-200.

Jiang T, Savaiano DA. Modification of colonic fermentation by bifidobacteria and pH *in vitro*. Impact on lactose metabolism, short-chain fatty acid, and lactate production. *Dig Dis Sci* 1997; 42: 2370-2377.

Kabir AM, Aiba Y, Takagi A, Kamiya S, Miwa T, Koga Y. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut* 1997; 41: 49-55.

Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 1992; 32: 141-144.

Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic diseases: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 1076-1079.

Kalliomaki MA, Isolauri E. Probiotics and down-regulation of the allergic response. *Immunol Allergy Clin North Am* 2004; 24: 739-752.

Kampman E, Giovannucci E, van't Veer P, Rimm E, Stampfer MJ, Colditz GA, Kok FJ, Willett WC. Calcium, vitamin D, dairy foods, and the occurrence of colorectal adenomas among men and women in two prospective studies. *Am J Epidemiol* 1994; 139: 16-29.

Kanazawa H, Nagino M, Kamiya S, Komatsu S, Mayumi T, Takagi K, Asahara T, Nomoto K, Tanaka R, Nimura Y. Synbiotics reduce postoperative infectious complications: a randomized controlled trial in biliary cancer patients undergoing hepatectomy. *Langenbecks Arch Surg* 2005; 390: 104-113.

Katelaris PH, Salam I, Farthing MJG. Lactobacillus to prevent traveler's diarrhea?. *N Engl J Med* 1995; 333: 1360-1361.

Kato I, Kobayashi S, Yokokura T, Mutai M. Antitumor activity of *Lactobacillus casei* in mice. *Gann* 1981; 72: 517-523.

Kato K, Mizuno S, Umesaki Y, Ishii Y, Sugitani M, Imaoka A, Otsuka M, Hasunuma O, Kurihara R, Iwasaki A, Arakawa Y. Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004; 20: 1133-1141.

Kelly D, Campbell JI, King TP, Grant G, Jansson EA, Coutts AG, Pettersson S, Conway S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR-gamma and RelA. *Nat Immunol* 2004; 5: 104-112.

Kim GY, Roh SI, Park SK, Ahn SC, Oh YH, Lee JD, Park YM. Alleviation of experimental septic shock in mice by acidic polysaccharide isolated from the medicinal mushroom *Phellinus linteus*. *Biol Pharm Bull* 2003; 26: 1418-1423.

Kirjavainen PV, El-Nezami HS, Salminen SJ, Ahokas JT, Wright PF. The effect of orally administered viable probiotic and dairy lactobacilli on mouse lymphocyte proliferation. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 26: 131-135.

Kitazawa H, Ueha S, Itoh S, Watanabe H, Konno K, Kawai Y, Saito T, Itoh T, Yamaguchi T. AT oligonucleotides inducing B lymphocyte activation exist in probiotic *Lactobacillus gasseri*. *Int J Food Microbiol* 2001; 10, 65 (3): 149-162.

Kohwi T, Imai K, Tamura A, Hashimoto Y. Antitumor effect of *Bifidobacterium infantis* in mice. *Gann* 1978;69: 613-618. Konrad A, Mahler M, Flogerzi B, Kalousek MB, Lange J, Varga L, Seibold F. Amelioration of murine colitis by feeding a solution of lysed *Escherichia coli*. *Scand J Gastroenterol* 2003; 38: 172-179.

Kopp MV, Goldstein M, Dietschek A, Sofke J, Heinzmann A, Urbanek R. *Lactobacillus GG* has in vitro effects on enhanced interleukin-10 and interferon-gamma release of mononuclear cells but no in vivo effects in supplemented mothers and their neonates. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 602-610.

Krawisz JE, Sharon P, Stenson WF. Quantitative assay for acute intestinal inflammation based on myeloperoxidase activity. Assessment of inflammation in rat and hamster models. *Gastroenterology* 1984; 87(6): 1344-1350.

Kruis W, Schutz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11: 853-858.

Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukas M, Fixa B, Kascak M, Kamm MA, Weismueller J, Beglinger C, Stolte M, Wolff C, Schulze J. Maintaining remission of ulcerative colitis

with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004; 53: 1617-1623.

Kubes P, Grisham MB, Barrowman JA, Gaginella T, Granger DN. Leukocyte-induced vascular protein leakage in cat mesentery. *Am J Physiol* 1991; 261(6 Pt 2): H1872-H1879.

Kuisma J, Mentula S, Jarvinen H, Kahri A, Saxelin M, Farkkila M. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on ileal pouch inflammation and microbial flora. *Aliment Pharmacol Ther* 2003; 17: 509-515.

Laake KO, Line PD, Grzyb K, Aamodt G, Aabakken L, Roset A, Hvinden AB, Bakka A, Eide J, Bjorneklett A, Vatn MH. Assessment of mucosal inflammation and blood flow in response to four weeks' intervention with probiotics in patients operated with a J-configured ileal-pouch-anal-anastomosis (IPAA). *Scand J Gastroenterol* 2004; 39: 1228-1235.

