

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II



TESIS DOCTORAL

“EFECTO DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 Y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, SOBRE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN CÉLULAS INTESTINALES HUMANAS”

MIRIAM BERMÚDEZ BRITO

2011

Editor: Editorial de la Universidad de Granada
Autor: Miriam Bermúdez Brito
D.L.: GR 1837-2012
ISBN: 978-84-9028-039-3

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR II

TESIS DOCTORAL

“EFECTO DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 Y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, SOBRE LA RESPUESTA INMUNITARIA EN CÉLULAS INTESTINALES HUMANAS”

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

Miriam Bermúdez Brito

Bajo la dirección de los doctores:

Ángel Gil Hernández

Carolina Gómez Llorente

Granada, 2011

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

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

Infoman:

Que el trabajo titulado “Efecto de las cepas probióticas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, sobre la respuesta inmunitaria en células intestinales humanas” ha sido realizado por Miriam Bermúdez Brito bajo su dirección y reúne todos los requisitos para ser defendido y optar al grado de Doctor.

Y para que conste donde proceda, se firma este informe en Granada a 2 de diciembre del 2011

Dr. Ángel Gil Hernández

Dra. Carolina Gómez Llorente

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

Infoma:

Que el trabajo titulado “Efecto de las cepas probióticas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, sobre la respuesta inmunitaria en células intestinales humanas” ha sido realizado por Miriam Bermúdez Brito en las instalaciones del Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Granada, donde están ubicados los laboratorios del grupo de investigación CTS-461 Bioquímica Nutricional: Implicaciones terapéuticas, perteneciente a este Departamento.

Y para que conste donde proceda, se firma este informe en Granada a 2 de diciembre del 2011

Dr. Alberto Vargas Morales

Este estudio forma parte del Proyecto nº3143 “Caracterización de la actividad probiótica de las bacterias *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 y *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035”, suscritos por la empresa Hero España S.A, la Universidad de Granada y la Fundación General Universidad de Granada-Empresa.

ABREVIATURAS

APC	Célula presentadora de antígenos
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
DAA	Diarrea asociada al uso de antibióticos
DAMP	Patrones moleculares asociados al daño
DC	Células dendríticas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EII	Enfermedades inflamatorias intestinales
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
FAE	Epitelio asociado al folículo
FBS	Suero fetal bovino
FUFOSE	<i>Functional Food Science in Europe</i>
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
ILSI	<i>International Life Sciences Institute</i>
LPS	Lipopolisacárido
MALT	Tejido linfoide asociado a la mucosa
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MRS	Medio <i>Man Rogosa Sharpe</i>
NF- κ B	Factor de transcripción nuclear <i>kappa</i> B
NOD	Dominios de unión a oligonucleótidos
PAMP	Patrones moleculares asociados a patógenos

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PRR	Receptores reconocedores de patrones
RNA	Ácido ribonucleico
TGF- β	Factor de transformación del crecimiento tipo beta
TLR	Receptor análogo a <i>Toll</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral- α
UFC	Unidades formadoras de colonias bacterianas



*A las personas que más quiero:
mis padres, mi hermana y Luis*

A mis abuelos

The background features the word "Gracias" repeated in various sizes, fonts, and colors (dark blue, light blue, grey). In the lower-left corner, a faint, circular emblem is visible, containing a stylized eagle with spread wings and the text "GRANATA" in an arc above it. The entire image has a light, textured appearance.

Gracias
Gracias
Gracias
Gracias
Gracias
Gracias
Gracias
Gracias
Gracias
Gracias

AGRADECIMIENTOS

"No hay deber más necesario que el de dar las gracias."

Marco Tulio Cicerón

Recordando a Machado: “*Caminante, no hay camino, se hace camino al andar*”, esta tesis refleja fielmente este verso y es el fruto de mucho trabajo, esfuerzo y dedicación, pero bien valen su recompensa. Durante estos años, no me ha faltado ayuda que ha hecho que esta etapa que hoy termina haya sido más llevadera. Por tanto, es mi deber agradecer a todos los que me han tendido una mano desde que me embarqué en esta aventura apasionante que es la ciencia y a los que sin duda les debo gran parte de la presente tesis.

En primer lugar, me gustaría hacer mención a la labor esencial desarrollada por mi jefe y director de esta tesis, Dr. Ángel Gil Hernández. Estimado Ángel, no existen las palabras para darte las gracias por tu apoyo incondicional, por creer en mí desde el principio y guiarme en mi formación. Desde el primer momento, durante la entrevista de trabajo, fue una sorpresa descubrir que entendíamos la ciencia de la misma forma: eres el ejemplo de que con buenos principios se obtienen buenos resultados y que la motivación es el elemento más importante de todo este engranaje. De ti me llevo con cariño el esfuerzo y la dedicación en cada detalle. Ha sido una gran satisfacción trabajar contigo y nunca sabré como agradecerte todo lo que has hecho por mí. Gracias de corazón.

En segundo lugar, gracias a Carolina y a Sergio, con los que he desarrollado este trabajo. Sergio, sé que estás lejos, pero gracias por tu ayuda. Sabes que cuentas conmigo para lo que necesites.

A continuación, me gustaría expresar mi agradecimiento más sincero a la empresa Hero España S.A, que gracias a su financiación este estudio ha sido posible.

Asimismo, me gustaría agradecer a Noah Shroyer, que me haya dejado formar parte de su equipo durante los tres meses que he realizado mi estancia en Cincinnati. Gracias por tenderme una mano y por tu amabilidad. *Noah, so many thanks for your support and your help when I was there!*

Asimismo, me gustaría agradecer a todos los componentes del INYTA y, en general, a todos los que hayan participado en esta tesis de una u otra manera. Especialmente, gracias a Antonio, por hacernos un huequito en su laboratorio y ayudarnos siempre.

A continuación, quería agradecer “a mis niñas” su ayuda, porque además de compañeras, son amigas. Por eso, dejando a un lado las formalidades, empiezo...Gracias a Maricruz, ¡Mi amoll! Gracias por tu ayuda, por esas interminables horas en el luminex y los archivos malditos (jiji). Thank you for loving me! (y gracias otra vez jiji). A María Borja (¡nunca

entendí porqué decimos su apellido si es la única maría! Única e irrepetible, of course!), nuestra “marde granaina”, gracias por esos desayunos, chistes, historias, refranes (eso estaba claro), pero sobre todo por tu compañía. A Josune, mi niña simplemente gracias por tanto cariño y por ser así, no cambies nunca, ¡te mereces lo mejor! A Vivi Ml (jiji en una de estas me borras de verdad), ¡cómo extrañé tus bailes durante mi estancia! ¡Gracias por estar ahí siempre, por ser un solete y tan linda! A Carola, porque sé que estés donde estés puedo y puedes contar conmigo. A Susu, por ayudarme desde el primer día, gracias por todo lo que hemos compartido y por ser tan especial. A Belén, *my international friend forever* jiji gracias por estar ahí siempre, por tus mails, por tus palabras, por tantas risas y buenos momentos, ¡gracias de verdad! ¡Me has ayudado un montón iff!; a Érika (ups! Sigo intentando reformarme jiji pero yo creo que ya lo damos por perdido ¿no?), *my iff, too!!!!* Gracias mi niña, por todo, por lo que me has ayudado con los trámites, pero sobre todo por no olvidarte de mí, por tu compañía, por escribirme y darme ánimos, por tu amistad y buenos momentos, por conciertos buenos...y conciertos malos (jajaja aún no me creo que fuera tan malo jajaja) ¡gracias de corazón! ¡A mi Lauris! ¡!!!Qué no me olvido de tíiiiiiiiiiiii!!!! ¡!!!Eso nunca!!! Gracias de verdad por escucharme, por tus palabras y por estar ahí aguantándome cada día, incluso en Cincinnati (jiji), ¡sé que vaya donde vaya me llevo una buena amiga! Gracias de verdad, sabes que para lo que necesites ahí estaré siempre ¿si? Por supuesto, tampoco puedo olvidarme de María José, ay mi cielo, por tus lindas palabras (¡pero que “frejcura”!), y de Carmen, por tus buenas vibraciones. Gracias también a Anabel, por ayudarme con el máster, pero sobre todo, por tu compañía. Bueno chicas, lo dicho, gracias a todas, saben que en mí tienen una amiga y que cuentan conmigo para lo que necesiten. Esto parece una declaración jiji No cambien nunca y lo más importante... ¡no me olviden!

Gracias también a Luis por tus consejos de la embajada, ¡tenías toda la razón! Y a Chiqui, ¡por tus firmas! (jiji) También, me gustaría reflejar unas palabras para Emilio e Ignacio, por tantas historias mañaneras (véase calle recogidas jiji) y tantos buenos ratos que hemos compartido y que nunca olvidaré.

Además, aunque sea anterior a esta tesis, no puedo olvidarme de Michael, Claudia y Helge, que gracias a su ayuda y su apoyo me hicieron sentir parte del equipo el tiempo que pasé en Bremen. *Vielen Dank! Ich vermisse euch sehr aber ich hoffe dass wir in die Zukunft noch wieder treffen können!* (Los echo mucho de menos y ojalá el destino vuelva a cruzar nuestros caminos).

Me gustaría hacer una mención especial a mis amigas de la facultad: Silvi, Elena y Virginia. Hace unos años empezamos esta carrera juntas y quiero agradecerles su amistad, que no me

ha faltado ni un sólo día desde que nos conocimos. Gracias chicas, porque sé que vaya donde vaya puedo contar con ustedes y que la distancia que nos separa es sólo física porque en mi mente las tengo siempre presentes. Asimismo, gracias también a mi amiga Cris, que me ha ayudado siempre en todo lo que he necesitado. ¡Gracias por estar ahí Cris!

Por último, pero no menos importante, mi agradecimiento más sincero va para las personas a las que dedico esta tesis, a los que más quiero.

A mis padres, porque ustedes son mi vida, gracias a ustedes soy lo que soy, por enseñarme que el trabajo siempre tiene su recompensa, por no dejarme caer, por estar ahí siempre, en los momentos buenos, pero sobre todo, en los malos. No me falten nunca. Gracias por ser la luz que alumbra mi camino, no hay palabras para expresar todo lo que me han ayudado y me ayudan cada día. Sin ustedes no soy nada. ¡Gracias papitos! ¡Los quiero por encima de todo!

A mi hermana, ay Yaya, ¡gracias! Gracias por escucharme, por ayudarme con “problemas informáticos” (¡¡¡¡, gracias también a Pris, Pris 1- NCSS 0, ¡¡¡¡), por animarme cuando estaba triste (1 con el universo ¡¡¡¡), por ser tan especial, por cuidarme, porque aunque estemos lejos, yo sé que siempre estás y estarás a mi lado (y yo al tuyo)... Gracias por ser mi angelita de la guarda, te necesito mucho y ojalá pronto estemos más cerquita...Te extraño... Te quiero demasiado, Yaya. ¡No me faltes nunca porfi! ¡Siempre juntas!

Gracias a Luis, por aguantarme cada día, que ya sé que no es fácil y en estos últimos tiempos menos todavía. Gracias por tener siempre una palabra de cariño, por hacer que cada día sea mejor que el anterior...pero sobre todo por demostrarme después de tantos años que siempre sabes sacarme una sonrisa y que vaya a donde vaya (que nunca se sabe ¡¡¡¡) tú siempre estarás a mi lado. ¡Gracias por quererme! ¡Te quiero más que a nada!

En definitiva, ustedes son los que mueven mi mundo y sin ustedes nada de esto sería posible. Gracias por creer en mí, por ser mi energía, mi motivación, los primeros que celebran mis alegrías y los que no dejan que me hunda cuando llegan las penas. ¡Gracias! Esta tesis les pertenece ¡muacks!

Finalmente, las últimas palabras se las dedico a mis abuelos. Yo sé que desde allá arriba, ustedes guían mis pasos y espero que ahora mismo tengan una sonrisa y se sientan muy orgullosos de mí. Ojalá estuvieran aquí para celebrarlo conmigo. Los echo de menos pero sé que siempre me acompañan y me cuidan. Los quiero cada día más y no los olvido.

Gracias a todos los que he mencionado y a aquellos a los que haya podido olvidar sin mala intención. Gracias por hacer posible esta tesis y por formar parte de mi vida.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	29
OBJETIVOS	33
ANTECEDENTES	37
SISTEMA INMUNITARIO INTESTINAL	37
GENERALIDADES	37
ESTRUCTURA	38
CÉLULAS EPITELIALES INTESTINALES	42
CÉLULAS DENDRÍTICAS	43
Origen	43
Maduración y función	44
CÉLULAS T	45
LA MICROBIOTA INTESTINAL	47
COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA	47
ADQUISICIÓN DE LA MICROBIOTA	48
FACTORES QUE INFLUYEN EN LA COMPOSICIÓN DE LA MICROBIOTA	50
FUNCIONES DE LA MICROBIOTA	51
INTERACCIÓN ENTRE MICROBIOTA Y SISTEMA INMUNITARIO INTESTINAL	52
SISTEMA INMUNITARIO INNATO	54
Barreras del sistema inmunitario innato	54
Receptores tipo Toll (<i>Toll-like receptors</i> , TLR)	55
SISTEMA INMUNITARIO ADAPTATIVO	61
TOLERANCIA ORAL A ANTÍGENOS	62
PROBIÓTICOS	64
RESEÑA HISTÓRICA Y DEFINICIÓN	64
MICROORGANISMOS UTILIZADOS COMO PROBIÓTICOS	65
EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS PROBIÓTICOS	66
Probióticos y diarrea	67
Probióticos y enfermedades intestinales	69
Probióticos y alergias	71
Probióticos y reducción de la colesterolemia	72
Probióticos y cáncer	74
MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS	75
Adhesión intestinal	76
Producción de compuestos antimicrobianos	77
Exclusión competitiva de patógenos	78
Inmunomodulación	79
Modulación de la expresión génica en células intestinales	82

MATERIALES Y MÉTODOS **89****MATERIALES** **89**

BACTERIAS	90
Origen de las cepas probióticas de estudio	90
Obtención del sobrenadante probiótico libre de células	91
Patógenos ensayados	91
LÍNEAS CELULARES	92
Preparación de las células dendríticas y células T	93

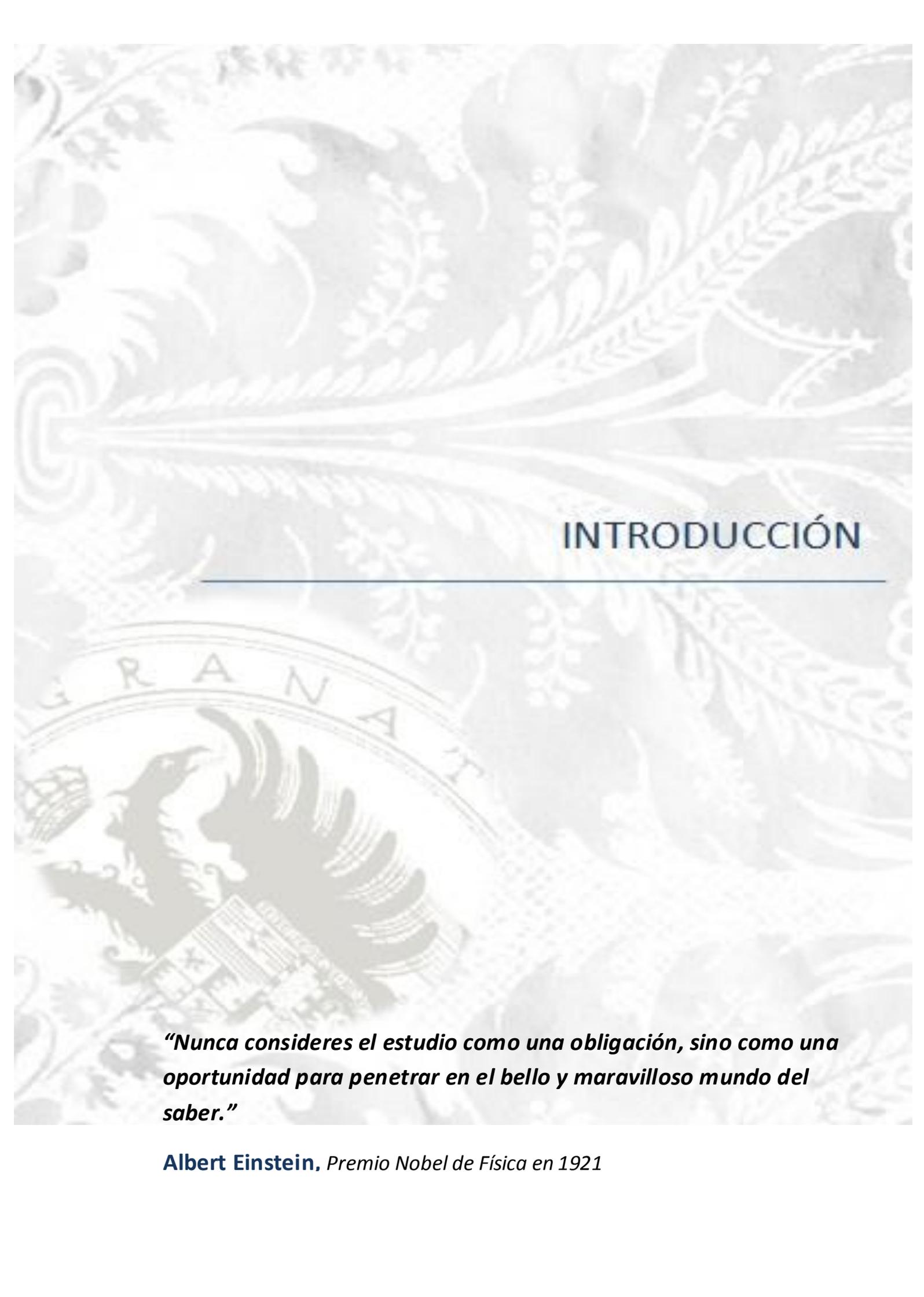
DISEÑOS EXPERIMENTALES **95**

EXPERIMENTO 1: CONTACTO DIRECTO DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN PRESENCIA DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS	
Objetivos.	95
Método de ensayo.	95
Grupos de ensayo	97
Determinación de citoquinas	98
Estudio de la viabilidad celular	99
Expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria	100
EXPERIMENTO 2: CO-CULTIVO DE CÉLULAS CACO-2 Y CÉLULAS DENDRÍTICAS EN PRESENCIA DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS	
Objetivo.	101
Método de ensayo.	101
Viabilidad celular	104
Determinación de citoquinas	104
Expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria	104
EXPERIMENTO 3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS T	
Objetivo.	105
Método de ensayo.	105
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	107
Expresión de los resultados	107
Análisis estadístico	108
Algoritmos de agrupamiento	108

RESULTADOS **111**

EXPERIMENTO 1: CONTACTO DIRECTO DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS EN PRESENCIA DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS	
Determinación de citoquinas	111
Estudio de la viabilidad celular	127
Expresión génica	128
EXPERIMENTO 2: CO-CULTIVO DE CÉLULAS CACO-2 Y CÉLULAS DENDRÍTICAS, EN PRESENCIA DE LAS CEPAS PROBIÓTICAS AISLADAS	
Determinación de citoquinas	150
Estudio de la viabilidad celular	159
Expresión génica	160

EXPERIMENTO 3. ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS T	203
DISCUSIÓN	209
CONTACTO DIRECTO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS, EN PRESENCIA DE PROBIÓTICOS Y PATÓGENOS	210
CO-CULTIVO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y CACO-2, EN PRESENCIA DE PROBIÓTICOS Y PATÓGENOS	215
ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS T	226
CONCLUSIONES/CONCLUSIONS	231
SUMMARY	237
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	247

The background of the page is a light gray, repeating pattern. It features a stylized eagle with its wings spread, perched on a banner. Above the eagle, the word "GRANATA" is written in a semi-circular arc. The eagle is surrounded by decorative foliage and leaves. The overall style is reminiscent of a traditional textile or wallpaper pattern.

INTRODUCCIÓN

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.”

Albert Einstein, *Premio Nobel de Física en 1921*

INTRODUCCIÓN

Hasta finales del siglo XX, la meta en la alimentación humana era asegurar un aporte adecuado de energía y nutrientes en la dieta. Actualmente, la creciente preocupación por comer sano ha cambiado el concepto de nutrición, que procura, además de los objetivos tradicionales, la promoción de la salud y el bienestar (Vasiljevik & Shah, 2008). La industria alimentaria ha evolucionado con este nuevo concepto desarrollando gran cantidad de productos que contribuyen a la prevención de enfermedades crónicas. En este ámbito, aparecen los **alimentos funcionales** (FuFoSe, 1999; Mollet *et al.* 2002), cuyo desarrollo se basa en la relación entre dieta y salud (Aranceta & Gil, 2010).

El primer uso del término "alimento funcional" se debe a los japoneses, quienes hace más de quince años empezaron a desarrollar estos productos, principalmente basados en la incorporación de bacterias lácticas y oligosacáridos (Stanton *et al.* 2005). Sin embargo, el origen de los alimentos funcionales se remonta a Hipócrates, que decía "*Que la comida sea tu alimento y el alimento tu medicina*". Los alimentos funcionales, son como su propio nombre indica, alimentos *per se*: no se trata de cápsulas ni de comprimidos; por el contrario, son elementos que forman parte de una dieta o modelo alimentario a los cuales se les reconoce un efecto potencialmente beneficioso para el bienestar de los individuos y para su salud (FuFoSe, 1999; Aranceta & Gil, 2010). La respuesta del organismo ante el consumo de un alimento funcional depende de distintos factores, incluyendo la genética, el estado fisiológico y la composición de la dieta (Aranceta & Gil, 2010).

Dentro de los alimentos funcionales, se encuentran los **probióticos**, microorganismos vivos que, ingeridos en cantidades suficientes, modulan o actúan sobre determinadas funciones del organismo, produciendo un efecto beneficioso, más allá del puramente nutricional, como contribuir al equilibrio de la microbiota intestinal del huésped y potenciar el

sistema inmunitario (FAO, 2002). De Vrese y Schrezenmeir (2008) han redefinido el concepto, puntualizando que un probiótico es “un preparado o producto que contiene microorganismos definidos, viables y en número suficiente para modificar la microbiota de un ecosistema del hospedador, ejerciendo como consecuencia efectos beneficiosos sobre la salud”. En este aspecto es importante destacar que la FAO recoge que los datos obtenidos con un probiótico específico no son extrapolables a otros alimentos que contengan una cepa probiótica concreta u otros microorganismos probióticos (FAO, 2001). Además, está suficientemente descrito el hecho de que distintas cepas de la misma especie ejercen distintos efectos en el hospedador (Aureli *et al.* 2011).

Entre los microorganismos empleados con fines probióticos, las bacterias ácido lácticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* ocupan con diferencia el lugar más destacado (Gourbeyre *et al.* 2011), completándose la lista con otras bacterias, como *Escherichia coli* y *Bacillus cereus*, así como levaduras, principalmente, *Saccharomyces boulardii* (Petrof, 2009). El efecto beneficioso depende de la cepa utilizada, la dosis, forma de administración, así como de características inherentes al huésped (Aureli *et al.* 2011).

Los probióticos han sido utilizados en un gran número de patologías, siendo eficaces en la prevención de la diarrea infecciosa aguda por bacterias y virus, la mejoría de procesos de agudización de varias enfermedades intestinales, ayuda a mejorar los síntomas de la intolerancia a la lactosa y de varios tipos de alergias e intolerancia a alimentos, así como a mejorar la absorción de minerales y la generación de péptidos hipotensores (Liong, 2007).



OBJETIVOS

“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber.”

Albert Einstein

OBJETIVOS

Este estudio forma parte del proyecto nº 3143 suscrito por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada, la Fundación General Universidad de Granada Empresa y HERO ESPAÑA S.A., titulado “Caracterización de la actividad probiótica de las bacterias *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 y *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035”.

En este contexto, y de acuerdo con lo anteriormente descrito, se plantea el presente trabajo de investigación que tiene como **objetivo general** estudiar el efecto de estas tres cepas probióticas en la respuesta inmunitaria en células intestinales humanas en presencia y ausencia de enteropatógenos.

Para ello, se consideran los siguientes **objetivos específicos**:

-Determinación del cambio de expresión génica de los genes implicados en la cascada inflamatoria de los receptores de tipo Toll (TLR) en células dendríticas, cultivadas en presencia de cepas probióticas y de bacterias patógenas.

-Determinación del cambio de expresión génica de los genes implicados en la cascada inflamatoria de los TLR en células dendríticas, co-cultivadas con células epiteliales intestinales Caco-2, en presencia de cepas probióticas y de bacterias patógenas.

-Determinación de la producción de citoquinas en un modelo *in vitro* de co-cultivo de células epiteliales intestinales y células dendríticas expuestas a la presencia de las cepas probióticas y de las bacterias patógenas.

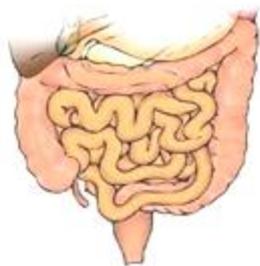
-Determinación de la proliferación de las células T autólogas, en las células dendríticas co-cultivadas con las cepas probióticas y las bacterias patógenas.



ANTECEDENTES

“Si uno no puede explicar lo que ha estado haciendo, su trabajo carecerá de valor.”

Erwin Schrödinger, Premio Nobel de Física en 1933



SISTEMA INMUNITARIO

GASTROINTESTINAL

SISTEMA INMUNITARIO INTESTINAL

Generalidades

El intestino, debido a su extensión, es particularmente vulnerable como lugar de infección y como puerta de entrada al resto del organismo. Su función principal es la absorción de nutrientes, electrolitos y agua, así como la eliminación de desechos (Cerovic *et al.* 2009). Sin embargo, más allá de la función digestiva, constituye una pieza clave del sistema inmunitario. La superficie intestinal, en contacto continuo con el medio exterior (Round & Mazmanian, 2009), recibe diariamente una enorme carga antigénica, por lo que debe ser capaz de discernir entre patógenos invasivos y antígenos inocuos procedente de los alimentos y de las bacterias comensales. Por este motivo, el sistema inmunitario intestinal (Stockinger *et al.* 2011) representa el mayor órgano inmunológico del cuerpo humano (Artis, 2008), ya que contiene la mayor colección de células inmunocompetentes del organismo (Alverdy & Chang, 2008).

Para el correcto funcionamiento y defensa del organismo, es necesario que se establezca un equilibrio entre el sistema inmunitario intestinal y la microbiota (Van den Abbeele *et al.* 2011). La alteración de este balance desencadena desórdenes inflamatorios crónicos (Hansen *et al.* 2010) como la enfermedad inflamatoria intestinal y alergias alimentarias. Por tanto, esta interacción es esencial para el mantenimiento de la homeostasis intestinal y el bienestar del individuo (Van't Land *et al.* 2011).

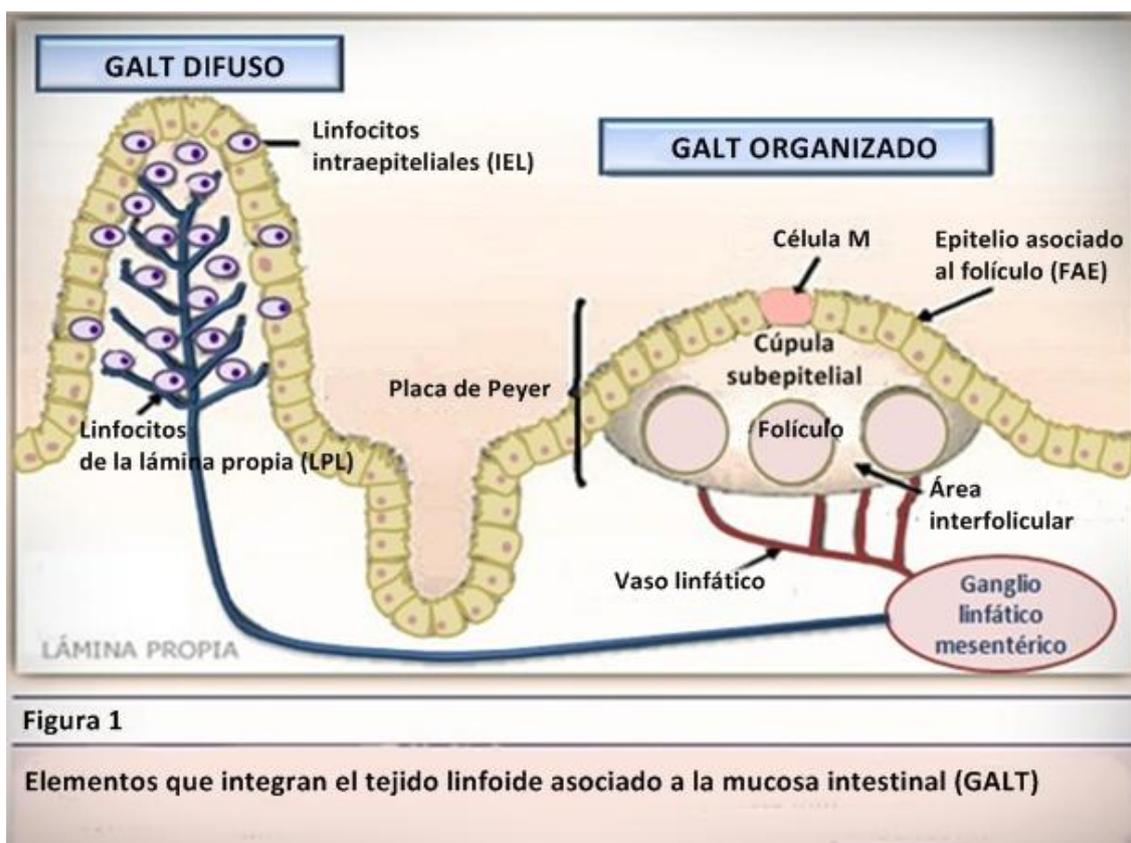
Estructura

El sistema inmunitario intestinal está compuesto por el tejido linfoide asociado al intestino o GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*), agregados linfoides en el intestino grueso y células inmunitarias diseminadas a lo largo de la lámina propia y del epitelio del tracto gastrointestinal (Cerovic *et al.* 2009; Aureli *et al.* 2011), que se encuentran en contacto con el resto del sistema inmunitario vía nódulos mesentéricos linfoides locales (Rakoff-Nahoum & Medzhitov, 2008). Estas regiones están interconectadas, pero separadas del medio externo, por mucus y la barrera epitelial (Takahashi *et al.* 2009). Además, el sistema inmunitario intestinal contiene más de cien millones de neuronas (Cognini *et al.* 2011), segrega más de veinte neurotransmisores idénticos a los producidos por el cerebro (serotonina, dopamina, noradrenalina, etc.) y concentra el 80-85% de las células inmunitarias de un individuo sano adulto (Delcenserie *et al.* 2008; Alverdy & Chang, 2008); estos componentes locales establecen relaciones con todo el organismo, siendo cruciales en la regulación de la inmunidad innata y adaptativa (Turner, 2009). Por esta razón, el GALT es un elemento importante en la capacidad inmunológica total del huésped (Brandtzaeg, 2009) y representa el mayor órgano del sistema inmunitario humano (10^6 linfocitos/g) (Valdés-Ramos *et al.* 2010).

Anatómicamente, el GALT se divide en dos compartimentos, tal como se muestra en la figura 1:

⇒ *GALT organizado*, inductor de la respuesta inmunitaria intestinal, constituido por folículos linfoides aislados, folículos linfoides asociados o placas de Peyer y ganglios linfáticos mesentéricos. Los sitios inductivos son responsables de capturar los antígenos luminales y, por tanto, de promover la respuesta inmunitaria.

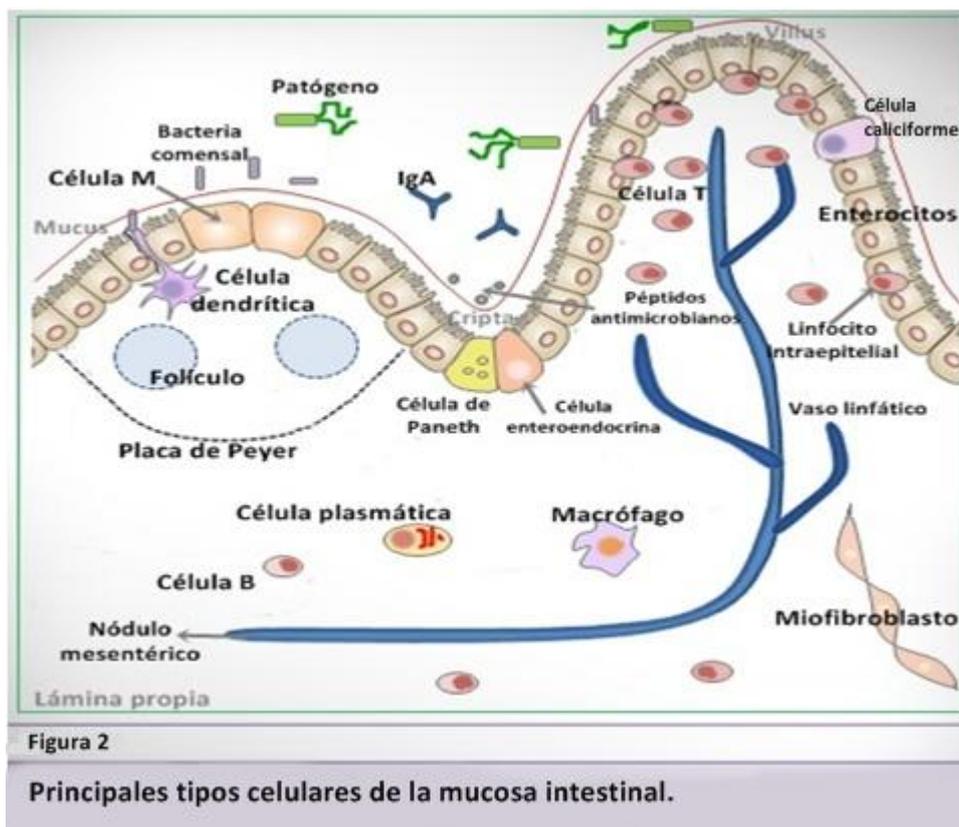
⇒ *GALT difuso*, efector de la respuesta inmunitaria, integrado por poblaciones de linfocitos dispersas en el entramado epitelial (*intraepithelial lymphocytes*, IEL) o en la lámina propia intestinal (*lamina propria lymphocytes*, LPL). En este punto, las células inmunitarias se diferencian y ejercen su función (Schenk & Müller, 2008; Cerovic *et al.* 2009; Magalhaes *et al.* 2007; Dogi *et al.* 2010).



La cara luminal del tracto gastrointestinal comprende varias capas que interactúan con el contenido de este espacio, como son la mucosa, la lámina propia, el glicocálix y una capa de mucus; todas ellas contribuyen a la función de “barrera” (Cencic & Langerholm, 2010).

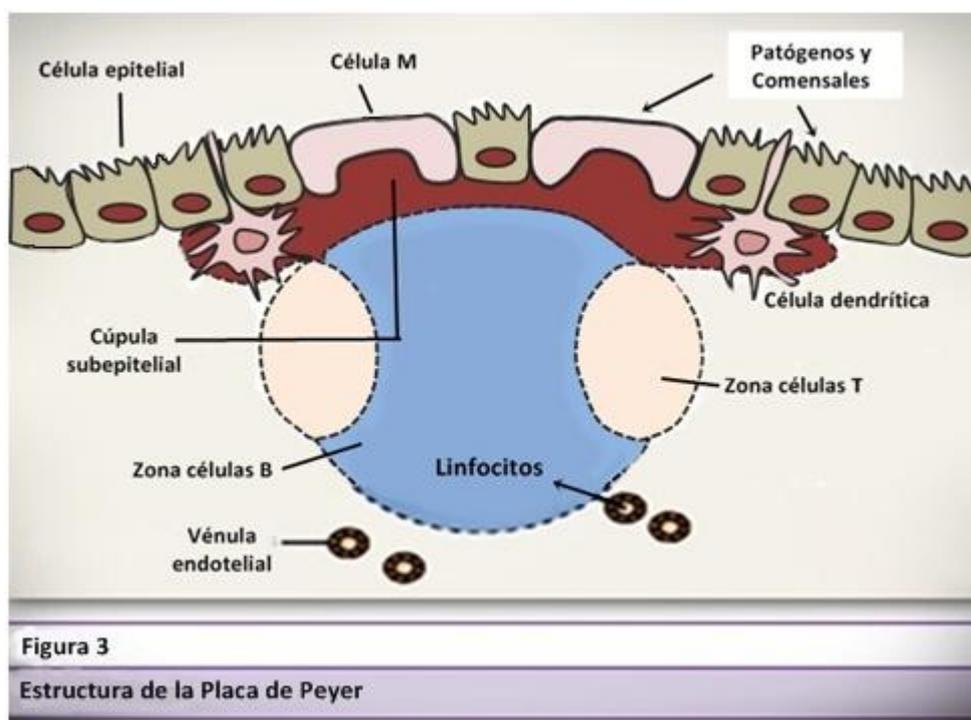
La mucosa intestinal ocupa 250-400 m² de extensión total (Aureli *et al.* 2011). Debido a su amplitud, supone la mayor interfase entre el sistema inmunitario y el medio externo (Chahine & Bahna, 2010). Quizás este hecho explica la alta proporción de células linfoides presentes en la mucosa intestinal, con un 80% de todas las células B del cuerpo humano (Pai & Kang, 2008), así como una gran presencia de células T y mieloides (macrófagos, neutrófilos, eosinófilos y mastocitos) (Sharma *et al.* 2010). Además, la superficie intestinal se ve aumentada gracias a la formación de vellosidades, proyecciones que llegan al lumen (Tezuka & Ohteki, 2010) y que contienen sangre y vasos linfáticos a lo largo de su eje, rodeadas por células que constituyen la lámina propia (Cerovic *et al.* 2009). La superficie luminal de las vellosidades está recubierta por células especializadas, los enterocitos, cuya función primordial es la captación de nutrientes. Esta barrera se encuentra reforzada por la presencia de una capa, compuesta por mucus y glicocálix, producida por las células caliciformes (Moretó & Pérez-Bosque, 2009; Maldonado-Contreras & McCormick, 2011), siendo la primera línea de

defensa frente a la gran diversidad de bacterias presentes en esta región (Rescigno *et al.* 2008) (Figura 2).



La mayoría de células intestinales se dedican a la absorción de nutrientes (pequeñas moléculas como pueden ser los aminoácidos, azúcares, etc.), pero algunas de ellas se han modificado para permitir la entrada de antígenos, generalmente, sustancias más grandes como es el caso de oligopéptidos, oligosacáridos o incluso microorganismos enteros (Van Wijk & Knippels, 2007). La entrada de estas sustancias antigénicas de mayor tamaño se produce por unos sitios especializados de la mucosa intestinal, las Placas de Peyer (Singh *et al.* 2009), distribuidas a lo largo del intestino delgado, sobre todo, en el íleon (Fries & Griebel, 2010). Estas placas son consideradas como un tejido linfoides secundario y están constituidas por varios conglomerados de células B, es decir, 10-1000 folículos individuales, que forman agregados linfoides, así como células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas (Ig) A (Salzman, 2011), rodeados por áreas ricas en células T, células dendríticas y macrófagos (Sipos *et al.* 2010), y separados del lumen intestinal por una monocapa de células o epitelio asociado al folículo (*follicle-associated epithelium*, FAE) (Ishii *et al.* 2010) (Figura 3). Son esenciales para

la modulación de la respuesta inmunitaria intestinal (Van Wijk & Knippels, 2007) e inflamatoria o tolerancia (Ishii *et al.* 2010). Su superficie está recubierta por algunas células secretoras de moco y unas células epiteliales aplanadas con pocas vellosidades, las células M (*Microfold* o membrana) (Lotz *et al.* 2007).



Las células M suponen menos del 1% del total de células epiteliales del intestino (Maldonado-Contreras & McCormick, 2011), y se desarrollan a partir de enterocitos en las criptas que rodean las Placas de Peyer (Voedisch *et al.* 2009). Dichas células transportan antígenos luminales, incluyendo bacterias y virus (Soloff & Barratt-Boyes, 2010), sin modificarlos y los liberan intactos a nivel de las placas de Peyer (Tezuka & Ohteki, 2010). Como particularidad, estas células pierden el borde apical, generando microproyecciones que facilitan la endocitosis y transcitosis de los microorganismos (Henderson *et al.* 2011). Por tanto, actúan como una puerta de entrada del antígeno al interior del cuerpo humano (Sharma *et al.* 2010) y son cruciales en el inicio de la respuesta inmunitaria mucosa y sistémica (Sipos *et al.* 2010).

Por debajo del FAE, yace una región difusa denominada cúpula subepitelial, integrada por células dendríticas y algunos macrófagos. En este área, se forman estructuras idénticas a los nódulos linfoides, rodeados por zonas ricas en linfocitos T, que proceden de la sangre a

través de las venas endoteliales superiores. Adyacentes a FAE, se localizan los folículos linfoides aislados que, al igual que las placas de Peyer, contienen células dendríticas, B y M (Maldonado-Contreras & McCormick, 2011; Valdés-Ramos *et al.* 2010).

Después de la inducción a nivel de las Placas de Peyer y folículos linfoides aislados, las células inmunitarias, como eosinófilos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, así como linfocitos T y B, migran a la lámina propia (Sipos *et al.* 2010). Esta capa, formada por tejido conectivo y rica en células inmunitarias, previene la entrada de patógenos, así como la difusión de los mismos a través de la barrera intestinal. Asimismo, coopera con los nódulos mesentéricos y el endotelio vascular en la diferenciación y expansión celular dentro del GALT (Acheson & Luccioli, 2004).

Para el correcto funcionamiento y defensa del organismo, el sistema inmunitario intestinal debe discriminar entre patógenos potenciales y bacterias comensales (Lee & Mazmanian, 2010), activando mecanismos de defensa frente a patógenos (Westendorf *et al.* 2010), mientras evita respuestas inflamatorias hacia la microbiota residente (Coombes & Powrie, 2008). Varios tipos celulares son vitales en el control de las respuestas inmunitarias intestinales y el mantenimiento de la homeostasis intestinal: células epiteliales intestinales, células dendríticas y células T (Rescigno *et al.* 2008).

Células epiteliales intestinales

El epitelio intestinal está compuesto al menos por seis linajes celulares diferentes (Maldonado-Contreras & McCormick, 2011), en el que los enterocitos son el tipo celular más representativo, superior al 80% del total de las células epiteliales intestinales. Los enterocitos presentan en su borde apical, en contacto con el lumen, unas proyecciones, llamadas *microvilli*, que actúan como una barrera física frente a patógenos (Roda *et al.* 2010). Estas células, además de ser necesarias para la absorción de nutrientes, agua y electrolitos y contribuir a la digestión, juegan un papel crucial en la logística del sistema inmunitario (Henderson *et al.* 2011). Su posición en primera línea y en contacto con la luz intestinal es crucial para el reconocimiento inicial de moléculas foráneas y para la generación de señales que se transmiten a las células inmunocompetentes (Thomas & Versalovic, 2010). La activación de los mecanismos de defensa depende en primer lugar del reconocimiento rápido a través de receptores innatos que detectan componentes estructurales comunes a bacterias o virus (Ng *et al.* 2010). La activación de esos sensores genera inmediatamente señales que convergen en

la migración de factores de transcripción, como el factor de transcripción nuclear Kappa B (NF- κ B) y otros, al núcleo celular, donde activan la expresión de genes responsables de la síntesis de proteínas pro-inflamatorias, básicamente citoquinas y enzimas inducibles, con capacidad de generar mediadores inflamatorios. De esta forma, las células epiteliales emiten señales con capacidad de atraer y activar leucocitos, aumentar el flujo sanguíneo, incrementar la permeabilidad capilar, etc. (Gil, 2010). Además, los enterocitos secretan gran variedad de proteínas antimicrobianas, como defensinas, lectinas tipo C, catelicidinas, que promueven la muerte de las bacterias, ya que actúan sobre la integridad de la pared bacteriana (Duerkop *et al.* 2009; Mukherjee *et al.* 2008). Por otra parte, los enterocitos están conectados entre sí mediante unas uniones, llamadas uniones estrechas o impermeables o *tight junctions*, que forman una barrera física frente a la penetración de patógenos (Magalhaes *et al.* 2007).

Los enterocitos no sólo tienen la capacidad de procesar y transportar activamente los antígenos hacia la lámina propia, sino además de actuar como células presentadoras de antígenos (APC), ya que expresan moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) I y II, que interactúan con las células efectoras (Madsen, 2006; Chahine & Bahna, 2010). Datos recientes sugieren que las células epiteliales intestinales, o bien factores derivados de éstas, influyen en la localización, función y migración de las subpoblaciones de células dendríticas (Shale & Gosh, 2009), así como en la expansión de las células T reguladoras en el intestino (Wershil & Furuta, 2008).

Células dendríticas

Las células dendríticas son una población heterogénea, con distintas subpoblaciones, distinguibles por la expresión superficial de marcadores, su función y su distribución en los tejidos, como por ejemplo la cavidad oral, intestino delgado, esófago y estómago (Fries & Griebel, 2010). Dentro del tejido linfoide gastrointestinal, las células dendríticas se localizan interconectadas en la monocapa epitelial, concentradas en los folículos linfoides aislados y compartimentadas en las placas de Peyer de la lámina propia (Varol *et al.* 2009).

Origen

En 1868, Paul Langerhans descubrió las células dendríticas en la piel, identificando un tipo de células clave entre la inmunidad innata y adaptativa, aunque no fue capaz de descifrar su funcionalidad ni naturaleza (Langerhans, 1868). Un siglo más tarde, dos científicos,

Steinman y Cohn (1973), las caracterizaron y las denominaron células dendríticas. Su nombre hace referencia a unas proyecciones ramificadas, similares a las dendritas de las neuronas (Watowich & Liu, 2010).

Las células dendríticas se originan en la médula ósea y se diseminan a través de la sangre a los distintos tejidos en el cuerpo (Soloff & Barrat-Boyes, 2010). Como todos los leucocitos, las células dendríticas se desarrollan a partir de progenitores hematopoyéticos; sin embargo, el origen exacto continúa siendo una incógnita. Varios trabajos sugieren que poseen un origen mieloide, común con monocitos, macrófagos y neutrófilos polimorfonucleares (Cerovic *et al.* 2009; Liu & Nussenzweig, 2010).

Atendiendo a su desarrollo, se pueden clasificar en células dendríticas convencionales, también denominadas mieloides, o células dendríticas plasmacitoides (Liu *et al.* 2009) y foliculares. Estas últimas no se desarrollan en la médula ósea y residen en los folículos de las células B de los órganos linfoides secundarios.

Maduración y función

Las células dendríticas son funcionales en dos estadios: células inmaduras y maduras (Rescigno & Di Sabatino, 2009). Las **células inmaduras** se encuentran en tejidos periféricos, actúan principalmente como células fagocíticas y presentan altos niveles de endocitosis y bajos de moléculas co-estimuladoras (Westendorf *et al.* 2010). Estas células sintetizan de forma abundante MHC-II, que es directamente dirigido a endosomas y lisosomas (Cerovic *et al.* 2009). De esta forma, los antígenos son capturados por estas células y llevados a los lisosomas, donde se unen a MHC-II (Ng *et al.* 2010). Tras detectar productos microbianos o entrar en contacto con citoquinas pro-inflamatorias, las células dendríticas inmaduras se transforman en **células dendríticas maduras**, reduciendo a mínimos la captura de antígenos pero aumentando excepcionalmente su capacidad de estimulación de las células T (López *et al.* 2010; Macdonald *et al.* 2011). Esta transición está acompañada de una gran reorganización plasmática, patente, sobre todo, por la redistribución de MHC-II desde los compartimentos intracelulares hacia la membrana plasmática (Cerovic *et al.* 2009). Al mismo tiempo, se incrementa la expresión en la superficie de la célula de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86), MHC-I y moléculas de adhesión a células T (CD48 y CD58), aumenta la capacidad de generar complejos funcionales péptido-MHC II y se reajusta su patrón de receptores de quimioquinas para facilitar su migración a los órganos linfoides (Rescigno & Di Sabatino, 2009). Además, las células dendríticas extienden largas prolongaciones o dendritas (realmente, repliegues de membrana),

que permiten incrementar las oportunidades de entrar en contacto con células T (Soloff & Barratt-Boyes, 2010). Tras estos cambios, las células dendríticas maduras migran a zonas ricas en células T, es decir, placas de Peyer o nódulos mesentéricos linfáticos, para activarlas e iniciar la respuesta inmunitaria (Macdonald *et al.* 2011).

Por todo lo descrito, el microambiente en el que se encuentran, es decir, citoquinas, quimioquinas y productos neuronales, contribuye a que las células presentadoras de antígenos (APC) puedan desarrollar su función (Schenk & Müller, 2008). Las células epiteliales intestinales expresan un amplio rango de factores inmunomoduladores, como CCL9 y CCL20 (Butler *et al.* 2006), dos quimioquinas que modulan el fenotipo y la función de las células dendríticas hacia células dendríticas tolerogénicas, las cuales secretan elevados niveles del factor de transformación del crecimiento tipo beta (TFG- β), citoquina anti-inflamatoria (Fries & Griebel, 2010; Westendorf *et al.* 2010). Esta simbiosis entre células epiteliales intestinales y células dendríticas parece ser un punto crítico en el mantenimiento de la salud intestinal (Tezuka & Ohteki, 2010).

Células T

El intestino contiene un gran número de linfocitos, incluso en ausencia de inflamación (Atarashi *et al.* 2011). Existen varias subpoblaciones de células T que, dependiendo de la naturaleza de la activación y el contexto, contribuyen a la homeostasis y tolerancia por distintos mecanismos (Spoerl & Li, 2011):

- Los linfocitos T citotóxicos o CD8⁺ están implicados en respuestas antivirales y poseen actividad antitumoral (Mesquita Júnior *et al.* 2010).

- Las células T CD4⁺ se dividen en células T cooperadoras (o *helper*) y T reguladoras (Figura 4):

- ✦ Las células Th1 son células inflamatorias, que liberan interferón gamma (IFN- γ) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), dando como resultado la activación de macrófagos y producción de Ig G. Participan en la inmunidad frente a patógenos intracelulares (Jutel & Akdis, 2011).

- ✦ Al contrario que las células Th1, las células Th2 producen IL-4, IL-5 e IL-13, citoquinas asociadas a la producción de inmunoglobulinas y eosinofilia. Estas células median en las

respuestas anafiláxicas mediadas por Ig E y alergias. Además, están implicadas en la defensa del huésped frente a parásitos (Westendorf *et al.* 2010).

✦ Por su parte, las células Th17 juegan un papel crucial en la defensa del huésped frente a infecciones producidas por bacterias y hongos (Dubin & Kolls, 2008), como *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* (Atarashi *et al.* 2011), pero con la particularidad que en condiciones patológicas, como la autoinmunidad, producen un estado de inflamación exacerbado (Steinman, 2008; Lavoie *et al.* 2010). Estas células se caracterizan por la producción de IL-17, IL-21, IL-22 y TNF- α , así como varias quimioquinas, que aumentan las respuestas de neutrófilos y la defensa de las mucosas como, por ejemplo, la expresión de péptidos antimicrobianos (Westendorf *et al.* 2010).

✦ Las células T reguladoras son esenciales en contrarrestar las respuestas inflamatorias (Rescigno & Di Sabatino, 2009), ya que tienen la capacidad de producir citoquinas inmunosupresoras, como IL-10 y TGF- β , que impiden la activación de las células T, así como la función de las células T efectoras (Jutel & Akdis, 2011).

Las células dendríticas son las únicas capaces de estimular la proliferación y diferenciación de las células T no activadas o *naïve* y memoria. Además, determinan el tipo de respuesta: tolerancia, inflamatoria o regulatoria (Ng *et al.* 2010).

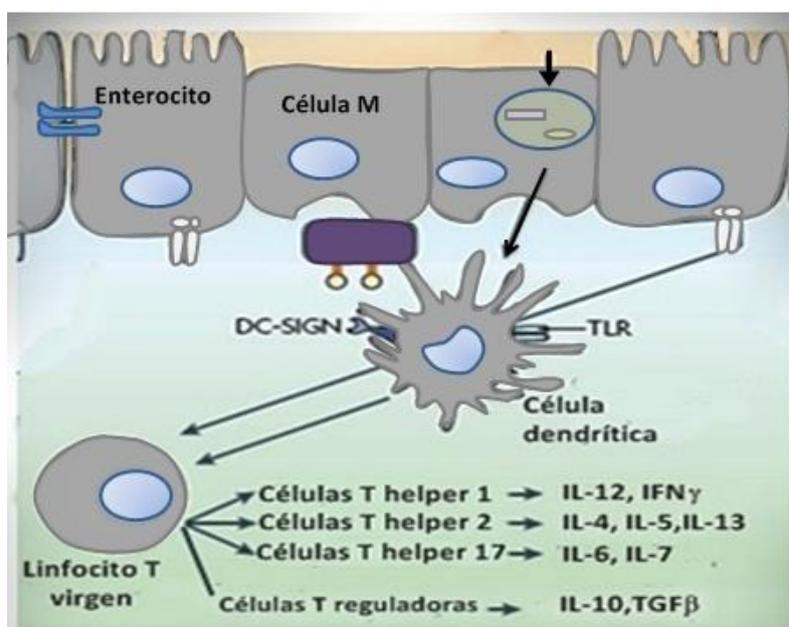


Figura 4

Proceso de diferenciación de los linfocitos T en una determinada subpoblación: efectora o reguladora..

- Por otra parte, los linfocitos intraepiteliales (IEL), localizados en el epitelio, desempeñan un papel fundamental ya que participan en la reconstitución del epitelio después de un daño en la mucosa (Magalhaes *et al.* 2007). Al contrario que la mayor parte de los linfocitos que presentan un receptor o TCR compuesto por dos cadenas α y β , éstos están formados por una cadena γ y δ . Esta característica le permite reconocer antígenos no proteicos sin procesarlos e independientemente de las moléculas MHC (Wesch *et al.* 2011).

-Otra pequeña subpoblación son las células T *natural killers* (NK), que producen grandes cantidades de citoquinas, y que pueden actuar en una gran variedad de respuestas, incluyendo autoinmunidad, rechazo a trasplantes y respuestas frente a patógenos (Pacifci, 2010).

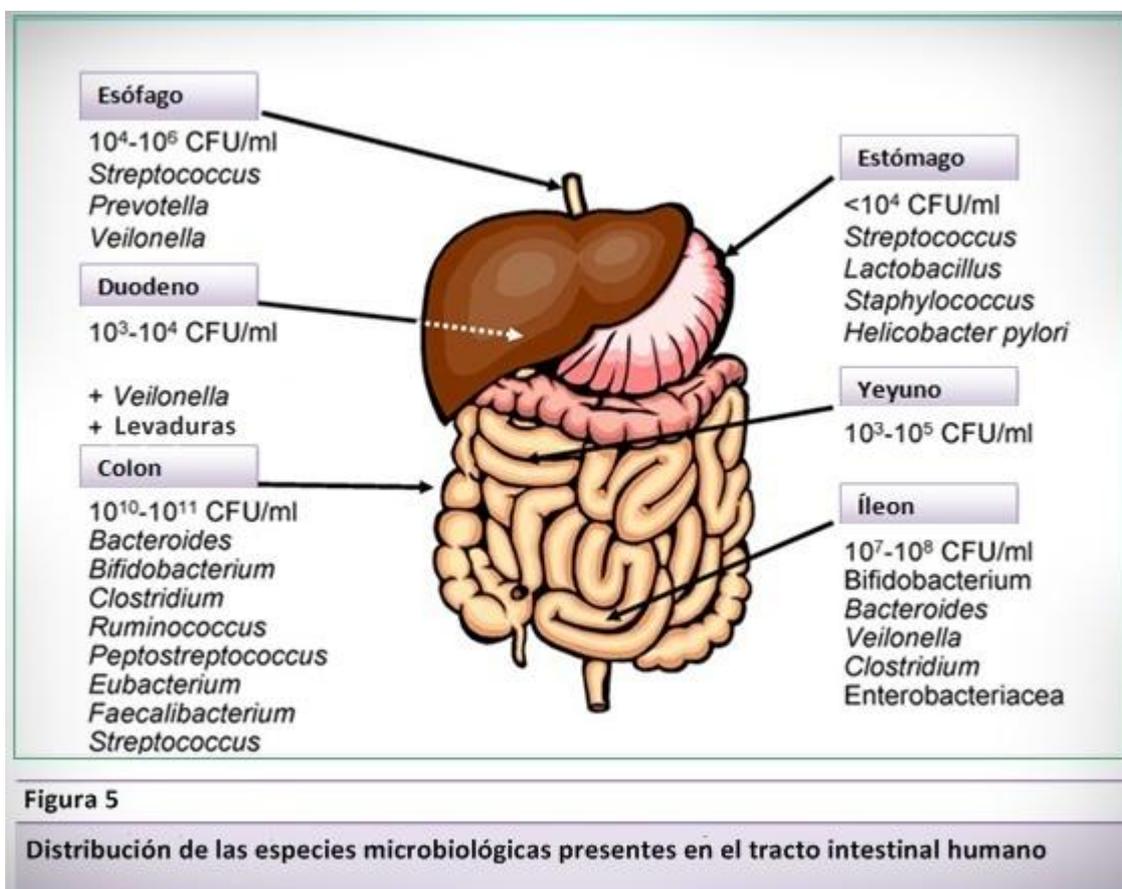
LA MICROBIOTA INTESTINAL

La población bacteriana del tracto gastrointestinal humano constituye un enorme ecosistema muy complejo que incluye muchos tipos de microorganismos (Savage, 1977; Bik *et al.* 2006); más del 95% viven en el tracto digestivo, sobre todo, en el colon (Hattori & Taylor, 2009). La densidad de microorganismos en el intestino delgado proximal y medio es relativamente baja, pero existe un aumento considerable en el intestino delgado distal, el cual puede alcanzar 10^9 UFC/ml del contenido luminal, y en el colon llega a 10^{11} - 10^{12} /g (Savage, 1977; Neish, 2009), siendo el 70% del número de microorganismos totales del cuerpo humano (Ley *et al.* 2006). Esto equivale a aproximadamente diez veces el número total de células individuales en el cuerpo humano (Palmer *et al.* 2007), representando un kilogramo del peso total del individuo (Scarpellini *et al.* 2010).

Composición de la microbiota

La microbiota está compuesta fundamentalmente por anaerobios estrictos, que dominan a los anaerobios facultativos y aerobios en dos o tres órdenes de magnitud (Pham *et al.* 2008). Aunque hay descritos más de cincuenta filos (*Phyla*) o clases (Schloss & Handelsmann, 2004), está caracterizada esencialmente por dos, *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, que constituyen el 90% de la microbiota intestinal presente en el intestino humano (Turnbaugh *et al.* 2009), mientras que *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria* y *Cianobacteria* se encuentran en menor proporción (Eckburg *et al.* 2005; Possemiers *et al.* 2010). Cada persona alberga unos cien billones de bacterias (Hahn *et al.*

2007) que pertenecen a unas 1.200-2.200 especies distintas (Qin *et al.* 2010). Sin embargo, un análisis reciente sugiere que la microbiota humana está constituida por más de 35000 especies bacterianas (Frank *et al.* 2007). En la Figura 5, se muestra la distribución de especies microbiológicas en el tracto gastrointestinal humano.



Adquisición de la microbiota

La evolución de la microbiota intestinal es notable con el paso de la edad. Al nacer, el intestino de los infantes es estéril y poco después del nacimiento comienza a ser colonizado por distintas bacterias (Dethlefsen *et al.* 2007; Domínguez-Bello *et al.* 2010) que habitan en la piel, la cavidad oral, la vagina y el tracto gastrointestinal (Gareau *et al.* 2010). Sin embargo, estudios recientes sugieren que el intestino fetal, en contacto con el líquido amniótico, estaría expuesto a distintos microorganismos (Indrio & Neu, 2011).

Las primeras bacterias que colonizan el intestino son bacterias aerobias y anaerobias facultativas, sobre todo, grandes cantidades de *Escherichia coli* (*E.coli*), estreptococos,

estafilococos y otras enterobacterias, a menudo alcanzando 10^8 - 10^{10} /g heces (Palmer *et al.* 2007). Gradualmente, estas bacterias reducen el potencial redox del intestino de los neonatos, permitiendo el crecimiento de anaerobios estrictos, como *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Clostridium*, los cuales se vuelven predominantes y reprimen la población de *E.coli* (Kelly *et al.* 2007; Mariat *et al.* 2009).

Estas bacterias que colonizan al recién nacido son principalmente de la madre y del medioambiente, siendo el tipo de parto, cesárea o vaginal, uno de los principales determinantes de la microbiota intestinal (Reid *et al.* 2010). Otro aspecto importante es la edad gestacional (prematuro frente a recién nacido a término), así como el uso de antibióticos en el periodo perinatal. En los partos vaginales, las comunidades que constituyen la microbiota proceden de la vagina de la madre, dominando especies como *Lactobacillus* spp, *Prevotella* spp, *Sneathia* spp (Nakamura *et al.* 2009), así como un incremento en bifidobacterias (Chen *et al.* 2007). Por el contrario, los partos realizados mediante cesárea están asociados con un aumento de géneros como *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Clostridia*, organismos prevalentes en el entorno hospitalario (Conroy *et al.* 2009), al igual que otros géneros como *Staphylococcus* spp, *Corynebacterium* spp o *Propionibacterium* spp, presentes en la piel de la madre (Nakamura *et al.* 2009). En estos niños, la colonización es tardía y existe una frecuencia menor de especies pertenecientes a los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *E.coli* (Ly *et al.* 2011).

La leche materna es también vehículo de bacterias del ácido láctico que contribuyen notablemente a la colonización del tracto intestinal del recién nacido (Lara-Villoslada *et al.* 2007; Reid *et al.* 2010). Los géneros más frecuentes son estafilococos, estreptococos, lactobacilos, micrococos, propionibacterias y bifidobacterias, ya que todos ellos tienen su origen en el pezón y alrededor de la piel, así como en los conductos galactóforos de la mama (Gueimonde *et al.* 2007; Martin *et al.* 2009). La leche materna reduce la permeabilidad intestinal en los lactantes, en comparación con aquellos alimentados con fórmula (Taylor *et al.* 2009). Varios componentes de la leche materna son vitales en la mediación de las defensas inmunitarias innata y adaptativa frente a patógenos microbianos (Rautava *et al.* 2009). Estos efectos son probablemente debidos a una acción sinérgica de inmunoglobulinas y otras muchas moléculas bioactivas presentes en la leche materna, como factores de crecimiento, citoquinas, nucleótidos, componentes celulares, oligosacáridos y lípidos (Gil & Rueda, 2002; Hanson & Silfverdal, 2009).

Con el destete ocurren cambios importantes y en unos cuantos meses la microbiota intestinal se torna semejante a la de un adulto (Vael & Desager, 2009). Así, las especies

bacterianas del intestino de un lactante de once meses son fundamentalmente *Bacteroides* y *Bifidobacterium* (Vaishampayan *et al.* 2010). Desde la infancia hasta la edad adulta el perfil de bacterias se mantiene relativamente estable (Robinson *et al.* 2010). Durante la niñez, las bacterias simbióticas tienen la capacidad de promover el crecimiento, inducir angiogénesis, optimizar la absorción de nutrientes, atenuar la inflamación intestinal y preparar las respuestas inmunitarias (Greer & O'Keefe, 2011). En el adulto, se observan pequeñas variaciones de miembros secundarios, como *Lactobacillus* spp (Rajilic-Stojanovic *et al.* 2009). Posteriormente, la transición hacia la vejez está caracterizada por un descenso en la población de bifidobacterias (Hopkins & MacFarlane, 2002), dejando paso a bacterias potencialmente más patógenas. Es interesante destacar que cada individuo posee un perfil de sus propias especies, distintas a las de los demás, si bien existe un conjunto de al menos cincuenta y siete especies bacterianas conservadas entre todos los individuos (Aureli *et al.* 2011; Eckburg *et al.* 2005; Gill *et al.* 2006).

Factores que influyen en la composición de la microbiota

Además de la composición de la microbiota de la madre, muchos otros factores contribuyen a la formación de la microbiota en el tracto gastrointestinal. La microbiota viene determinada, entre otros, por la edad, la dieta, el ambiente y la filogenia (Ley *et al.* 2008).

Varios estudios han demostrado que la genética del huésped influye en la composición de la microbiota (Ley *et al.* 2005), aunque muchos de estos efectos son indirectos, interviniendo en el metabolismo del huésped (Zhang *et al.* 2010).

Asimismo, se ha comprobado que la dieta también afecta a la composición de la microbiota (Dethlefsen *et al.* 2006), debido a que las bacterias tienen distintas preferencias por las fuentes de energía. Así, los polisacáridos presentes en las plantas son el sustrato de microorganismos beneficiosos y promueven su crecimiento (Kranich *et al.* 2011). Como era de prever, algunas cepas son más sensibles a los cambios en la dieta que otras. Así, una dieta sin gluten tiene un fuerte impacto en distintas comunidades bacterianas, incluyendo poblaciones de *Bifidobacterium*, grupo que se encuentra dentro de las bacterias residentes en el intestino y que puede restaurar parcialmente la microbiota alterada de pacientes celíacos y asemejarla a la existente en individuos sanos (Collado *et al.* 2009). Por otra parte, la administración de una dieta hipercalórica altera significativamente la composición de la microbiota en ratones obesos. Si se manipula esta dieta limitando el aumento de peso, se revierten los efectos de la obesidad inducida en la microbiota (Turnbaugh *et al.* 2008). Asimismo, se han observado

alteraciones en la microbiota en modelos de ratones que presentan diabetes tipo I, correspondiéndose con el hecho de que la microbiota confiere protección frente al comienzo de esta enfermedad en ratones genéticamente susceptibles (Wen *et al.* 2008).

Por otro lado, se ha sugerido que un entorno excesivamente higiénico puede ser la causa del aumento de asma y enfermedades atópicas. En este ambiente, existe un menor número de estímulos infecciosos, necesarios para que el sistema inmunitario se desarrolle adecuadamente, predominando respuestas tipo Th1 (Kranich *et al.* 2011).

Funciones de la microbiota

La microbiota intestinal desarrolla una intensa actividad metabólica que le permite mantener una relación de simbiosis o comensalismo con el huésped (Garrett *et al.* 2010). Aunque esta primera asociación parece aumentar la eficiencia digestiva del huésped ya que ayuda a metabolizar glicanos y xenobióticos y a sintetizar proteínas (Cerf-Bensussan & Gaboriau-Routhiau, 2010), millones de años de co-evolución han llevado a una conexión fundamental para la fisiología de mamíferos y de las bacterias comensales (Vijav-Kumar *et al.* 2010). Como resultado, los microorganismos intestinales son claves en distintos aspectos del desarrollo y fisiología del huésped (Tabla 1) (Gareau *et al.* 2010). Así, participan en la formación de la pared intestinal (Greer & O'Keefe, 2011); resisten a la colonización, siendo la primera línea de defensa frente a la invasión de bacterias patógenas (Aureli *et al.* 2011); producen ácidos grasos de cadena corta, metabolitos que desempeñan funciones fisiológicas en la fermentación (por ejemplo, ácido acético para los músculos o ácido propiónico para la gluconeogénesis) (Resta, 2009); sintetizan vitaminas, especialmente, las pertenecientes al grupo B y vitamina K (Lanning *et al.* 2005); e interaccionan con el sistema inmunitario de la mucosa (Tsuji *et al.* 2008). Por ejemplo, las bacterias intestinales estimulan el sistema inmunitario intestinal, dirigen el cambio de clase de las células B intestinales (He *et al.* 2007) y gobiernan el desarrollo de las células T efectoras Th17 (Ivanov *et al.* 2008). Adicionalmente, las bacterias comensales determinan la proporción de las células efectoras Th1 y Th2, clave en la respuesta inmunitaria sistémica (Mazmanian *et al.* 2005).

Tabla 1. Ejemplos de especies bacterianas, presentes en el tracto intestinal, que contribuyen a la fisiología del huésped

Phylum	Especies	Contribución a la fisiología del huésped
Bacteroidetes	<i>Bacteroides fragilis</i>	Modulación del sistema inmunitario por la síntesis de polisacáridos capsulares (Mazmanian <i>et al.</i> 2008)
	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	Hidrólisis de polisacáridos (Martens <i>et al.</i> 2008)
Firmicutes	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Inhibición de la inflamación intestinal (Petrof <i>et al.</i> 2009)
	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Modulación del sistema inmunitario, inducción de la expansión de linfocitos intraepiteliales (Roselli <i>et al.</i> 2009)
	<i>Enterococcus faecalis</i>	Estimulación de IL-10, síntesis de aminas biogénicas (Are <i>et al.</i> 2008; Ladero <i>et al.</i> 2009)
Actinobacteria	<i>Bifidobacterium longum</i>	Expansión de linfocitos intraepiteliales (Roselli <i>et al.</i> 2009)

Además, la presencia de la microbiota tiene un efecto de inmunomodulación, ya que crea un nicho ecológico, gracias a la mucosa intestinal, que previene del ataque de los microorganismos patógenos (Duerkop *et al.* 2009). Las bacterias comensales producen una exclusión competitiva limitando la superficie a colonizar, reducen la disponibilidad de nutrientes para patógenos exógenos y secretan sustancias antimicrobianas, como las bacteriocinas (Lenoir-Winjkooop *et al.* 2007).

INTERACCIÓN ENTRE MICROBIOTA Y SISTEMA INMUNITARIO INTESTINAL

Tras la evolución de millones de años, las células inmunitarias del huésped han desarrollado una jerarquía de mecanismos homeostáticos, incluyendo una capa de Ig A y péptidos antimicrobianos, una barrera física epitelial y componentes de la inmunidad innata y adaptativa, que permiten el crecimiento de una microbiota diversa y abundante, pero al mismo tiempo, limitan la acción de bacterias que conducen a un estado de inflamación (Hooper & Macpherson, 2010).

El cuerpo humano se encuentra íntimamente asociado con billones de bacterias que forman parte de la microbiota comensal. La presencia y la actividad de dichas bacterias son de vital importancia para el individuo, pues de ellas depende la salud y el bienestar del ser humano (De Preter *et al.* 2011). De hecho, el tipo de bacterias que colonizan el intestino de los recién nacidos va a determinar la modulación de su sistema inmunitario pues actúan como importantes estímulos antigénicos en el proceso de maduración de la respuesta (Tiihonen *et al.* 2010). En el tracto intestinal ocurren el mayor número de interacciones entre el sistema

inmunitario del huésped y componentes de la microbiota comensal. Una de las características clave del sistema inmunitario intestinal es la habilidad de distinguir entre bacterias simbióticas y patogénicas, y, por ello, proteger frente a la infección mientras evita respuestas inflamatorias innecesarias frente a la microbiota residente (Feng & Elson, 2011).

En el momento de nacer, el sistema inmunitario intestinal progresa al mismo tiempo que la microbiota. La maduración de GALT y el reclutamiento de células plasmáticas secretoras de Ig A y células T activadas en sitios de la mucosa depende estrictamente de señales derivadas de la microbiota. Estos signos influyen la interferencia entre células epiteliales y células dendríticas, modulando así la naturaleza y la intensidad de las respuestas de las células B y T (Rescigno & Di Sabatino, 2009). Por tanto, el establecimiento de la microbiota intestinal determina el desarrollo del sistema inmunitario, actuando como regulador esencial en las respuestas inmunitarias (Lee & Mazmanian, 2010). Los estudios realizados en neonatos y en animales axénicos o libres de gérmenes (*germ-free*), criados en condiciones de asepsia total, demuestran que la interacción entre el epitelio y la microbiota es esencial para el desarrollo normal del sistema inmunitario (Tiihonen *et al.* 2010).

En ausencia de microbiota intestinal, el desarrollo de la red capilar intestinal se encuentra detenido y se reduce la producción de anticuerpos (Murgas Torrazza & Neu, 2011). Estos animales poseen un sistema inmunitario intestinal infradesarrollado (Lee & Mazmanian, 2010). Así, los ratones axénicos presentan números anormales de varios tipos inmunitarios celulares y sus productos, así como déficits en estructuras linfoides locales y sistémicas (Macpherson & Harris, 2004). Por otro lado, se observan irregularidades en los perfiles y niveles de citoquinas (O'hara & Shanahan, 2006), que afectan a la generación de la tolerancia oral (Ishikawa *et al.* 2008). Otro hecho importante es que las células epiteliales intestinales expresan menos TLR, al igual que ocurre con las moléculas MHC-II, afectando al reconocimiento de patógenos y a la presentación de antígenos, respectivamente (Lundin *et al.* 2008). Al inducirse experimentalmente la colonización bacteriana en estos animales, se recuperan la mayoría de parámetros inmunológicos afectados por la ausencia de microorganismos. Por tanto, la microbiota intestinal actúa como un importante estímulo inmunogénico, permitiendo la maduración del GALT (Salzman, 2011). Además, la microbiota intestinal es vital para elaborar y dirigir la respuesta inmunitaria del huésped. Varios trabajos han descrito el papel de la microbiota en la homeostasis epitelial intestinal, angiogénesis, en la inmunidad sistémica (induyendo la eliminación de patógenos) y el desarrollo del sistema inmunitario intestinal innato y adaptativo (Mazmanian *et al.* 2005; Hooper & Gordon, 2001; Hörmannspurger & Haller, 2010; Stappenbeck *et al.* 2002). Así, la colonización microbiana

después del nacimiento es necesaria para generar células Th17. Aún más, la diferenciación Th17 está dirigida por bacterias filamentosas segmentadas (Ivanov *et al.* 2008). Finalmente, es importante señalar que la estimulación constante de la mucosa es imprescindible para mantener las defensas del huésped (Willing *et al.* 2010), razón por la cual los ratones axénicos son más susceptibles a agentes infecciosos, como *Shigella flexneri* o *Leishmania*.

Sistema inmunitario innato

El sistema inmunitario innato constituye la primera línea de defensa del organismo, que detecta a los agentes infecciosos y actúa inmediatamente (Iwazaki & Medzhitov, 2010). La respuesta inmunitaria innata es iniciada por bacterias, virus, protozoos y hongos, que inducen la activación de neutrófilos, monocitos y macrófagos, células dendríticas, células NK y sistema del complemento (Neish, 2009).

Barreras del sistema inmunitario innato

El sistema inmunitario innato en el intestino incluye barreras químicas y mecánicas. El componente mecánico está definido por la capa mucosa que cubre todo el tracto gastrointestinal y previene del ataque de patógenos (Rescigno, 2011). Las barreras químicas aluden a péptidos antimicrobianos (AMP) como lisozimas, fosfolipasas A₂, catelicidinas y α -defensinas, secretadas por las células de Paneth. Estas moléculas son mediadores inflamatorios y moléculas de señalización (Keshav, 2006; Mukherjee *et al.* 2008), que participan en el mantenimiento de la homeostasis en el interior del tracto gastrointestinal y colapsan procesos infecciosos e inflamatorios crónicos (Bevins & Salzman, 2011). Estas sustancias actúan como enzimas líticas, ya que rompen la estructura de la pared de estos patógenos o afectan a su funcionalidad (Maldonado-Contreras & McCormick, 2011).

Otro componente que juega un papel clave en el reconocimiento y control de patógenos es la familia de receptores reconocedores de patrones (*Pattern-recognition receptors*, PRR) (Willin *et al.* 2010). La mucosa intestinal presenta una serie de receptores celulares, transmembrana o intracitoplasmáticos, PRR, (Neish, 2009), los cuales son expresados en células inmunitarias innatas como las células dendríticas, macrófagos y neutrófilos (Takeuchi & Akira, 2010), y definidos por su habilidad de reconocer específicamente ligandos de macromoléculas microbianas y unirse a ellos. Estos ligandos, conservados en las distintas

especies bacterianas, se denominan patrones moleculares asociados a patógenos (*Pathogen-associated molecular patterns*, PAMP) (Kumar *et al.* 2011), esenciales para su ciclo vital (Kawai & Akira, 2010). Cada cepa bacteriana expresa un conjunto de moléculas específicas de ese microorganismo, como son péptidos, lipoproteínas, polisacáridos, glicolípidos, ácidos nucleicos; cada una de las cuales es reconocida de manera más o menos selectiva por los PRR (Brown *et al.* 2010). Incluso, a pesar de que las bacterias sean comensales y no patogénicas contienen componentes que son reconocidos por el sistema inmunitario de la mucosa. El sistema innato reconoce a estos PAMP y desencadena una respuesta inmunitaria, mediante la activación de rutas de señalización complejas que culminan en la inducción de un estado de inflamación, mediado por varias citoquinas y quimioquinas, que facilitará la erradicación del patógeno (Iwazaki & Medzhitov, 2010). Además, activa la maquinaria del sistema inmunitario adaptativo, que ejecuta respuestas altamente específicas, ya que está mediada por la producción de linfocitos B y T específicos de los antígenos del patógeno. Este proceso lleva semanas o, incluso meses, y proporciona una memoria inmunológica de larga duración (Yamamoto & Takeda, 2010; Chang, 2010). La respuesta apropiada frente al estímulo bacteriano desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis intestinal (Scharl & Rogler, 2010).

Actualmente, se han caracterizado varias clases de PRR, como los receptores análogos a RIG (Retinoic acid-inducible gene (RIG)-*like receptors*, RLR); receptores de DNA (sensores citosólicos de DNA) (Kumar *et al.* 2011); la familia de los receptores análogos a *Toll* (*Toll-like receptors*, TLR), localizados en el medio extracelular y compartimentos endosomales; e intracelularmente, receptores análogos a NOD (*Nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD)-*like receptors*, NLR), en el citosol (Sharma *et al.* 2010). Estos dos últimos grupos de PRR son esenciales en el reconocimiento bacteriano, inducción de factores antimicrobianos, activación y modulación de respuestas inmunitarias, tanto innata como adaptativa, y el mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal (Scharl & Rogler, 2010).

Receptores tipo Toll (Toll-like receptors, TLR)

Los TLR son una familia de proteínas transmembranas de tipo I, que contienen repeticiones ricas en leucina (LRR), que forman un dominio extracelular, necesario para el reconocimiento de los PAMP (Khoo *et al.* 2011), como lípidos, proteínas, lipoproteínas y ácidos nucleicos de bacterias, virus, parásitos y hongos (Jin & Lee, 2008); y un receptor *Toll/IL-1* (TIR) en el dominio intracelular, esencial para la cascada de señalización (Rhee, 2011). Los TLR se

expresan en células inmunitarias innatas como dendríticas y macrófagos, al igual que en otras líneas celulares no inmunitarias, como es el caso de fibroblastos y células epiteliales (Haas *et al.* 2008). Estos receptores poseen un papel fundamental ya que regulan las respuestas inmunitarias adaptativas e innatas de las células epiteliales, primera línea de defensa de las mucosas (Rhee, 2011). Asimismo, median en el reclutamiento de leucocitos hacia tejidos infectados, así como en la captura de microorganismos por parte de las células fagocitarias. De igual forma, se ha descrito que los TLR regulan la reparación, regeneración y apoptosis de los tejidos, por lo que poseen un efecto en el mantenimiento de la homeostasis de los mismos (Ioannou & Voulgarelis, 2010). Por otra parte, Chang (2010) sugiere que los TLR son capaces de reconocer otros patrones moleculares, que se encontrarían asociados al estrés o al daño tisular (*damage-associated molecular patterns*, DAMP) (Chang, 2010).

Hasta la fecha, se han identificado quince TLR en mamíferos (Schreibelt *et al.* 2010). En humanos se han descrito diez TLR funcionales (Kumar *et al.* 2011) y trece en ratones (Yamamoto & Takeda, 2010). Los TLR 1-10 se encuentran conservados en ambas especies, aunque el TLR10 no es funcional en ratones por la presencia de un codón de parada en su secuencia génica (Kawai & Akira, 2010). Por el contrario, los TLR 11-13 no están presentes en humanos. Se ha sugerido que el TLR11 asocia moléculas presentes en bacterias uropatógenicas y *Toxoplasma gondii* (Schreibelt *et al.* 2010).

Los TLR que mejor se conocen son los TLR 1-9. Los TLR 1, 2, 4, 5, 6, 10 y 11 se expresan en la superficie celular y reconocen PAMP derivados de bacterias, protozoos y hongos, como componentes de la pared bacteriana, flagelina, partículas virales, etc.; mientras que los TLR 3, 7, 8 y 9 se expresan exclusivamente en vesículas intracelulares como endosomas y retículo endoplasmático y reconocen ácidos nucleicos de bacterias y virus (Kumar *et al.* 2011; Khoo *et al.* 2011) (tabla 2).

Tabla 2. Toll-like receptors (TLR) y sus ligandos

<i>Toll like receptors, TLR</i>	Ligandos
TLR1	Lipopéptidos triacilados
TLR2	Lipoproteínas, hemaglutinina, peptidoglicano, otros
TLR3	Virus RNAs, Virus RNAs
TLR4	Lipopolisacárido
TLR5	Flagelina
TLR6	Lipoproteínas, lipopéptidos diacilados, otros
TLR7	RNA viral
TLR8	RNA viral
TLR9	Regiones CpG no metiladas
TLR10	Desconocido
TLR11	Profilina, Bacterias uropatógenicas

Los TLR 1, 2, 4, 5, 6, 7 y 9 están principalmente dedicados al reconocimiento de componentes bacterianos.

El complejo MD2-**TLR4** detecta lipopolisacárido (LPS), el mayor componente de la pared celular de bacterias *Gram* negativas. Este mecanismo permite detectar microorganismos patógenos sin necesidad de sobreexpresarse en la superficie del epitelio intestinal (Kumar *et al.* 2011). Este complejo requiere dos proteínas accesorias: la proteína de unión a LPS y CD14 (Lavelle *et al.* 2010).

Otro componente esencial de la pared bacteriana es el peptidoglicano, reconocido por el **TLR2**, que también es capaz de detectar micobacterias, ricas en lipoarabinomano, glicosilfosfatidilinositol del *Trypanosoma cruzi*, lipoproteínas de micoplasma y *Borrelia burgdorferi*. Asimismo, reconoce componentes fúngicos, como el zymosano, o víricos (Kang *et al.* 2009), como hemaglutininas, proteínas no sólo bacterianas sino también presentes en virus y parásitos (Yamamoto & Takeda, 2010; Akira *et al.* 2006). La diversidad de ligandos del TLR2 es posible porque forma un complejo heterodimérico con el **TLR1** y con el **TLR6**. El complejo TLR1-TLR2 reconoce los lipopéptidos triacilados bacterianos, mientras que el complejo TLR2-TLR6 identifica los lipopéptidos diacilados. El TLR2 y sus co-receptores desempeñan papeles fundamentales en las respuestas inmunitarias innatas frente a la infección de varios patógenos, incluyendo bacterias como *Helicobacter pylori*, virus como el *Herpes simplex*, u hongos como *Paracoccidioides brasiliensis*; así como en la progresión de enfermedades infecciosas e inflamatorias. El **TLR10** interactúa también con este TLR, pero sus posibles agonistas no están claros (Loures *et al.* 2009; Khoo *et al.* 2011).

El **TLR3** reconoce RNA viral de cadena doble, liberado por células dañadas, y a *poly I:C*, molécula sintética análoga al RNA de cadena doble. También, es capaz de detectar pequeños RNA de transferencia, induciendo la producción de IL-12 e IFN- γ (Chang, 2010). Este TLR contribuye a la activación de la inmunidad innata en respuesta a una infección viral. La presencia de TLR3 en células dendríticas mieloides pero no en plasmacitoides, sugiere la posibilidad de que el TLR3 se requiera para la modulación de la respuesta inmunitaria adaptativa en lugar de intervenir en la producción de IFN tipo I (Khoo *et al.* 2011).

El **TLR5** reconoce la flagelina, componente de los flagelos de bacterias *Gram* positivas y negativas, como *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* y *Pseudomonas aeruginosa*. Se ha descrito que este TLR es crucial en la inmunidad intestinal (Morris *et al.* 2009; Khoo *et al.* 2011).

EL **TLR7** reconoce a los principales virus de RNA de cadena simple, como el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1) (Heil *et al.* 2004). Junto con el **TLR9**, TLR7 está altamente expresado en células dendríticas plasmacitoides, y ambos son críticos en la producción de IFN de tipo I en respuesta a los virus RNA de cadena simple (Petzke *et al.* 2009). El **TLR8** está muy relacionado con el TLR7, identificando los mismos PAMP, pero parece que el TLR7 juega un papel más importante en este reconocimiento (Gantier *et al.* 2008). Al igual que otros TLR, el TLR7 es capaz de identificar ligandos endógenos, principalmente ácidos nucleicos propios, lo que contribuye al desarrollo de enfermedades autoinmunes, como la psoriasis (Ganguly *et al.* 2009). Además, el TLR9 es un potente activador de las células inmunitarias ya que reconoce regiones no metiladas de secuencia CpG bacterianas (Yamamoto & Takeda, 2010), así como otros ligandos no bacterianos, por ejemplo, DNA viral (Akira *et al.* 2006).

Los TLR se encuentran representados en la figura 6.