Lammers KM, Vergopoulos A, Babel N, Gionchetti P, Rizzello F, Morselli C, Caramelli E, Fiorentino M, d'Errico A, Volk HD, Campieri M. Probiotic therapy in the prevention of pouchitis onset: decreased interleukin-1beta, interleukin-8, and interferon-gamma gene expression. *Inflamm Bowel Dis* 2005; 11: 447-454.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; 201(2): 233-240.

Le Blay G, Michel C, Blottiere HM, Cherbut C. Prolonged intake of fructooligosaccharides induces a short-term elevation of lactic acid-producing bacteria and a persistent increase in cecal butyrate in rats. *J Nutr* 1999; 129: 2231-2235.

Leite MS, Pacheco P, Gomes RN, Guedes AT, Castro-Faria-Neto HC, Bozza PT, Koatz VL. Mechanisms of increased survival after lipopolysaccharide-induced endotoxic shock in mice consuming olive oil-enriched diet. *Shock* 2005;23: 173-178.

Levine DS. Clinical features and complications of Crohn's disease. En: Targan SR, Shanahan F, eds. *Inflammatory Bowel Disease: From Bench To Bedside*. Baltimore, Maryland: Willians and Wilkins, 1994: 296-319.

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: 646-652.

Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965; 147: 747-748.

Lin YP, Thibodeaux CH, Peña JA, Ferry GD, Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* suppress proinflammatory cytokines via c-Jun. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1068-1083.

Liu S, Adcock IM, Old RW, Barnes PJ, Evans TW. Lipopolysaccharide treatment in vivo induces widespread tissue expression of inducible nitric oxide synthase mRNA. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 196: 1208-1213.

Liu SF, Malik AB. NF- $\kappa$ B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2006; 290: 622-645.

Loftus EV Jr. Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. *Gastroenterology* 2004; 126(6): 1504-1517.

Lykova EA, Bondarenko VM, Izachik IuA, Izachik NA, Grigor'ev AV, Murashov AO, Abramob NA. The probiotic correction of microecological and immune disorders in gastroduodenal pathology in children. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 1996; 2: 88-91.

Maassen CB, van Holten-Neelen C, Balk F, den Bak-Glashouwer MJ, Leer RJ, Laman JD, Boersma WJ, Claassen E. Strain dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* 2000; 18: 2613-2623.

MacDonald TT, Hutchings P, Choy MY, Murch S, Cooke A. Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol* 1990; 81(2): 301-305.

MacFarlane GT, Cummings JH. Probiotics, infection and immunity. *Curr Opin Infect Dis* 2002; 15: 501-506.

Macpherson AJ, Gatto D, Sainsbury E, Harriman GR, Hengartner H, Zinkernagel RM. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science* 2000; 288: 2222-2226.

Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. *Lactobacillus* species prevents colitis in interleukin 10 gene deficient mice. *Gastroenterology* 1999; 116: 1107-1114.

Madsen K, Cornish A, Soper P, McKaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell L, De Simone C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001; 121: 580-591.

Maeda Y, Noda S, Tanaka K, Sawamura S, Aiba Y, Ishikawa H, Hasegawa H, Kawabe N, Miyasaka M, Koga Y. The failure of oral tolerance induction is functionally coupled to the absence of T cells in Peyer's patches under germfree conditions. *Immunobiology* 2001; 204: 442-457.

Mahida YR, Wu K, Jewell DP. Enhanced production of interleukin 1-beta by mononuclear cells isolated from mucosa with active ulcerative colitis of Crohn's disease. *Gut* 1989; 30(6): 835-838.

Majamaa H, Isolauri E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 1997; 99: 179-185.

Malchow HA. Crohn's disease and Escherichia coli. A new approach in therapy to maintain remission of colonic Crohn's disease?. *J Clin Gastroenterol* 1997; 25: 653-658.

Malhotra SL. Dietary factors in a study of colon cancer from cancer registry, with special reference to the role of saliva, milk, and fermented milk products and vegetable fibre. *Med Hypotheses* 1977; 3: 122-134.

Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, Adawi D, Stenram U, Molin G, Jeppsson B. The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 1996; 111: 334-344.

Marchant A, Bruyns C, Vandenameele P, Ducarme M, Gerard C, Delvaux A, *et al.* Interleukin-10 controls interferon-gamma and tumor necrosis factor production during experimental endotoxemia. *Eur J Immunol* 1994; 24: 1167-1171.

Marin ML, Tejada-Simon MV, Lee JH, Murtha J, Ustunol Z, Pestka JJ. Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by *Streptococcus thermophilus*: comparison with *Bifidobacterium* sp. and *Lactobacillus bulgaricus*. *J Food Prot* 1998; 61: 859-864.

Marteau P, Flourie B, Pochart P, Chastang C, Desjeux JF, Rambeau JC. Effect of the microbial lactase activity in yoghurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase-deficient humans. *Brit J Nutr* 1990; 64: 71-79.

Marteau PR, de Vrese M, Cellier CJ, Schrezenmeir J. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 430S-436S.

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

Marteau P, Lemann M, Seksik P, Laharie D, Colombel JF, Bouhnik Y, Cadiot G, Soule JC, Bourreille A, Metman E, Lerebours E, Carbonnel F, Dupas JL, Veyrac M, Coffin B, Moreau J, Abitbol V, Blum-Sperisen S, Mary JY. Ineffectiveness of *Lactobacillus johnsonii* LA1 for prophylaxis of postoperative recurrence in Crohn's disease: a randomised, double blind, placebo controlled GETAID trial. *Gut* 2006; 55: 842-847.

Mathew JS, Sharma RP. Effect of all-trans-retinoic acid on cytokine production in a murine macrophage cell line. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22: 693-706.

Matsumoto S, Watanabe N, Imaoka A, Okabe Y. Preventive effects of *Bifidobacterium*- and *Lactobacillus*-fermented milk on the development of inflammatory bowel disease in senescence-accelerated mouse P1/Yit strain mice. *Digestion* 2001; 64: 92-99.

Matricardi PM, Rosmini F, Rapicetta M, Gasbarrini G, Strofolini T. Atopy, hygiene and anthropometric lifestyle. *Lancet* 1999; 354: 430.

Mayer AM. Therapeutic implications of microglia activation by lipopolysaccharide and reactive oxygen species generation in septic shock and central nervous system pathologies: a review. *Medicina (B Aires)* 1998; 58: 377-385.

Mayeux RP. Pathobiology of lipopolysaccharide. *J Tox Environm Health* 1997; 51: 415-435.

McCafferty DM, Rioux KJ, Wallace JL. Granulocyte infiltration in experimental colitis in the rat is interleukin-1 dependent and leukotriene independent. *Eicosanoids* 1992; 5(3-4): 121-125.

McCarthy J, O'Mahony L, Dunne C, Kelly P, Feeney M, Kiely B, O'Sullivan G, Collins JK, Shanahan F. An open trial of a novel probiotic as an alternative to steroids in mild/moderately active Crohn's disease. *Gut* 2001; 49: A2447.

McLean NW, Rosenstein IJ. Characterisation and selection of a *Lactobacillus* species to re-colonise the vagina of women with recurrent bacterial vaginosis. *J Med Microbiol* 2000; 49: 543-552.

Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1: 135-145.

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

Michetti P, Dorta PH, Wiesel D, Brassart E, Verdu M, Herranz C, Felley N, Porta M, *et al.* Effect of whey-based culture supernatant of *Lactobacillus acidophilus (johnsonii)* La1 on *Helicobacter pylori* infection in humans. *Digestion* 1999; 60: 203-209.

Midolo PD, Lambert JR, Hull R, Luo F, Grayson ML. *In vitro* inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acids and lactic acid bacteria. *J Appl Bacteriol* 1995; 79: 475-479.

Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, Nicholls RJ, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. *Gut* 2004; 53: 108-114.

Mohamadzadeh M, Olson S, Kalina WV, Ruthel G, Demmin GL, Warfield KL, Bavari S, Klaenhammer TR. Lactobacilli activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 2880-2885.

Monteleone G, Biancone L, Marasco R, Morrone G, Marasco O, Luzzza F, Pallone F. Interleukin 12 is expressed and actively released by Crohn's disease intestinal lamina propria mononuclear cells. *Gastroenterology* 1997; 112(4): 1169-1178.

Morita H, He F, Fuse T, Ouwehand AC, Hashimoto H, Hosoda M, Mizumachi K, Kurisaki J. Adhesion of lactic acid bacteria to caco-2 cells and their effect on cytokine secretion. *Microbiol Immunol* 2002; 46: 293-297.

Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology* 1989; 96(3): 795-803.

Morrison DJ, Mackay WG, Edwards CA, Preston T, Dodson B, Weaver LT. Butyrate production from oligofructose fermentation by the human faecal flora: what is the contribution of extracellular acetate and lactate? *Br J Nutr* 2006; 96: 570-577.

Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 31-41.

Müller JM, Ziegler-Heitbrock HW, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B, a mediator of lipopolysaccharide effects. *Immunobiology* 1993; 187: 233-256.

Murch SH. Toll of allergy reduced by probiotics. *Lancet* 2001; 357: 1057-1059.

Nagao F, Nakayama M, Muto T, Okumura K. Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the immune system in healthy human subjects. *Biosci Biotechnol Biochem* 2000; 64: 2706-2708.

Nagino M, Kamiya J, Uesaka K, Sano T, Yamamoto H, Hayakawa N, Kanai M, Nimura Y. Complications of hepatectomy for hilar cholangiocarcinoma. *World J Surg* 2001; 25(10):1277-1283.

Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stuber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med* 1995; 182(5): 1281-1290.

Neurath MF, Fuss I, Paparakis M, Alexopoulou L, Haralambous S, Meyer zum Büschenfelde KH, Strober W, Kollias G. Predominant pathogenic role of tumor necrosis factor in experimental colitis in mice. *Eur J Immunol* 1997; 27(7): 1743-1750.

Niedzielin K, Kordecki H, Birkenfeld B. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of *Lactobacillus plantarum* 299V in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 143-147.

Nimura Y, Hayakawa N, Kamiya J, Maeda S, Kondo S, Yasui A, Shionoya S. Combined portal vein and liver resection for carcinoma of the biliary tract. *Br J Surg* 1991; 78: 727-731.

Nobaek S, Johansson ML, Molin G, Ahné S. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction of abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000; 95: 1231-1238.