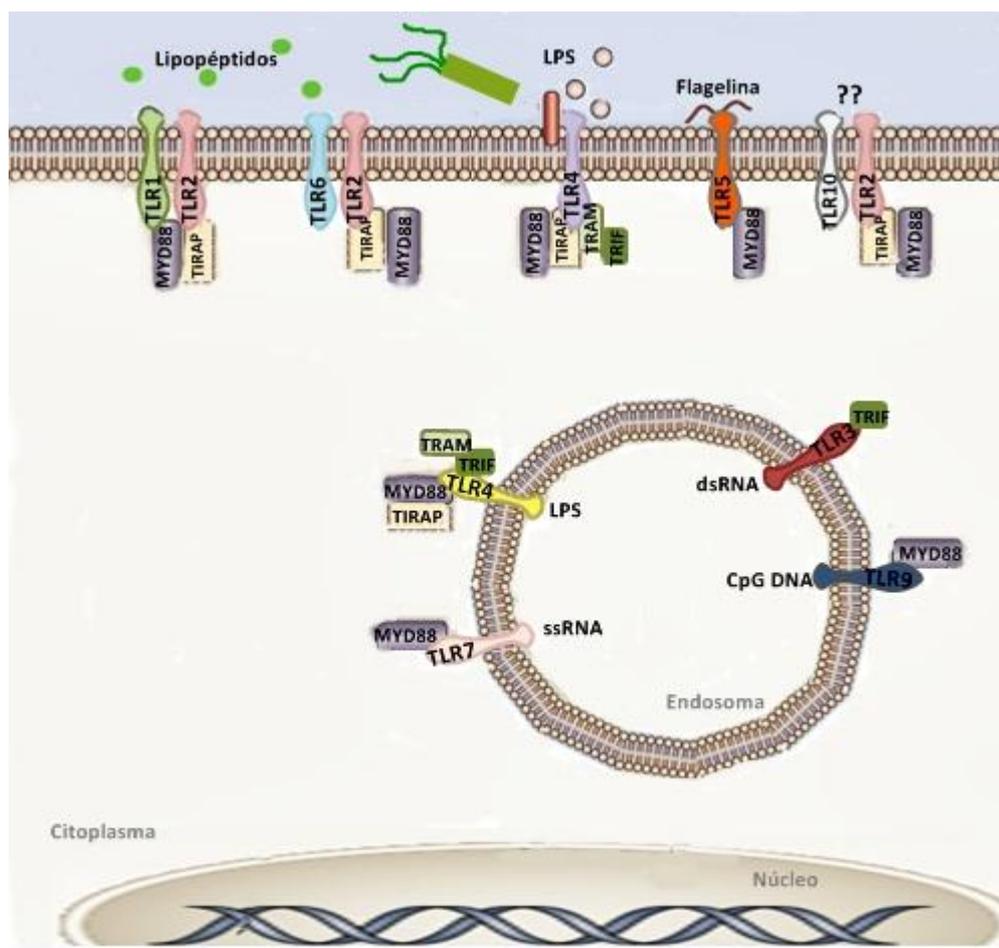
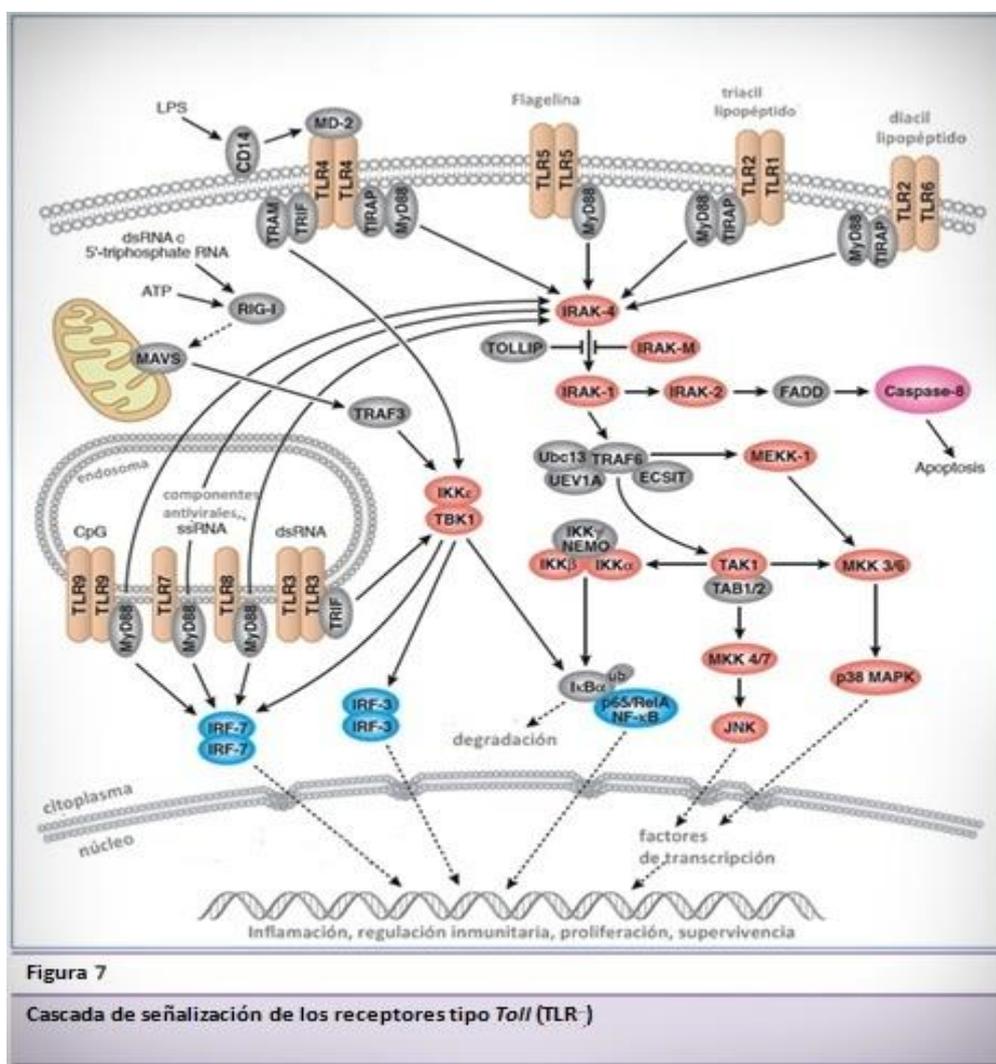


Figura 6
Toll-like receptors (TLR): localización y ligandos

Tras la interacción con su ligando (figura 7), los TLR dimerizan y sufren un cambio conformacional, necesario para el reclutamiento y activación secuencial de diversos complejos proteicos de señalización. Éstos incluyen moléculas adaptadoras que interactúan con el dominio TIR, como MyD88, TIRAP/MAL, TRIF y TRAM (Takeuchi & Akira, 2010). MyD88 activa a IRAK, que a su vez estimulan a TRAF6 y a la ubiquitin-ligasa E3, que conduce a la degradación de un complejo formado por TGF- β (TAK1), proteínas de unión a TAK1 (TAB1 y TAB2) y TRAF6 (Lin *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2011). Se inicia entonces la cascada de fosforilación de I κ K, α y β , y el complejo NF- κ B e I κ B. La degradación de I κ B permite la liberación de NF- κ B, que se transloca al núcleo e induce la expresión de citoquinas pro-inflamatorias (Tseng *et al.* 2010). Todos los TLR reducen a la proteína adaptadora MyD88, a excepción del TLR3 (Kawagoe *et al.* 2008). La cascada de señalización del TLR3 es dependiente de la molécula TRIF, que también es reclutada por el TLR4. Se forma un complejo que contiene a TRAF6, TAK-1, TAK-2 y la proteína quinasa R, que median la cascada de activación de NF- κ B. La activación de IFN tipo I por parte

de los TLR 7 y 9 también es dependiente de la vía MyD88, estando implicado el complejo TRAF6, TRAF3, IRAK1 e IRAK4, los cuales activan al factor regulador de interferón 7 (IRF7) (Khoo *et al.* 2011).



La activación de los TLR en las células dendríticas induce su maduración, acompañado de cambios en la expresión de receptores de quimioquinas que van a favorecer su movilización a los ganglios linfáticos, la producción de citoquinas pro-inflamatorias (IL-12, TNF- α) y un aumento de la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD40, CD80, CD86) (Liu & Zhao, 2007; Joffre *et al.* 2009). Como particularidad, las células dendríticas maduras poseen mayor capacidad de actuar como APC y estimular a los linfocitos T, iniciando la respuesta inmune adaptativa (Ng *et al.* 2010). Por tanto, la activación de los TLR sirve de enlace entre la inmunidad innata y adaptativa (Schreibelt *et al.* 2010).

Recientemente, se ha observado que la expresión de los TLR no está restringida al sistema inmunitario innato, estando presente en células B y T, y en sus subpoblaciones. Así, la expresión de los TLR en linfocitos $\gamma:\delta$ juega un papel crucial en respuestas inmunitarias tempranas de estas células frente a distintos patógenos (Wesch *et al.* 2011).

Sistema inmunitario adaptativo

La respuesta inmunitaria adaptativa en el intestino se caracteriza por la producción de Ig A, células T $\gamma:\delta$, CD8⁺ y CD4⁺. Estos tipos celulares, junto con las citoquinas que producen, son importantes en la regulación de la respuesta inflamatoria en el intestino, así como en el control de las bacterias comensales, tanto en abundancia como en su actividad (Kelsall, 2008). La inducción de la respuesta adaptativa depende de las células presentadoras de antígenos, como macrófagos y células dendríticas (Willing *et al.* 2010).

Las células dendríticas son el nexo de unión entre la inmunidad innata y adaptativa (Davies *et al.* 2009) y representan la comunicación del sistema inmunitario entre los tejidos linfoides secundarios organizados y periféricos (Cerovic *et al.* 2009). Son las células más potentes actuando como presentadoras de antígenos, promoviendo respuestas inmunitarias específicas adaptativas (López *et al.* 2010). Las células dendríticas intestinales trabajan "mano a mano" con las células M (Strober *et al.* 2009): éstas translocan antígenos luminales a través de la barrera epitelial y se los entregan a las células dendríticas subyacentes residentes en las Placas de Peyer y folículos linfoides aislados. A este nivel, el antígeno es fagocitado por las células mieloides y/o células B y, tras la digestión y modificación del antígeno, lo muestran a las células T. La respuesta de las células T es la secreción de determinadas citoquinas, entre las que destaca el TGF- β , implicadas en la transformación de las células B a células productoras de Ig A (Barbosa & Rescigno, 2010; Salzman, 2011). Una vez activadas, las células B migran a través de la linfa a los nódulos mesentéricos, donde se multiplicarán y madurarán hasta convertirse en células plasmáticas, productoras de Ig A en grandes cantidades (Cerruti & Rescigno, 2008). En este punto, las células plasmáticas podrán viajar por el torrente circulatorio y linfático y serán reclutadas a los diversos puntos efectores entre los que destacan las glándulas salivares, las glándulas lacrimales, el tracto respiratorio y los sitios efectores en la lámina propia del tracto gastrointestinal (Delcenserie *et al.* 2008). Las células dendríticas y algunos tipos de macrófagos también migran hasta los nódulos linfoides mesentéricos y allí presentan los antígenos a las células T *naïve* (linfocitos T en estado no activado), que dependiendo de la naturaleza del antígeno, inducirán la polarización hacia células efectoras

Th1, Th2 o Th17, o, alternativamente, a células T reguladoras (Zu & Paul, 2008; López *et al.* 2010).

La respuesta inmunitaria adaptativa más característica que se produce en las mucosas es la síntesis de Ig A, liberadas por las células plasmáticas y transportadas a través de la capa de células epiteliales hasta la luz intestinal, donde reaccionan con antígenos específicos (Scarpellini *et al.* 2010). Estas moléculas son resistentes a la proteólisis intraluminal y no activan el complemento (Woof & Mestecky, 2005), por tanto, desempeñan una función protectora sin generar respuestas inflamatorias (Aureli *et al.* 2011). Una vez en el lumen, se unen a la mucosa, ayudando en la inhibición de la permeabilidad y adherencia de los microorganismos y neutralizando sus toxinas, por lo que resulta un mecanismo ideal de defensa de la mucosa intestinal (Maldonado-Contreras & McCormick, 2011). Por otra parte, la Ig A secretora del intestino forma parte del sistema inmunitario de las mucosas del organismo o MALT (*Mucosa Associated Lymphoid Tissue*), que incluye el tracto respiratorio y lacrimal, glándulas salivares y mamarias. En consecuencia, cuando se inicia una respuesta inmunitaria en el GALT puede promover respuestas en otras mucosas (Singh *et al.* 2009).

Tolerancia oral a antígenos

Atendiendo a la propia naturaleza del tracto gastrointestinal, en contacto continuo con antígenos externos y bacterias comensales (Round & Mazmanian, 2009), éste debería estar en un estado de inflamación permanente (Novak & Bieber, 2008), proceso incompatible con el bienestar intestinal (Cristofaro & Opal, 2006). Por ello, se desarrolla el sistema inmunitario de las mucosas, que establece un equilibrio entre la capacidad de respuesta frente a una infección, mientras que evita el desencadenamiento de procesos inflamatorios frente a antígenos “conocidos” o ubicuos, como la propia microbiota intestinal (Chahine & Bahna, 2010; Sibartie *et al.* 2009). Este estado de no respuesta a ciertos antígenos se conoce como tolerancia oral (Valdés-Ramos *et al.* 2010). Cuando estas respuestas inmunitarias intestinales se encuentran desreguladas por factores genéticos y/o ambientales adversos, provoca desórdenes inflamatorios crónicos en el intestino (Hansen *et al.* 2010), incluyendo enfermedad inflamatoria intestinal (EII) (Sartor, 2008), enfermedad celíaca (Hooper & Macpherson, 2010) y alergias alimentarias (Chehade & Mayer, 2005).

La tolerancia oral se produce principalmente a través de dos mecanismos. Si la respuesta es inducida por una única dosis elevada de un antígeno, el principal mecanismo desencadenante de la tolerancia es la eliminación de linfocitos capaces de reconocer al

antígeno por muerte celular o apoptosis, fenómeno conocido como delección clonal (Peron *et al.* 2009). En este caso, se eliminan del organismo a las células capaces de reconocer al antígeno en cuestión. Sin embargo, la administración repetida de pequeñas dosis de antígeno suele inducir una supresión activa mediada por células T CD4⁺ o CD8⁺ mediante la secreción de citoquinas supresoras como el TGF- β o la IL-10, sustancias que a la vez que modulan la expresión de Ig A inhiben la generación de procesos inflamatorios. De esta manera, a pesar de que sí existen linfocitos capaces de reconocer al antígeno, estos tienen un fenotipo supresor, fenómeno denominado anergia clonal (Singh *et al.* 2009). Por tanto, la presentación de antígenos y la preparación de las células T son pasos cruciales en la inducción de este fenómeno de tolerancia (Peron *et al.* 2009).

PROBIÓTICOS



La administración de bacterias seleccionadas, **probióticos**, en forma de alimentos o suplementos alimentarios constituye una estrategia idónea para modular la composición de la microbiota intestinal y potenciar sus efectos beneficiosos (Takahashi *et al.* 2009). Algunas bacterias, pertenecientes principalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, presentes en alimentos fermentados, han demostrado su efecto probiótico ya que modulan el GALT potenciando la producción de Ig A, la prevención de algunas infecciones intestinales, el control de la respuesta inmunitaria inflamatoria y la reducción de niveles de factores promotores de tumores (Gobbato *et al.* 2008; De Moreno De LeBlanc *et al.* 2010).

PROBIÓTICOS

Reseña histórica y definición

El término probiótico proviene del griego “pro” (a favor de) y “bios” (vida). El uso de los probióticos por sus efectos beneficiosos se remonta al Antiguo Testamento donde se dice que Abraham atribuye su longevidad al consumo de leche (Vasiljevic & Shah, 2008).



E. Metchnikoff

Pese a la antigüedad del concepto, esta relación entre alimentación y salud no se volvió a tener en cuenta hasta principios del siglo XX. Fue el microbiólogo ruso Elie Metchnikoff

(1845-1916) quien observó que en regiones de Bulgaria, donde el consumo de leches fermentadas era habitual, la longevidad se veía significativamente incrementada (Metchnikoff, 1908; Quigley, 2010). Metchnikoff consiguió aislar las bacterias responsables de la producción del yogur que utilizó en sus investigaciones. Además, fue el primero en desarrollar un preparado utilizando lactobacilos en forma de cápsula, denominado Lactobacillin.

Paralelamente, Tissier, un microbiólogo francés, no sólo describió que la microbiota fecal de recién nacidos alimentados con leche materna presentaba más bacterias del género *Bifidobacterium* que los que habían recibido leche artificial, sino que además demostró el papel beneficioso de este microorganismo en niños con infecciones intestinales (Tissier, 1908).

El término probiótico fue usado por primera vez por Lilly y Stillwell, en 1965, para designar a los productos derivados de la fermentación láctica. Parker, en 1974, acercó la definición de probiótico a su uso actual, describiéndolos como organismos y sustancias que contribuyen al equilibrio microbiano intestinal. Años más tarde, Fuller (Fuller 1989, 1992), redefinió el concepto como: “suplementos de microorganismos vivos que añadidos a los alimentos, ejercen efectos beneficiosos en la salud del receptor como consecuencia de condicionar una mejora en su balance microbiano intestinal”.

En 1998, el *Internacional Life Science Institute* (ILSI) indujo los términos “salud y bienestar”, sentando las bases para el concepto más aceptado actualmente: “microorganismos vivos que, administrados a una dosis suficiente, confieren un efecto beneficioso a la salud general del hombre o animal” (FAO/OMS, 2001).

Microorganismos utilizados como probióticos

Los requisitos que ha de cumplir un microorganismo para ser considerado probiótico son los siguientes:

- * Formar parte de la microbiota del intestino humano
- * No ser patógeno ni toxigénico
- * Mantenerse viable en medio ácido del estómago y en contacto con la bilis del duodeno
- * Poseer capacidad de adhesión a las células epiteliales intestinales
- * Adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar a la ya nativa o existente
- * Producir sustancias antimicrobianas

- * Tener capacidad para aumentar de forma positiva las funciones inmunes y las capacidades metabólicas (West *et al.* 2009).

En el desarrollo de los alimentos probióticos propuestos para el consumo humano, las cepas de las bacterias del ácido láctico, como *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, han sido las más habituales (Lebeer *et al.* 2010).

El grupo más amplio es el género *Lactobacillus*, que presenta más de cien especies diferentes (Vasiljevik & Shah, 2008). Los lactobacilos son bacilos *Gram* positivos (aunque al crecer en determinadas condiciones pueden parecer cocos), que frecuentemente forman cadenas. Son catalasa negativos, no esporulados y en general inmóviles (Claesson *et al.* 2007). El pH óptimo de crecimiento oscila entre 5,5 y 6,2. En cuanto a la temperatura pueden ser mesófilos o termófilos. Son anaerobios aerotolerantes y su crecimiento se ve favorecido en atmósfera microaerófila con un 5-10% de CO₂. Estas bacterias se encuentran en una variedad de nichos ecológicos, siempre y cuando exista en ellos una fuente abundante de hidratos de carbono hidrosolubles (Walter, 2008).

Las bifidobacterias son microorganismos *Gram* positivos, anaerobios estrictos, inmóviles, no esporulados y catalasa negativos. El género está formado por algo más de treinta especies. Su pH óptimo se sitúa entre 6,0 y 7,0 y su temperatura alrededor de los 37 °C. Son bacilos pleomórficos, de manera que pueden cambiar su morfología a formas ramificadas en “Y” o “V”, ensanchadas normalmente en uno de sus extremos (Turroni *et al.* 2010).

Efectos beneficiosos de los probióticos

Los probióticos se han consolidado como una alternativa al uso de antibióticos en la prevención o tratamiento de desórdenes gastrointestinales (Ouwehand *et al.* 2004). Por otra parte, los medicamentos pueden producir complicaciones, incluyendo fenómenos de resistencia y toxicidad crónica a largo plazo (O’Flaherty *et al.* 2005). Numerosos estudios muestran la gran utilidad de las bacterias ácido-lácticas como probióticos tanto en humanos como en animales. Algunas cepas se han usado como adyuvantes en la prevención de infecciones gastrointestinales y enteritis (Coconnier *et al.* 2000).

Además de la actividad antibacteriana de los probióticos, se ha descrito un potencial antivírico, principalmente rotavirus causantes de diarreas (Zhang *et al.* 2008). Los lactobacilos son capaces de potenciar respuestas antigénicas específicas inducidas por vacunas bacterianas o víricas, como gripe (Olivares *et al.* 2007), polio (de Vrese *et al.* 2005), difteria y tétanos (West

et al. 2008). Los beneficios de los probióticos no se limitan exclusivamente al tracto gastrointestinal. Tanto en niños como en adultos, son útiles en el tratamiento y/o prevención de alergias y enfermedades de distinta índole, como la diarrea, vaginitis, dermatitis atópica o cáncer. Huang *et al.* (2009) demostraron que *Lactobacillus rhamnosus* LGG es capaz de suprimir la penetración de *E.coli* K1 meningítica a través de las células epiteliales intestinales *in vitro* y reducir la meningitis en ratas recién nacidas.

Sin embargo, no se debe asumir que todas las bacterias ácido-lácticas poseen propiedades beneficiosas. Asimismo, es importante recordar que cuando se describe un efecto de una cepa no se puede extrapolar a las restantes cepas de la misma especie (Gareau *et al.* 2010).

Probióticos y diarrea

La **diarrea aguda** producida por virus o bacterias es el mayor problema de salud a nivel mundial y, frecuentemente, causa la muerte, especialmente en niños hospitalizados y países en desarrollo. Comúnmente, ocurre por el consumo de agua o comida contaminada con materia fecal (Chen *et al.* 2010). Sin embargo, es un error pensar que sólo afecta a regiones pobres, ya que su incidencia en países desarrollados, a pesar de las condiciones sanitarias, es superior al 30% de la población cada año (De Vrese & Marteau, 2007). El uso de probióticos con propiedades inmunomoduladoras que alivian los síntomas y acortan la duración de esta infección es quizás el efecto más estudiado (Quigley, 2010). Estos beneficios incluyen una disminución de la frecuencia de infección, episodios que se acortan en 1-1,5 días (Binns & Lee, 2010), promueven una respuesta inmunitaria sistémica o local, y aumentan el número de anticuerpos específicos frente a rotavirus (Iannatti & Palmieri, 2010). En un ensayo en niños sanos, la administración de un yogur enriquecido con *L.casei* ha demostrado que esta bacteria reduce la frecuencia y duración de la diarrea comparado con los que habían consumido un yogur tradicional (Pedone *et al.* 2000). Distintos estudios tipo meta-análisis, tres usando una variedad de probióticos y dos empleando cepas únicas, indican la efectividad del tratamiento con probióticos, ya que disminuye el riesgo y el tiempo de esta infección en niños (Gareau *et al.* 2010).

La **diarrea asociada a antibióticos** se define como aquella diarrea vinculada a la administración de antibióticos de forma periódica (Aureli *et al.* 2011). Este tipo de patología suele ser consecuencia de alteraciones en la microbiota intestinal inducida por el uso de antibióticos (McFarland, 2008). La ingestión diaria de *L.plantarum* en pacientes a los que se les

administra antibióticos para controlar una infección recurrente reduce la severidad de los síntomas comparados con el placebo (Lonnermark *et al.* 2010). En niños, la administración oral de *L.rhamnosus* previene este tipo de diarrea (Ruszczynsk *et al.* 2008). Además, un meta-análisis indica la efectividad del tratamiento con *S.bouardii* en la prevención de esta diarrea, en adultos (McFarland, 2010).

Clostridium difficile, patógeno oportunista, permanece latente en el organismo, y, cuando las condiciones son favorables, es decir, en situaciones de inmunodepresión provocadas por la toma de antibióticos, se manifiesta cursando desde diarreas leves, hasta colitis pseudomembranosa y complicaciones intra-abdominales y sistémicas que pueden conducir a la muerte del paciente (Surawicz & Alexander, 2011). Es una infección nosocomial severa y prevalente (McFarland, 2008). Los probióticos se han utilizado para reducir este tipo de patología en ancianos hospitalizados (Leffler & Lamont, 2009). Un ensayo tipo meta-análisis indica la efectividad de los probióticos, disminuyendo la frecuencia de diarrea aguda en pacientes con esta infección (McFarland, 2006). En concreto, se ha descrito el efecto protector del tratamiento con el probiótico *Saccharomyces bouardii*, no así *L.rhamnosus* GG, frente al desarrollo de diarrea asociada a *C.difficile*, así como en la prevención de esta enfermedad (Pillai & Nelson, 2008). Asimismo, se ha descrito un efecto beneficioso de *L.plantarum* en la recurrencia de diarrea en un pequeño estudio (Wullt *et al.* 2003).

La **diarrea del viajero** es una patología que afecta entre un 20% a un 60% de los viajeros, dependiendo del lugar que visiten (López-Gigosos *et al.* 2009). Puede ser causada por virus y bacterias, siendo *E.coli* enterotoxigénica y enterohemorrágica las más frecuentes, o parásitos, como *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica* (De Saussure, 2009). *Lactobacillus rhamnosus* GG ha sido el probiótico más efectivo frente a la diarrea de viajero (Hilton 1997). Sin embargo, los resultados existentes son inconsistentes debido, en parte, al país donde se viaje, a las distintas cepas probióticas, la microbiota local, etc. (De Vrese & Schrezenmeir, 2008).

Entre los mecanismos por los que los probióticos podrían prevenir o aminorar los efectos de estas diarreas se induyen:

- * Adherencia a la superficie epitelial intestinal, de tal forma que impiden el acceso de los patógenos. Este fenómeno de exclusión competitiva se ha observado en estudios in vitro en células epiteliales intestinales, las cuales son pre-tratadas con *L.helveticus*, que inhibe la invasión de *Campylobacter jejuni* (Wine *et al.* 2009).
- * Los probióticos producen factores antibacterianos, que ayudan a la eliminación de microorganismos no deseados. Uno de estos factores son las bacteriocinas,

pequeños péptidos termo-estables, que inhiben el crecimiento de otras bacterias, incluyendo a los enteropatógenos (Corr *et al.* 2007). Asimismo, proteínas superficiales presentes en algunos lactobacilos, como la proteína A de *L.acidophilus* previene la unión de *E.coli* EHEC O 157:H7 a células epiteliales intestinales (Johnson-Henry *et al.* 2007).

Probióticos y enfermedades intestinales

Otro ejemplo de la efectividad de los probióticos con un fin terapéutico es su utilización para paliar las **enfermedades inflamatorias intestinales** (EII): desórdenes inflamatorios crónicos del intestino, colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn.

La patogénesis de las EII no se conoce completamente. Involucra dos elementos importantes: factores genéticos y ambientales (Veluswamy *et al.* 2010), lo que genera respuestas inmunitarias descontroladas y exageradas frente a la microbiota intestinal y, en consecuencia, el desarrollo de inflamación (Barrie & Regueiro, 2007; Cerf-Bensussan & Gaboriau-Routhiau, 2010). Particularmente, una respuesta desregulada de las células T de la mucosa intestinal conduce a la producción de citoquinas pro-inflamatorias asociadas a una respuesta tipo Th1, como IFN- γ y TNF- α (Raman *et al.* 2011).

La microbiota alterada del intestino juega un papel importante en la patogénesis de las EII, fundamentalmente en la enfermedad de Crohn. Así, bacterias pro-inflamatorias, como las cepas de *E.coli* enteroinvasivas, son más frecuentes en la mucosa del íleon de los pacientes con enfermedad de Crohn en comparación con individuos sanos, lo que sugiere que la presencia de estos microorganismos podría ser el origen de la enfermedad (Darfeuille-Michaud *et al.* 2004). Otra hipótesis sugiere que una especie de *Firmicutes*, *F. prausnitzii*, presente en menor frecuencia en la microbiota intestinal de estos pacientes, es el factor desencadenante de esta patología (Sokol *et al.* 2008). El aumento de la permeabilidad intestinal parece ser otra causa de esta desregulación de la respuesta inmunitaria, provocando graves lesiones en el tracto gastrointestinal (Iannetti & Palmieri, 2010). Además, se ha descrito que deficiencias de NOD-2 contribuyen al desarrollo de la enfermedad de Crohn, así como que la insuficiencia/ausencia de vitamina D influye en la prevalencia de esta enfermedad (Wang *et al.* 2010).

La diferencia principal entre colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn radica en la localización y la naturaleza de los cambios inflamatorios. La enfermedad de Crohn puede localizarse en cualquier parte del tracto gastrointestinal, desde la boca hasta el ano, y afecta a

toda la pared del intestino; mientras que la colitis ulcerosa se restringe al colon y recto y daña la mucosa (Shida & Nanno, 2008).

Los probióticos son capaces de re-colonizar y restaurar la microbiota a nivel del tracto gastrointestinal (Iannitti & Palmerieri, 2010), lo que sugiere que el uso de los probióticos puede ser una buena estrategia para el tratamiento de estos pacientes (Gareau *et al.* 2010). Un estudio describe un efecto beneficioso de los probióticos en el tratamiento de colitis y pouchitis, pero no para la enfermedad de Crohn (Isaacs & Herfarth, 2008). Este trabajo utiliza VSL#3, una mezcla de ocho bacterias probióticas, entre las que se incluyen distintas especies de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Streptococcus*, mediado en parte por un incremento de la expresión de FoxP3 localizada (Pronio *et al.* 2008). En pacientes con colitis ulcerosa, el uso de los probióticos *Escherichia coli* Nissle 1917 y *L.rhamnosus* GG muestra una eficacia equivalente al tratamiento de referencia, mesalazina, en cuanto a la prevención y remisión de la enfermedad, respectivamente (Shida & Nanno, 2008).

Por otro lado, los estudios realizados en pacientes con enfermedad de Crohn no son concluyentes, e incluso, contradictorios. Se ha descrito que el consumo diario de *L.rhamnosus* GR-1 y *L.reuteri* RC-14 durante un periodo de treinta días incrementa la proporción de células CD4+CD25+ (células T reguladoras) y disminuye el ratio TNF- α /IL-12 de las células dendríticas y macrófagos en sangre periférica de los pacientes con esta enfermedad (Lorea Baroja *et al.* 2007). En modelos experimentales, se ha comprobado que la cepa *L.casei* DN-114001 reduce el daño de la mucosa, la respuesta inflamatoria y la translocación bacteriana. *In vitro*, este probiótico suprime la producción desmesurada de TNF- α y disminuye el número de linfocitos T *helper* activados. Asimismo, se ha descrito que las citoquinas INF- γ , IL-6, IL-2, así como las quimioquinas IL-8 y CXCL1, se encuentran inhibidas en presencia de esta cepa en explantes de la mucosa inflamada de estos enfermos (Llopis *et al.* 2009).

Un aspecto importante es el aumento de procesos apoptóticos en sitios con daño inflamatorio agudo y a través de todo el eje cripta-vellosidad que presentan los pacientes con EII, debido fundamentalmente a la desregulación de las señales del sistema inmunitario intestinal (Hörmannspurger & Haller, 2010). La producción de TNF e IFN, consecuencia de este estado inflamatorio crónico, acelera la apoptosis de células epiteliales intestinales. En este sentido, se ha descrito que dos proteínas liberadas por el probiótico *L.rhamnosus* GG, así como *E.coli* Nissle 1917, inhiben la señalización pro-apoptótica inducida por TNF y activa las rutas dependiente de Akt (Yan *et al.* 2007; Kamada *et al.* 2008).

Probióticos y alergias

El sistema inmunitario intestinal reconoce bacterias comensales, bacterias patógenas que intentan invadir el intestino y antígenos alimentarios, discriminando entre los componentes peligrosos o beneficiosos y atacando a aquellos que puedan ser nocivos para el huésped. El mantenimiento de la simbiosis microbiota comensal-sistema inmunitario intestinal es indispensable para la homeostasis del intestino (Takahashi, 2010). Cuando esta interacción no es adecuada, se desarrollan enfermedades derivadas de desregulaciones de la respuesta inmunitaria como alergias y enfermedades autoinmunes (Shida & Nanno, 2008). Así, en niños atópicos, se ha demostrado que existe una correlación entre la incidencia de esta enfermedad y la composición de la microbiota (Takahashi, 2010). Estos niños presentan menos lactobacilos y bifidobacterias en comparación con niños sanos (Shida & Nanno, 2008). Otro estudio comprueba que la prevalencia de bifidobacterias en lactantes que desarrollan procesos alérgicos durante el primer año de vida es menor, lo que sugiere que la desregulación de la microbiota intestinal precede a la aparición de los síntomas de alergia (Björkstén *et al.* 2001).

En las últimas décadas, la incidencia de trastornos alérgicos ha aumentado drásticamente en países industrializados, de tal forma que se ha convertido en las enfermedades crónicas más comunes (Shida & Nanno, 2008). Pese al componente genético de esta patología, los datos indican que este incremento puede estar relacionado con ambientes limpios, conforme a la “hipótesis de la higiene”, es decir, la ausencia de estímulos microbianos durante la infancia, debido a las buenas condiciones sanitarias, provoca una maduración lenta del sistema inmunitario y un desequilibrio entre las respuestas inmunitarias Th1 y Th2, que favorece el desarrollo de alergias mediadas por Ig E (Borchers *et al.* 2009).

Los probióticos parecen ayudar al tratamiento de las enfermedades alérgicas por distintos mecanismos: su habilidad de producir cambios en la microbiota, su actividad metabólica y su capacidad de modular al sistema inmunitario produciendo efectos beneficiosos (Iannitti & Palmieri, 2010). La administración de probióticos durante el periodo perinatal parece ayudar a la prevención de la dermatitis atópica (Ji, 2009). Así, varios estudios controlados por placebo demuestran que la administración de *L.rhamnosus* GG en recién nacidos reduce la incidencia de esta enfermedad hasta los dos años (Kalliomaki *et al.* 2001). Por otra parte, la aplicación de *L.fermentum* VRI-033 PPC aminora la gravedad de la enfermedad durante la infancia (Weston *et al.* 2005). Otros autores han descrito como

L.reuteri y *L.rhamnosus* disminuyen o previenen el eczema en niños, pero no eliminan la enfermedad (Wickens *et al.* 2008; Abrahamsson *et al.* 2007). Kukkonen *et al.*, 2007, observaron una asociación inversa entre enfermedades atópicas y la colonización intestinal mediante probióticos y conduyeron que la prevención del eczema atópico en niños de alto-riesgo es posible gracias al tratamiento con probióticos y prebióticos, los cuales modulan la microbiota del lactante. Por último, el uso de *L.casei* DN-114 001 muestra un efecto profiláctico en la incidencia de rinitis alérgica, en niños. Aún así, no todos los pacientes responden igual al tratamiento, posiblemente debido a que esta enfermedad implica factores genéticos y ambientales (Giovannini *et al.* 2007).

Pese a que todos estos estudios son bastante prometedores en la búsqueda de un tratamiento alternativo para paliar las alergias, también se han observado efectos no deseados. Así, se ha descrito que el uso de *L.acidophilus* LAVRI-A1 incrementa el riesgo de padecer una sensibilización alérgica en niños de alto-riesgo (Taylor *et al.* 2007).

Probióticos y reducción de la colesterolemia

El colesterol es una molécula biológica de vital importancia que desempeña papeles fundamentales, incluyendo ser el precursor de la síntesis de hormonas esteroideas y ácidos biliares y el mantenimiento de la estructura de la membrana y de las estructuras de aislamiento de los nervios (Lee *et al.* 2010). Altos niveles de colesterol están asociados a enfermedades cardiovasculares (**Fogli-Cawley *et al.* 2007**), así como a un aumento del riesgo de los síntomas del síndrome metabólico, incluyendo obesidad abdominal, hiperglucemia e hipertensión (Isomaa *et al.* 2001).

Los probióticos suponen una alternativa para el tratamiento de pacientes con hipercolesterolemia. Este efecto está bien documentado tanto en animales como en humanos. La administración de *L.plantarum* y *L.acidophilus*, a determinadas dosis y durante un tiempo determinado, reduce significativamente los niveles de colesterol total y los triglicéridos comparados con el control, en ratones y ratas, respectivamente (Nguyen *et al.* 2007; Fukushima *et al.* 1999). En humanos, las cepas *L.acidophilus* y *Bifidobacterium longum* han demostrado que disminuyen significativamente la concentración de colesterol total, en varios estudios control-placebo. Uno de estos ensayos, describe que *B.longum* aumenta los valores de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), en comparación con el control (Anderson & Gilliland, 1999; Xiao *et al.* 2003).

Los distintos estudios que examinan la eficacia de los probióticos no aportan mucha información acerca de los mecanismos a través de los cuales los probióticos modularían los niveles de colesterol. Se han propuesto varias estrategias (Ooi & Liang, 2010):

- Desconjugación enzimática de sales biliares mediante una hidrolasa presente en probióticos (Jones *et al.* 2004).

- Que sean capaces de unir colesterol. Se ha descrito que *Lactobacillus gasseri* es capaz de unir esta molécula a su superficie celular *in vitro*. Esta capacidad es específica de cepa y de su fase de crecimiento (Usman 1999; Kimoto *et al.* 2002) (Figura 8).



- Conversión de colesterol en coprostanol, molécula que se elimina directamente por las heces. Lye *et al.* (2010) evaluaron esta transformación en coprostanol utilizando distintas cepas de *Lactobacillus*. La concentración de colesterol disminuye como resultado de la fermentación por parte de los probióticos acompañada de un incremento de la concentración de coprostanol.

- La degradación de los probióticos en el intestino conduce a la producción de ácidos grasos de cadena corta en cantidades importantes, principalmente, acetato, propionato y butirato, los cuales son absorbidos a través de la circulación o excretados. Mientras que el butirato es metabolizado por los enterocitos, el acetato y el propionato alcanzan intactos el hígado, ya que ambos están implicados en la síntesis de colesterol (Floch, 2010). El propionato sirve como sustrato para la gluconeogénesis e inhibe la síntesis de colesterol, mientras que el acetato participa en la producción de ácidos grasos de cadena larga (De Preter *et al.* 2011).

La mayoría de estos mecanismos están comprobados *in vitro*, por lo que sería necesario estudios posteriores que demostraran este efecto *in vivo* (Ooi & Liang, 2010).

Probióticos y cáncer

La etiopatogenia del cáncer incluye varias rutas mediadas por el sistema inmunitario (Vollmers *et al.* 2007), especialmente, en la mucosa epitelial (Lan *et al.* 2008).

El cáncer de colon es una enfermedad multifactorial y compleja, que incluye factores genéticos y ambientales. Parece ser que existe una estrecha relación entre este cáncer, la dieta y la microbiota intestinal. La ruptura de la homeostasis intestinal, consecuencia de una mala dieta, incrementa el riesgo de desarrollar este tipo de enfermedad (Bosscher *et al.* 2009). Recientemente, se ha descrito que estos pacientes presentan un aumento de las poblaciones *Bacteroides/Prevotella* y/o células inmuno-reactivas IL-17 en la mucosa, pudiendo ser estos dos parámetros buenos marcadores del cáncer de colon (Sobhani *et al.* 2011).

En el colon, ciertas bacterias producen sustancias nocivas que se han correlacionado con el inicio del cáncer. Además, este cáncer se ha asociado a dietas ricas en grasas, ya que el colon aumenta los niveles de ácidos biliares para ayudar a digerirlas. Las sales biliares liberadas en el intestino delgado son re-absorbidas en ese mismo lugar, pero algunas llegan a nivel del colon. Los productos de degradación de la bilis pueden tener un efecto tóxico en las células que revisten esta zona, aumentando la proliferación celular y un posible cáncer (Iannetti & Palmieri, 2010). Las bacterias probióticas que crecen en el colon desempeñan distintas funciones, incluyendo el control del crecimiento de bacterias potencialmente dañinas, unión a mutágenos, prevención de la actividad nociva de enzimas en el intestino (β -glucuronidasa, nitroreductasa) (Liong, 2008; Gupta & Garg. 2009) y formación de ácido linoleico conjugado, compuesto con propiedades anti-inflamatorias que puede inhibir el desarrollo del cáncer. Asimismo, incrementan los niveles de ácido butírico en el colon, fuente de energía y regulador del crecimiento de los colonocitos, estimulando la actividad de enzimas que inactivan carcinógenos (glutatión-S-transferasa), y al sistema inmunitario, generando productos beneficiosos para las células del colon (Kumar *et al.* 2010). Así, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* producen ácido láctico y ácidos grasos de cadena corta que incrementan la acidez del lumen intestinal (Iannetti & Palmieri, 2010).

Para potenciar esta actividad beneficiosa se ha utilizado la combinación simbiótica de probióticos y prebióticos, que se define como “ingrediente de la dieta que no es digerible y el cual beneficia y estimula el crecimiento de bacterias intestinales que mejoran el balance intestinal del huésped”, tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo*. La administración de *Bifidobacterium* y oligofruktosa conjuntamente retarda la carcinogénesis en ratas en comparación con su aplicación individual (Liong, 2008).

Los estudios relacionados con el consumo de probióticos y su posible efecto en el cáncer parecen muy prometedores, ya que distintos trabajos *in vitro* e *in vivo* indican que las bacterias probióticas reducen el riesgo, la incidencia y el número de tumores en el colon, hígado y vejiga (Kumar *et al.* 2010). En general, los estudios *in vitro* demuestran que las bacterias probióticas poseen una gran actividad antimutagénica (Wollowski *et al.* 2001). Por ejemplo, se ha demostrado que varias cepas de *Lactobacillus* y *Lactococcus* son resistentes a ocratoxina A, una micotoxina carcinógena, genotóxica e inmunosupresora. Más aún, este mismo estudio describe que *L.rhamnosus* GG es capaz de reducir la cantidad de esta toxina a más de la mitad (Piotrowska & Zakowska, 2005). Por otra parte, los efectos beneficiosos de las bacterias probióticas frente al cáncer pueden ser atribuidos a su capacidad de estimular y potenciar el sistema inmunitario (Murosaki *et al.* 2000). Así, Takeda & Okumura (2007) sugieren que la administración diaria de *L.casei* sub *shirota* proporciona un estímulo positivo en la actividad de las células NK, las cuales desempeñan un papel clave en la protección del organismo frente al cáncer.

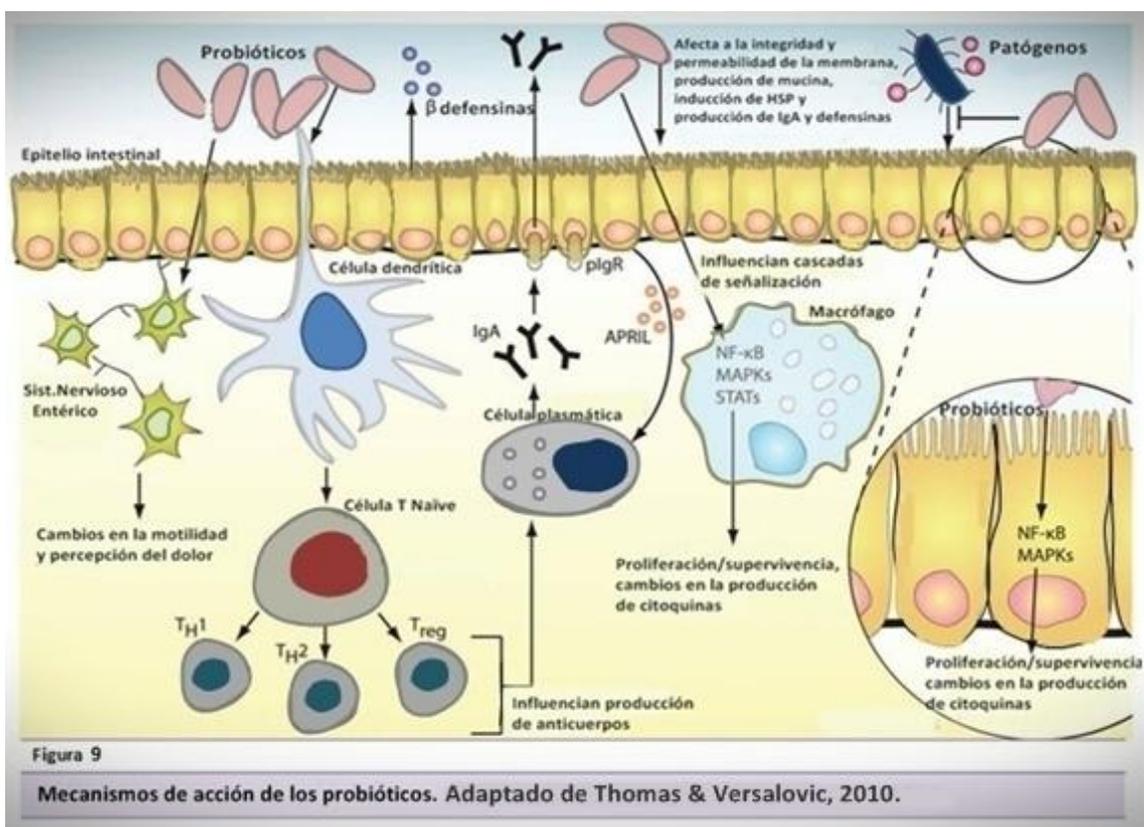
En el caso del cáncer de mama, se han realizado varios estudios para entender los factores moleculares implicados en su desarrollo. Algunos factores, como una dieta rica en lácteos, puede inhibir el desarrollo de algunos tipos de cáncer, incluido el de mama (De Moreno de Le Blanc, 2005). Las leches fermentadas pueden poseer componentes bacterianos que contribuyen a sus propiedades inmunológicas y actividad antitumoral (Matar, 2003). Pequeñas fracciones de péptidos liberadas durante la fermentación de la leche con *Lactobacillus helveticus* R389 estimulan el sistema inmunitario e inhiben el crecimiento de fibrosarcoma inmunodependiente en un modelo de ratón (Leblanc *et al.* 2002).