Nopchinda S, Varavithya W, Phuapradit P, Sangchai R, Suthutvoravut U, Chantraruksa V, Haschke F. Effect of *Bifidobacterium* Bb12 with or without *Streptococcus thermophilus* supplemented formula on nutritional status. *J Med Assoc Thai* 2002; 85 (suppl. 4): S1225-S1231.

Oberholzer A, Oberholzer C, Moldawer LL. Interleukin-10: A complex role in the pathogenesis of sepsis syndromes and its potential as an anti-inflammatory drug. *Crit Care Med* 2002; 30: S58-S63.

Obrador A, Riera J. Definitions. En: Gassull MA, Obrador A, Chantar C, eds. Management of Inflammatory Bowel Disease. Barcelona: *Prous Science* 1994; 1-6.

Ogawa T, Asai Y, Tamai R, Makimura Y, Sakamoto H, Hashikawa S, Yasuda K. Natural killer cell activities of symbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clin Exp Immunol* 2006; 143:103-109.

Olivares M, Díaz-Ropero MP, Gómez N, Lara-Villoslada F, Sierra S, Maldonado JA, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J. The consumption of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans. *Int Microbiol* 2006; 9: 47-52.

O'Sullivan MG, Thornton G, O'Sullivan GC, Collins JK. Probiotic bacteria: myth or reality. *Trends Food Sci Technol* 1992; 3: 309-314.

O'Sullivan MA, O'Morain CA. Bacterial supplementation in the irritable bowel syndrome. A randomised double-blind placebo-controlled cross-over study. *Digest Liver Dis* 2000; 32: 94-301.

Ouwehand AC, Salminen S. The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int Dairy J* 1998; 8: 749-758.

Palmen MJ, Dieleman LA, van der Ende MB, Uytterlinde A, Pena AS, Meuwissen SG, van Rees EP. Non-lymphoid and lymphoid cells in acute, chronic and relapsing experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 1995; 99(2): 226-232.

Parrillo JE. Mechanisms of septic shock. *N Engl J Med* 1993; 328: 1471-47.

Parronchi P, Romagnani P, Annunziato F, Sampognaro S, Becchio A, Giannarini L, Maggi E, Pupilli C, Tonelli F, Romagnani S. Type 1 T-helper cell predominance and interleukin-12 expression in the gut of patients with Crohn's disease. *Am J Pathol*. 1997; 150(3): 823-832.

Patel GP, Gurka DP, Balk RA. New treatment strategies for severe sepsis and septic shock. *Curr Opin Crit Care* 2003; 9: 390-396.

Pathmakanthan S, Li CK, Cowie J, Hawkey CJ. *Lactobacillus plantarum* 299: beneficial in vitro immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004; 19(2): 166-173.

Peluso I, Fina D, Caruso R, Stolfi C, Caprioli F, Fantini MC, Caspani G, Grossi E, Di Iorio L, Paone FM, Pallone F, Monteleone G. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* B21060 suppresses human T-cell proliferation. *Infect Immun* 2007; 75:1730-1737.

Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Diaz-Ropero MP, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. Preventative effects of a probiotic, *Lactobacillus salivarius* ssp. *salivarius*, in the TNBS model of rat colitis. *World J Gastroenterol* 2005; 11(33): 5185-5192.

Peran L, Camuesco D, Comalada M, Nieto A, Concha A, Adrio JL, Olivares M, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. *Lactobacillus fermentum*, a probiotic capable to release glutathione, prevents colonic inflammation in the TNBS model of rat colitis. *Int J Colorectal Dis* 2006; 21: 737-746.

Peran L, Sierra S, Comalada M, Lara-Villoslada F, Bailon E, Nieto A, Concha A, Olivares M, Zarzuelo A, Xaus J, Galvez J. A comparative study of the preventative effects exerted by two probiotics, *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus fermentum*, in the trinitrobenzenesulfonic acid model of rat colitis. *Br J Nutr* 2007; 97(1): 96-103.

Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy* 2000; 30: 1804-1808.

Pixley RA, De La Cadena R, Page JD, Kaufman N, Wyshock EG, Chang A, Taylor FB Jr, Colman RW. The contact system contributes to hypotension but not disseminated

intravascular coagulation in lethal bacteremia. In vivo use of a monoclonal anti-factor XII antibody to block contact activation in baboons. *J Clin Invest* 1993; 91(1):61-68.

Plevy S. The immunology of inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin North Am* 2002; 31(1):77-92.

Pochapin M. The effect of probiotics on *Clostridium difficile* Diarrhea. *Am J Gastroenterol* 2000; 95 (suppl. 1): S11-S13.

Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 2002; 347(6): 417-429.

Pool-Zobel BL, Neudecker C, Domizlaff I, Ji S, Schillinger U, Rumney C, Moretti M, Vilarini I, Scassellati-Sforzolini R, Rowland I. *Lactobacillus*-and *Bifidobacterium*-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr Cancer* 1996; 26: 365-380.

Prantera C, Scribano ML, Falasco G, Andreoli A and Luzi C. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus* GG. *Gut* 2002; 51: 405-409.

Rachmilewitz D, Simon PL, Schwartz LW, Griswold DE, Fondacaro JD, Wasserman MA. Inflammatory mediators of experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1989; 97(2): 326-337.

Rachmilewitz D, Karmeli F, Takabayashi K, Hayashi T, Leider-Trejo L, Lee J, Leoni LM, Raz E. Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology* 2002; 122: 1428-1441.

Raetz CRH. Biochemistry of endotoxins. *Annu Rev Biochem* 1990; 59: 129-170.

Ranganathan P, Eisen S, Yokoyama WM, Mcleod HL. Will pharmacogenetics allow better prediction of methotrexate toxicity and efficacy in patients with rheumatoid arthritis?. *Ann Rheum Dis* 2003; 62: 4-9.

Rangavajhyala N, Shahani KM, Sridevi G, Srikumaran S. Nonlipopolisaccharide component(s) of *Lactobacillus acidophilus* stimulate(s) the production of interleukin-1 alpha and tumor necrosis factor-alpha by murine macrophages. *Nutr Cancer* 1997; 28: 130-134.

Rani B, Khetarpaul N. Probiotic fermented food mixture: possible applications in clinical anti-diarrhoea usage. *Nutr Health* 1998; 12: 97-105.

Rautava S, Kalliomaki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breastfeeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2002; 109: 119-121.

Reid G. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr* 2000; 73: 437S-443S.

Reid G, Bruce AW. Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis* 2001b; 183: S77-S80.

Reid G, Gibson G, Sanders ME, Guarner F, Versalovic J. *The Lancet* 2008; 372: 112-113.

Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, Muller CD, Baumann R, Poindron P, Duclos B. Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol* 1996; 16(3): 144-150.

Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, and Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999; 354: 635-639.

Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolini M, Rotta G, Bonasio R, Granucci F, Kraehenbuhl JP, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol* 2001; 2: 361-367.

Rinne M, Kalliomaki M, Arvilommi H, Salminen S, Isolauri E. Effect of probiotics and breastfeeding on the *bifidobacterium* and *lactobacillus/enterococcus* microbiota and humoral immune responses. *J Pediatr* 2005; 147: 186-191.

Roediger WE. The colonic epithelium in ulcerative colitis: an energy-deficiency disease?. *Lancet* 1980; 2: 712-715.

Rutgeerts P, van Assche G, Vermeire S. Optimizing anti-TNF treatment in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2004; 126: 1593–1610.

Saavedra J. Probiotics and infectious diarrhea. *Am J Gastroenterol* 2000; 95 (suppl.1): S16-S18.

Salminen S, Isolauri E, Salminen E. Clinical uses of probiotics for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* 1996; 7: 347-358.

Salvemini D, Cuzzocrea S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation. *Free Radic Biol Med* 2002; 33: 1173-1185.

Sanchez de Medina F, Galvez J, Romero JA, Zarzuelo A. Effect of quercitrin on acute and chronic experimental colitis in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1996; 278(2): 771-779.

Sansonetti PJ. War and peace at mucosal surfaces. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 953-964.

Schleifer KH, Ludwig W. Phylogeny of the genus *Lactobacillus* and related genera. *Syst Appl Microbiol* 1995; 14: 461-467.

Schultz M, Linde HJ, Lehn N, Zimmermann K, Grossmann J, Falk W, Scholmerich J. Immunomodulatory consequences of oral administration of *Lactobacillus rhamnosus* strain GG in healthy volunteers. *J Dairy Res* 2003; 70: 165-173.

Schultz M, Timmer A, Herfarth HH, Sartor RB, Vanderhoof JA, Rath HC. *Lactobacillus* GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 2004; 4: 5.

Sener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanli G, Kaçmaz A, Tilki M, Yeğen BC. Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg Today* 2005; 35: 52-59.

Setoyama H, Imaoka A, Ishikawa H, Umesaki Y. Prevention of gut inflammation by *Bifidobacterium* in dextran sulfate-treated gnotobiotic mice associated with *Bacteroides* strains isolated from ulcerative colitis patients. *Microbes Infect* 2003; 5: 115-122.

Shahani KM, Ayebo AD. Role of dietary lactobacilli in gastrointestinal microecology. *Am J Clin Nutr* 1980; 33: 2448-2457.

Shanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis* 2000; 6(2): 107-115.

Shanahan F, Guraner F, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, O'Donoghue D, Kiely B. A one year, randomised, doubleblind, placebo controlled trial of a *Lactobacillus* or a *Bifidobacterium* probiotic for maintenance of steroid-induced remission of ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2006; 130 (suppl 2): A44.

Sharma R, Schumacher U, Ronaasen V, Coates M. Rat intestinal mucosal responses to a microbial flora and different diets. *Gut* 1995; 36: 209-214.

Sharon P, Stenson WF. Enhanced synthesis of leukotriene B4 by colonic mucosa in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1984; 86(3): 453-460.

Sheih YH, Chiang BL, Wang LH, Liao CK, Gill HS. Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *J Am Coll Nutr* 2001; Apr 20 (suppl. 2) 20: 149-156.

Sheil B, McCarthy J, O'Mahony L, Bennett MW, Ryan P, Fitzgibbon JJ, Kiely B, Collins JK, Shanahan F. Is the mucosal route of administration essential for probiotic function? Subcutaneous administration is associated with attenuation of murine colitis and arthritis. *Gut* 2004; 53(5): 694-700.