Mecanismos de acción de los probióticos

Los probióticos son cruciales para el bienestar y la salud del hospedador. Estas bacterias representan una herramienta efectiva en el control y prevención de enfermedades (Kim *et al.* 2006), ya que son capaces de interferir en el crecimiento y la virulencia de patógenos (Basu *et al.* 2007; Lee *et al.* 2005).

Se han propuesto varios mecanismos por los que estas bacterias, que se encuentran mayoritariamente alojadas en el tracto gastrointestinal, podrían ser capaces de tratar y prevenir desórdenes intestinales, como la reducción del pH, potenciar la reparación de la mucosa (Hickson *et al.* 2007), un aumento de la proliferación de anaerobios (Apostolou *et al.* 2001), competición con patógenos, secreción de sustancias antimicrobianas y la estimulación

del sistema inmunitario (Servin, 2004). Estos mecanismos de interacción huésped-bacteria incluyen un contacto físico entre la bacteria y el epitelio intestinal (adhesión a la mucosa y células epiteliales, estimulación de la secreción de mucus, producción de moléculas de defensa y refuerzo de la barrera intestinal); interacción sistema inmunitario-bacteria (modulación y regulación de la respuesta inmunológica); y, también, un contacto bacteria-bacteria (exclusión e inhibición de patógenos gracias a la prevención de la adhesión, secreción de sustancias antimicrobianas, competición por los nutrientes y efectos antitoxina) (Collado *et al.* 2010). Estas interacciones se encuentran detalladas en la Figura 9.



Adhesión intestinal

Los probióticos son capaces de colonizar el intestino, aunque sea transitoriamente, adhiriéndose a la mucosa intestinal. Varios estudios concluyen que las bacterias probióticas ingeridas no llegan a ser miembros estables de la microbiota pero persisten durante cortos periodos de tiempo (Gardiner *et al.* 2004; Klingberg & Budde, 2006).

La adhesión bacteriana al epitelio intestinal es un requisito indispensable en la selección de una cepa como probiótica, ya que afecta al periodo de residencia de esa bacteria en el

tracto intestinal (Servin & Coconnier, 2003), evitando que sean eliminadas por los movimientos peristálticos intestinales y/o por otras bacterias que componen la microbiota; y es antagónica frente a patógenos (Reid *et al.* 2002). Las bacterias probióticas ya adheridas pueden prevenir la adhesión de patógenos, tanto de bacterias coliformes como de dostridios, y estimulan la renovación del tracto intestinal (Forestier *et al.* 2001; Lee *et al.* 2003; Alemka *et al.* 2010). En un estudio reciente, Romeo *et al.* (2010), han descrito que dos cepas de *Lactobacillus, reuteri* y *rhamnosus*, son capaces de prevenir la colonización intestinal de especies de *Candida* y reducir los síntomas de la infección, en neonatos. Esta propiedad de las cepas probióticas de inhibir la colonización e invasión de microorganismos patógenos reside en su capacidad de adherencia al epitelio intestinal (Servin & Coconnier, 2003). Varios estudios han demostrado que diversas proteínas celulares de superficie, como la proteína MapA de *L.reuteri* (Miyoshi *et al.* 2006) y EF-Tu de *L.johnsonii*, son factores importantes implicados en la adhesión de estas cepas al trato intestinal (Granato *et al.* 2004). Asimismo, se ha descrito que los lactobacilos poseen adhesinas superficiales similares a las patogénicas (Neeser, 2000), lo que sustenta que determinadas cepas de este género pueden ser usadas como agentes en la prevención de la invasión de patógenos y el tratamiento de la infección (Horie *et al.* 2002).

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

Producción de compuestos antimicrobianos

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

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

Exclusión competitiva de patógenos

La exclusión competitiva de los microorganismos patógenos es el mecanismo más importante del efecto beneficioso de los probióticos (Adlerbeth *et al.* 2000). Este mecanismo está basado en una interacción bacteria-bacteria y mediado por la competición de los nutrientes disponibles y los sitios de adhesión a la mucosa. Las bacterias son capaces de modificar el ambiente para que sea más inhóspito para sus competidores. La producción de sustancias antimicrobianas, como ácido láctico o acético, es un ejemplo claro de este cambio ambiental. Varios estudios demuestran que cepas probióticas específicas inhiben competitivamente la adhesión de patógenos y los desplazan (Lee *et al.* 2003; Gueimonde *et al.* 2006). Los lactobacilos y las bifidobacterias comparten receptores de unión a glúcidos con algunos enteropatógenos, esto hace que puedan competir por los sitios de unión de los receptores del huésped con los patógenos (Nesser *et al.* 2000; Todoriki *et al.* 2001). Asimismo, los probióticos pueden reducir la colonización y la invasión, disminuyendo la viabilidad de los patógenos por la generación de inhibidores del crecimiento. Esta exclusión competitiva se ha demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* (Genovese *et al.* 2000). Hirano *et al.* (2003), observaron que *Lactobacillus rhamnosus*, bien adherido a células epiteliales intestinales, era capaz de inhibir la penetración de *E.coli* enterohemorrágica (EHEC).

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

Inmunomodulación

La microbiota intestinal normal a través del contacto y la interacción con el tejido linfoide de la mucosa intestinal desempeña un papel fundamental en el desarrollo y maduración del sistema inmune competente. En los últimos años, se ha descrito que los probióticos poseen funciones semejantes a la microbiota residente, pudiendo modular los mecanismos de defensa inmunitarios innatos y adaptativos (Borchers *et al.* 2009). Las propiedades inmunomoduladoras actúan a distintos niveles: producen enzimas hidrolíticas y disminuyen la inflamación intestinal (Ferre Lorente & Dalmau Serra, 2001); modifican las respuestas a antígenos, potenciando respuestas Th1 y atenuando respuestas Th2 (Hua *et al.* 2010); inducen la migración de las células B y aumentan la secreción de Ig A específica vía modulación de las células dendríticas intestinales (Galdeano *et al.* 2004; Mora *et al.* 2006); y facilitan la captación de antígenos en las Placas de Peyer.

Probióticos e inmunidad innata

La colonización por enterobacterias del tracto gastrointestinal induce la activación de la cascada inflamatoria que da como resultado la secreción de IL-8 y otras moléculas pro-inflamatorias y, como consecuencia, se produce el reclutamiento de neutrófilos y otras células inflamatorias. En muchos casos, una infiltración masiva y prolongada de neutrófilos provoca una inflamación crónica que conduce al daño celular, disfunción de la barrera epitelial y diarrea. Algunas cepas probióticas, como *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium longum*, pueden inhibir la producción de IL-8 de las células epiteliales intestinales inducida por la presencia de enteropatógenos (Frick *et al.* 2007; Candela *et al.* 2008), a través de la modulación de la señalización de NF- κ B (Sokol *et al.* 2008). Recientemente, se ha descrito que la inflamación producida por la infección de enteropatógenos provoca cambios en la microbiota, reduce la resistencia a la colonización y potencia el crecimiento de patógenos (Stecher & Hardt, 2008). Alternativamente, los probióticos liberan factores solubles que en sí mismos activan estas cascadas a nivel del epitelio o de las células del sistema inmunitario (Hoarau *et al.* 2006).

En otros casos, la asociación de los probióticos con las células epiteliales intestinales es suficiente para activar la inmunidad innata, potenciando la secreción de mucinas y defensinas (Caballero-Franco *et al.* 2007; Schlee *et al.* 2008), evitando procesos apoptóticos (Yan *et al.* 2007), o bien, desencadenando cascadas de señalización que finalmente activan a las células del sistema inmunitario de la lámina propia. Debido a esta interacción, la liberación de

citoquinas pro-inflamatorias se encuentra notablemente disminuida (Elmadfa *et al.* 2010). Así, la infección de las células epiteliales intestinales Caco-2 con la bacteria *Shigella flexneri* normalmente induce una respuesta pro-inflamatoria, pero si estas células son previamente incubadas con el probiótico *Lactobacillus casei* DN-114 01, se reduce esta respuesta gracias a la inhibición de la activación de NF- κ B (Shida & Nanno, 2008). Por el contrario, otros autores proponen que los probióticos promueven el bienestar intestinal a través de mecanismos que estimulan las respuestas innatas epiteliales, en lugar de suprimir el estado inflamatorio, es decir, que activarían la vía de NF- κ B y la producción de TNF- α en el epitelio intestinal, y, por tanto, estos efectos beneficiosos estarían asociados a procesos de inmuno-estimulación y no de inmuno-supresión (Mizoguchi *et al.* 2008; Pagnini *et al.* 2010). Así, *Bifidobacterium lactis* BB12 induce la activación de RelA, lo que supone un incremento en la secreción de IL-6. La expresión de esta citoquina está ligada a la ruta de señalización del TLR2. Otro ejemplo es *Bacteroides vulgatus*, bacteria comensal que activa la ruta de NF- κ B a través de la vía IL-1R/TLR4 (Thomas & Versalovic, 2010).

Algunos probióticos son capaces de estimular la inmunidad innata, por ejemplo, incrementando la capacidad fagocítica (Bezirtzoglou & Stavropoulou, 2011). Los probióticos están dotados de propiedades antivíricas, que aumentan el potencial citotóxico de las células NK (Moretta *et al.* 2008) y la capacidad de fagocitar de los macrófagos (Delcenserie *et al.* 2008).

Por otra parte, componentes de la pared de los probióticos pueden interactuar con receptores del huésped, PRR, que reconocen determinados patrones, MAMP, generando una respuesta rápida frente a numerosos microorganismos, incluyendo patógenos potenciales. El contacto MAMP-PRR induce cascadas de señalización, que afectan a las rutas del NF- κ B y MAP-quinasas. El resultado final depende del tipo de microorganismo (Lebeer *et al.* 2010; Strober *et al.* 2006). Al igual que con las células epiteliales intestinales, los probióticos interactúan con las células dendríticas a través de TLR (figura 10), promoviendo una cascada de señales que conduce a la inmunotolerancia (Gómez-Llorente *et al.* 2010).

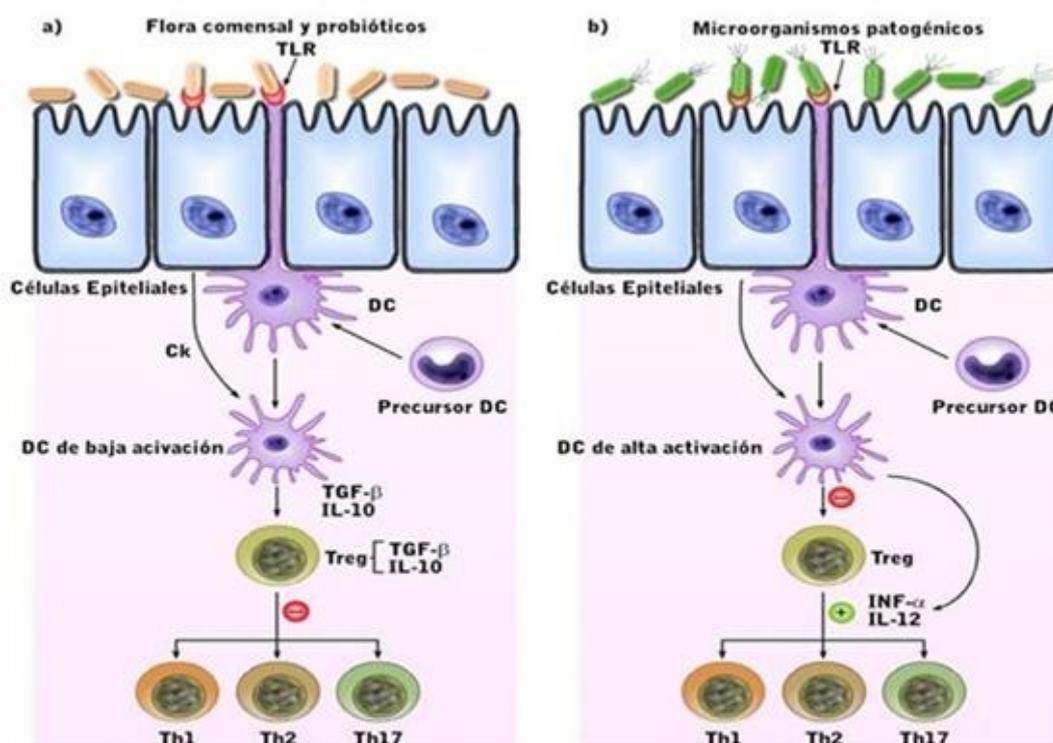


Figura 10

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

Probióticos e inmunidad adaptativa

Componentes antigénicos de los probióticos son capaces de cruzar la barrera intestinal, a través de las células epiteliales intestinales y las células M hasta las Placas de Peyer, donde son procesados y presentados al sistema inmunitario, modulando las respuestas innata y adaptativa (Gourbeyre *et al.* 2011). Se ha demostrado que la pared de los lactobacilos contiene componentes, como polisacáridos, peptidoglicanos y bacteriocinas, que pueden activar la respuesta inmune adaptativa (Vinderola *et al.* 2006, Forchielli & Walker, 2005).

Varias citoquinas están implicadas en la modulación del sistema inmunitario (Corr *et al.* 2010). TNF-α e IL-6 son citoquinas pro-inflamatorias, que participan en la inflamación sistémica y en la fase de reacción aguda. IL-12, junto con IFN-γ, produce un cambio hacia una respuesta Th1, lo que favorece el desarrollo de la inmunidad citotóxica o celular. La prostaglandina E₂ (PGE₂), junto con IL-4, induce la producción de una respuesta tipo Th2, lo que ayuda a la síntesis de anticuerpos e inducción de Ig E y respuestas alérgicas. La respuesta inmunitaria Th2 involucra a IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13, e induce inmunidad humoral (Borchers *et al.* 2009). IL-10,

citoquina antiinflamatoria, potencia la generación de células T reguladoras. La función de estas células parece estar bloqueada/regulada por la producción de citoquinas, como IL-10 y TFG- β (Hua *et al.* 2010). Los probióticos parecen disminuir el estado inflamatorio mediante la elevación de Ig A, Ig E e IL-10 (Iannitti & Palmieri, 2010). El efecto antiinflamatorio más marcado se ha demostrado en bifidobacterias, las cuales aumentan la producción de IL-10 por parte de las células dendríticas y disminuyen la expresión de moléculas co-estimuladoras, como CD80 y CD40 (Hart *et al.* 2004). Además, se ha descrito que *Lactobacillus rhamnosus GG* provoca la síntesis de IL-10 y disminuye la liberación de citoquinas pro-inflamatorias como IFN- γ , IL-6 y TNF- α , en células T CD4⁺ (Wohlgemuth *et al.* 2010). Se ha descrito que el probiótico *S.thermophilus* es un inductor más potente de citoquinas tipo Th1, como IL-12 e INF- γ , que las bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus* (Kekkonen *et al.* 2008).

Algunas especies de lactobacilos parecen generar células dendríticas “semimaduras”, un fenotipo que se caracteriza por una expresión elevada de marcadores co-estimuladores y una baja producción de citoquinas pro-inflamatorias. Este tipo de células dendríticas parece contribuir a la síntesis de células T reguladoras y, en consecuencia, a la tolerancia *in vivo* (Lutz & Schuler, 2002).

Por otra parte, se ha descrito que la microbiota comensal es capaz de activar la proliferación de las células T (Feng & Elson, 2011).

Modulación de la expresión génica en células intestinales

Aunque el epitelio intestinal es inmunológicamente quiescente, cuando entra en contacto con bacterias probióticas éstas ejercen efectos inmunomoduladores en las células intestinales que median las respuestas del sistema inmunitario gastrointestinal (O’Hara *et al.* 2006). Así, tras la ingestión, los probióticos son capaces de proteger al hospedador a través de numerosos mecanismos, entre los que se incluye la modulación de genes implicados en la defensa de la inmunidad intestinal de la mucosa (Collado *et al.* 2009). De igual forma, las bacterias comensales son capaces de modificar la expresión génica de procesos de distinta índole como el metabolismo, absorción, la función de barrera y la maduración de las células epiteliales intestinales (Zeuthen *et al.* 2010).

Existen evidencias de que la interacción de los probióticos y los enterocitos es la responsable de las modificaciones complejas que sufre el epitelio. Así, la bacteria *L.acidophilus* produce una expresión diferencial de los genes relacionados con la adhesión en células Caco-2

(Han *et al.* 2011). Por otra parte, la administración de probióticos incrementa la expresión de los genes *muc*, responsables de la producción de mucinas, componentes fundamentales del mucus que recubre el epitelio (Dykstra *et al.* 2011). Además, se ha descrito que determinadas cepas probióticas aumentan la expresión de defensinas *in vitro* (Schlee *et al.* 2008). Un trabajo reciente demuestra que la bacteria probiótica *L.plantarum* potencia la expresión de 19 genes relacionados con las uniones estrechas o impermeables que se forman entre las células epiteliales (*tight junctions*), evitando que se rompan y fortaleciendo la integridad de la membrana (Anderson *et al.* 2010). Por tanto, gracias a la modulación de determinados genes de la mucosa, las bacterias probióticas son capaces de potenciar la función de barrera del epitelio intestinal y limitar el acceso de patógenos (Dykstra *et al.* 2011).

En el intestino, las respuestas inflamatorias e inmunitarias se hallan bajo el control de NF- κ B. Esta proteína de unión al DNA es el regulador central de la activación de la transcripción de un gran número de genes, que abarcan distintos procesos como adhesión celular, respuesta inmunitaria y pro-inflamatoria (expresión de citoquinas y quimioquinas), apoptosis, diferenciación y crecimiento (Lakhdari *et al.* 2010). Estudios recientes demuestran que la señalización de NF- κ B es un elemento crítico en la función homeostática pro-inflamatoria en el intestino (Hayden *et al.* 2006) y tanto la deficiencia como la sobreexpresión de este factor genera patologías como IBD crónica y obesidad (Lakhdari *et al.* 2010).

Como ya hemos mencionado, NF- κ B en su estado inactivo se localiza en el citoplasma unido a una molécula inhibidora, I κ B. Bajo condiciones pro-inflamatorias, I κ B se fosforila y deja libre a NF- κ B, que es capaz de migrar al núcleo y activar la transcripción de genes efectores. Los probióticos pueden interactuar con esta ruta a distintos niveles (Figura 11) (Tabla 3): inhibir la fosforilación de I κ B α , como *L.rhamnosus* GG (Zhang *et al.* 2005); otros evitan la degradación del proteosoma, como *L.plantarum* (Petrof *et al.* 2009); o impiden la translocación de NF- κ B al núcleo, como *L.reuteri* (Ma *et al.* 2004). Gracias a estos mecanismos previenen la activación de NF- κ B y atenúan la expresión de citoquinas (Thomas & Versalovic, 2010). De igual forma, el probiótico *Saccharomyces boulardii* modula las cascadas de señalización pro-inflamatorias en respuesta a *E.coli* ETEC, inhibiendo la activación de las MAP-quinasas y NF- κ B (Zanello *et al.* 2011). En este trabajo, la inhibición de los genes pro-inflamatorios se correlaciona con una disminución de la MAP-quinasa ERK 1/2 y fosforilación de p38.

Sin embargo, no todos los probióticos actúan de la misma forma. Así, se ha puesto de manifiesto que otras bacterias probióticas parecen tener efectos opuestos a la vía NF- κ B, es

decir, que activan esta ruta para incrementar la liberación de citoquinas (Thomas & Versalovic, 2010). Así, *B.lactis* BB12 y *L.casei* desencadenan la fosforilación de la subunidad p65 de NF- κ B y MAP-quinasa p38, activando la respuesta inmunitaria innata (Kim *et al.* 2006; Ruiz *et al.* 2005).

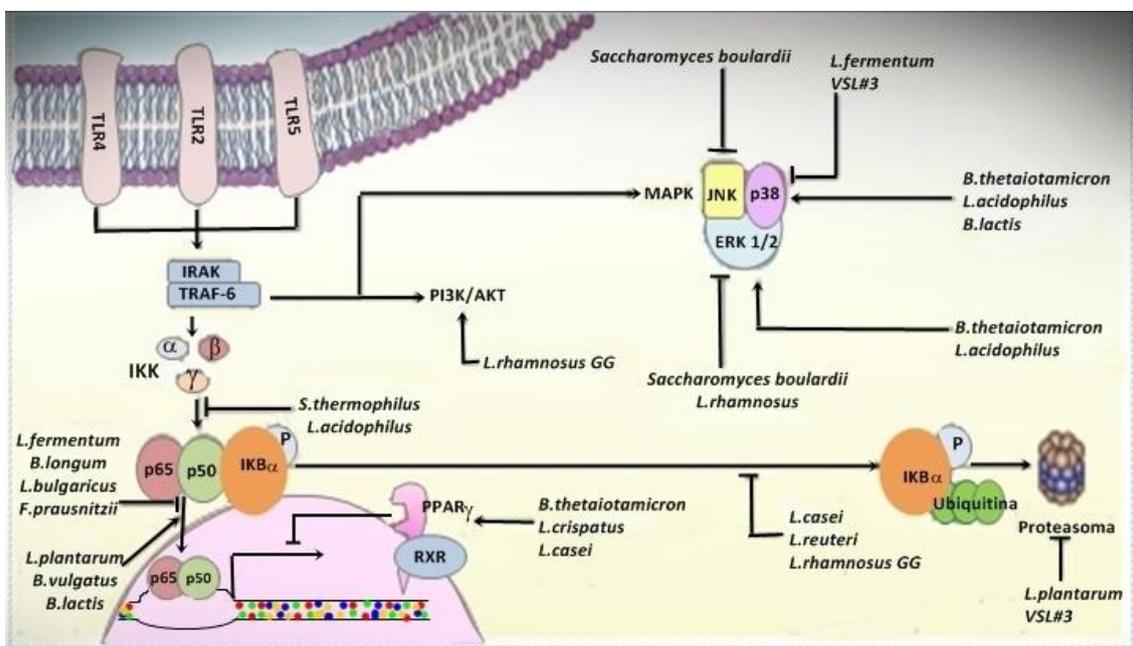


Figura 11

Modulación de las cascadas de señalización mediadas por probióticos en células intestinales. Adaptado de Thomas & Versalovic, 2010.

Activación se indica con una flecha (→) e inhibición con un bloqueo de la ruta (⊥)

Otras bacterias probióticas producen cambios a nivel de las MAP-quinasas, mediadores clave en las respuestas celulares frente a PAMP reconocidos por los PRR (Putala *et al.* 2010), que afectan a los niveles de expresión de citoquinas y procesos apoptóticos. Este es el caso de todas las cepas del género *Lactobacillus*, que activan las MAP-quinasas ERK 1/2, JNK y p38 e inician respuestas pro-inflamatorias epiteliales como la producción de IL-8 (Schlee *et al.* 2007; Segawa *et al.* 2011). Por otra parte, se ha descrito que el tratamiento de células epiteliales intestinales con el DNA de la combinación de probióticos VSL#3 es capaz de suprimir la fosforilación de p38, disminuyendo la secreción de IL-8, por una ruta independiente al sistema NF- κ B (Jijon *et al.* 2004).

Tabla 3. Modulación de las cascadas de señalización en células epiteliales intestinales por distintas cepas probióticas.		
Probiótico	Ruta	Efecto
<i>B.lactis</i> BB12	NF-κB	Activa RelA
	MAPK	Aumenta fosforilación de p38 (Ruiz <i>et al.</i> 2005)
<i>B.longum</i>	NF-κB	Disminuye la translocación de p65 (Bai <i>et al.</i> 2006)
<i>F.prausnitzii</i> DSMZ 17677	NF-κB	Inhibe la activación de NF-κB (Sokol <i>et al.</i> 2008)
<i>L.acidophilus</i> ATCC 4356	MAPK	Activa ERK1/2 y p38
	NF-κB	Disminuye la fosforilación de IκBα (Resta-Lenert <i>et al.</i> 2006)
<i>L.bulgaricus</i>	NF-κB	Disminuye la translocación de p65 (Bai <i>et al.</i> 2004)
<i>L.casei</i> DN-114001	NF-κB	Previene la degradación de IκBα (Tien <i>et al.</i> 2005)
<i>L.casei</i>	PPARγ	Incrementa el mRNA PPARγ (Eun <i>et al.</i> 2007)
<i>L.fermentum</i> DSMZ 20052	NF-κB	Bloquea la activación de NF-κB
	MAPK	Disminuye la activación de p38 (Frick <i>et al.</i> 2007)
<i>L.plantarum</i>	NF-κB	Inhibe proteosoma (Petrof <i>et al.</i> 2009)
<i>L.rhamnosus</i> GG ATCC 53103	MAPK	Aumenta la fosforilación de p38 y JNK (Tao <i>et al.</i> 2006)
	Apoptosis	Aumenta la expresión de los genes de MAPK (Lin <i>et al.</i> 2008)
		Activa AKT/PI3K (Yan <i>et al.</i> 2007)
		Previene la ubiquitinación y degradación de IκBα (Kumar <i>et al.</i> 2007; Lin <i>et al.</i> 2009)
<i>Saccharomyces boulardii</i>	Apoptosis	Previene la activación de casp-3 (Czerucha <i>et al.</i> 2000)

Los receptores TLR son indispensables en el funcionamiento de la maquinaria de la respuesta inmunitaria, tanto innata como adaptativa (Lavelle *et al.* 2010), ya que su estimulación genera señales intracelulares que desencadenan la activación de distintos factores de transcripción, entre los que se encuentra el NF-κB, que culmina en la expresión de distintas citoquinas. Al igual que en el caso anterior, los probióticos pueden regular de forma diferente la expresión de los TLR y de sus adaptadores, pudiendo manifestar efectos opuestos, pro- y anti-inflamatorios (Thomas & Versalovic, 2010).

El TLR2 reconoce peptidoglicano, componente principal de las bacterias *Gram* positivas, como el género *Lactobacillus*. Varios trabajos describen que los probióticos incrementan la expresión de los TLR2 y TLR9, activando la inmunidad innata (Kim *et al.* 2006; Tao *et al.* 2006; Vizoso Pinto *et al.* 2009; Voltan *et al.* 2007). La estimulación de TLR2 no sólo se limita a un aumento en la producción de citoquinas, sino que además potencia la barrera epitelial, ya que se ha demostrado que la activación de este TLR desempeña un papel importante en la resistencia frente a la invasión bacteriana (Abreu *et al.* 2005).

El TLR4 es capaz de reconocer LPS, presente en la pared de bacterias *Gram* negativas (Lavelle *et al.* 2010). Este TLR juega un papel fundamental en la defensa frente a *Salmonella*.

Un trabajo describe como la administración de *L.casei* a ratones aumenta la expresión de TLR4, lo que podría ser utilizado como mecanismo de vigilancia contra bacterias patógenas como *Salmonella* (Castillo *et al.* 2011).

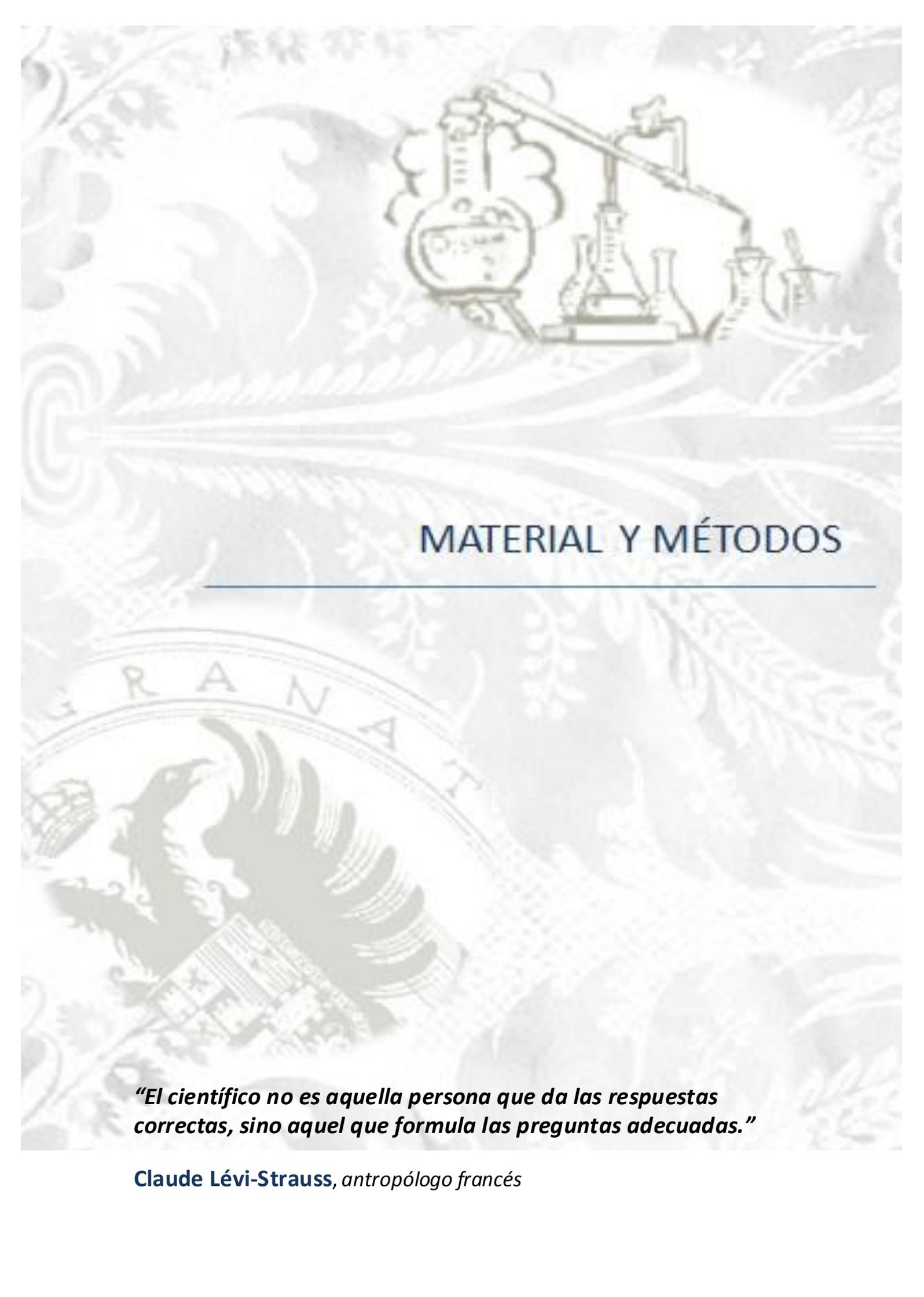
Por otra parte, el TLR5 es un mediador clave en las respuestas pro-inflamatorias frente a la flagelina de bacterias patógenas y comensales. Varios trabajos han demostrado que la administración de lactobacilos incrementa la expresión de este TLR en respuesta a *Salmonella* (Vizoso Pinto *et al.* 2009; Castillo *et al.* 2011). Además, está descrito que la flagelina activa la ruta de las MAP-quinasas en células epiteliales intestinales (Zanello 2011).

Varios trabajos describen un aumento de la expresión del TLR9 cuando se administran probióticos, como *L.johnsonii* y *L.casei* (Kingma *et al.* 2011; Castillo *et al.* 2011). Este TLR es necesario para mediar en el efecto anti-inflamatorio inducido por los probióticos (Lavelle *et al.* 2010). Recientemente, se ha propuesto que la estimulación apical de TLR9 en células epiteliales intestinales conduce a un estado de mayor vigilancia inmunológica (Kingma *et al.* 2011).

Un hecho importante es que cuando se utilizan sobrenadantes probióticos libres de células el número de genes regulados es bajo, lo que sugiere que estas sustancias no son tan potentes como las bacterias intactas en la regulación de la expresión génica. Sin embargo, cabe destacar que estos metabolitos son capaces de inducir cambios biológicos y génicos en el epitelio intestinal, por tanto, estos factores secretados por los probióticos, presentes en el medio, participan en el efecto beneficioso que éstos producen (Putala *et al.* 2010).

Igualmente, es importante señalar que los efectos que se observan son cepa-dependientes y que no se debe asumir que todas las cepas de una especie bacteriana comparten los mismos efectos (Thomas & Versalovic, 2010).

Por último, cabe destacar que actualmente, gracias a las nuevas tecnologías, es posible el análisis de una matriz de genes, lo que proporciona un nuevo enfoque para evaluar los efectos de los probióticos en células inmunitarias, aportando una visión global de los cambios de los patrones de expresión de los genes seleccionados en las distintas rutas (Van Baarlen *et al.* 2011). Este hecho supone un gran avance y ayudará a entender los mecanismos de actuación de los probióticos en el epitelio intestinal.



MATERIAL Y MÉTODOS

“El científico no es aquella persona que da las respuestas correctas, sino aquel que formula las preguntas adecuadas.”

Claude Lévi-Strauss, antropólogo francés

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES



El proyecto “Identificación, aislamiento y caracterización de microorganismos probióticos”, suscrito entre HERO España S.A, el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada y la Fundación Empresa-Universidad de Granada (Referencia A2659), finalizó con el aislamiento e identificación de tres cepas bacterianas: *Lactobacillus rhamnosus* HERO 22A, *Lactobacillus paracasei* HERO 7 y *Bifidobacterium breve* HERO 15B. Estas tres cepas se enviaron a la Colección Nacional de Cultivo de Microorganismos (CNCM) del Instituto Pasteur para su proceso de registro y su patentado con la siguiente referencia PCT AX090006WO.

Las tres cepas de bacterias fueron aceptadas como cepas innovadoras y se les asignó la siguiente denominación:

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

Posteriormente, estas bacterias probióticas han dado lugar a un segundo proyecto, “Caracterización de la actividad probiótica de las bacterias *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-

4036, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 y *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035", dentro del cual se incluye la presente tesis.

Bacterias

☞ Origen de las cepas probióticas de estudio

Como ya hemos mencionado, para que una cepa bacteriana pueda ser considerada un potencial probiótico debe cumplir las siguientes premisas:

- * Formar parte de la microbiota del intestino humano
- * No ser patógeno ni toxigénico
- * Mantenerse viable en medio ácido del estómago y en contacto con la bilis del duodeno
- * Poseer capacidad de adhesión a las células epiteliales intestinales
- * Adaptarse a la microbiota intestinal sin desplazar a la ya nativa o existente
- * Producir sustancias antimicrobianas
- * Tener capacidad para aumentar de forma positiva las funciones inmunes y las capacidades metabólicas (West *et al.* 2009).

En nuestro caso, se seleccionaron lactantes alimentados con leche materna exclusivamente, ya que la microbiota intestinal de estos lactantes es muy rica en bifidobacterias (Boesten *et al.* 2010) y lactobacilos (Nakamura *et al.* 2009), a los que se atribuyen parte de las propiedades protectoras de la leche materna en relación con la menor incidencia de enfermedad en los lactantes, comparados con los alimentados con lactancia artificial. Se aislaron tres cepas a partir de las heces de estos niños y se les realizaron pruebas esenciales para evaluar su capacidad como probióticos. Estos microorganismos fueron capaces de resistir las condiciones de la digestión gástrica e intestinal, la acidez gástrica (prueba de pH) y las sales biliares (Oxgall®). Se demostró que eran capaces de adherirse a las células del epitelio intestinal, en concreto, a células HT29 (Vieites *et al.* PCT AX090006WO). Esta capacidad de supervivencia de estas bacterias podría suponer una ventaja selectiva en cuanto a la colonización y mantenimiento de las bacterias en el tracto gastrointestinal humano. Además, la información filogenética de sus RNA 16s, clasifican a estas nuevas bacterias como

cepas individuales: *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036, *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 y *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035.

☞ Obtención del sobrenadante probiótico libre de células

En este trabajo, se han utilizado sobrenadantes del medio de cultivo de crecimiento de las bacterias probióticas sometidas a estudio, ensayados frente a enterobacterias.

Estos sobrenadantes fueron suministrados por la empresa Biopolis S.L., bajo el protocolo que se detalla a continuación.

Las cepas probióticas del género *Lactobacillus* se cultivaron en medio líquido Man, Rogosa & Sharpe (MRS) (Oxoid) durante 17 h o 24h, a 37 °C, mientras que la cepa de *Bifidobacterium* se cultivó en medio MRS adicionado con cisteína 0.05%. Transcurrido este tiempo, el sobrenadante de cada una de las cepas se recogió por centrifugación, se liofilizó y se diluyó para concentrarlo diez veces su volumen, se neutralizó el pH hasta un valor de 6.0 y se esterilizó con un filtro *Millipore* de 0.22 µm de diámetro. Alícuotas del sobrenadante neutralizado y esterilizado se almacenaron en congelación a -80 ° C, hasta su uso.

☞ Patógenos ensayados

Las bacterias patógenas fueron obtenidas de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT).

Debido al efecto cepa descrito en numerosos trabajos (Salminen *et al.* 2010) y atendiendo al estudio de patógenos con distinto mecanismo de patogenicidad, se estudiaron las tres bacterias probióticas frente a enteropatógenos (tabla nº 4): tres cepas de *E.coli* enterotoxigénica (ETEC), tres cepas de *E.coli* enteropatógena (EPEC) y tres cepas de *Salmonella enterica*.

Tabla 4. Bacterias patógenas ensayadas, pertenecientes a la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)

Colección Española de Cultivos Tipo (CECT)	Bacteria patógena
CECT 443 CECT 4594	<i>Salmonella enterica</i> sub <i>typhimurium</i>
CECT 725 CECT 727	<i>Salmonella enterica</i> sub <i>typhi</i>
CECT 729 CECT 742	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena EPEC
CECT 434 CECT 501 CECT 515	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica ETEC

Líneas celulares

☞ *Células epiteliales intestinales Caco-2*

Se utilizaron células epiteliales intestinales Caco-2, procedentes de cáncer de colon (tumor de cáncer de colon primario de un hombre caucasiano de 72 años, pase 42), obtenidas del Centro de Instrumentación Científica de la UGR.

Estas células se cultivaron en medio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM; Sigma Aldrich), 10% suero fetal bovino (Invitrogen), 1% glutamax (Invitrogen) y 1% de una solución de antibióticos (penicilina G (10 IU/ml), estreptomina sulfato (100 µg/ml) y anfotericina B (250ng/ml); Invitrogen), hasta su confluencia en condiciones estándar (37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad). Después de una semana de post-confluencia, donde es bien conocido que los enterocitos se encuentran diferenciados, se realizaron los ensayos.

☞ *Células dendríticas de Langerhans*

Se utilizaron las células dendríticas de Langerhans, derivadas de células progenitoras CD34⁺ (células madre hematopoyéticas), obtenidas a partir de sangre del cordón umbilical, y comercializadas por *MatTek Corporation* (Ashland, MA).

Para su cultivo se siguieron los protocolos descritos por *MatTek Corporation*. Estas células expresan CD1a, HLA-DR, CD80, CD86, CD40, CD11c, CD54, CD206, gránulos de Birbeck, así como distintos TLR: TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6, TLR7 y TLR9.

Como particularidad, estas células crecen en suspensión. Además, después de un día del proceso de descongelación, se realizaron los experimentos, ya que la viabilidad de estas células disminuye con el transcurso de los días.

El medio en el que se realizaron los experimentos, también fue suministrado por *MatTek Corporation*. Básicamente, está compuesto de medio RPMI-1640, suero fetal bovino y antibióticos (penicilina y estreptomycin). Para nuestros ensayos, se utilizó el medio DC-MM y DC-BAS, en los que la única diferencia es la presencia o no de una combinación de citoquinas, respectivamente.

☞ Células T

En los ensayos de proliferación, se utilizaron células T autólogas, es decir, procedentes del mismo individuo a partir del cual se han obtenido las células dendríticas, comercializadas por *MatTek corporation*.

Al igual que en el caso anterior, para su cultivo se siguieron los protocolos descritos por la casa comercial. En este caso, el medio utilizado para los experimentos fue TC-MM y TC-BAS, suministrados por el fabricante. La particularidad del medio TC-MM es la presencia de citoquinas en su composición.

☞ Preparación de las células dendríticas y células T

El protocolo de descongelación de las células dendríticas/células T es el recomendado por el fabricante.

Brevemente, se descongela el vial a 37 °C, durante 1-2 minutos.

Se transfiere la suspensión celular de 2 ml a un tubo cónico de 15 ml y se lleva a un volumen de final de 10 ml de medio DC-BAS, para las células dendríticas, y TC-BAS, para las

células T. Este procedimiento es extremadamente delicado así que, para no dañar las células, no se debe re-pipetear y es necesario realizarlo lentamente.

Se centrifuga a 200-300 g, a temperatura ambiente durante 10 minutos.

Se descarta el sobrenadante con cuidado dejando un volumen de 0.5 ml. Se resuspende el precipitado en 2 ml de medio adecuado, DC-MM y TC-MM, medio de mantenimiento para las células dendríticas y células T, respectivamente.

Se cuentan las células con una cámara de *Neubauer*. Básicamente, se trata de un portaobjetos que tiene dos zonas ligeramente deprimidas y que en el fondo posee una cuadrícula de dimensiones conocidas. Luego, se prepara una solución con 50 μ l de la suspensión celular y el mismo volumen de una solución de azul tripán (*trypan blue*), colorante vital. Las células vivas con la membrana intacta no son coloreadas. Sin embargo, es capaz de atravesar la membrana de las células muertas. Por tanto, bajo el microscopio, las células viables son incoloras y las células muertas presentan un distintivo color azul. Se cuentan 4 campos y se aplica la siguiente fórmula:

$$\text{N}^{\circ} \text{ de células} = \text{n}^{\circ} \text{ de células contadas} \times \text{factor de dilución} \times \text{factor de corrección} \times \text{n}^{\circ} \text{ de ml totales}$$

En nuestro caso, el factor de dilución es 2, porque la solución se prepara con el mismo volumen de células y azul tripán. El factor de corrección viene dado por el fabricante de acuerdo a la profundidad de la cámara y en nuestro caso es de 10^4 .

Posteriormente, se ajusta el volumen a $1-2 \times 10^5$ células/ml y se incuban a 37°C , durante toda la noche.

Después de este periodo, las células están listas para proceder con el ensayo.

Es importante señalar que estas células son “*ready-to-use*”, por lo que no se multiplican.

DISEÑOS EXPERIMENTALES

Experimento 1: Contacto directo de las células dendríticas en presencia de las cepas probióticas

Objetivos.

- ✦ *Determinación de la maduración de las células dendríticas*
- ✦ *Producción de citoquinas de las células dendríticas*
- ✦ *Determinación del cambio de expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria*

Método de ensayo.

Para este experimento se siguió el protocolo utilizado por Vossenkämper *et al.* (2010).

Se cultivaron las bacterias patógenas en aerobiosis y agitación durante 8h en el medio de cultivo recomendado por la CECT, es decir, en *Tryptone Soya Broth* (TS) (Cultimed), en condiciones estándar (37 °C, 5% CO₂). Posteriormente, se realizaron diluciones 1/500 de cada patógeno en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich) y suero fetal bovino (Invitrogen) al 10% y se incubaron bajo las mismas condiciones durante una noche. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 4000 x g durante cinco minutos. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de PBS estéril (Invitrogen). Se determinó la densidad óptica (DO) de cada bacteria a 620 nm y se diluyeron en medio RPMI-1640, a una concentración de 1-2 x 10⁶ unidades formadoras de colonias (UFC)/ml.

Tras el protocolo de descongelación, las células dendríticas se centrifugaron a 200-300 g. Se eliminó el medio DC-MM (MatTek) y se resuspendieron en medio RPMI-1640, a una densidad de 2 x 10⁵ células dendríticas por pocillo.