Shenep JL. Septic shock. *Adv Pediatr Infect Dis* 1997; 12: 209-241.

Shiba T, Aiba Y, Ishikawa H, Ushiyama A, Takagi A, Mine T, Koga Y. The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. *Microbiol Immunol* 2003; 47:371-378.

Shida K, Makino K, Morishita A, Takamizawa K, Hachimura S, Ametani A, Sato T, Kumagai Y, Habu S, Kaminogawa S. *Lactobacillus casei* inhibits antigen-induced IgE secretion through regulation of cytokine production in murine splenocyte cultures. *Int Arch Allergy Immunol* 1998; 115: 278-287.

Shida K, Takahashi R, Iwadate E, Takamizawa K, Yasui H, Sato T, *et al.* *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. *Clin Exp Allergy* 2002; 32(4): 563-570.

Shida K, Suzuki T, Kiyoshima-Shibata J, Shimada S, Nanno M. Essential roles of monocytes in stimulating human peripheral blood mononuclear cells with *Lactobacillus casei* to produce cytokines and augment natural killer cell activity. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 997-1003.

Shortt C. "Living it up for dinner". *Chemistry & Industry* 1998; 8: 300-303.

Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 1985; 150(1): 76-85.

Smits HH, Engering A, van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TM, Zaat BA, Yazdanbakhsh M, Wierenga EA, van Kooyk Y, Kapsenberg ML. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1260-1267.

So JS, Kwon HK, Lee CG, Yi HJ, Park JA, Lim SY, Hwang KC, Jeon YH, Im SH. *Lactobacillus casei* suppresses experimental arthritis by down-regulating T helper 1 effector functions. *Mol Immunol* 2008a; 45: 2690-2699.

So JS, Lee CG, Kwon HK, Yi HJ, Chae CS, Park JA, Hwang KC, Im SH. *Lactobacillus casei* potentiates induction of oral tolerance in experimental arthritis. *Mol Immunol* 2008b; 46: 172-180.

Solis-Pereyra D, Aattouri N, Lemonnier D. Role of food in the stimulation of cytokine production. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 521S-525S.

Stallmach A, Giese T, Schmidt C, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Meuer SC. Cytokine/chemokine transcript profiles reflect mucosal inflammation in Crohn's disease. *Int J Colorectal Dis* 2004; 19: 308-315.

Steidler L, Hans W, Schotte L. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000; 289: 1352-1355.

Stein RB, Hanauer SB. Comparative tolerability of treatments for inflammatory bowel disease. *Drug Saf* 2000; 23(5): 429-448.

Stenson WF, McDermott RP. Inflammatory Bowel Disease. En: Yamada T, ed. *Textbook of Gastroenterology*. Philadelphia: Lippincott Company 1991: 1588-1645.

Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* 1989; 299: 1259-1260.

Strober W, Ludviksson BR, Fuss IJ. The pathogenesis of mucosal inflammation in murine models of inflammatory bowel disease and Crohn disease. *Ann Intern Med* 1998; 128(10): 848-856.

Stucchi AF, Shofer S, Leeman S, Materne O, Beer E, McClung J, Shebani K, Moore F, O'Brien M, Becker JM. NK-1 antagonist reduces colonic inflammation and oxidative stress in dextran sulfate-induced colitis in rats. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2000; 279(6): G1298-G1306.

Sturm A, Rilling K, Baumgart DC, Gargas K, Abou-Ghazalé T, Raupach B, Eckert J, Schumann RR, Enders C, Sonnenborn U, Wiedenmann B, Dignass AU. *Escherichia coli* Nissle 1917 distinctively modulates T-cell cycling and expansion via toll-like receptor 2 signaling. *Infect Immun* 2005; 73: 1452-1465.

Suárez L, Perdomo M, Escobar H. Microflora bacteriana y ecosistema intestinal. Fisiopatología del intestino delgado contaminado. Diarrea aguda. Medio Ambiente en España. *GEN* 1994; 48 (2): 61-64.

Suffredini AF, Harpel PC, Parrillo JE. Promotion and subsequent inhibition of plasminogen activation after administration of intravenous endotoxin to normal subjects. *N Engl J Med* 1989; 4;320: 1165-1172.

Sugawara G, Nagino M, Nishio H, Ebata T, Takagi K, Asahara T, Nomoto K, Nimura Y. Perioperative synbiotic treatment to prevent postoperative infectious complications in biliary cancer surgery: a randomized controlled trial. *Ann Surg* 2006; 244: 706-714.

Surawicz CM, Elmer G, Speelman P, Lynne V, McFarland LV, Chinn J. Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* 1989; 96: 981-988.

Szentkuti L, Riedesel H, Enss ML, Gaertner K, Von Engelhardt W. Pre-epithelial mucus layer in the colon of conventional and germ-free rats. *Histochem J* 1990; 22: 491-497.

Tabbers MM, Benninga MA. Administration of probiotic lactobacilli to children with gastrointestinal problems: there is still little evidence. *Ned Tijdschr Geneesk* 2007; 151: 2198-2202.