Las células dendríticas se incubaron con las bacterias, patógenas o probióticas, o sus sobrenadantes durante un periodo de cuatro horas, a 37 °C y atmósfera controlada. Los distintos grupos ensayados se encuentran detallados en el siguiente apartado. Como control positivo se usó lipopolisacárido (LPS; Sigma Aldrich) a una concentración de 20 ng/ml.

Transcurrido el tiempo de incubación, se centrifugaron las placas a 200-300 g, durante 10 minutos a temperatura ambiente. El sobrenadante se guardó a -80 °C para su uso posterior. Las células se resuspendieron en medio DC-MM y se incubaron durante 20 h, en condiciones estándar.

Después de este periodo, se centrifugaron las placas a 200-300 g y se recogieron las muestras. El sobrenadante se recogió para valorar la presencia de determinadas citoquinas. Se añadió 600 µl del buffer de lisis al precipitado celular para conservarlo hasta la extracción del RNA a -80 °C. Asimismo, otros pocillos se utilizaron para comprobar el fenotipo de distintos marcadores de maduración y su viabilidad.

El desarrollo de este trabajo experimental se encuentra resumido en la figura nº 12.

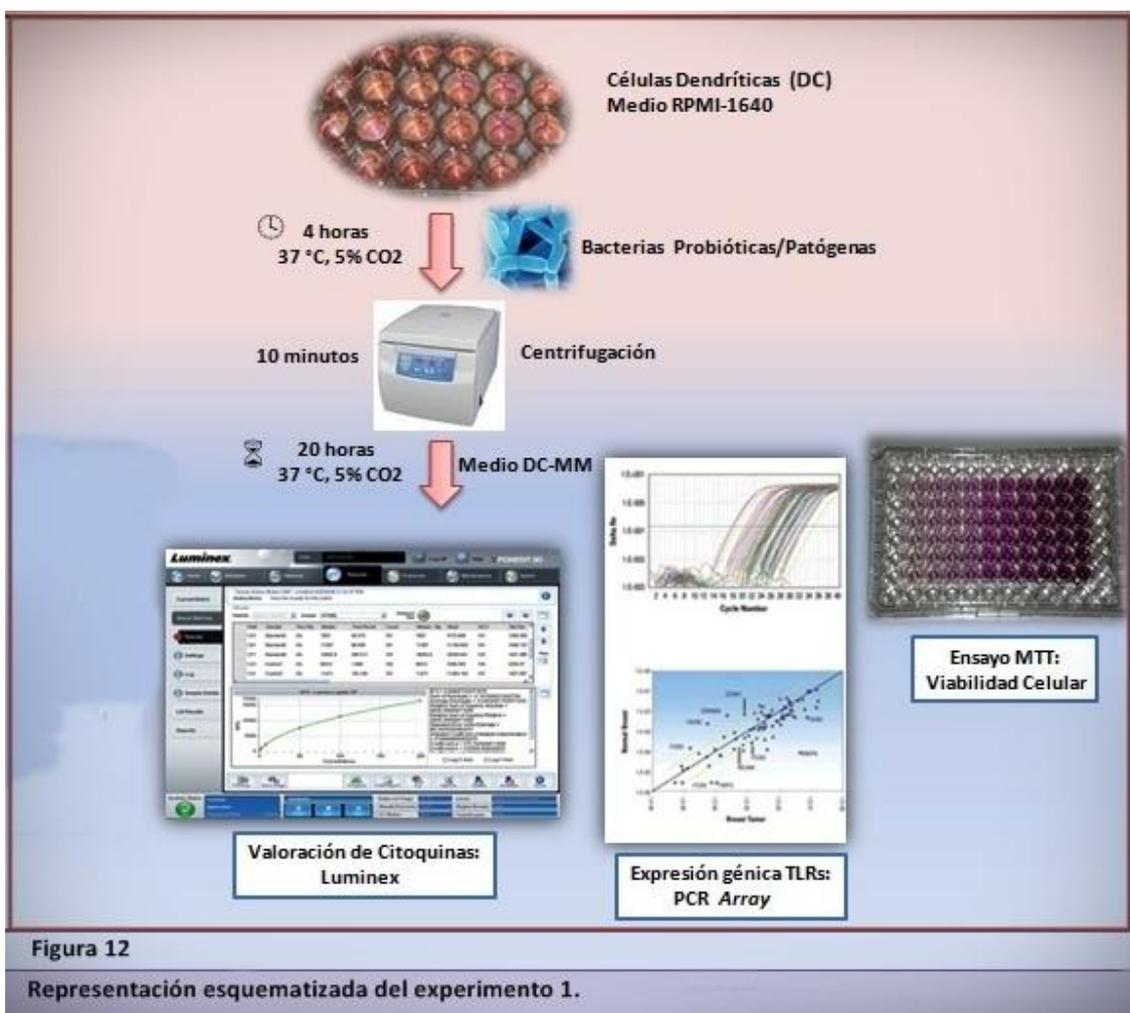


Figura 12
Representación esquematizada del experimento 1.

Grupos de ensayo

Se seleccionaron tres sobrenadantes probióticos, neutralizados, concentrados diez veces y cultivados 24 h, suministrados por la empresa Biopolis, en los que previamente ya se había observado un efecto inhibitorio de la actividad de las enterobacterias en un modelo *in vitro* utilizando células epiteliales intestinales Caco-2. Asimismo, se emplearon las tres bacterias probióticas directamente, crecidas durante 18h, en condiciones de anaerobiosis, a 37 C y 5 % de CO₂.

De estos grupos, se ensayaron distintas combinaciones con los patógenos de interés, además de los respectivos controles. Las mezclas detalladas se muestran en las tablas nº 5 y 6.

La suspensión bacteriana se añadió al 7% v/v.

Tabla 5. Patógenos y bacterias probióticas aisladas, empleados en el experimento 1.	
Bacteria Probiótica	Patógeno
<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034	<i>Salmonella typhimurium</i> CECT 4594
	<i>Salmonella typhi</i> CECT 725
<i>B. breve</i> CNCM I-4035	<i>Salmonella typhi</i> CECT 725
<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036	<i>E. coli</i> ETEC CECT 515
	<i>E. coli</i> EPEC CECT 729
	<i>Salmonella typhimurium</i> CECT 4594

Tabla 6. Patógenos y sobrenadantes de las bacterias probióticas aisladas (24h de cultivo, neutralizados), empleados en el experimento 1.	
Probiótico	Patógeno
Sob. <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034, 24h	<i>Salmonella typhi</i> CECT 725
Sob. <i>B. breve</i> CNCM I-4035, 24h	<i>Salmonella typhi</i> 725
<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036, 24 h	<i>E. coli</i> EPEC CECT 742

Determinación de citoquinas

Principio del ensayo

En respuesta a la detección por parte de las células dendríticas de antígenos o estímulos inflamatorios, se produce la activación de mecanismos de secreción de citoquinas, las cuales dirigirán que tipo de respuesta inmunitaria se genera (López *et al.* 2010).

El fundamento de esta técnica es el uso de microesferas, idénticas entre sí en cuanto a tamaño, pero cada una teñida de una forma diferente, tapizadas con un anticuerpo de captura específico. Cuando un analito es capturado por una microesfera, se introduce un anticuerpo de detección, unido a biotina. La mezcla de reacción se incuba con un conjugado de estreptavidina-ficoeritrina (PE), la molécula *reporter* o indicadora. Las microesferas pasan a través un láser, que excita a la PE. La cantidad de citoquina presente en la muestra se determina midiendo la intensidad de fluorescencia de la PE del anticuerpo de detección.

Procedimiento

Se determinó en el sobrenadante la presencia y la cantidad de las siguientes citoquinas: IFN γ , IL-10, IL-1 β , IL-12 (p70 y p70+p40), IL-6, IL-8, TNF- α , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , RANTES y TGF- β , utilizando los kits de ensayo LINCOPlex (*Linco Research Inc, Mo, USA*), tal y como describe el fabricante, y la metodología de detección *Luminex XMap*.

Brevemente, la placa se bloquea con 200 μ l de la solución de ensayo o *assay buffer*. A continuación, se incorpora el anticuerpo. Se añade el estándar, controles y muestra en los pocillos apropiados. Posteriormente, se añade medio RPMI-1640 a los pocillos del estándar y controles, así como el buffer de ensayo a los pocillos de las muestras. Se incuba entre 16-18 h a 4 °C en oscuridad. Tras este periodo, se lava dos veces con el reactivo de lavado. A continuación, se añade el anticuerpo de detección.

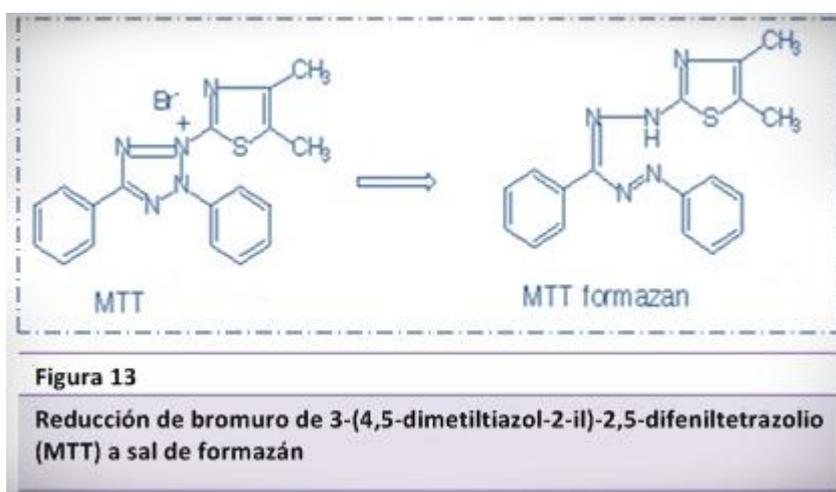
Tras una hora de incubación en agitación, a temperatura ambiente y en oscuridad, se incorpora el conjugado de estreptavidina-ficoeritrina. Se incuba nuevamente en las mismas condiciones, durante media hora.

Finalmente, se lava dos veces con la solución de lavado y se añade el líquido de sistema a cada pocillo. Se agita suavemente durante 5 minutos a temperatura ambiente y se procede a su lectura en el aparato Luminex (*Luminex Corporation*).

Estudio de la viabilidad celular

Principio del ensayo

Para valorar la viabilidad celular se escogió un método colorimétrico. El método MTT permite evaluar la viabilidad celular mediante la metabolización de un compuesto cuyo producto resultante es medible colorimétricamente. El bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) es un reactivo de óxido-reducción que, en condiciones de disminución de la concentración de oxígeno, cambia de color: de amarillo (estado oxidado) a púrpura (estado reducido) (Figura 13). El producto generado se conoce como sal de formazán. Esta reducción sólo tiene lugar cuando las reductasas están activas, por ello, las células no viables no pueden metabolizar el MTT.



Procedimiento

Se siguió el protocolo empleado por Ayehunie *et al.* (2009).

Brevemente, se añadió 200 μ l de la solución de MTT (1mg/ml en medio RPMI-1640; Sigma Aldrich) a cada pocillo y se incubó durante 4 h en condiciones estándar y oscuridad.

Tras este tiempo, se centrifugaron 10 minutos a 300 g. A continuación, se añadió 200 μ l de 0,04N de HCl en isopropanol (*acidic isopropanol*, IPA; Sigma Aldrich). Para evitar evaporaciones, se selló la placa. Se incubó 1 h en agitación y oscuridad a 37 °C y 5% CO₂.

Posteriormente, se centrifugó la placa 10 minutos a 300g y se transfirió la solución a una placa de 96 pocillos. Se leyó la absorbancia a 570 nm en un lector de placa multipocillos (Thermo Scientific Multiskan FC, NY, USA).

Los resultados de viabilidad se expresan como porcentaje de densidad óptica con respecto a los controles (células dendríticas sin tratar) considerando que estos últimos poseen un 100% de viabilidad.

Expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria

Principio del ensayo

Los receptores tipo *Toll* (TLR) forman una familia de receptores que detectan bacterias patógenas a través de patrones moleculares específicos, por lo que ocupan un lugar esencial dentro de la respuesta inmunitaria.

Procedimiento

A partir de las células dendríticas tratadas con los distintos probióticos, se extrajo el RNA total mediante el kit de extracción *RNAqueous* (Ambion), de acuerdo a las especificaciones del fabricante.

Tras este procedimiento, se aplicó un tratamiento con la *TurboDNAsa* (Ambion), para eliminar cualquier contaminación de DNA genómico presente en las muestras.

Posteriormente, se cuantificó mediante el Kit *Rediplate 96 Ribogreen RNA Quantitation* (Invitrogen).

Por otra parte, se comprobó su integridad, utilizando el kit *RNA 6000 Pico* (Agilent) y el aparato *Bioanalyzer 2100* (Agilent), el cual nos da la información necesaria para conocer el estado de degradación del RNA de las muestras.

De igual forma, se evaluó la calidad del RNA utilizando *Human RNA QC PCR Array* (SABiosciences), el cual contiene distintos controles de PCR, que valoran la integridad del RNA, inhibidores de la transcripción inversa, así como contaminación por DNA genómico.

Una vez comprobada la calidad de las muestras, el RNA fue transcrito a cDNA, empleando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), usando hexámeros al azar en lugar de oligodT.

Los genes *housekeeping* o constitutivos se seleccionaron mediante *Human Housekeeping Genes Profiler PCR Array* (SABiosciences). Estos genes se expresan de forma constante y se utilizan para normalizar la expresión relativa de los genes estudiados.

Para cuantificar la variación de la expresión génica se utilizó el siguiente array, *TLR Signaling Pathway PCR Array* (SABiosciences). Usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real y siguiendo las indicaciones del fabricante, se analizó la expresión de 20 genes de los 84 disponibles, incluyendo genes de inicio y final de la ruta de la cascada de señalización de los TLR, así como aquellos implicados en la regulación. La ruta completa se muestra en la figura 7.

Los 20 genes de estudio fueron los siguientes: *TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9, MYD88, TNF, IRAK-1, IRAK-4, TOLLIP, CASP8, IL-10, TAK-1, JNK, NFKBIA, NFKB-1, TBK-1, MAPK14* e *IRF-3*.

Experimento 2: Co-cultivo de células Caco-2 y células dendríticas en presencia de las cepas probióticas

Objetivo.

- ✦ *Estudio de la influencia de las cepas probióticas sobre las células Caco-2 cultivadas en presencia de las células dendríticas.*

Método de ensayo.

Para este procedimiento, utilizamos el modelo de un cultivo tipo *transwell*, es decir, dos compartimentos separados por una membrana (Figura 14).

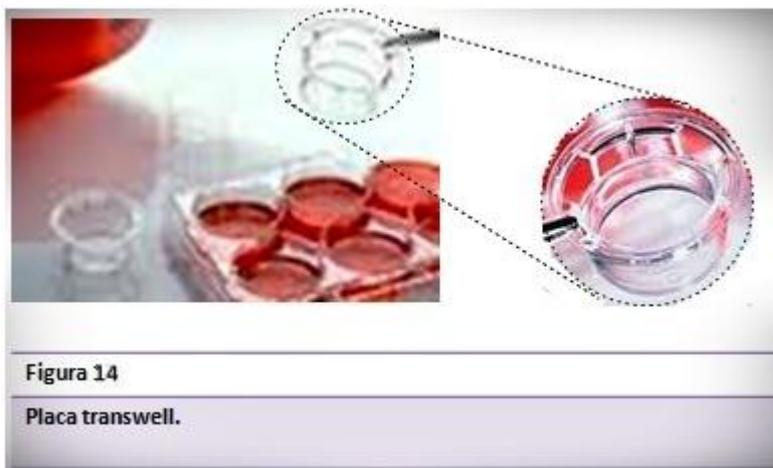


Figura 14

Placa transwell.

Primero, las células epiteliales intestinales, Caco-2, se cultivaron en la parte apical de una membrana o *transwell* (poro de 3 μm , diámetro de 6,5 mm; Corning) durante 15-21 días, hasta que alcanzó una resistencia trans-epitelial de aproximadamente 1000 Ωcm^2 (Vossenkämper *et al.* 2010; Mileti *et al.* 2009). Después de este tiempo de cultivo, las células Caco-2 están totalmente diferenciadas en enterocitos.

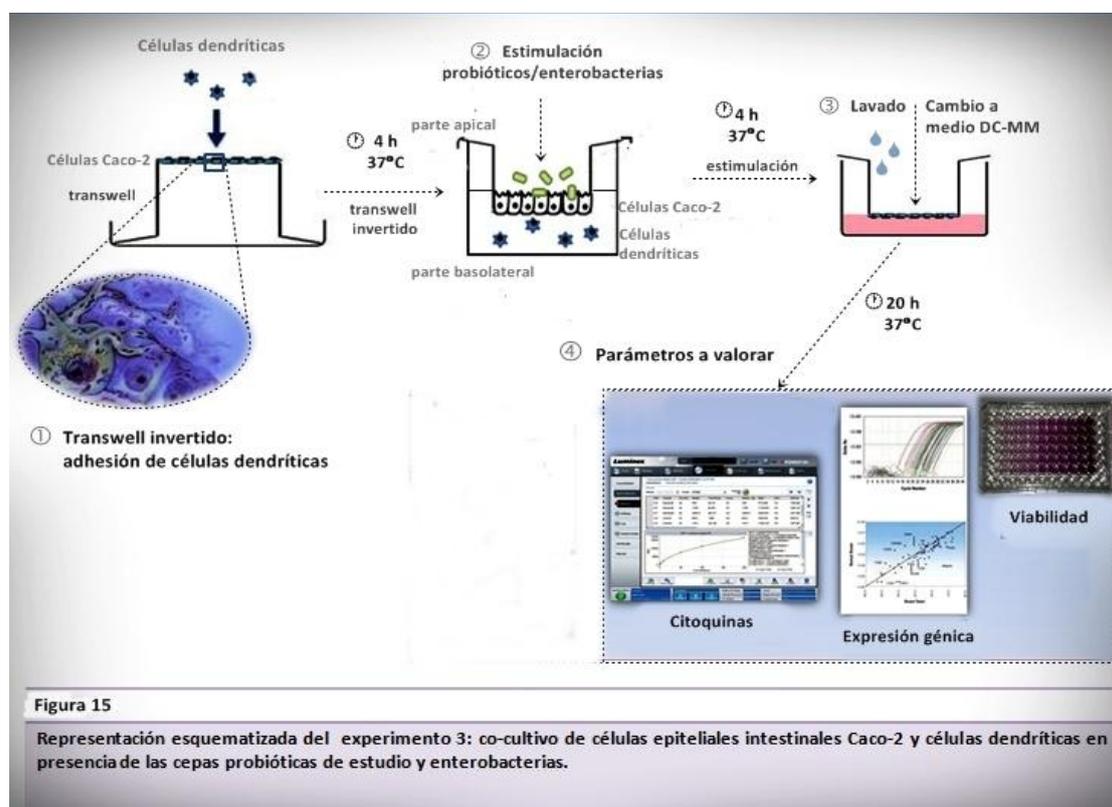
Para el cultivo de las bacterias, patógenas y probióticas, se siguió el protocolo de Vossenkämper *et al.* (2010). Se cultivaron las bacterias patógenas en aerobiosis y agitación durante 8h en el medio de cultivo recomendado por la CECT, en *Tryptone Soya Broth* (TS) (Cultimed), en condiciones estándar (37 °C, 5% CO_2). Posteriormente, se realizaron diluciones 1/500 de cada patógeno en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich) y suero fetal bovino (Invitrogen) al 10% y se incubó bajo las mismas condiciones toda la noche. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 4000 x g durante cinco minutos. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se resuspendió en 1 ml de PBS estéril (Invitrogen). Se determinó la densidad óptica (DO) de cada bacteria a 620 nm y se diluyeron en medio RPMI-1640, a una concentración de $1-2 \times 10^6$ UFC/ml. Las bacterias probióticas siguieron este mismo protocolo pero se cultivaron en condiciones anaeróbicas y la concentración final fue de $1-2 \times 10^7$ UFC/ml.

Las células dendríticas se prepararon de acuerdo con las especificaciones del fabricante (detallado en el apartado Preparación de las células dendríticas / células T).

El proceso se llevó a cabo de la siguiente manera detallada a continuación (Figura 15). Se siguió el protocolo usado por Rimoldi *et al.* (2005), con ligeras modificaciones. Los *transwells* se invirtieron en una placa de 6 pocillos. Se pipeteó un volumen de 50 μl , con una concentración de 50000 células dendríticas, en medio RPMI-1640. Se incubaron durante 4

horas, a 37°C y 5% de CO₂, para permitir que se adhiriesen a la membrana. Transcurrido este periodo, se volteó de nuevo el *transwell* y se colocó en una placa de 24 pocillos. En la parte basolateral del *transwell*, se pipetearon 250000 células dendríticas por pocillo en un volumen de 600 µl de medio RPMI-1640.

Se trataron los co-cultivos con las bacterias probióticas, así como distintas combinaciones con bacterias patógenas. En la parte apical, se pipetearon 100 µl de cada uno de los tratamientos. Asimismo, se incluyeron controles negativos y positivos, en este último caso, LPS (20 ng/ml) (Sigma Aldrich). Se incubaron durante 4 h en condiciones estándar. Se retiró el *transwell*. Se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos. Se recogió el sobrenadante. Se sustituyó el medio RPMI-1640 por medio DC-MM (que ya posee antibióticos) (MatTek). El *transwell* se lavó con una solución de PBS al 1% de PSN (Invitrogen), que contiene estreptomicina, anfotericina y penicilina, para eliminar los posibles restos bacterianos. Se incubaron durante 20 h, en condiciones estándar. Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 300 g durante 10 minutos. El sobrenadante se congeló a -80 °C y se guardó para la valoración de distintas citoquinas. Las células dendríticas fueron utilizadas para la cuantificación de la expresión génica, ensayos de viabilidad celular y marcadores de superficie. Las células caco-2 se reservaron para el estudio de cambios en la expresión génica.



Viabilidad celular

Procedimiento

Se siguió el protocolo empleado por Ayehunie *et al.* (2009). Se añadió 200 µl de la solución de MTT (Sigma Aldrich; 1mg/ml en medio RPMI-1640) a cada pocillo. Se incubó durante 4 h en condiciones estándar. Se centrifugaron 8-10 minutos a 200-300 g. Se añadió 200 µl de 0,04N de HCl en isopropanol (Sigma Aldrich; *acidic* isopropanol, IPA) y se pipeteó varias veces. Para evitar evaporaciones, se selló la placa. Se incubó 1 h en agitación. Se centrifugó la placa y se transfirió la solución a una placa de 96 pocillos. Se leyó la absorbancia a 570 nm en un lector de placa multipocillos (Thermo Scientific Multiskan FC).

Los resultados de viabilidad se expresan como porcentaje de densidad óptica con respecto a los controles considerando que estos últimos poseen un 100% de viabilidad.

Determinación de citoquinas

Procedimiento

Se determinó en el sobrenadante la presencia y la cantidad de las siguientes citoquinas: IFN γ , IL-10, IL-1 β , IL-12 (p70 y p70+p40), IL-6, IL-8, TNF- α , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , RANTES y TGF- β , utilizando los kits de ensayo LINCOplex (*Linco Research Inc*), tal y como describe el fabricante, y la metodología de detección *Luminex XMap*.

Expresión de genes implicados en la respuesta inmunitaria

Procedimiento

A partir de las células dendríticas tratadas con los distintos probióticos, se extrajo el RNA total mediante el kit de extracción *RNAqueous* (Ambion), de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Posteriormente, se cuantificó mediante el Kit *Rediplate 96 Ribogreen RNA Quantitation* (Invitrogen) y se comprobó su integridad, utilizando el kit *RNA 6000 Pico* (Agilent)

y el aparato *Bioanalyzer 2100* (Agilent). A continuación, el RNA fue transcrito a cDNA, empleando el kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems), usando hexámeros al azar en lugar de oligodT.

Las células epiteliales intestinales Caco-2 se recogieron de la siguiente manera. Se agregó 150 µl de Tripsina-EDTA (Sigma Aldrich) y se incubaron de cinco a diez minutos a 37 °C. Se recogió toda la superficie celular a un Eppendorf® y se siguió el protocolo de extracción de RNA del kit RNeasy (Qiagen). El RNA se cuantificó en el Nanodrop (Fisher Scientific). Se comprobó su integridad utilizando el Kit Nano 6000 (Agilent) en el aparato Bioanalyzer 2100 (Agilent). Se transcribió a cDNA, empleando el kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems).

Para cuantificar la variación de la expresión génica se utilizó el siguiente array, *TLR Signaling Pathway PCR Array* (SABiosciences). Usando la PCR a tiempo real, se analizó la expresión de 20 genes de los 84 disponibles, incluyendo genes de inicio y final de la ruta de la cascada de señalización de los TLR, así como aquellos implicados en la regulación. Los 20 genes seleccionados fueron los siguientes: *TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR9, MYD88, TNF, IRAK-1, IRAK-4, TOLLIP, CASP8, IL-10, TAK-1, JNK, NFKBIA, NFKB-1, TBK-1, MAPK14* e *IRF-3*.

Experimento 3. Ensayo de proliferación de las células T

Objetivo.

- ✦ *Determinación de la proliferación de las células T autólogas, en presencia de las células dendríticas, pre-tratadas con las cepas probióticas aisladas.*

Método de ensayo.

Se siguió el protocolo descrito por Mohamadzadeh *et al.* (2005), con algunas modificaciones.

Inicialmente, se estimularon las células dendríticas con las bacterias probióticas aisladas, a 37 °C por un periodo de 4h. Después de la incubación, se lavaron las células con DC-BAS.

Posteriormente, se trataron con mitomicina C (Sigma Aldrich) durante 30 minutos a 37°C. Se lavaron las células dendríticas con DC-BAS.

Se ajustó la concentración a 100000 células dendríticas / 100 µl. Para este ensayo se utilizó un número variable de células dendríticas: 1000, 10000, 50000 y 100000, y un número fijo de 100000 TC/ 100 µl a cada pocillo.

Como controles negativos se utilizaron cultivos de células dendríticas, células T y un co-cultivo de ambas, sin tratar, mientras que como control positivo se utilizó fitohemaglutinina (PHA; Sigma Aldrich).

Se co-cultivaron las células dendríticas y células T por un periodo de 48 h, a 37°C y atmósfera controlada.

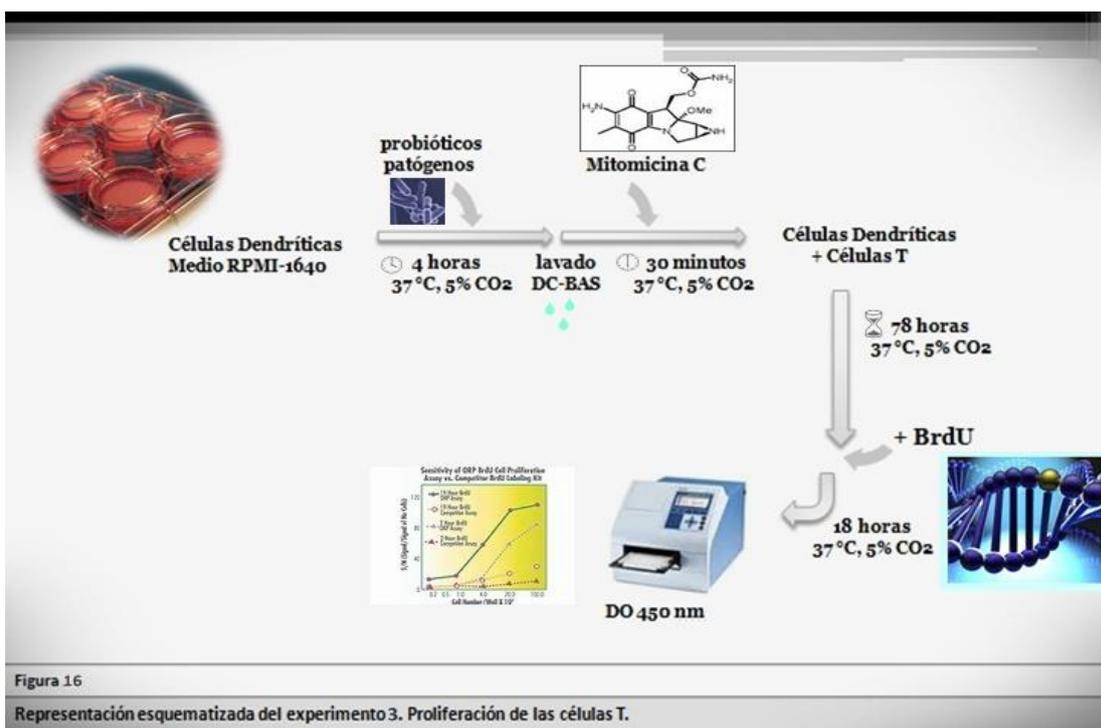
Tras este tiempo, se centrifugó la placa, se retiró 100 µl de medio de cada pocillo y se añadió la misma cantidad de medio TC-MM fresco.

Posteriormente, después de 30 horas de incubación, se utilizó un kit de 5-Bromo-2'-deoxiuridina (BrdU; *Cell Proliferation ELISA Kit, Roche Applied Science*), para valorar la proliferación celular, siguiendo las recomendaciones del fabricante. La incorporación de Brd U se valoró por espectrofotometría a 450 nm. El índice de estimulación se calculó mediante el ratio:

$$\text{Índice de estimulación: } \frac{\text{Abs}_{450\text{ nm}} \text{ TC + DC estimuladas}}{\text{Abs}_{450\text{ nm}} \text{ TC+DC sin tratar}}$$

Abs = absorbancia
DC: células dendríticas
TC: células T

La figura 16 representa de forma esquematizada este experimento.



Análisis estadísticos

Expresión de los resultados

Los valores del análisis de citoquinas y quimioquinas producidas por las células dendríticas y/o células caco-2 en presencia de las bacterias probióticas, o sus sobrenadantes, y enterobacterias, una vez transformados en porcentaje en tanto por 1 con respecto a la cantidad de citoquinas producida por estas células en ausencia de estímulo (control), se expresaron como la media \pm el error estándar de la media (EEM), de tres experimentos independientes para los ensayos de contacto directo (experimento 1), o dos experimentos independientes, para los co-cultivos en transwell (experimento 2).

Por otra parte, la expresión génica se cuantificó con el programa *RT2 Profiler PCR Array Data Analysis* versión 3.4, de *SABiosciences*. Aquellos valores con un valor $C_t > 35$, fueron eliminados. La eficiencia de cada muestra se consideró aceptable si ΔC_t (AVG RTC - AVG PPC) < 5 , siendo RTC el control de retrotranscripción y PPC el control positivo. Todas aquellas muestras que no cumplieron este criterio fueron excludidas. A pesar de realizar tres experimentos

independientes para el ensayo de contacto directo y dos para los co-cultivos de células dendríticas y caco-2, tras este cribado, el número de datos no fue suficiente para realizar análisis estadísticos.

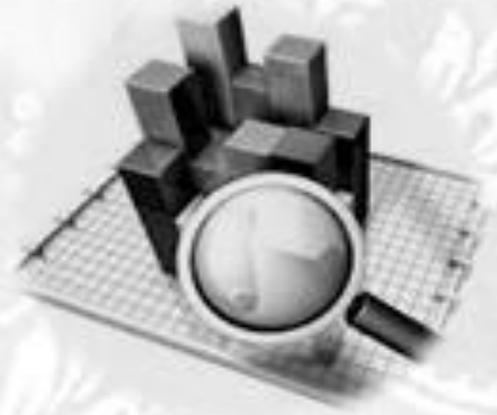
Análisis estadístico

Para contrastar los efectos de los probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036, o sus sobrenadantes frente a enterobacterias en células dendríticas y/o caco-2 en la producción de citoquinas y quimioquinas se realizó un test no paramétrico de comparación de medias de dos muestras independientes, la prueba U de Mann-Whitney o de Mann-Whitney-Wilcoxon, con un valor de significación $p < 0.05$, mediante el programa NCCS 2007.

Algoritmos de agrupamiento

Con objeto de conocer el grado de ordenación de nuestros resultados, se construyó un dendrograma y un *heat map* para cada tratamiento a partir de los valores de expresión génica, utilizando el programa estadístico NCCS 2007. Este tipo de análisis permite apreciar la asociación entre grupos con perfiles de expresión similares.

Un dendrograma o *cluster* es un diagrama que organiza los datos en subcategorías, de acuerdo al grado de homogeneidad. En su parte superior, muestra la distancia euclídea, representando las similitudes en los patrones de expresión entre los casos individuales, en nuestro caso las correspondientes a diferentes tratamientos con enteropatógenos, probióticos o sus sobrenadantes. Asimismo, se representa un *heat map* que no es más que un gráfico en el que los valores de los datos son representados por colores con diferentes intensidades. El código de colores utilizado para reflejar los cambios de expresión génica es el siguiente: el color verde representa la mínima expresión génica, mientras que el color rojo representa el máximo de expresión.



RESULTADOS

“Duda siempre de ti mismo, hasta que los datos no dejen lugar a dudas.”

Louis Pasteur, *químico francés*

RESULTADOS

Experimento 1: contacto directo de las células dendríticas en presencia de las cepas probióticas*Determinación de citoquinas**Las citoquinas pro-inflamatorias secretadas por las células dendríticas disminuyen tras 4 horas de incubación estimuladas con enteropatógenos en presencia de las bacterias probióticas *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036, o de sus sobrenadantes*

Se determinaron las concentraciones de las siguientes citoquinas: IFN γ , IL-10, IL-1 β , IL-12 (p70 y p70+p40), IL-6, IL-8, TNF- α , IP-10(CXCL10), MCP-1(CCL2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) y TGF- β , en el sobrenadante recogido tras cuatro horas de incubación en cultivos de células dendríticas en presencia de las bacterias probióticas de estudio (o de sus sobrenadantes tras 24 horas de cultivo, liofilizados, concentrados diez veces y neutralizados) y enterobacterias.

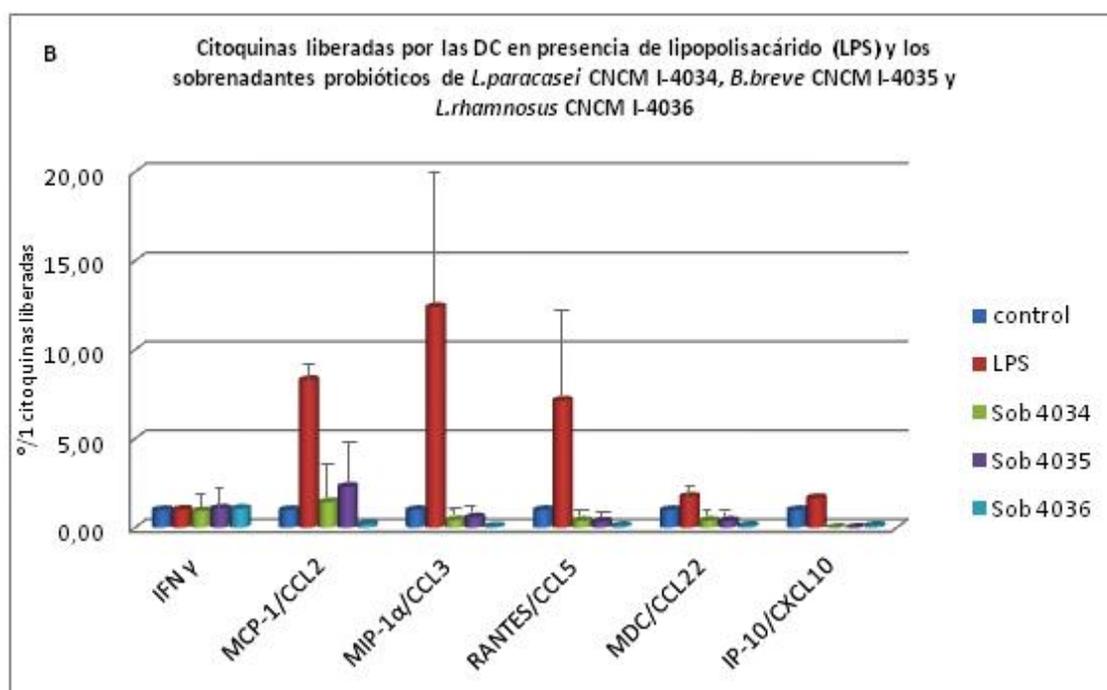
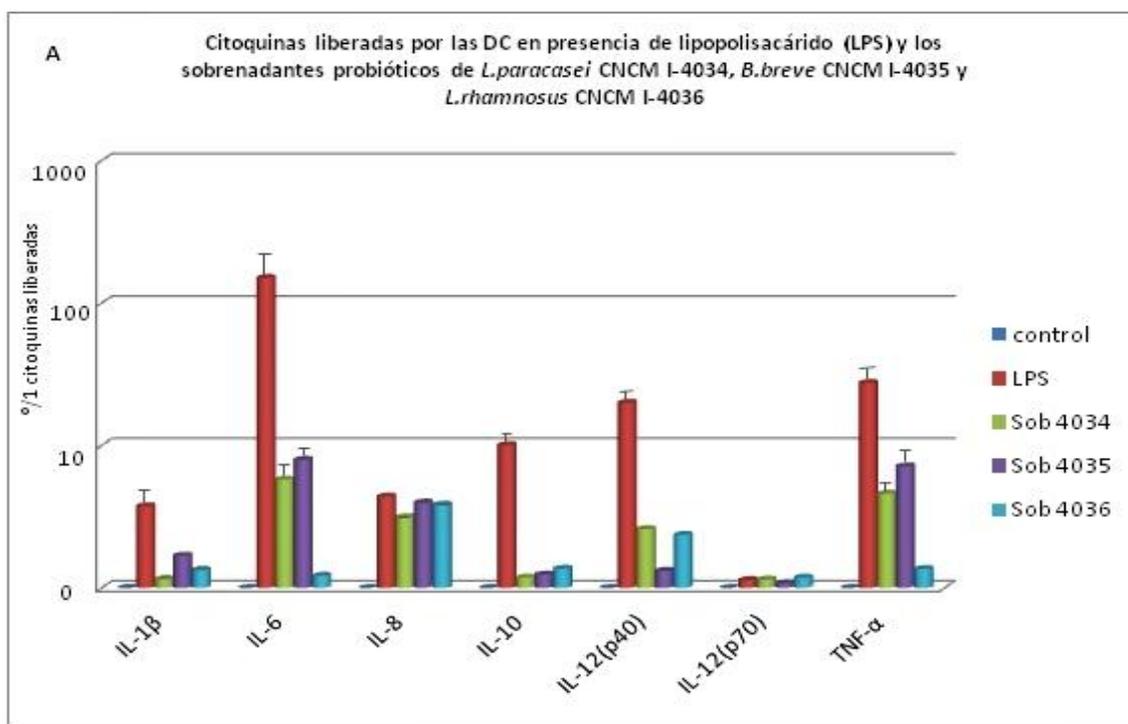
Las gráficas 17 a 23 representan la concentración de citoquinas liberadas por las células dendríticas cuando se estimulan durante 4 h con los distintos sobrenadantes y bacterias probióticas, así como los patógenos. Los valores representan la cantidad de citoquinas liberadas, respecto al control (en tanto por uno). Para cada tratamiento, las citoquinas se dividen en tres gráficos: A, en el que se representan las interleuquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p70 y p70+p40) y TNF- α ; B, en el que se representan IFN- γ , y las quimioquinas MCP-1(CCL2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10(CXCL10); y C, en el que se representan TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3.

Las citoquinas pro-inflamatorias liberadas por las células dendríticas aumentaron tras 4 horas de incubación con los enteropatógenos *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* (figuras 18-22) o en presencia de lipopolisacárido (LPS; figura 17). Sin embargo, cuando fueron estimuladas conjuntamente con los probióticos o sus sobrenadantes disminuyeron en la mayoría de los grupos estudiados.

Es importante señalar que la disminución de las citoquinas producidas por las células dendríticas en presencia de enterobacterias no fue igual en todos los grupos estudiados y depende tanto de la cepa probiótica como del uso del sobrenadante o la bacteria. Así, el probiótico *L.paracasei* CNCM I-4034 manifestó la mayor capacidad para limitar la liberación de las citoquinas estudiadas, disminuyendo drásticamente su producción frente a *Salmonella typhimurium* CECT 4594 (figura 21) y *Salmonella typhi* CECT 725 (figura 23), mientras que la bacteria *L.rhamnosus* CNCM I-4036 ejerció un leve efecto en las mismas en respuesta a *Escherichia coli* CECT 729 (figura 19) y CECT 515 (figura 20), incluso, aumentó la producción de IL-6, IL-1 β , CCL3/ MIP-1 α y TNF- α frente a *Salmonella typhimurium* CECT 4594 (figura 21). La bacteria *B.breve* CNCM I-4035 no ejerció efecto en la secreción de las citoquinas estudiadas, a excepción de CCL3/ MIP-1 α , que aumenta ligeramente, e IL-10, que incrementa su producción de forma significativa (figura 23). Los resultados obtenidos para el TGF- β , mostraron claramente que los lactobacilos son potentes inductores de TGF- β 2. *L.rhamnosus* CNCM I-4036 además aumentó la liberación de TGF- β 1, al igual que *B.breve* CNCM I-4035 (figuras 19, 20, 21 y 23). No se pudo detectar la presencia de TGF- β 3 con ninguno de los tratamientos.

Los sobrenadantes probióticos presentaron un mayor efecto en la disminución de las citoquinas estudiadas y esta disminución fue significativa en muchos de los casos. De esta forma, el sobrenadante perteneciente a la bacteria *L.rhamnosus* CNCM I-4036 disminuyó notablemente la liberación de las citoquinas pro-inflamatorias por parte de las células dendríticas en respuesta a *Escherichia coli* CECT 742 (figura 18), al igual que los sobrenadantes de *L.paracasei* CNCM I-4034 y *B.breve* CNCM I-4035 frente a *Salmonella typhi* CECT 725 (figura 22). En relación al TGF- β , cabe señalar que los tres sobrenadantes aumentaron la liberación de TGF- β 1 respecto al patógeno (figura 18 y 23).

De acuerdo con los resultados, cabe señalar que aunque el probiótico *B.breve* CNCM I-4035 no ejerció ningún efecto en la secreción de citoquinas de las células dendríticas en respuesta a *Salmonella typhi* CECT 725, su sobrenadante sí fue capaz de producir una disminución importante en la mayoría de citoquinas estudiadas, a excepción de TNF- α .