Takagi A, Matsuzaki T, Sato M, Nomoto K, Morotomi M, Yokokura T. Enhancement of natural killer cytotoxicity delayed murine carcinogenesis by a probiotic microorganism. *Carcinogenesis* 2001; 22: 599-605.

Takeda K, Suzuki T, Shimada SI, Shida K, Nanno M, Okumura K. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin Exp Immunol* 2006; 146:109-115.

Teahon K, Smethurst P, Levi AJ, Menzies IS, Bjarnason I. Intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their first degree relatives. *Gut* 1992; 33(3):320-323.

Thompson WG. Probiotics for irritable bowel syndrome: a light in the darkness?. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001; 13: 1135-1136.

Tissier H. Traitement des infections intestinales par la méthode de transformation de la flore bactérienne de l'intestin. *C R Soc Biol* 1906; 359-361.

Toklu HZ, Tunali Akbay T, Velioglu-Ogunc A, Ercan F, Gedik N, Keyer-Uysal M, Sener G. Silymarin, the antioxidant component of *Silybum marianum*, prevents sepsis-induced acute lung and brain injury. *J Surg Res* 2008; 145: 214-222.

Tomioka H, Tomioka K, Sato K, Saito H. The protective activity of immunostimulants against *Listeria monocytogenes* infection in mice. *J Med Microbiol* 1992; 36: 112-116.

Triantafyllidis JK, Papalois AE, Parasi A, Anagnostakis E, Burnazos S, Gikas A, Merikas EG, Douzinas E, Karagianni M, Sotiriou H. *World J Gastroenterol* 2005; 11(43): 6843-6847.

Trinchieri S. Natural killer cells. *Encyclopedia of Cáncer* 1987; 2: 129-1141.

Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 1994; 84(12): 4008-4027.

Tubelius P, Stan V, Zachrisson A. Increasing work-place healthiness with the probiotic *Lactobacillus reuteri*: a randomised, double-blind placebo-controlled study. *Environ Health* 2005; 4: 25.

Ulisse S, Gionchetti P, D'Alo S, Russo FP, Pesce I, Ricci G, Rizzello F, Helwig U, Cifone MG, Campieri M, De Simone C. Expression of cytokines, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinases in pouchitis: effects of probiotic treatment. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2691-2699.

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 de Water J, Keen CL, Gershwin ME. The influence of chronic yoghurt consumption on immunity. *J Nutr* 1999; 129(7): 1492-1495.

Van Dijk APM, Keuskamp ZJ, Wilson JHP, Zijlstra FJ. Sequential release of cytokines lipid mediators and nitric oxide in experimental colitis. *Mediators Inflamm* 1995; 4: 186-190.

Van Dullemen HM, van Deventer SJ, Hommes DW, Bijl HA, Jansen J, Tytgat GN, Woody J. Treatment of Crohn's disease with anti-tumor necrosis factor chimeric monoclonal antibody (cA2). *Gastroenterology* 1995; 109: 129-135.

Vaughan EE, de Vries MC, Zoetendal EG, Ben-Amor K, Akkermans ADL, de Vos WM. The intestinal LABs. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002; 82: 341-352.

Veljaca M, Lesch CA, Pillana R, Sanchez B, Chan K, Guglietta A. BPC-15 reduces trinitrobenzene sulfonic acid-induced colonic damage in rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 272(1): 417-422.

Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, Matteuzzi D, Campieri M. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999; 13: 1103-1108.

Vergio F. Anti-und Probiotika. *Hipocrates* 1954; 25: 116-119.

Vesa T, Marteau P, Korpela R. Lactose intolerance. *J Am Coll Nutr* 2000; 19: 165S-175S.

Viriyakosol S, Kirkland T. Knowledge of cellular receptors for bacterial endotoxin-- 1995. *Clin Infect Dis* 1995; 21 (suppl 2): S190-S195.

Von der Weid T, Bulliard C, Schiffrin EJ. Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4(+) T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor beta and interleukin-10. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 695-701.

Wagner RD, Warner T, Roberts L. Colonization of congenitally immunodeficient mice with probiotic bacteria. *Infect Immun* 1997; 65: 3345-3351.

Walker WA. Role of nutrients and bacterial colonization in the development of intestinal host defense. *J Pediatr Gastroenterol* 2000; 30: S2-S7.

Wallace JL, MacNaughton WK, Morris GP, Beck PL. Inhibition of leukotriene synthesis markedly accelerates healing in a rat model of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1989; 96(1): 29-36.

Welbourn CR, Young Y. Endotoxic, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br J Surg* 1992; 79: 998-1003.

Wheeler JG, Shema SJ, Bogle ML, Shirrell MA, Burks AW, Pittler A, Helm RM. Immune and clinical impact of *Lactobacillus acidophilus* on asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 1997a; 79: 229-233.

Wheeler JG, Bogle ML, Shema SJ, SJ, Shirrell MA, Stine KC, Pittler AJ, Burks AW, Helm RM. Impact of dietary yogurt on immune function. *Am J Med Sci* 1997b; 313(2): 120-123.

Wills-Karp M, Santeliz J, Karp CL. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol* 2001; 1(1): 69-75.