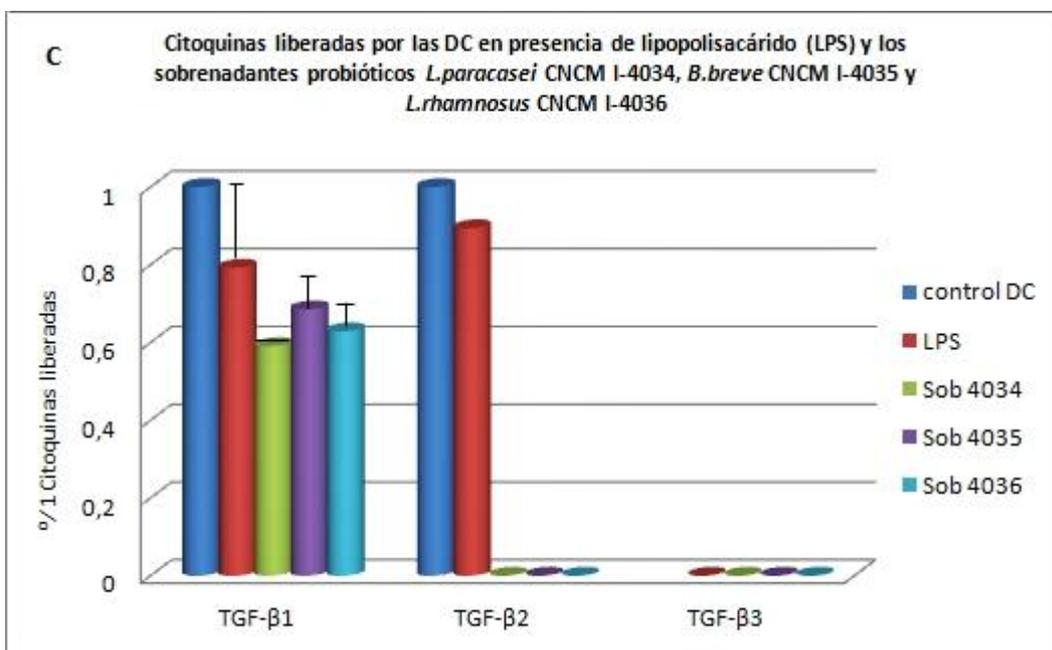
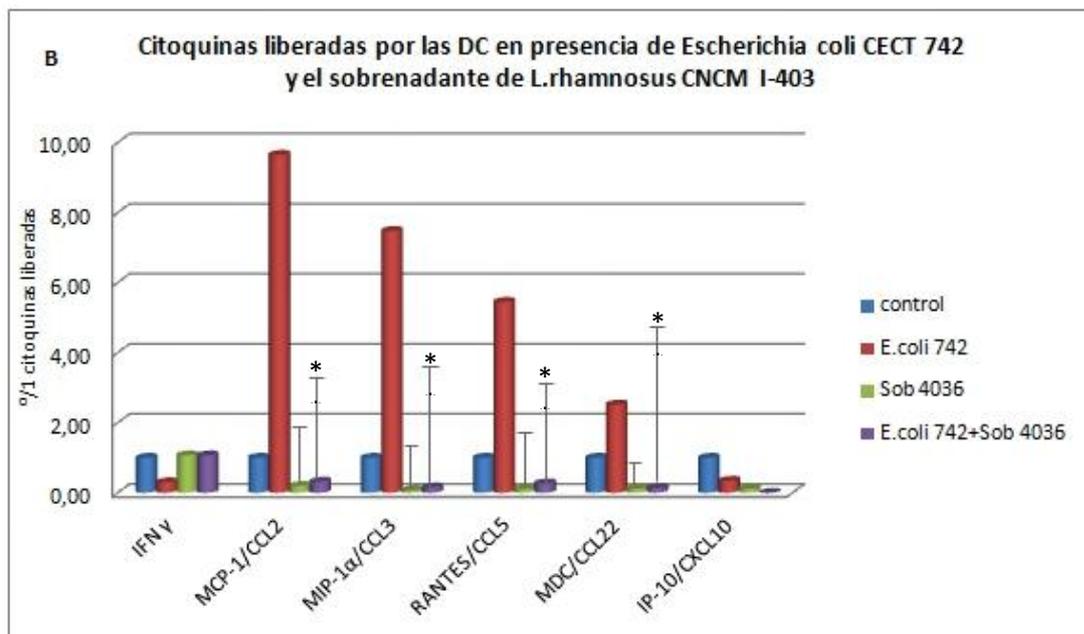
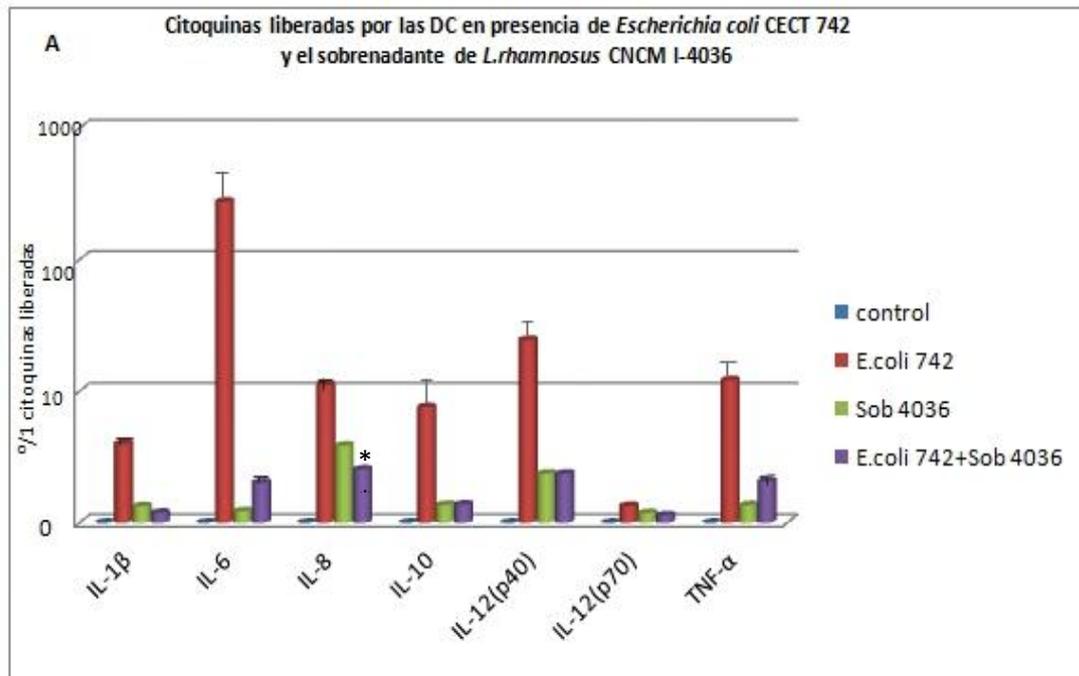


Figura 17. Valores de la liberación de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α (A), IFN- γ y quimioquinas MCP-1 (CCL-2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10 (B), así como de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 (C), respecto al control (en tanto por uno), de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con lipopolisacárido (LPS) y los sobrenadantes probióticos.



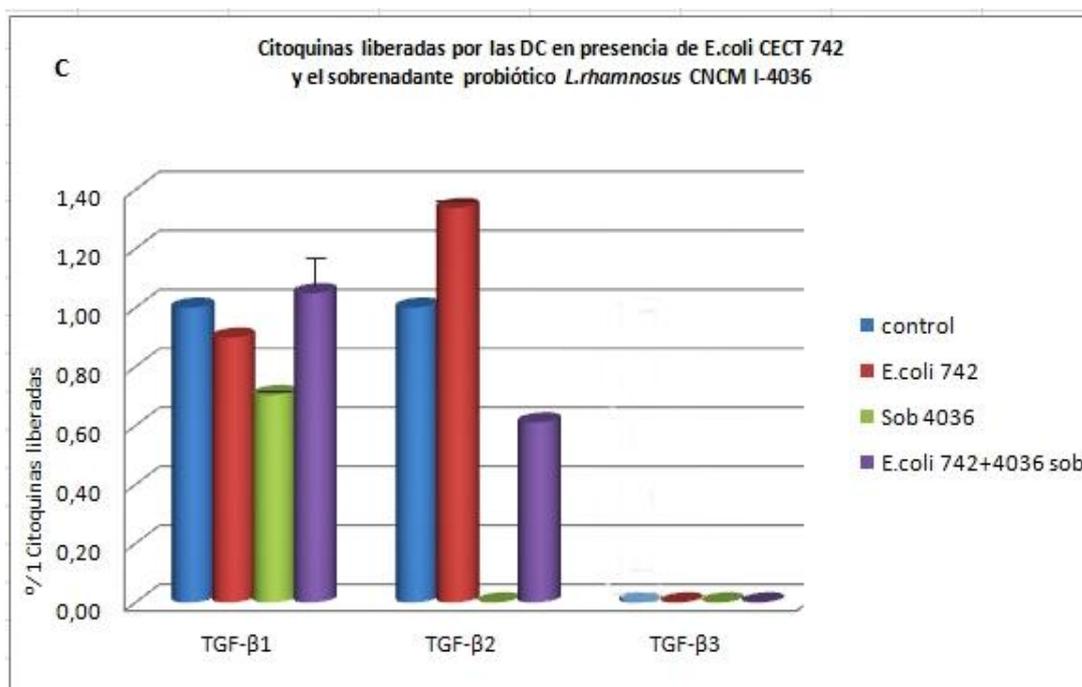
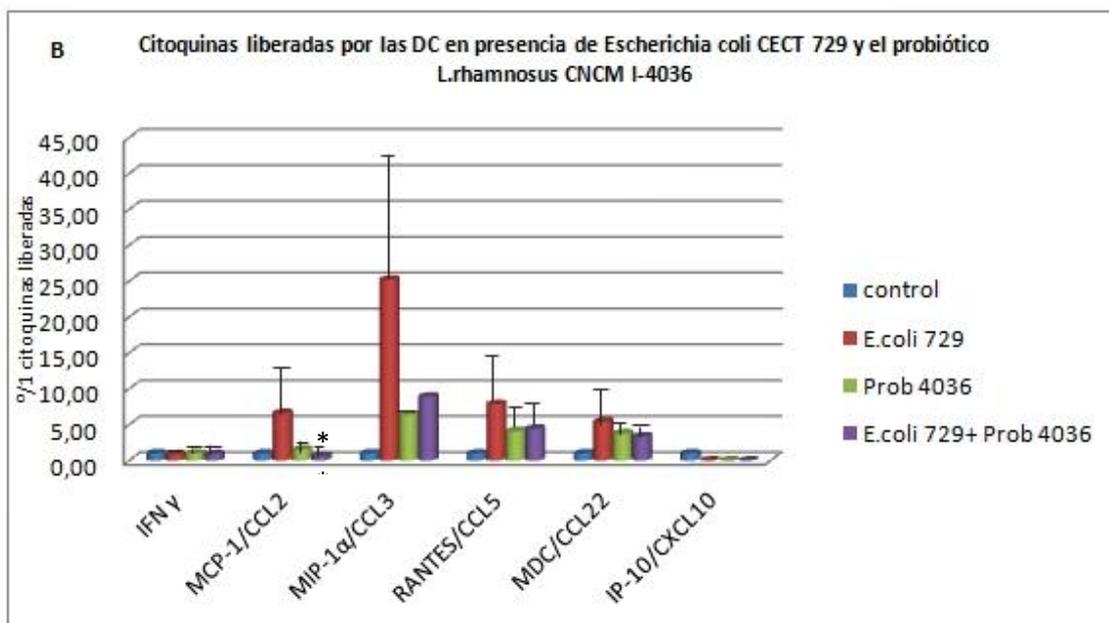
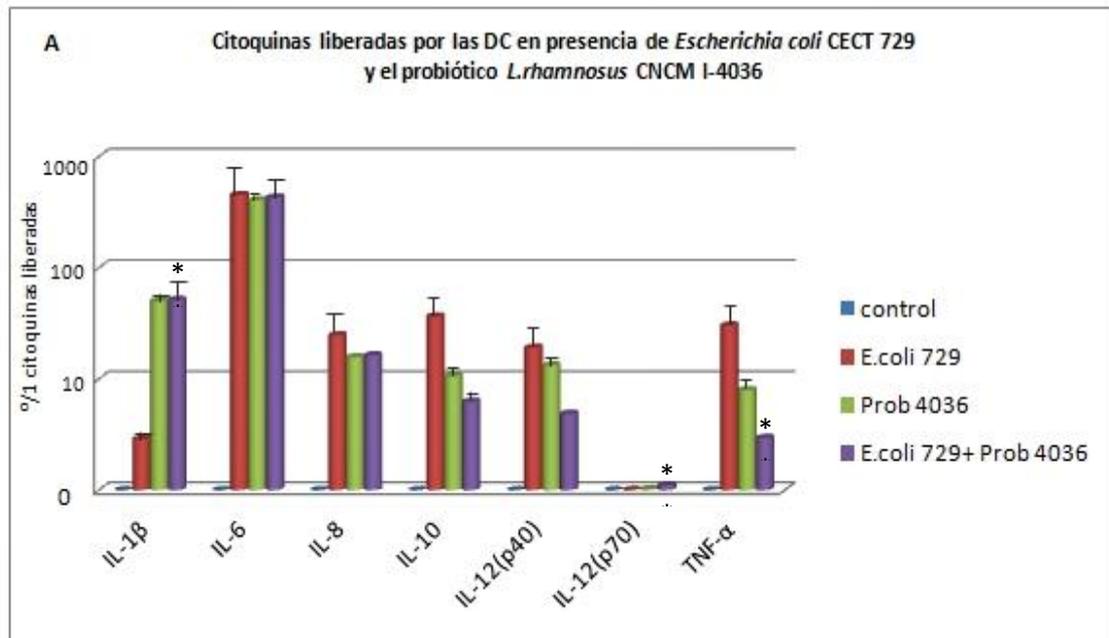


Figura 18. Valores de la liberación de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α (A), IFN- γ y quimioquinas MCP-1 (CCL-2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10 (B), así como de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 (C), normalizados frente al control (en tanto por uno), de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Escherichia coli* CECT 742 y el sobrenadante de *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036. (*, $p < 0.05$, en comparación con la bacteria patógena).



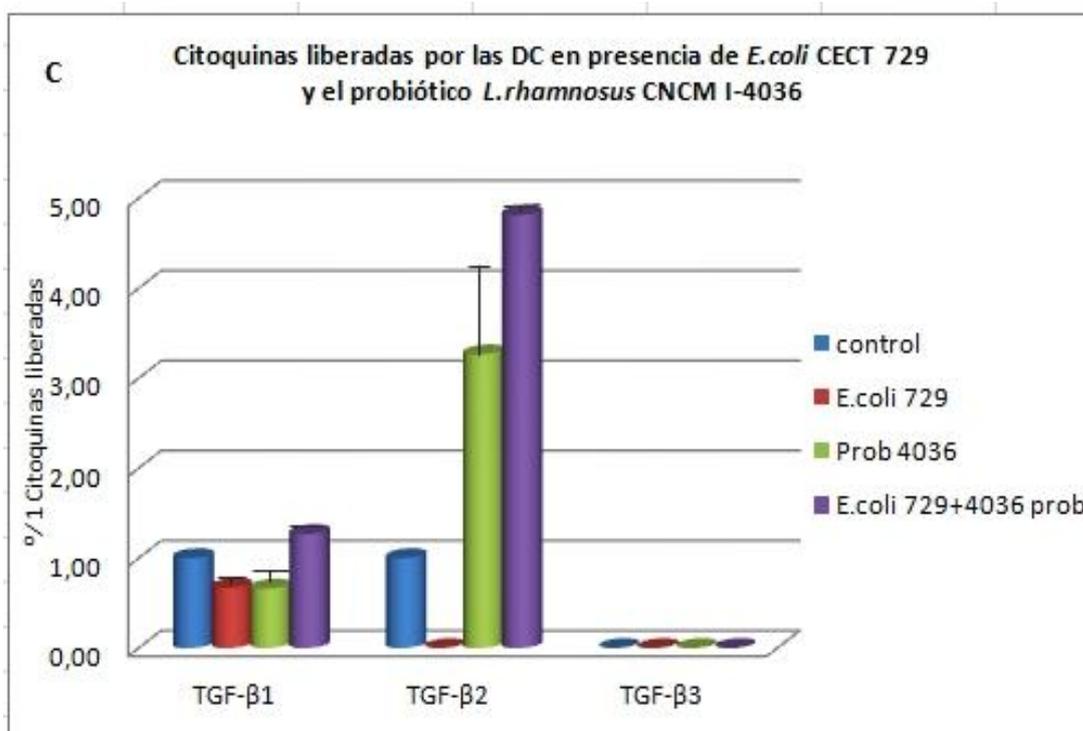
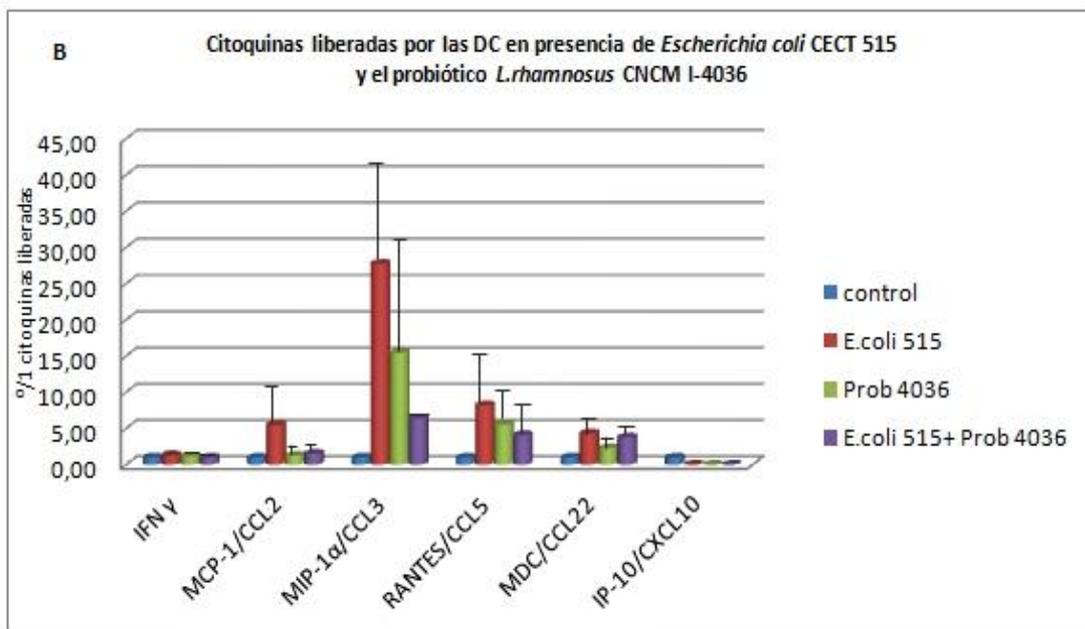
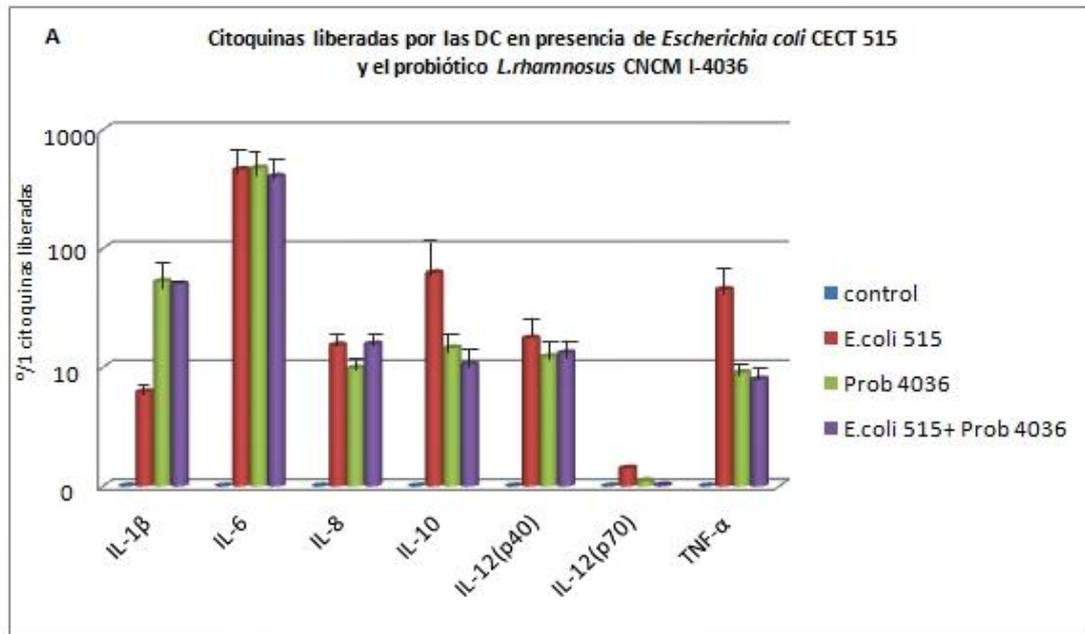


Figura 19. Valores de la liberación de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α (A), IFN- γ y quimioquinas MCP-1 (CCL-2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10 (B), así como de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 (C), normalizados frente al control (en tanto por uno), de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Escherichia coli* CECT 729, en presencia de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036. (*, $p < 0.05$, en comparación con la bacteria patógena).



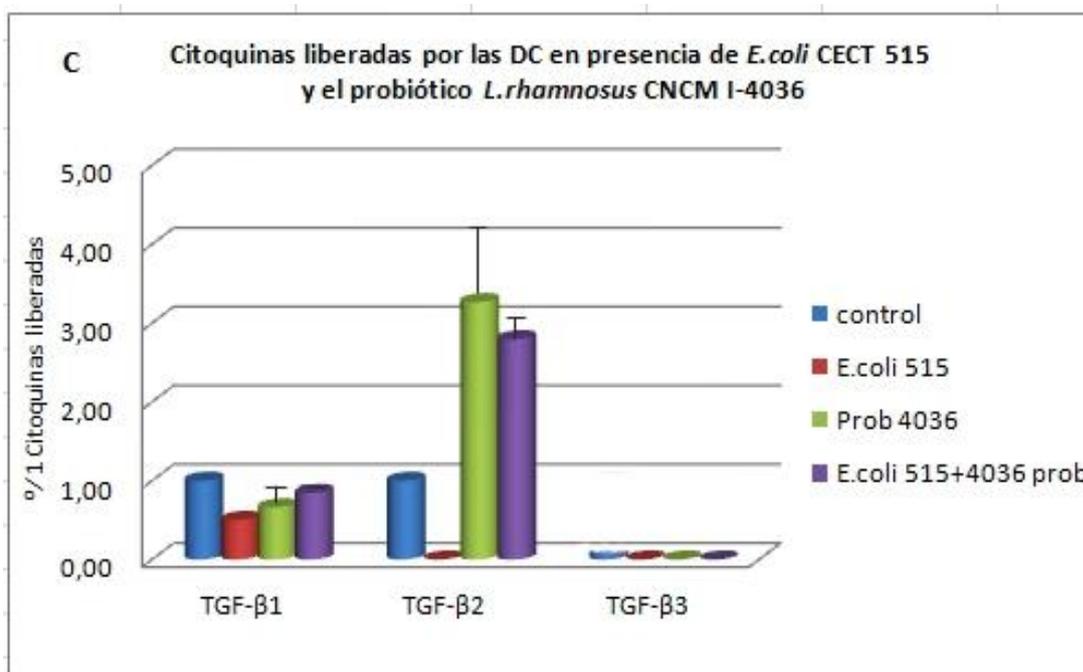
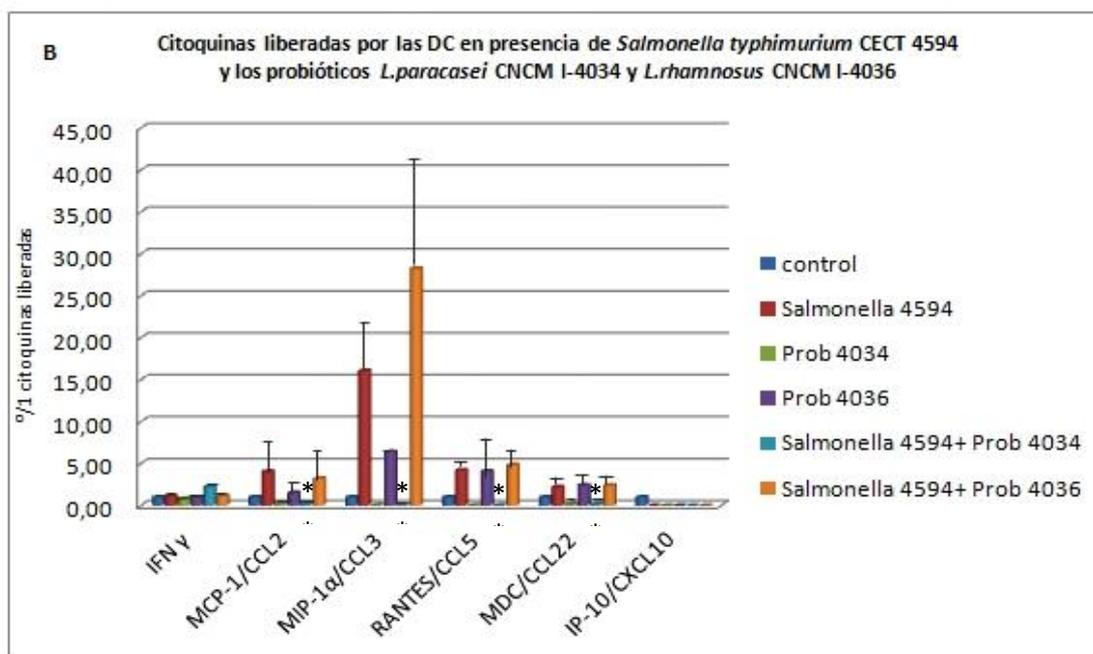
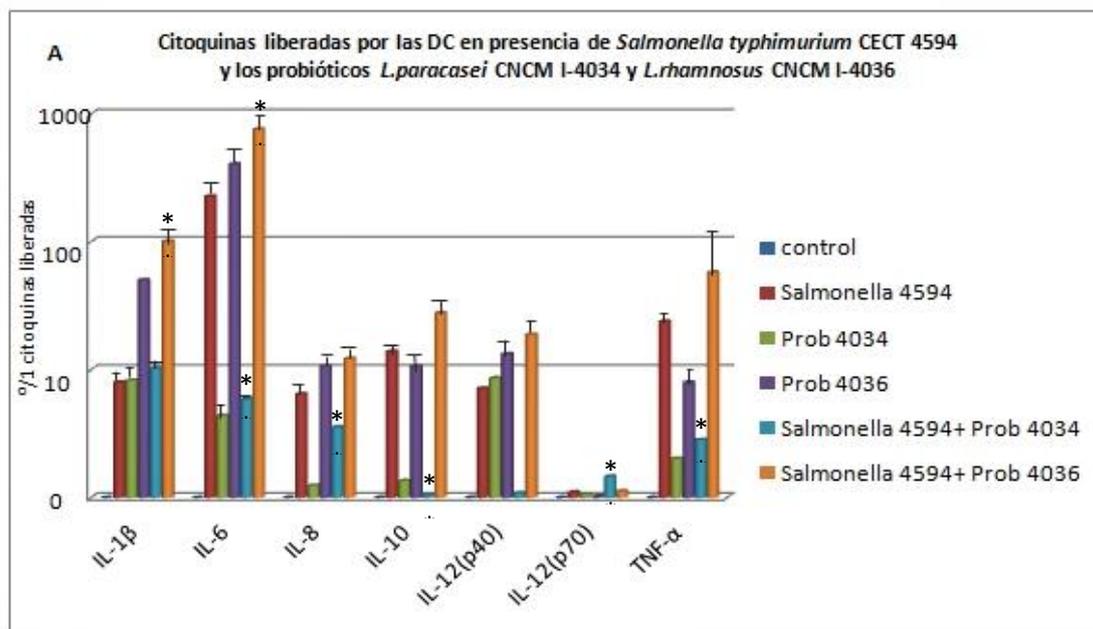


Figura 20. Valores de la liberación de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α (A), IFN- γ y quimioquinas MCP-1 (CCL-2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10 (B), así como de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 (C), normalizados frente al control (en tanto por uno), de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Escherichia coli* CECT 515, en presencia de la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036.



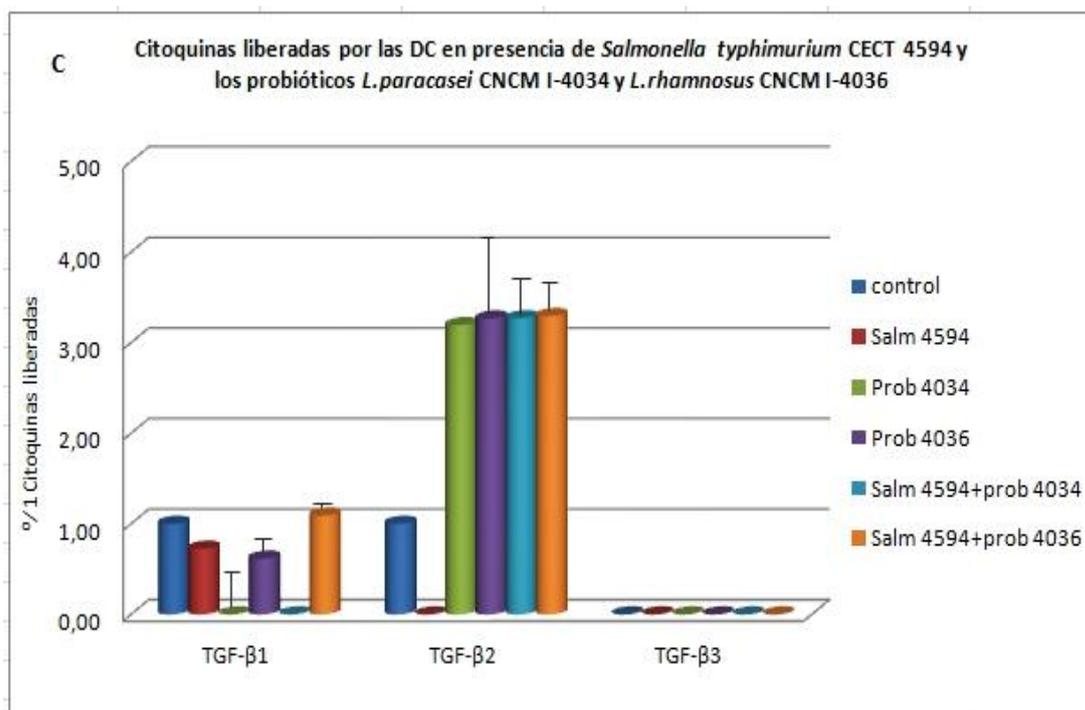
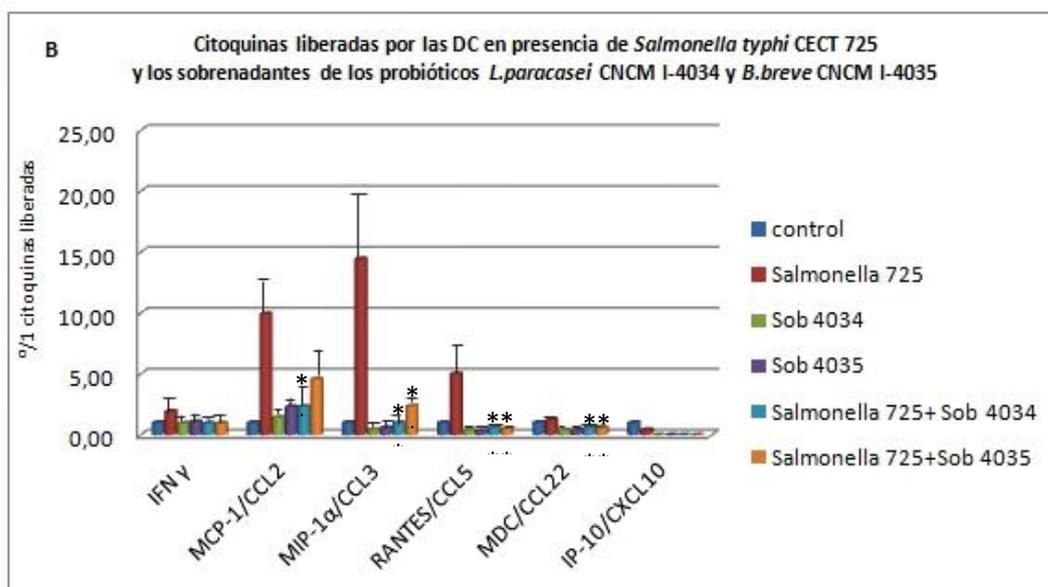
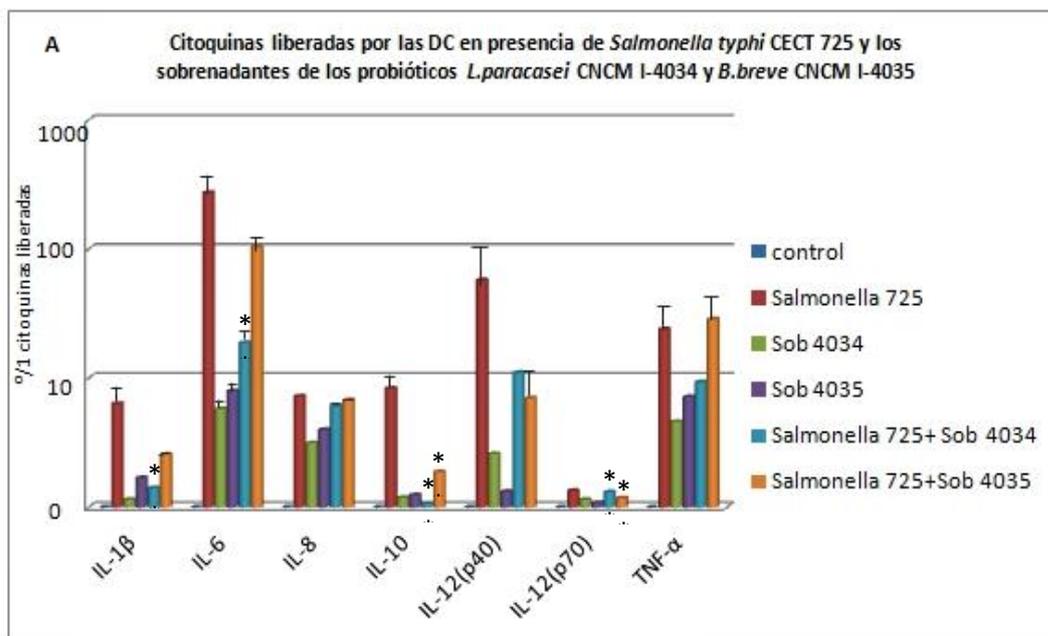


Figura 21. Valores de la liberación de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α (A), IFN- γ y quimioquinas MCP-1 (CCL-2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10 (B), así como de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 (C), normalizados frente al control (en tanto por uno), de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Salmonella typhimurium* CECT 4594, en presencia de las bacterias probióticas *L.paracasei* CNCM I-4034 y *L. rhamnosus* CNCM I-4036. (*, $p < 0.05$, en comparación con la bacteria patógena).



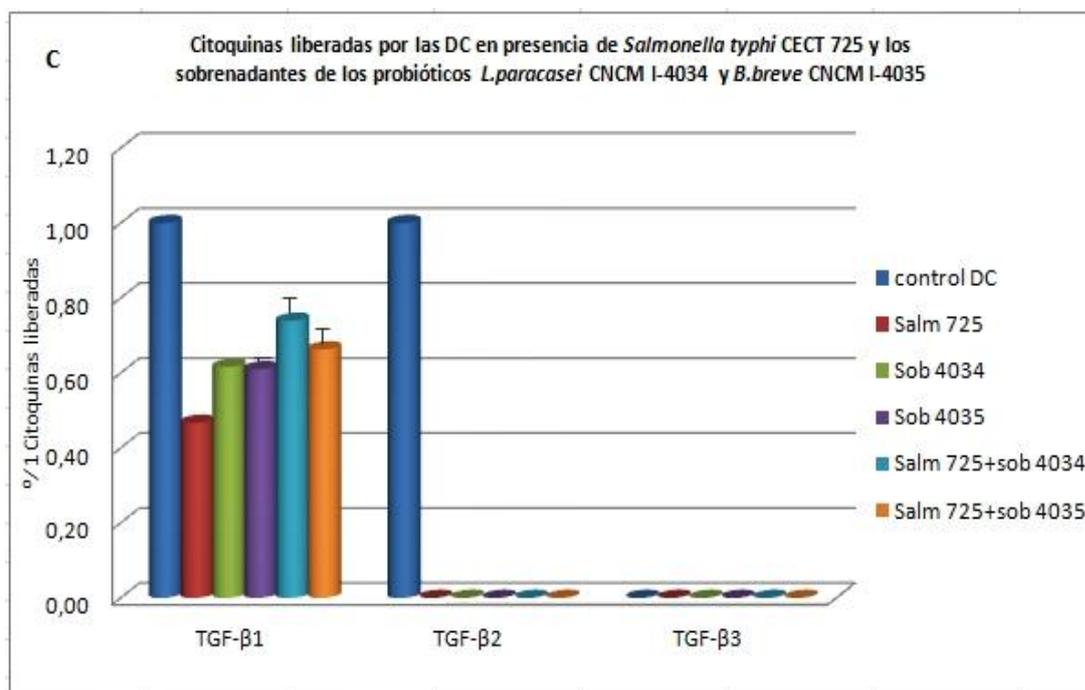
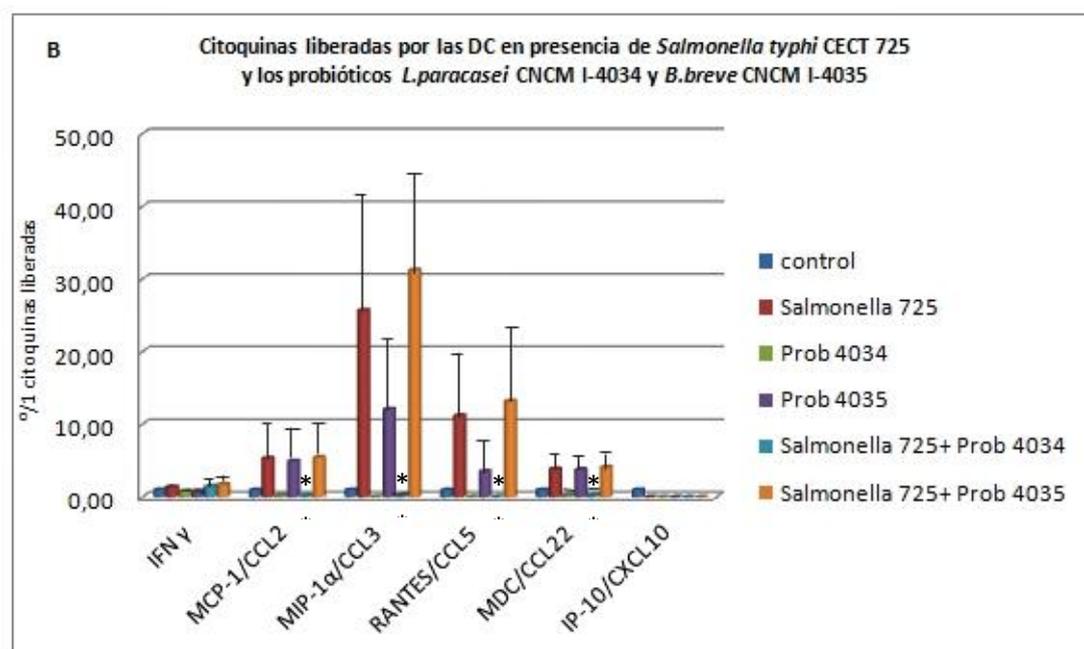
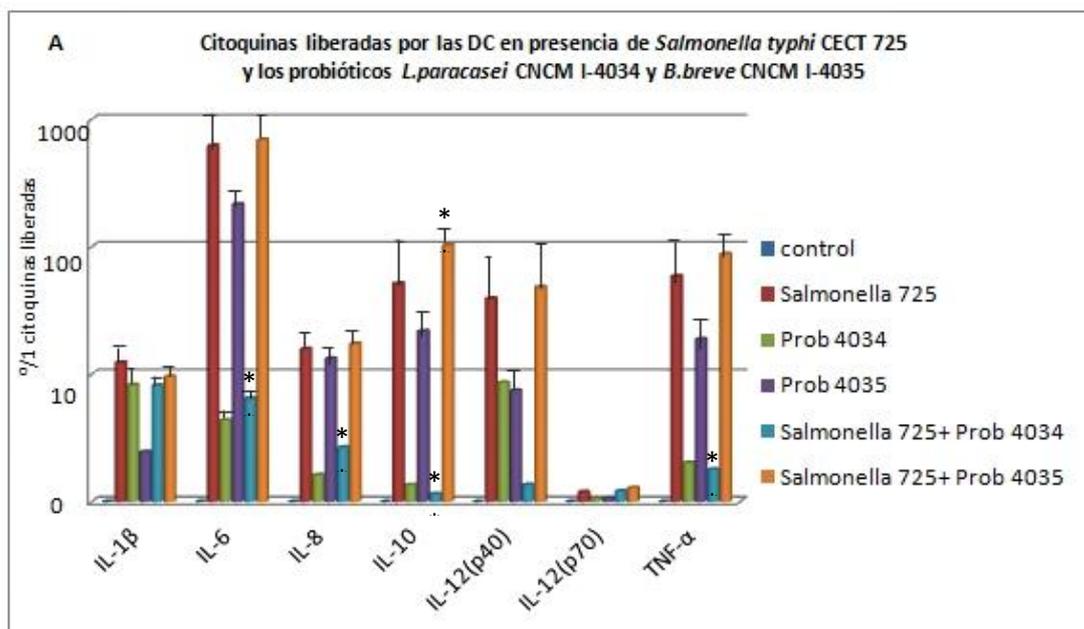


Figura 22. Valores de la liberación de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α (A), IFN- γ y quimioquinas MCP-1 (CCL-2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10 (B), así como de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 (C), normalizados frente al control (en tanto por uno), de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Salmonella typhi* CECT 725 y los sobrenadantes probióticos de *L.paracasei* CNCM I-4034 y *B.breve* CNCM I-4035. (*, p< 0.05, en comparación con la bacteria patógena).



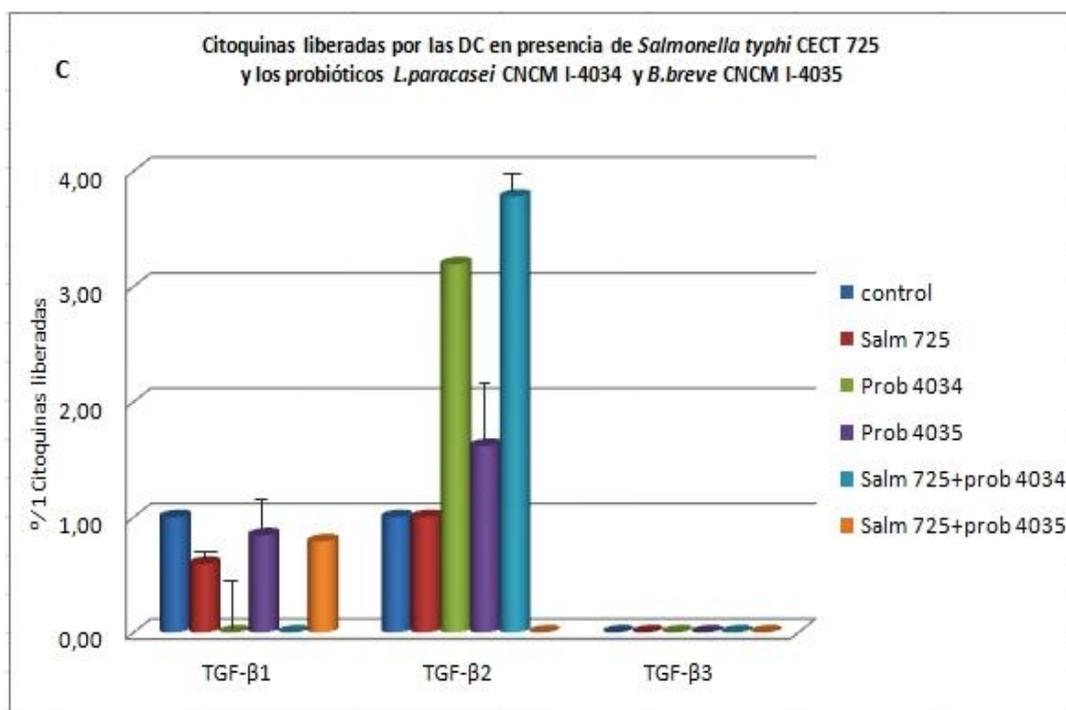


Figura 23. Valores de la liberación de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α (A), IFN- γ y quimioquinas MCP-1 (CCL-2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10 (B), así como de TGF- β 1, TGF- β 2 y TGF- β 3 (C), normalizados frente al control (en tanto por uno), de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Salmonella typhi* CECT 725, en presencia de las bacterias probióticas *L.paracasei* CNCM I-4034 y *B.breve* CNCM I-4035. (*, $p < 0.05$, en comparación con la bacteria patógena).

Estudio de la viabilidad celular

La viabilidad de las células dendríticas se mantiene en presencia de los probióticos o sus sobrenadantes

El método MTT permite evaluar la viabilidad celular mediante la metabolización de un compuesto cuyo producto resultante es medible colorimétricamente. El ensayo se realiza tras cuatro horas de incubación de las células dendríticas con el probiótico, su sobrenadante y la enterobacteria *Salmonella typhi* CECT 725. Se seleccionó este tiempo porque todos los experimentos tienen cuatro horas de incubación con los distintos tratamientos.

Los resultados de viabilidad se expresan como porcentaje de densidad óptica a 570 nm con respecto a los controles (células dendríticas sin tratar) considerando que estos últimos poseen un 100% de viabilidad.

Como se observa en la figura 24, la presencia en el medio de los probióticos o de sus sobrenadantes, así como de la bacteria patógena *Salmonella typhi* CECT 725 no afectó la viabilidad celular, que se mantuvo cercana al 80% en la mayoría de los casos, respecto al control. La menor viabilidad se registró cuando se incuban las células dendríticas con lipopolisacárido (LPS).

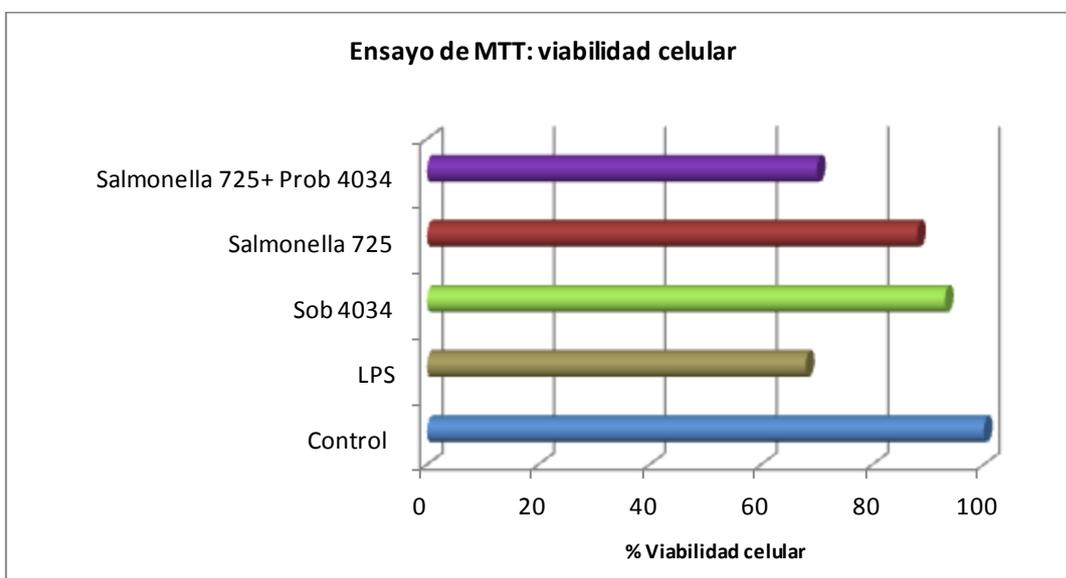


Figura 24. Porcentajes de viabilidad celular de las células dendríticas en presencia de lipopolisacárido (LPS), el sobrenadante *L.paracasei* CNCM I-4034, *Salmonella typhi* CECT 725 y una mezcla del probiótico *L.paracasei* y *Salmonella typhi*. Los valores se representan en porcentaje de viabilidad respecto al control (100%), células dendríticas sin tratar.

Expresión génica

La presencia de los probióticos o sus sobrenadantes en el medio produce una sobreexpresión de TLR9, TOLLIP, CASP8 e IL-10

Para investigar el mecanismo de acción de las bacterias probióticas *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036 en la respuesta inmunitaria intestinal se ha estudiado la expresión de distintos genes implicados en la cascada de señalización de los Toll-like receptors (TLR): los receptores TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5 y TLR9; la molécula adaptadora *MYD88*; *IRAK4*, *IRAK1* y *TOLLIP* como moléculas mediadoras de acción intermedia; y genes de acción final como *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1* (MAP3K7) y *JNK*, *NF-κB1* y *NF-κBIA* (*IκBA*), *TBK1* e *IRF3*, y finalmente *TNF-α* e *IL-10*.

La expresión génica se cuantificó con el programa *RT2 Profiler PCR Array Data Analysis* versión 3.4, de *SABiosciences*. Aquellos valores que no cumplían los criterios de eficiencia fueron eliminados, como todos aquellos con un valor $C_t > 35$.

Las figuras 25, 27, 29, 31, 33 y 35 representan el cambio de expresión o *fold change* para cada uno de los genes analizados experimentado por las células dendríticas en presencia de las bacterias probióticas o sus sobrenadantes y enteropatógenos. El nombre de cada gen se representa en el eje X. Asimismo, se muestra un dendrograma y un gráfico en el que los valores de las variables son representados por colores o *heat map* para cada tratamiento utilizado, para conocer el grado de ordenación de los resultados, realizados con el programa *NCSS 2007* (figuras 26, 28, 30, 32, 34 y 36).

La exposición de las células dendríticas a enterobacterias, *E.coli* o *Salmonella*, durante cuatro horas origina patrones similares de expresión (figuras 27 a 35). Un efecto característico es la extraordinaria sobreexpresión de *TLR9* (figuras 27A-35A), acompañada de un aumento de la expresión de los genes *TAK1*, *IRAK4* e *IRF3*. Además, todas las bacterias patógenas regularon a la baja el gen *NF-κBIA* (figuras 27E, 29E, 31E, 35E), a excepción de *Salmonella typhimurium* CECT 4594 (figura 33E). Por otra parte, se apreció que las bacterias pertenecientes al género *Escherichia* provocaron una ligera sobreexpresión del gen *CASP8* (figuras 27C, 29C y 31C), mientras que las bacterias del género *Salmonella* regularon a la baja su expresión (figuras 33C y 35C).

Cuando las células dendríticas se estimularon exclusivamente con los sobrenadantes probióticos la sobreexpresión de *TLR9* continuó siendo patente (figura 25A). Además, se

detectó un aumento en la expresión de los genes *TOLLIP* e *IL-10* (figuras 25B y 25F), con cualquiera de los sobrenadantes utilizados. Sin embargo, el sobrenadante de *L.paracasei* CNCM I-4034 parece que es el que produce un mayor cambio en la expresión de estos genes. Por tanto, y en virtud de los resultados, no es de extrañar que el dendrograma muestre dos grupos, uno para los sobrenadantes de las bacterias *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036 y otro para el sobrenadante de *L.paracasei* CNCM I-4034 (figura 26).

La estimulación de las células dendríticas con los sobrenadantes probióticos y las enterobacterias condujo a una altísima expresión de *TLR9* (figuras 27A y 35A). Asimismo, dieron lugar a patrones de expresión semejantes para los genes *IRAK4*, *CASP8*, *NF-κB1*, fuertemente sobreexpresados (figuras 27B, 27C, 27E; 35B, 35C y 35E), y *TNF-α* y *TAK1* con una expresión moderada (figuras 27D, 27F, 35D y 35F). Por otra parte, se detectó una expresión diferencial para los genes *TOLLIP* e *IL-10*, que se expresaron al alza cuando se utilizaron los sobrenadantes pertenecientes a *L.paracasei* CNCM I-4034 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036 (figuras 27B, 27F, 35B y 35F) pero que fueron inhibidos con el sobrenadante de *B.breve* CNCM I-4035 (figuras 35B y 35F).

La exposición de las células dendríticas a *E.coli* CECT 515 o CECT 729 con el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036 generó un patrón de expresión idéntico para los genes implicados en la ruta de los TLR, e incluso del mismo orden de magnitud. Además, si atendemos a los dendrogramas, ambos se distribuyeron de la misma forma, ordenándose en dos grupos: uno constituido por el patógeno y la combinación de patógeno y probiótico y otro formado por el probiótico (figuras 30 y 32). Estos tratamientos produjeron un incremento muy marcado de la expresión de los genes *TLR9*, *TOLLIP*, *IRAK4*, *MYD88*, *CASP8*, *JNK*, *TAK1*, *IRF3*, *NF-κB1* y *NF-κBIA* e *IL-10* (figuras 29 y 31). Por el contrario, este mismo probiótico en presencia de *Salmonella typhimurium* CECT 4594 reprimió los genes *CASP8*, *JNK*, *NF-κBIA* y *TNF-α* (figura 33C, 33D, 33E y 33F), aunque la sobreexpresión de *TLR9* continuó siendo del mismo orden que en los casos anteriores (figura 33A). Además, en este caso, se detectó una ligera expresión al alza de los genes *TOLLIP* e *IL-10* (figuras 33B y 33F). Si cotejamos los resultados con el dendrograma, resulta interesante destacar que, al igual que en los casos anteriores, el agrupamiento jerarquizado mostró dos grupos: uno constituido exclusivamente por el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036 y otro dividido en subgrupos, para *Salmonella typhimurium* CECT 4594 y las combinaciones con este probiótico y *L.paracasei* CNCM I-4034 (figura 34).

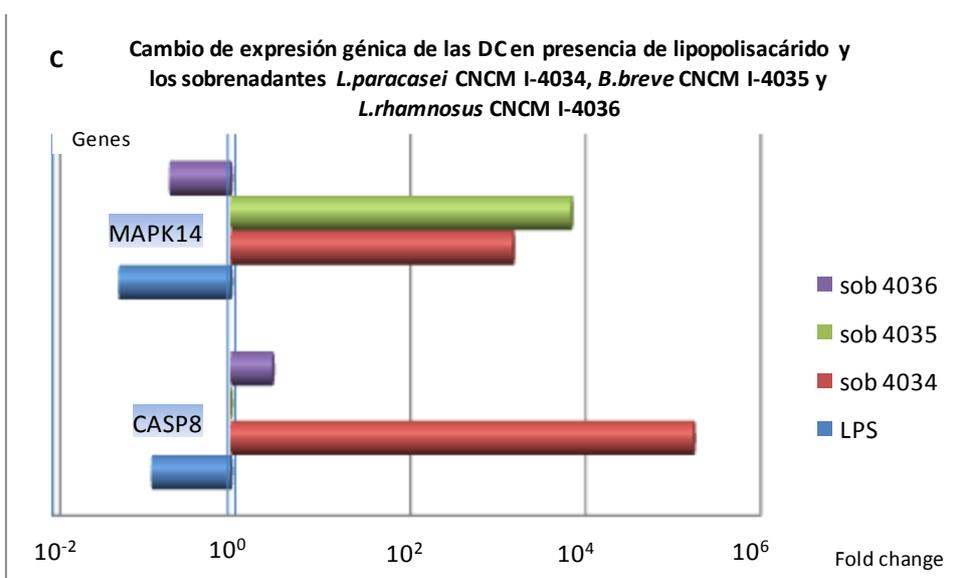
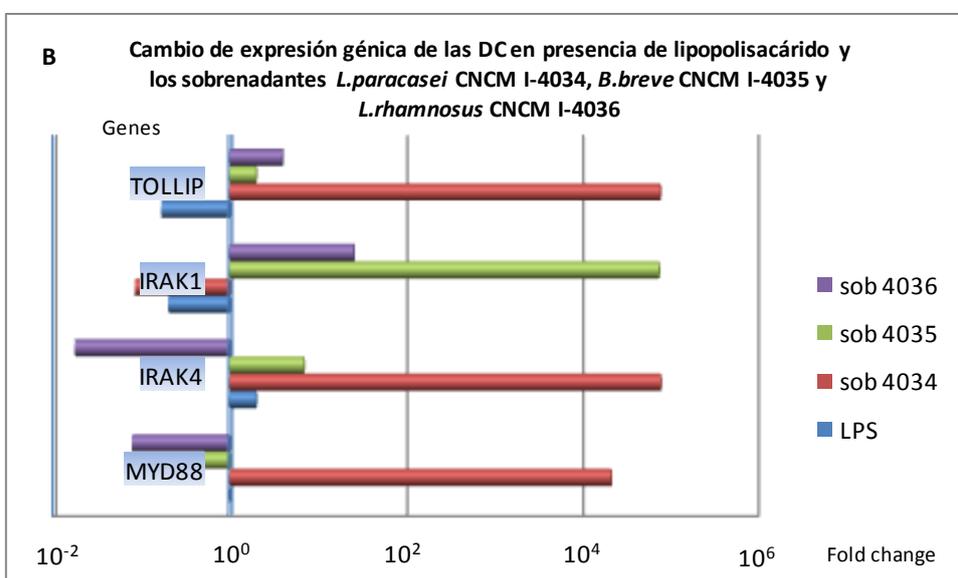
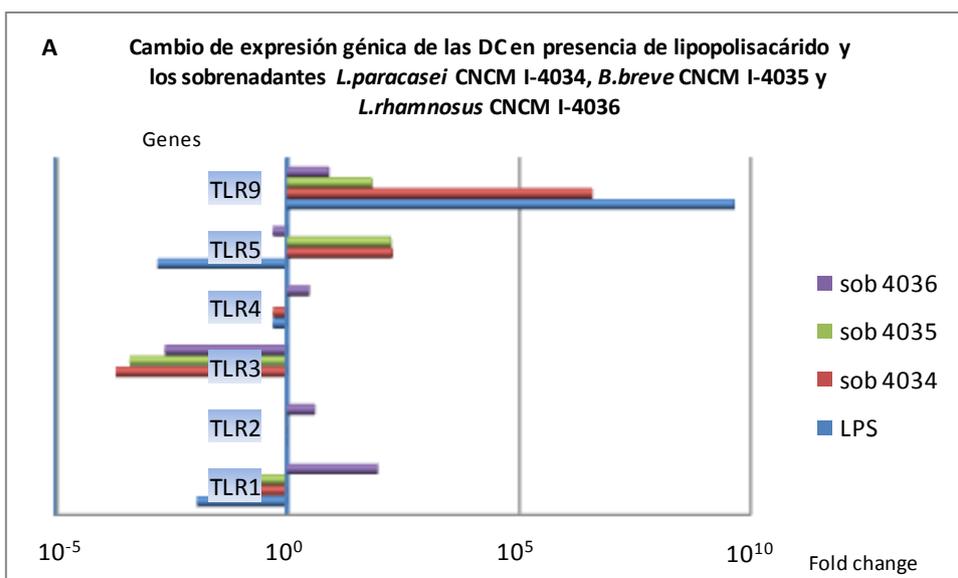
La comparación de los genes regulados por el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036 en presencia de los patógenos puso de manifiesto que se expresa un mayor número de genes en

presencia de bacterias *E.coli* que en presencia de aquellas pertenecientes al género *Salmonella* y, además, la respuesta fue de mayor intensidad.

Tras la incubación de las células dendríticas con el probiótico *L.paracasei* CNCM I-4034 y los patógenos *Salmonella typhimurium* CECT 4594 o *Salmonella typhi* CECT 725, la expresión al alza de *TLR9* se mantuvo, al igual que en los casos anteriores, pero la intensidad fue sensiblemente menor (figuras 33A y 35A). Asimismo, se obtuvo un patrón de expresión similar para los genes *IRAK4* y *TBK1* (figuras 33B, 33E, 35B y 35E), con un ligero aumento en su expresión, y *MAPK14*, *IRAK1*, *NF-κB1* y *NF-κBIA*, que permanecieron inhibidos (figuras 33B, 33C, 33E; 35B, 35C y 35E). No obstante, se detectó una expresión diferencial para los genes *TOLLIP*, *IRF3* y *TAK1*, reprimidos en presencia de *Salmonella typhimurium* CECT 4594 (figuras 33B, 33D y 33E) y expresados levemente al alza cuando se incubó con *Salmonella typhi* CECT 725, y el probiótico (figuras 35B, 35D y 35E). Por otra parte, es interesante señalar que cuando se estimulan las células dendríticas con el probiótico *B.breve* CNCM I-4035 y en presencia de *Salmonella typhi* CECT 725 (figura 35), el patrón de expresión de los genes fue similar al del tratamiento de *L.paracasei* CNCM I-4034 con este mismo patógeno, observándose una única diferencia de expresión a nivel del gen *CASP8*, inhibido cuando se utilizó *B.breve* CNCM I-4035 y expresado con *L.paracasei* CNCM I-4034 (figura 35B). Este hecho se confirma si analizamos el dendrograma de *Salmonella typhi* CECT 725, que muestra grandes similitudes en la expresión génica cuando se utilizan estos probióticos, *L.paracasei* y *B.breve*, englobados en el mismo subgrupo (figura 36).

Cabe destacar que la comparación de los genes regulados por los distintos probióticos y en presencia de los patógenos puso de manifiesto que la intensidad transcripcional o de la expresión génica fue mayor con el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036 que con los otros dos probióticos de estudio. Si se analiza los niveles de expresión génica mediados por este probiótico en relación a su sobrenadante, la intensidad fue del mismo orden. Sin embargo, resulta destacable que la expresión génica fue mucho mayor en presencia de *E.coli* que de *Salmonella*.

De igual forma, al contrastar la actividad de los probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034 y *B.breve* CNCM I-4035 con la de sus sobrenadantes, en presencia de *Salmonella typhi* CECT 725 (figura 35), se observó que los sobrenadantes tuvieron mayor capacidad de regulación, expresando fuertemente la mayoría de los genes implicados en la cascada de señalización de los TLR.



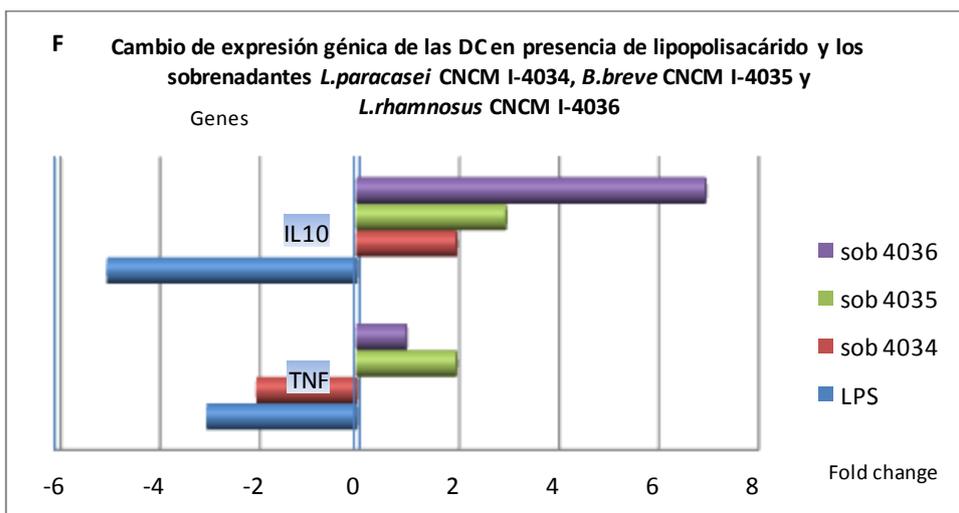
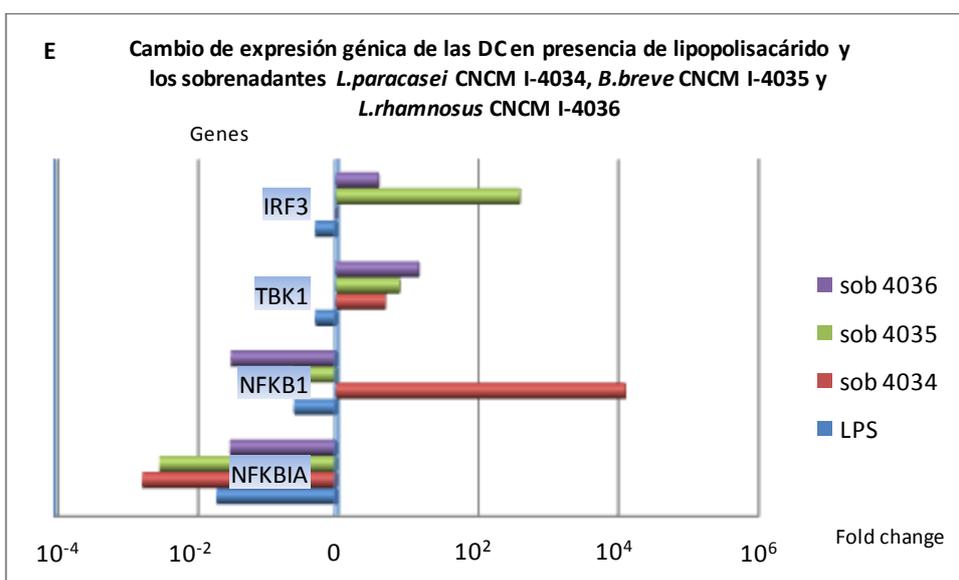
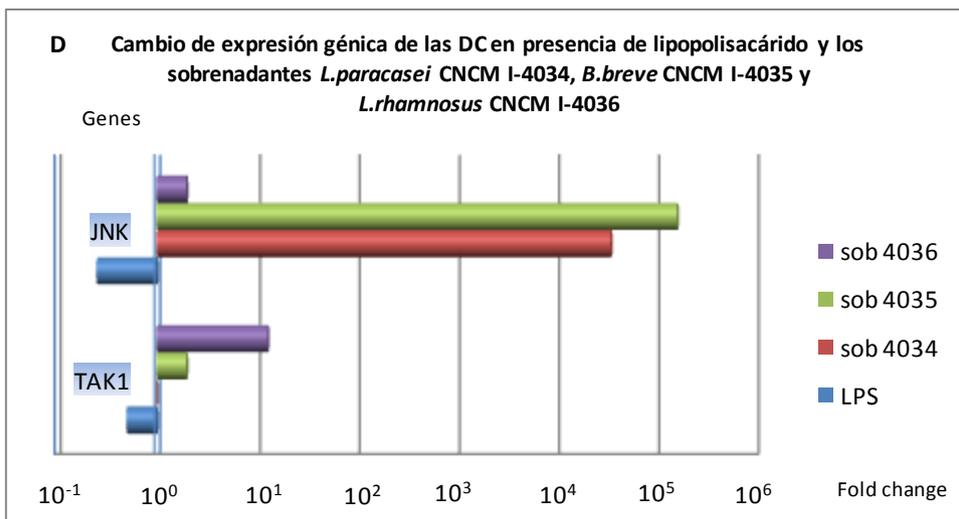


Figura 25. Valores de los cambios de expresión para los genes *Toll-like receptors* (TLR) (A); *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1* y *TOLLIP* (B); *CASP8* y *MAPK14* (C); *TAK1* y *JNK* (D); *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1* e *NF-κBIA* (E); y *TNF-α* e *IL-10* (F), de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con lipopolisacárido (LPS) y los sobrenadantes probióticos 4034, 4035 y 4036.

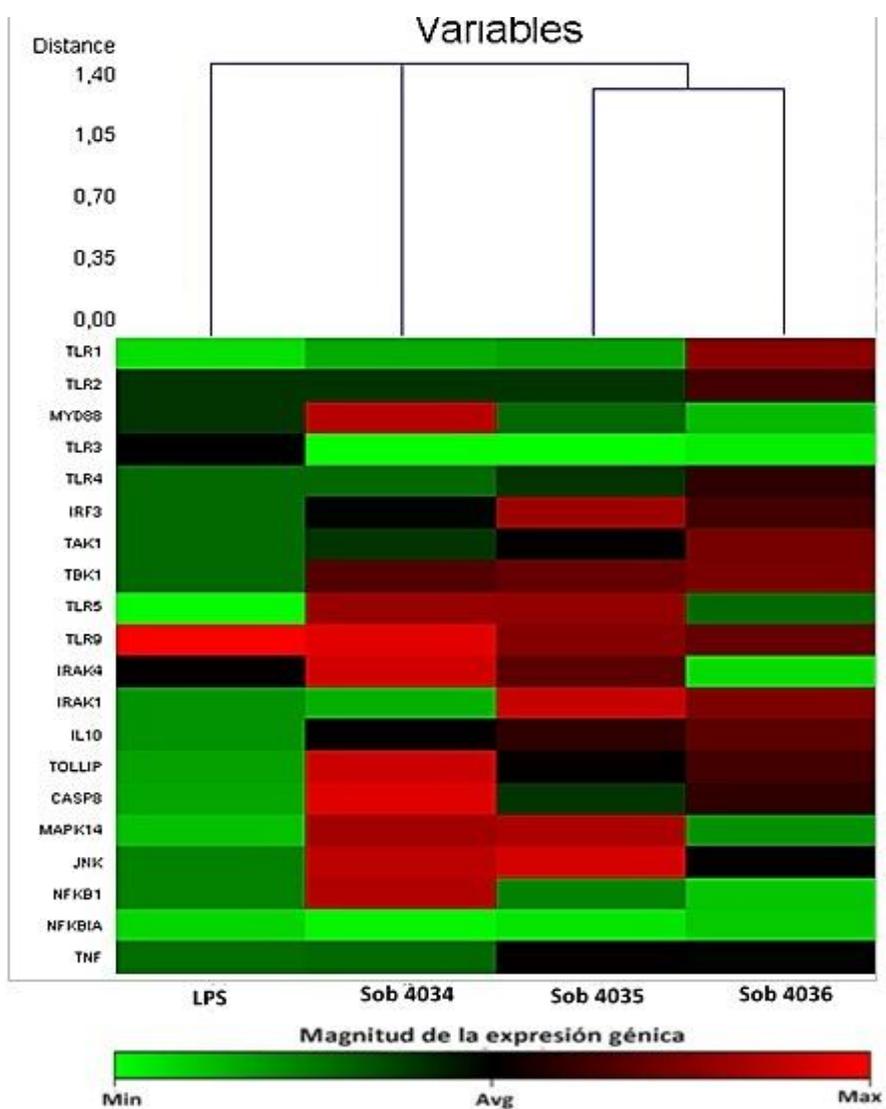
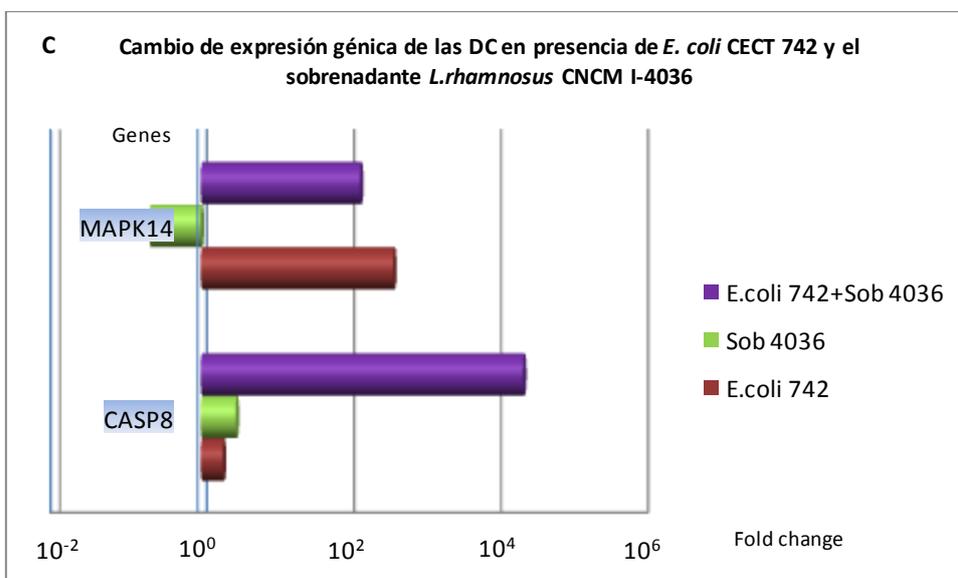
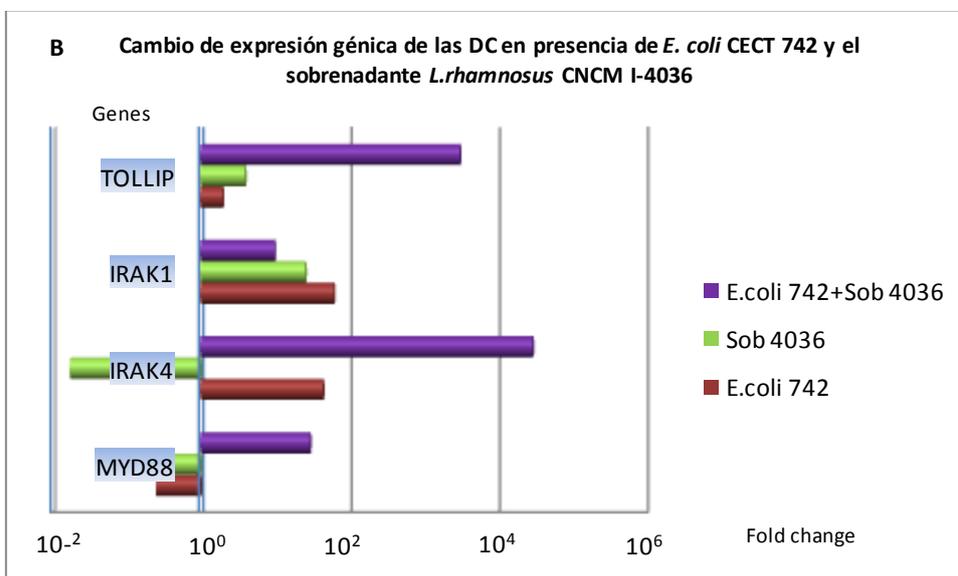
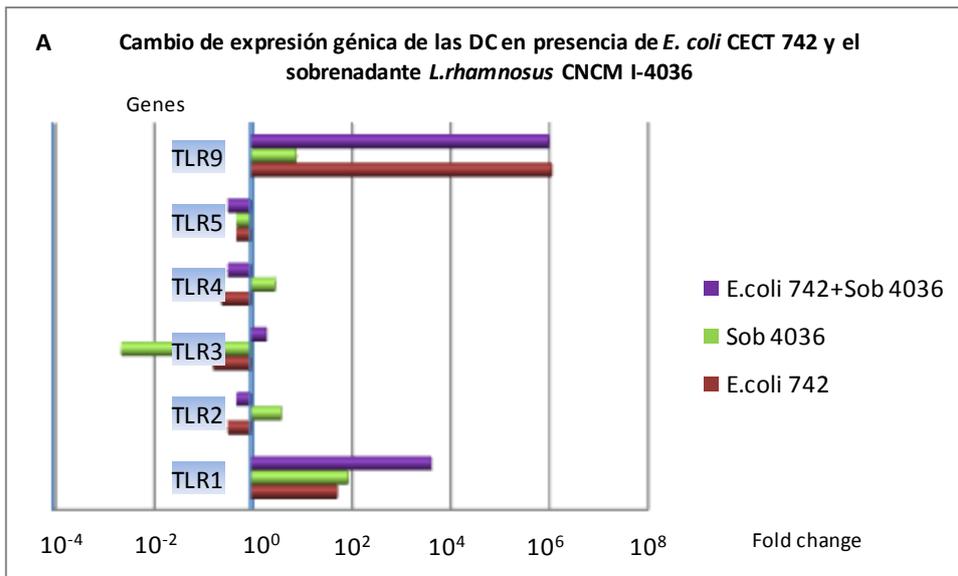


Figura 26. Visualización del *Heat Map* y dendrograma y para los genes *Toll-like receptors (TLR)*, *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF- κ B1*, *NF- κ BIA*, *TNF- α* e *IL-10*, de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con lipopolisacárido (LPS) y los sobrenadantes probióticos 4034, 4035 y 4036.



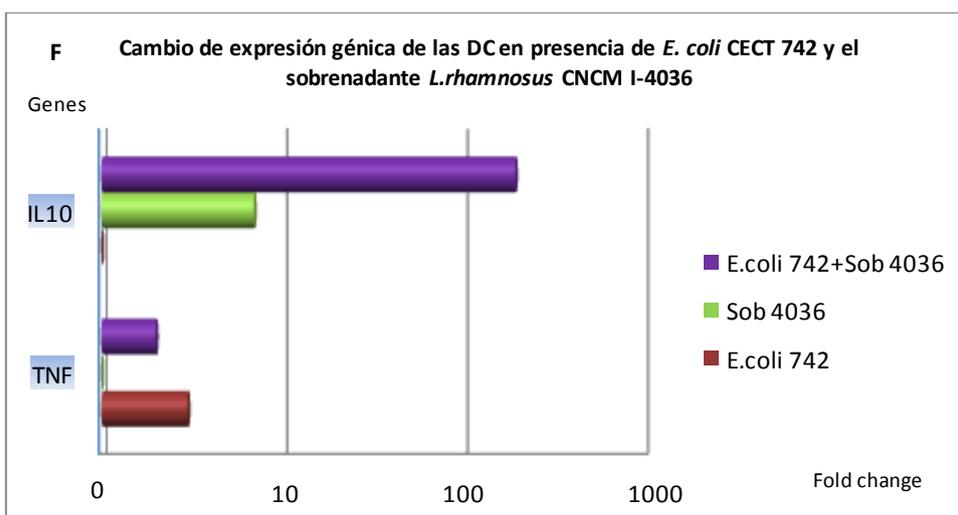
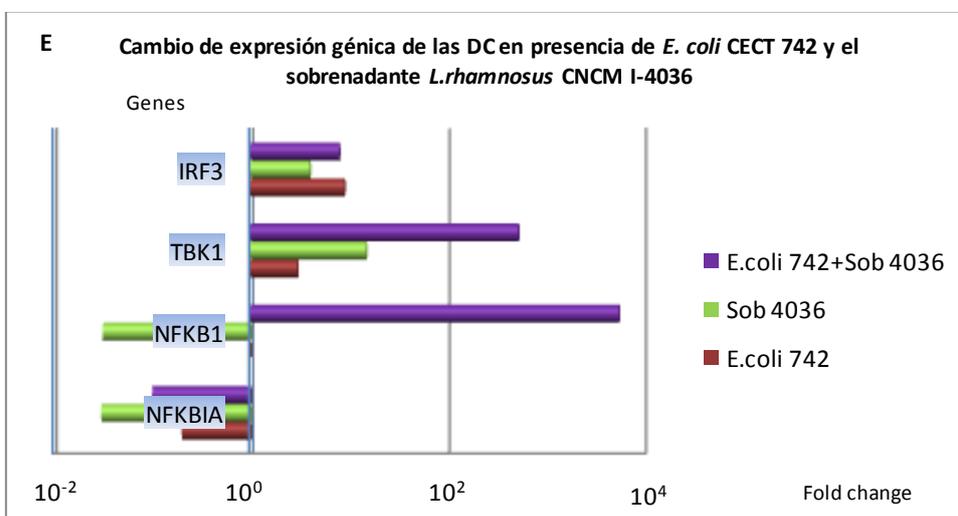
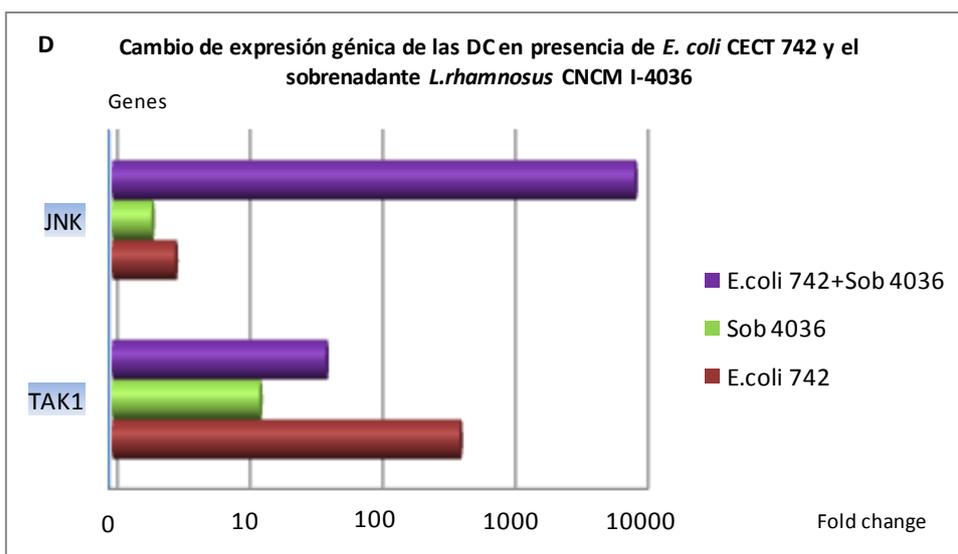


Figura 27. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1* y *TOLLIP* (B); *CASP8* y *MAPK14* (C); *TAK1* y *JNK* (D); *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1* e *NF-κBIA* (E); y *TNF-α* e *IL-10* (F), de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Escherichia coli* CECT 742 y el sobrenadante *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

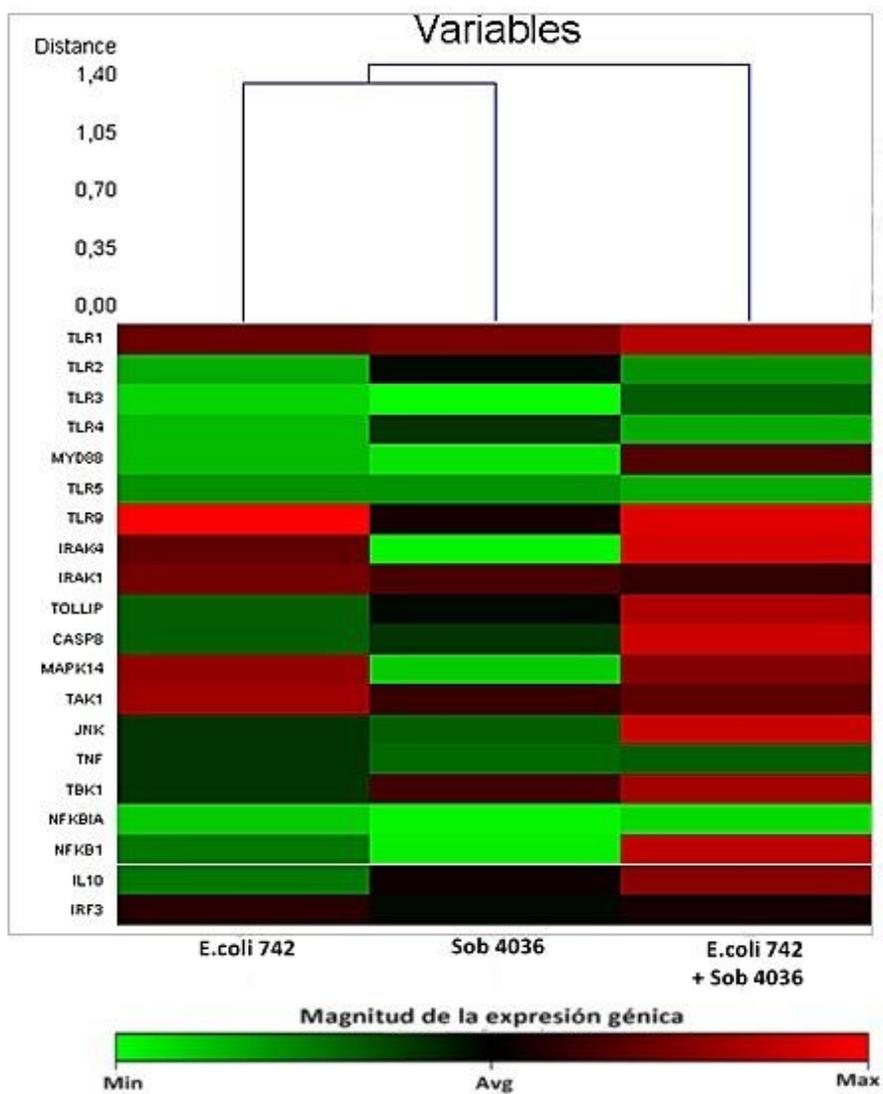
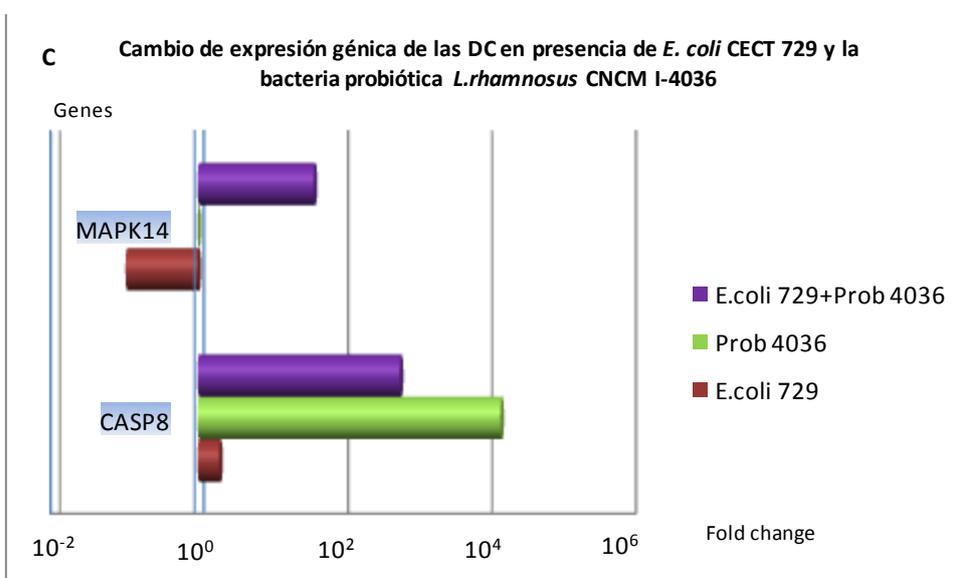
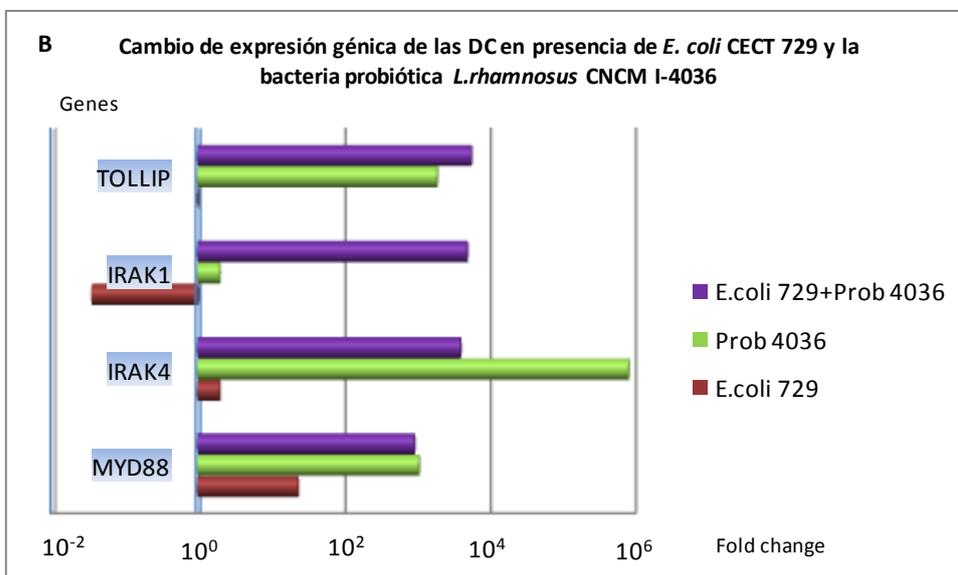
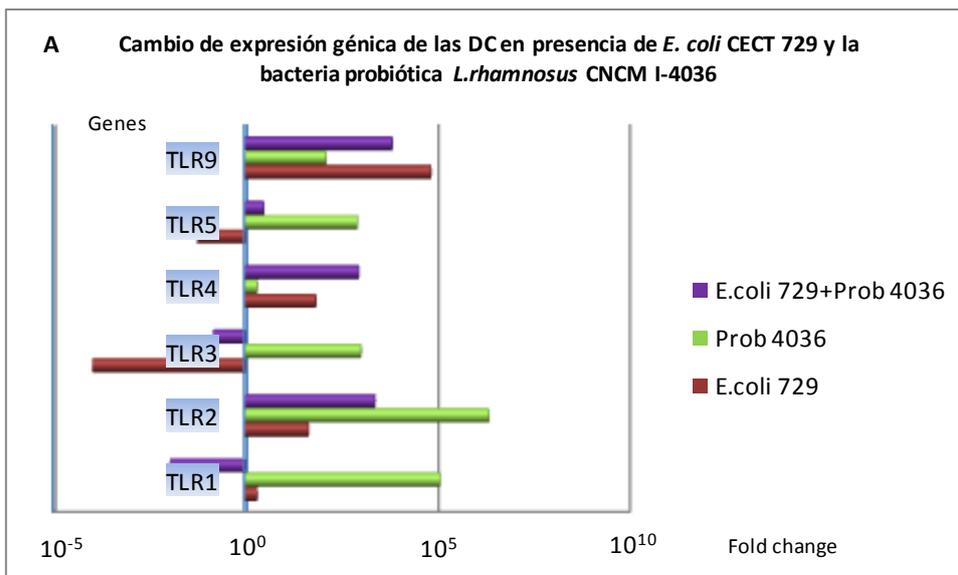


Figura 28. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes Toll-like receptors (*TLR*), *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1*, *NF-κBIA*, *TNF-α* e *IL-10*, de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Escherichia coli* CECT 742 y el sobrenadante *L.rhamnosus* CNCM I-4036.