Wong M, Oakley SP, Young L, Jiang B, Wierzbicki AS, Panayi G, Chowienczyk P, Kirkham BW. Infliximab improves vascular stiffness in patients with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 2008; [Epub ahead of print].

Woywodt A, Ludwig D, Neustock P, Kruse A, Schwarting K, Jantschek G, Kirchner H, Stange EF. Mucosal cytokine expression, cellular markers and adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11(3): 267-276.

Wu JY, Tsou MY, Chen TH, Chen SJ, Tsao CM, Wu CC1. Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J Pineal Res* 2008; 45: 106-116.

Yamada T, Marshall S, Specian RD, Grisham MB. A comparative study of two models of experimental colitis in rats. *Gastroenterology* 1992; 102: 1524-1534.

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

Yende S, Angus DC. Long-term Outcomes from Sepsis. *Curr Infect Dis Rep* 2007; 9: 382-386.

Youngman KR, Simon PL, West GA, Cominelli F, Rachmilewitz D, Klein JS, Fiocchi C. Localization of intestinal interleukin 1 activity and protein and gene expression to lamina propria cells. *Gastroenterology* 1993; 104(3): 749-758.

Zalashko MV, Anisimova HI, Bortkevich LG. Antimicrobial and immunomodulatory activities of *Lactobacillus acidophilus* Ke-10. *Prikl Biokhim Mikrobiol* 1997; 33: 305-309.

Zandi E, Rothwarf DM, Delhase M, Hayakawa M, Karin M. The I $\kappa$ B kinase complex contains two kinase subunits, IKK $\alpha$  and IKK $\beta$ , necessary for I $\kappa$ B phosphorylation and NF- $\kappa$ B activation. *Cell* 1997; 91:243–252.

Zhang L, Li N, des Robert C, Fang M, Liboni K, McMahon R, Caicedo RA, Neu J. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in a gastrostomy-fed infant rat model. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006; 42: 545-552.

Zhang Z, Zheng M, Bindas J, Schwarzenberger P, Kolls JK. Critical role of IL-17 receptor signaling in acute TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis* 2006; 12(5): 382-388.

Zocco MA, dal Verme LZ, Cremonini F, Piscaglia AC, Nista EC, Candelli M, Novi M, Rigante D, Cazzato IA, Ojetti V, Armuzzi A, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Efficacy of *Lactobacillus* GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 2006; 23: 1567-1574.

*Abreviaturas*

---



---

Ag	Antígeno
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AINEs	Antiinflamatorios no esteroideos
BCA	Ácido bicinchonínico
CARD	<i>Dominio de reclutamiento y activación de caspasas (Caspase-activation recruitment domains)</i>
Con A	Concanavalina A
CU	Colitis ulcerosa
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMH	1,2-dimetilhidrazina
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato ( <i>Deoxynucleotide triphosphate</i> )
DSS	Sulfato de dextrano sódico ( <i>Dextran sulfate sodium</i> )
DTNB	5,5'-ditiobisnitrobenzoico
EC	Enfermedad de Crohn
EDTA	Ácido etilendiaminetetraacético ( <i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i> )
EII	Enfermedad inflamatoria intestinal
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino ( <i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i> )
GSH	Glutation reducido
GSSG	Glutation oxidado
GSSGrd	Glutation reductasa
HTAB	Tampón de bromuro de hexadeciltrimetilamonio
IDM	Índice de daño macroscópico
IFN- $\gamma$	Interferón $\gamma$
Ig	Inmunoglobulina
I $\kappa$ B	Subunidad inhibidora $\kappa$ B

## Abreviaturas

---

IL	Interleuquina
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
KDO	Ácido 2-keto-3-deoxioctanoico
KO	<i>Knock out</i>
LPS	Lipopolisacárido
LT	Leucotrieno
MPO	Mieloperoxidasa
NADPH	Nicotinamida adenín dinucleótido fosfato reducido ( <i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i> )
NF-κB	Factor de transcripción nuclear kappa B
NK	Células asesinas naturales ( <i>Natural killer</i> )
NNG	N'-nitro-N'-nitrosoguanidina
NO	Óxido nítrico
NOD	Dominio de oligomerización de de la unión a nucleótidos ( <i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i> )
PBS	Tampón fosfato salino ( <i>Phosphate buffer saline</i> )
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PPAR	Receptor activador de la proliferación de peroxisomas ( <i>Peroxisome proliferator-activated receptors</i> )
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ROS	Especies reactivas del oxígeno
SDS	Dodecil sulfato sódico ( <i>Sodium dodecyl sulfate</i> )
SII	Síndrome del intestino irritable
TBS	Tampón tris salino ( <i>Tris buffer saline</i> )
TCA	Ácido tricloroacético
TBS-T	Tampón tris salino-Tween-20
TGF-β	Factor de crecimiento transformante β ( <i>Transforming growth factor β</i> )

TNBS	Ácido trinitrobencenosulfónico
TNF $\alpha$	Factor de necrosis tumoral $\alpha$ ( <i>Tumor necrosis factor <math>\alpha</math></i> )
Th	Célula T colaboradora ( <i>T helper</i> )
TLR	Receptor de tipo Toll ( <i>Toll like receptor</i> )
Treg	Célula T reguladora
UFC	Unidades formadoras de colonias