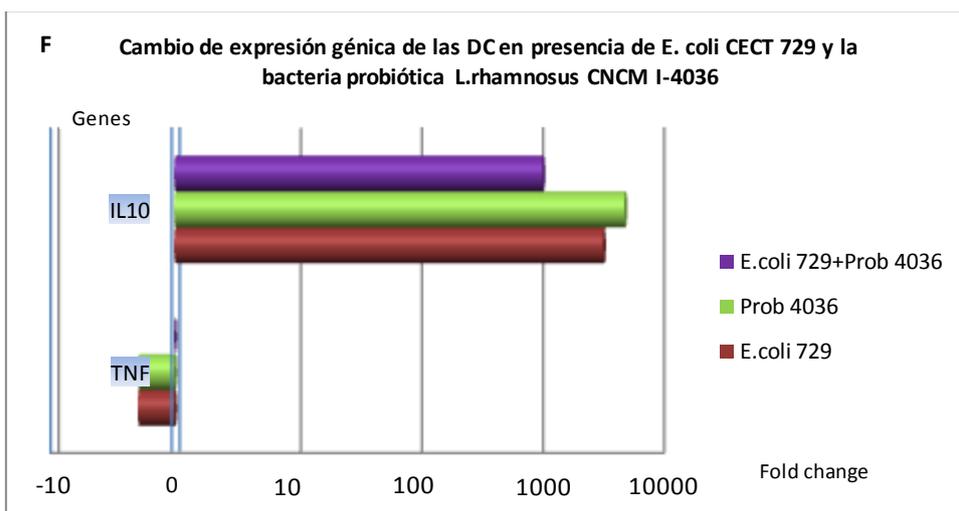
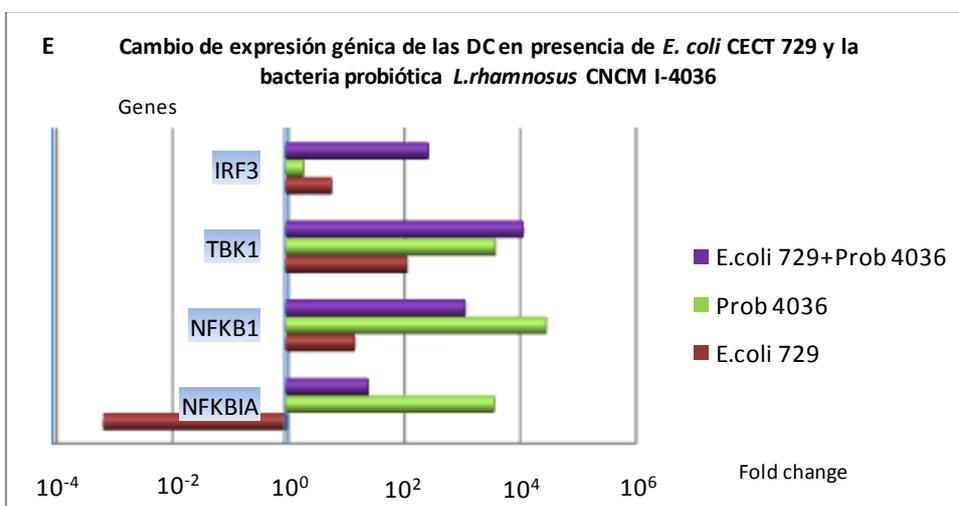
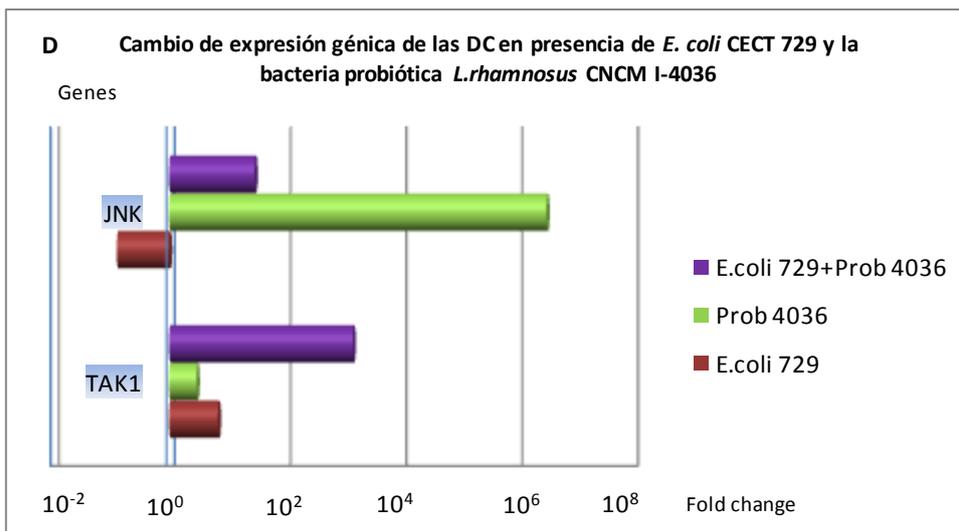


Figura 29. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1* y *TOLLIP* (B); *CASP8* y *MAPK14* (C); *TAK1* y *JNK* (D); *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1* e *NF-κBIA* (E); y *TNF-α* e *IL-10* (F), de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Escherichia coli* CECT 729 y el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

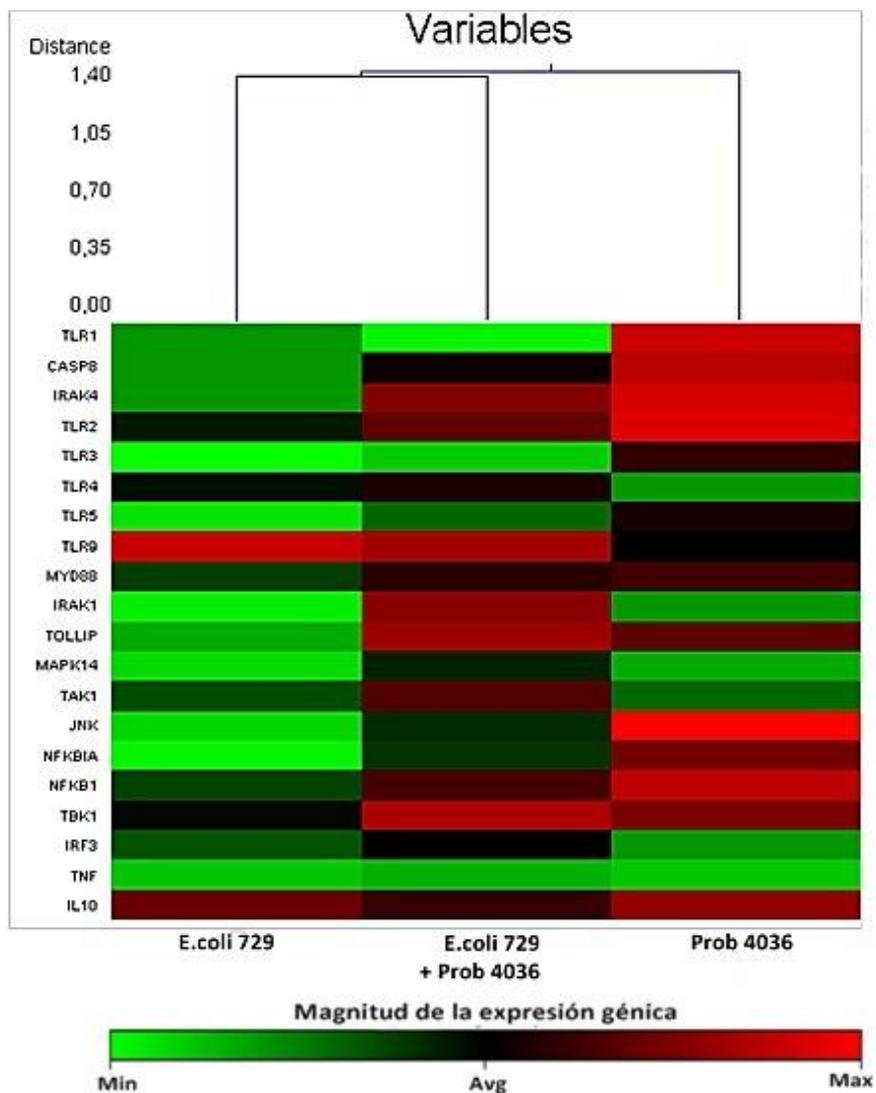
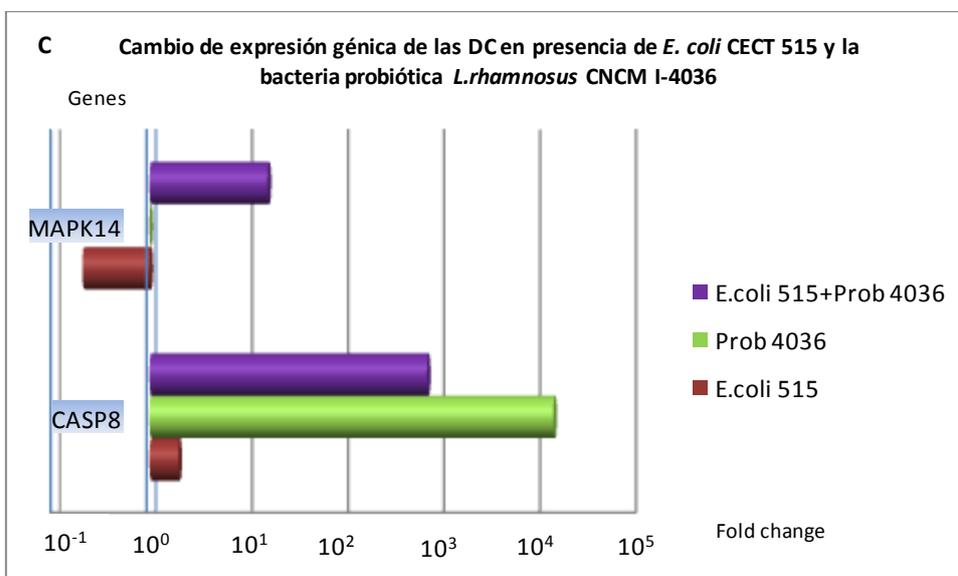
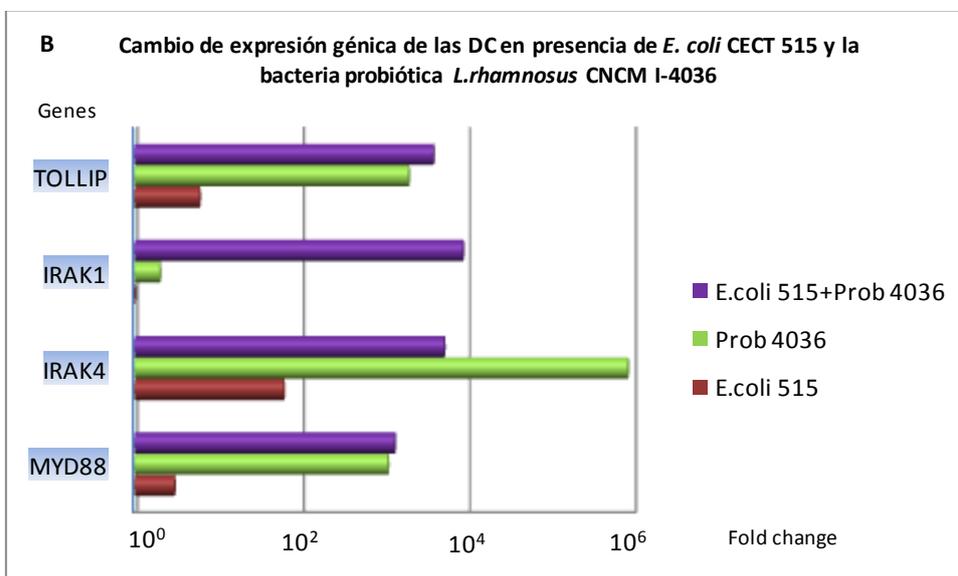
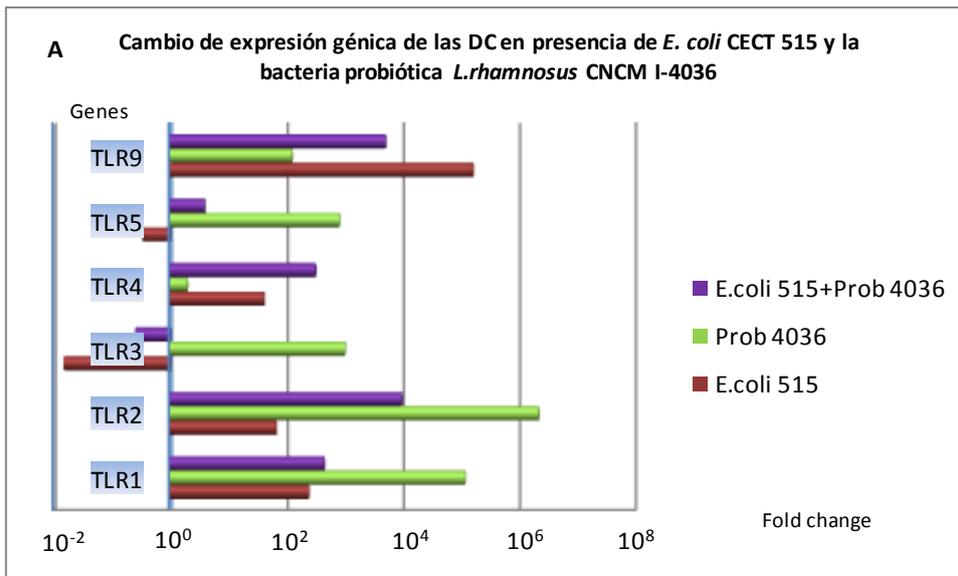


Figura 30. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes *Toll-like receptors* (TLR), *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF- κ B1*, *NF- κ BIA*, *TNF- α* e *IL-10*, de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Escherichia coli* CECT 729 y el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036.



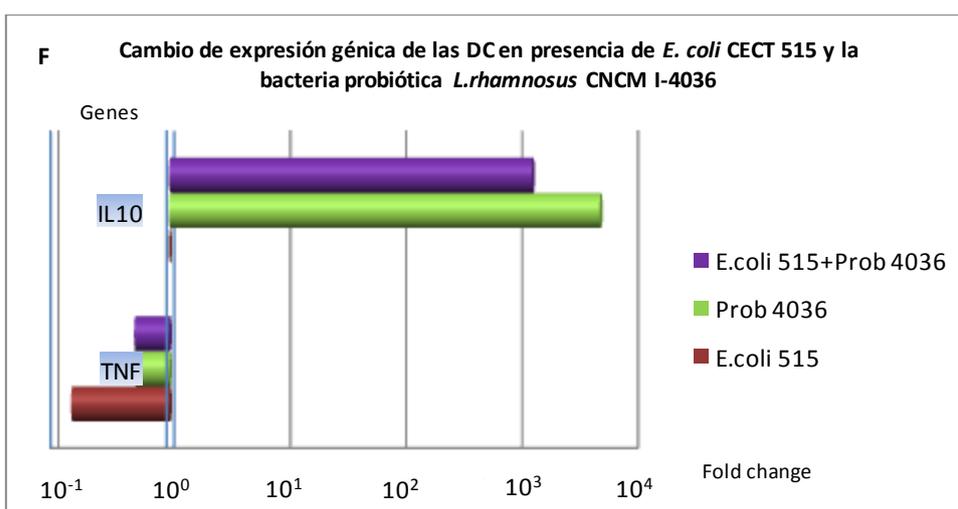
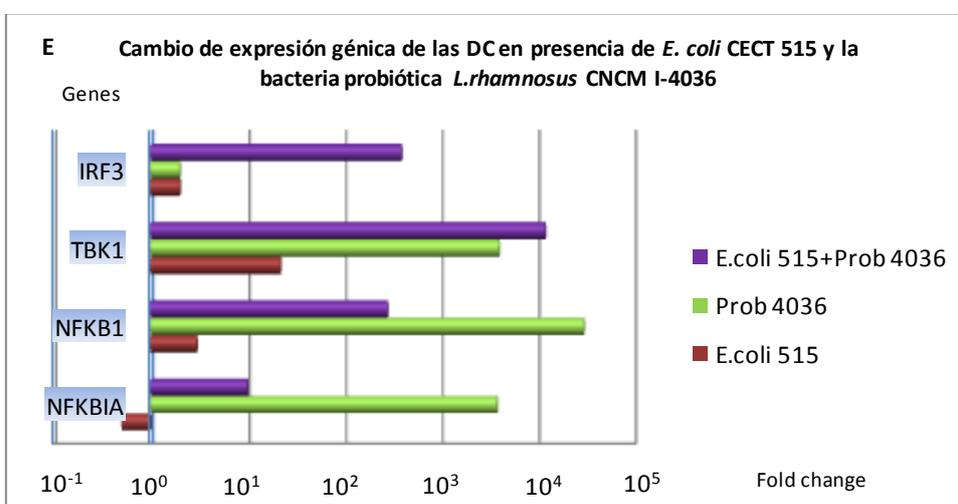
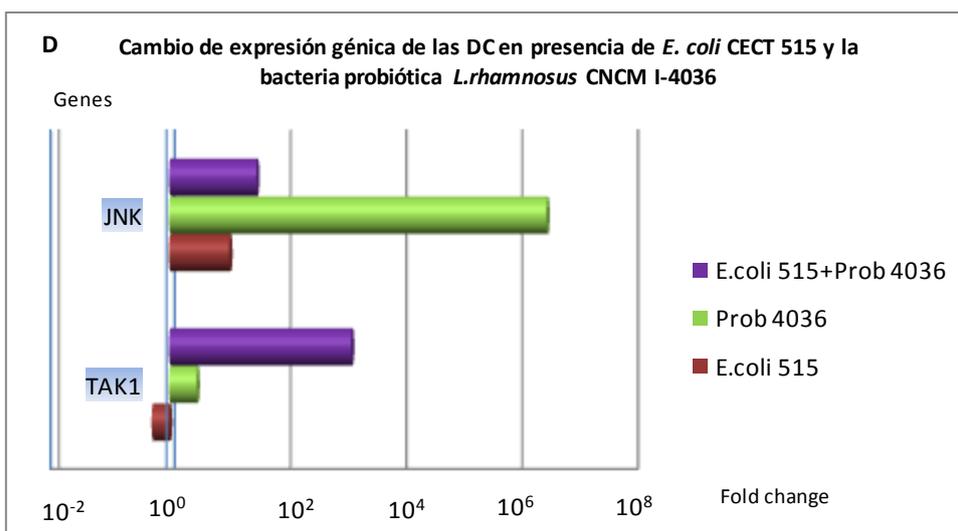


Figura 31. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1* y *TOLLIP* (B); *CASP8* y *MAPK14* (C); *TAK1* y *JNK* (D); *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1* e *NF-κBIA* (E); y *TNF-α* e *IL-10* (F), de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Escherichia coli* CECT 515 y el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

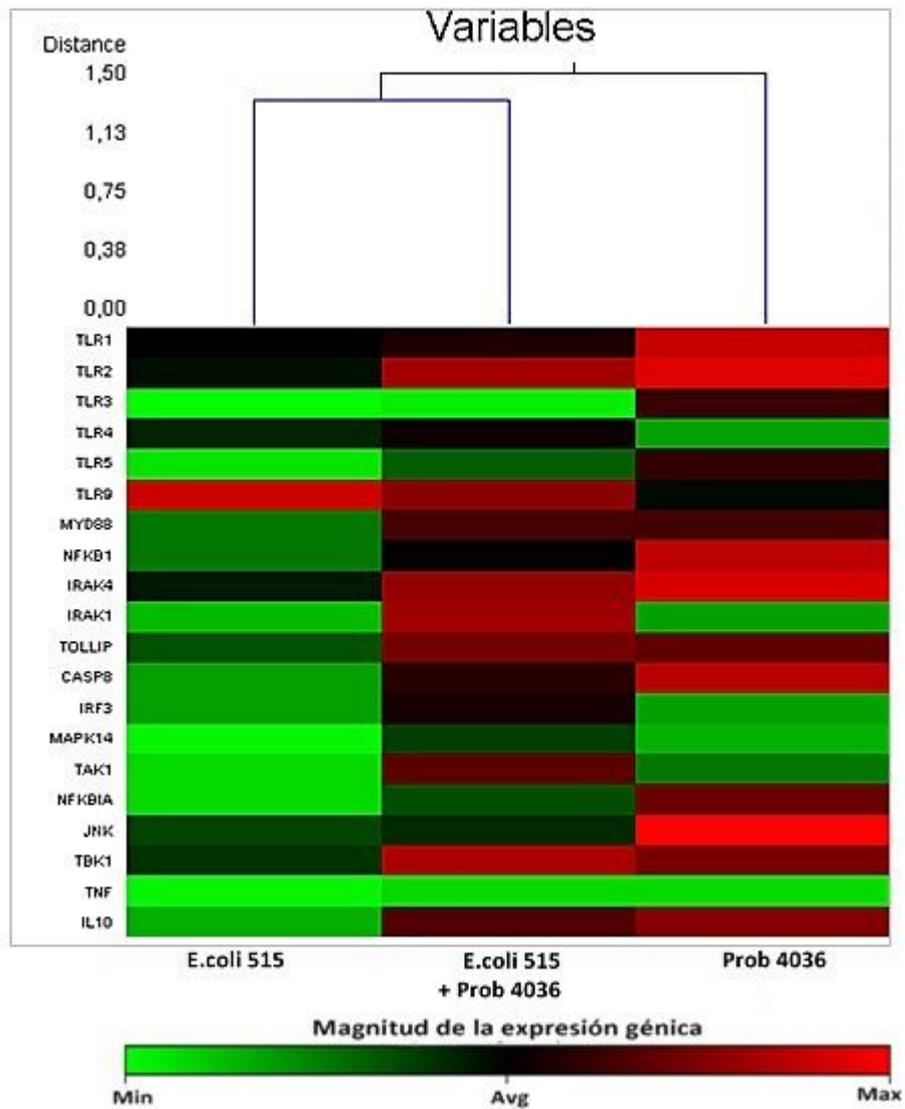
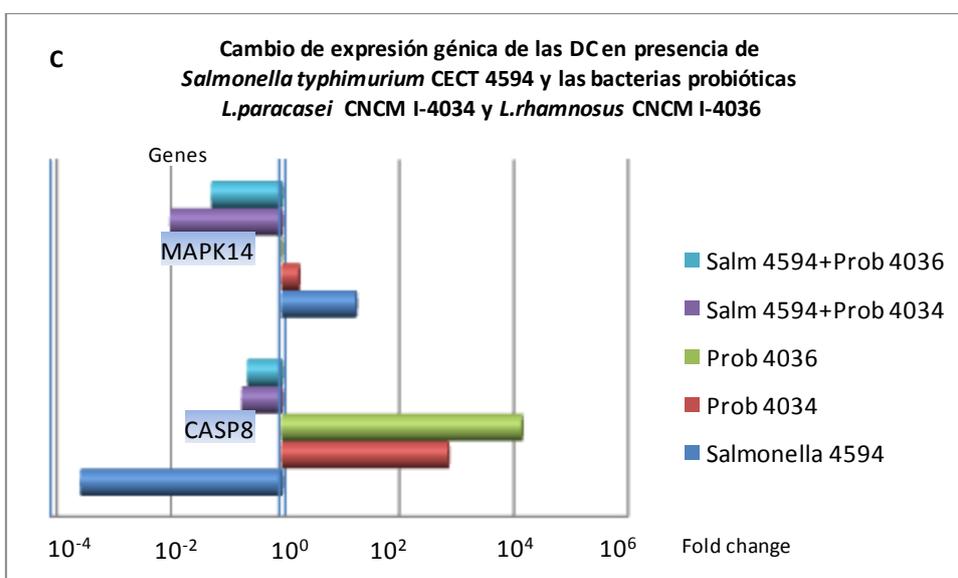
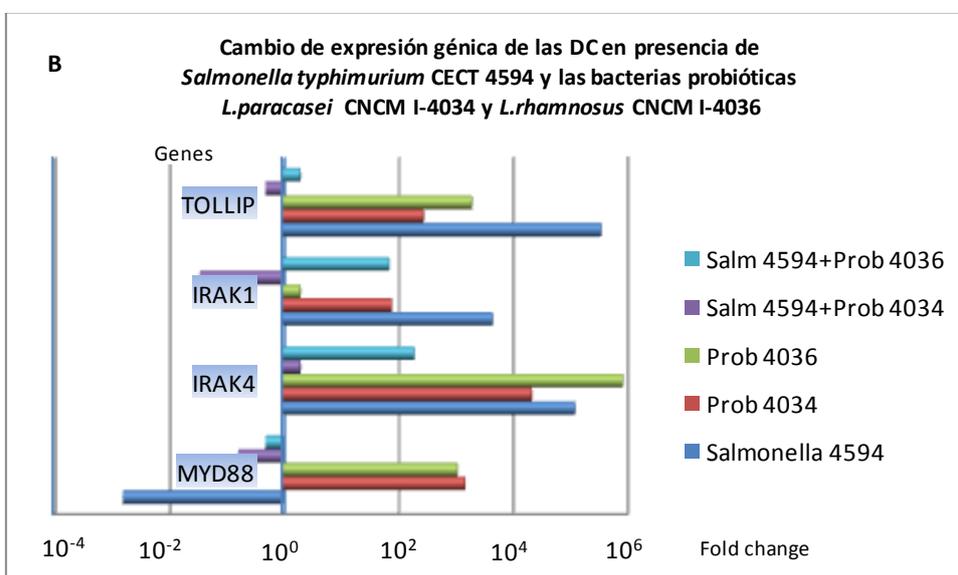
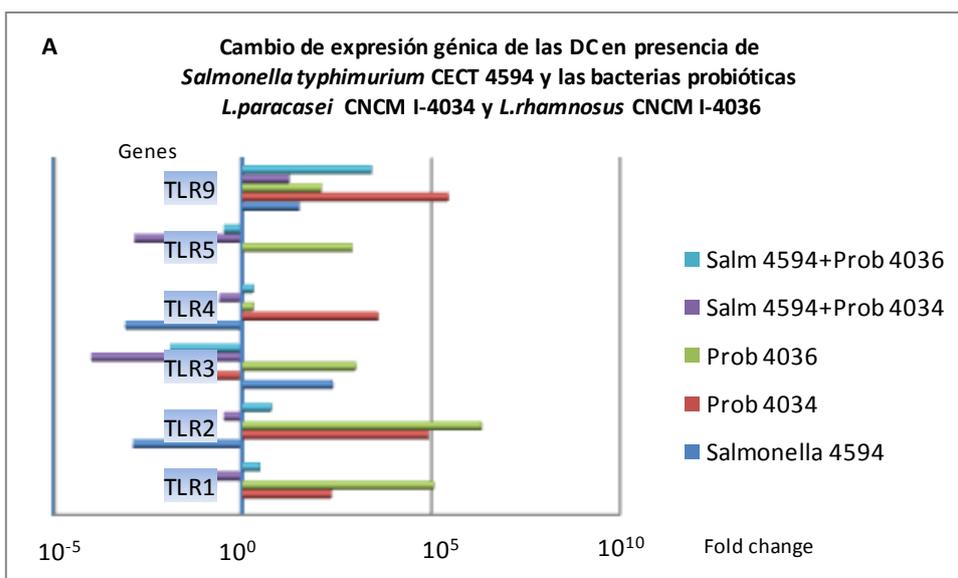


Figura 32. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes Toll-like receptors (TLR), MYD88, IRAK4, IRAK1, TOLLIP, CASP8, MAPK14, TAK1, JNK, TBK1, IRF3, NF- κ B1, NF- κ BIA, TNF- α e IL-10, de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Escherichia coli* CECT 515 y el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036.



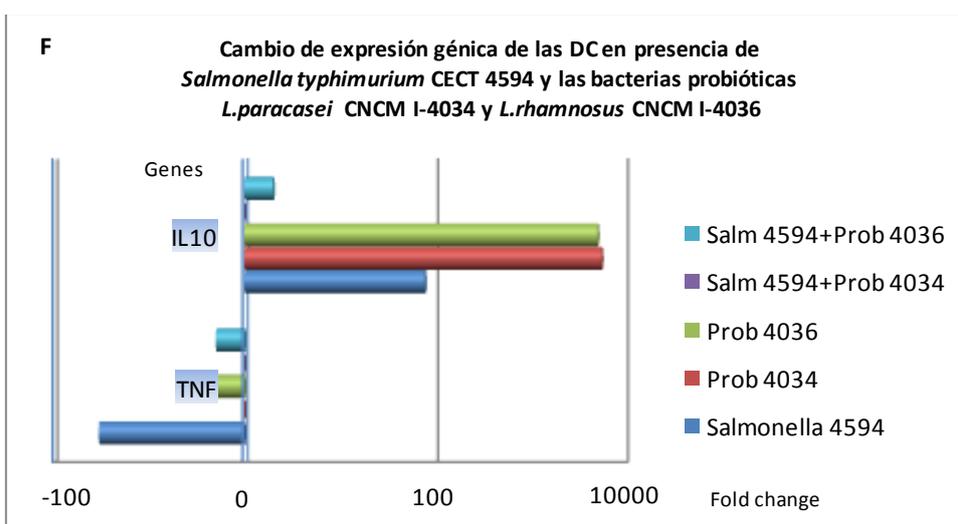
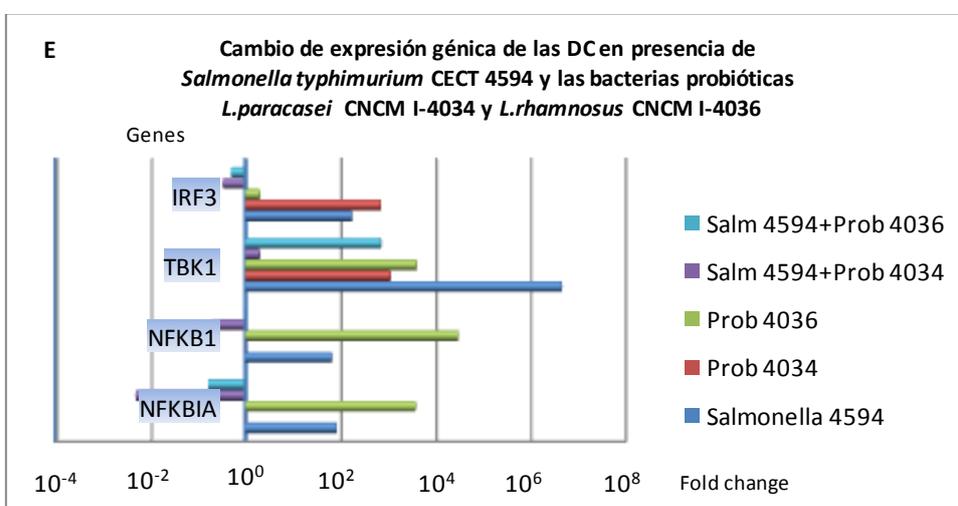
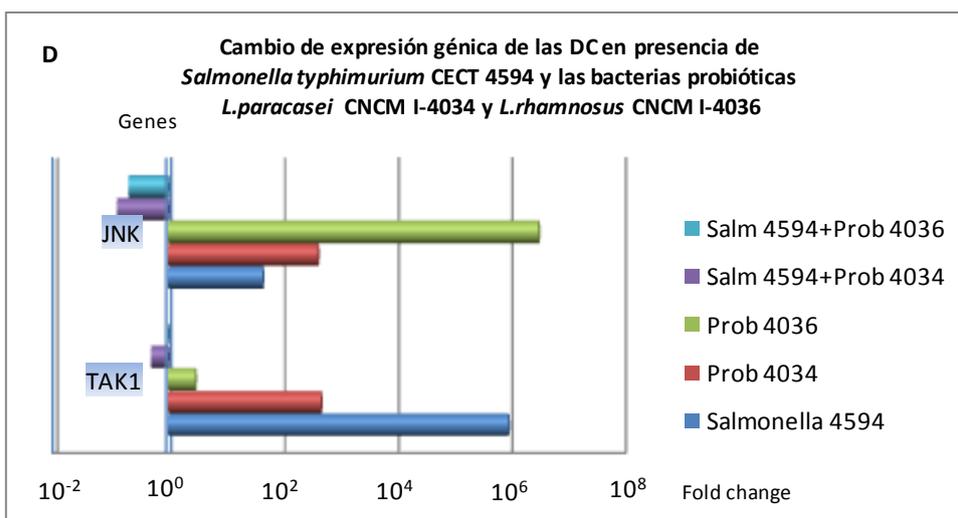


Figura 33. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1* y *TOLLIP* (B); *CASP8* y *MAPK14* (C); *TAK1* y *JNK* (D); *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1* e *NF-κBIA* (E); y *TNF-α* e *IL-10* (F), de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Salmonella typhimurium* CECT 4594 y los probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

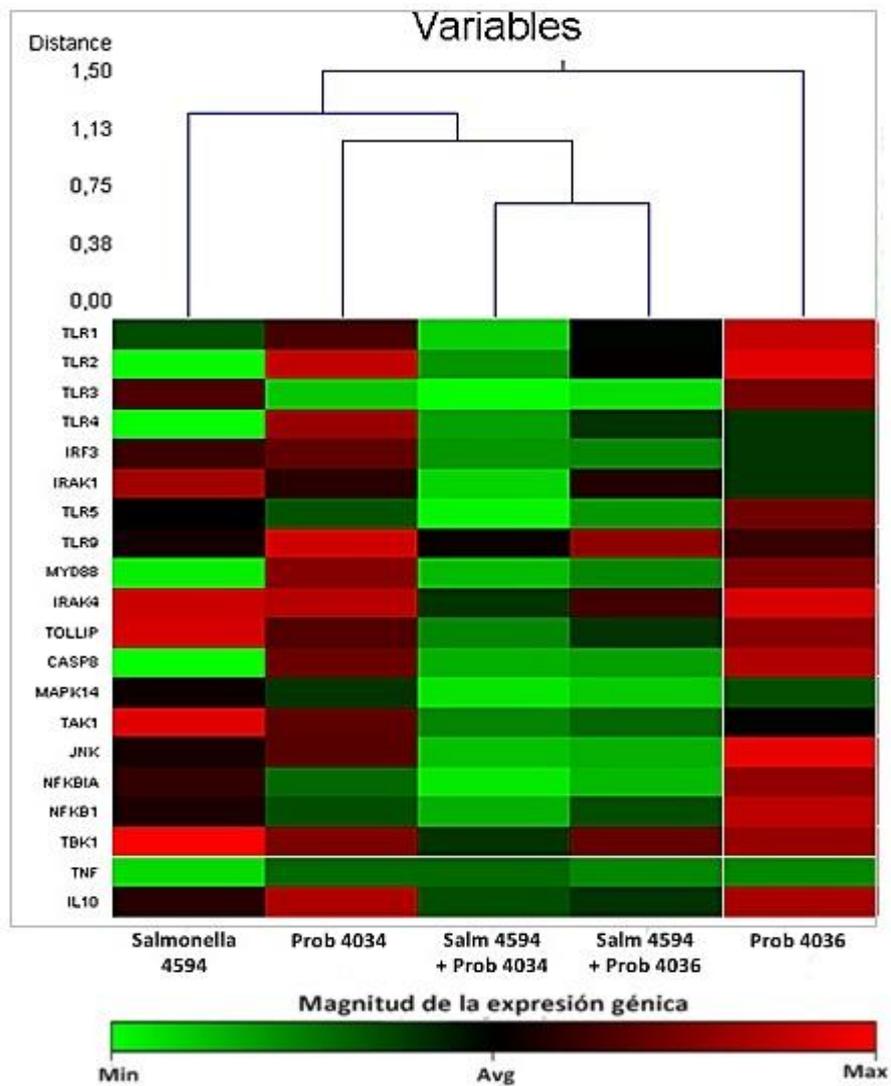
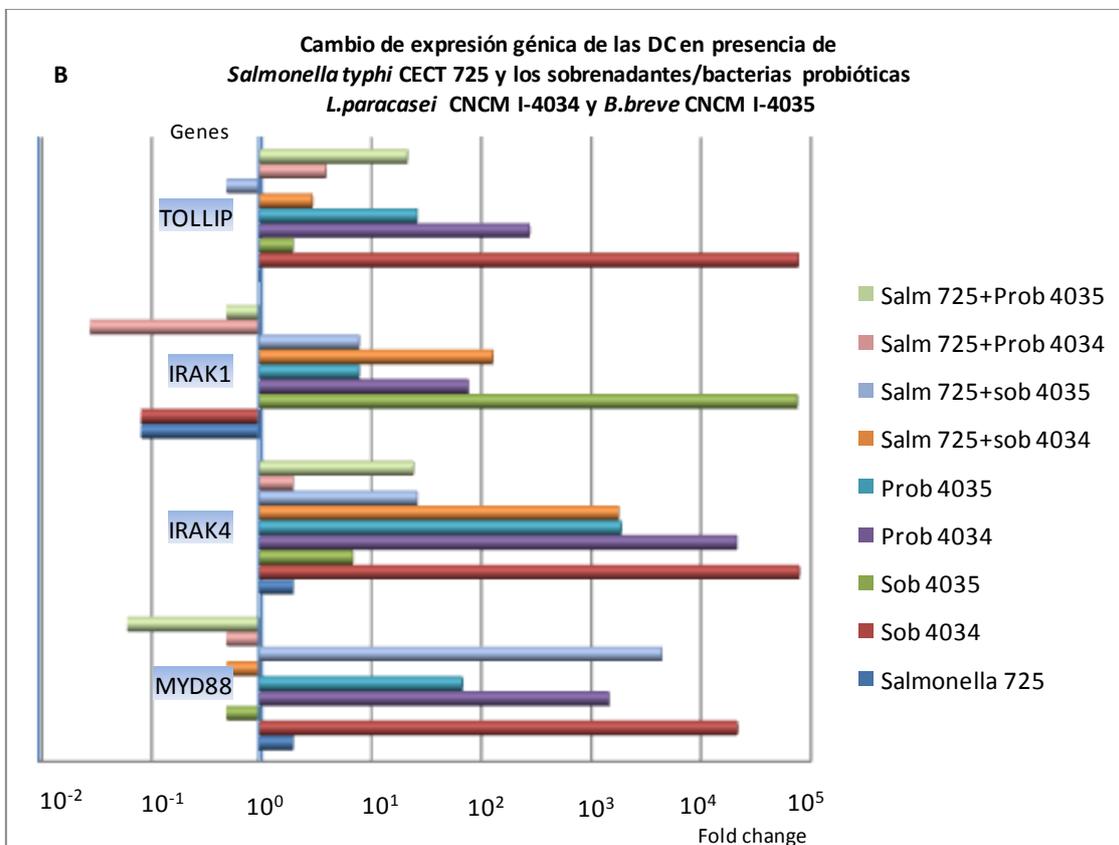
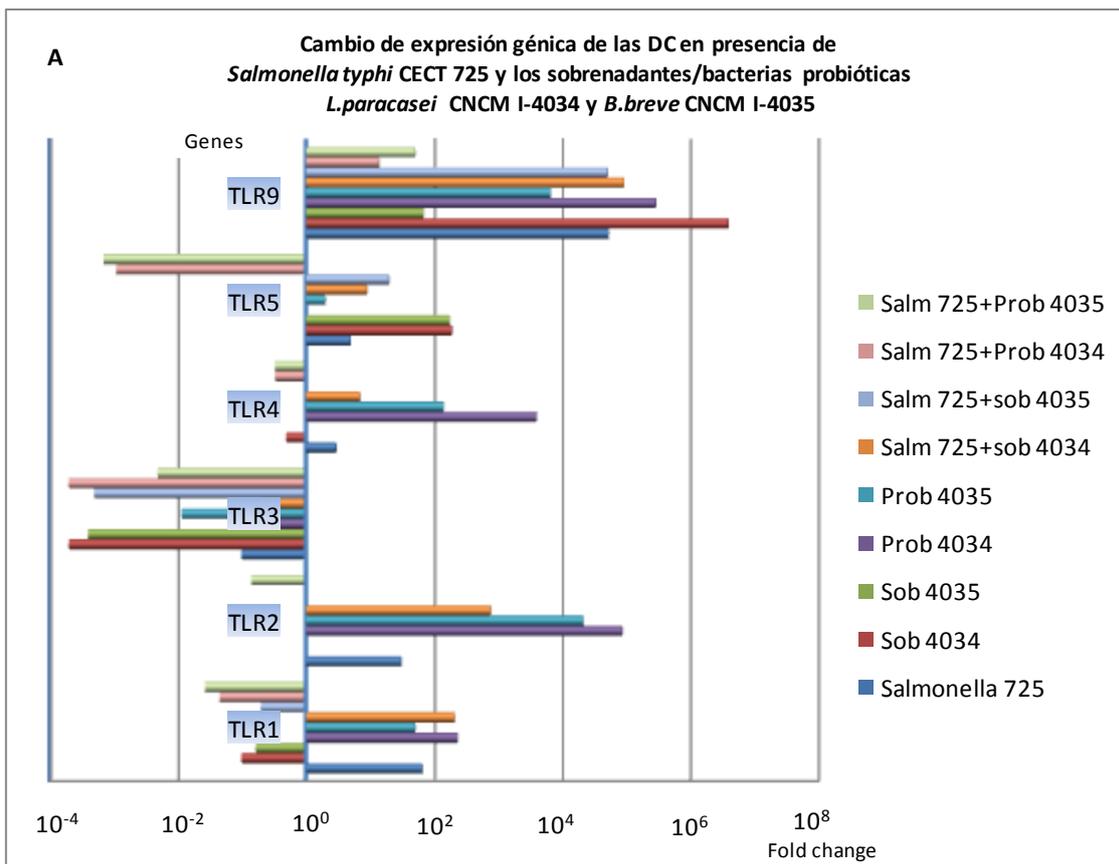
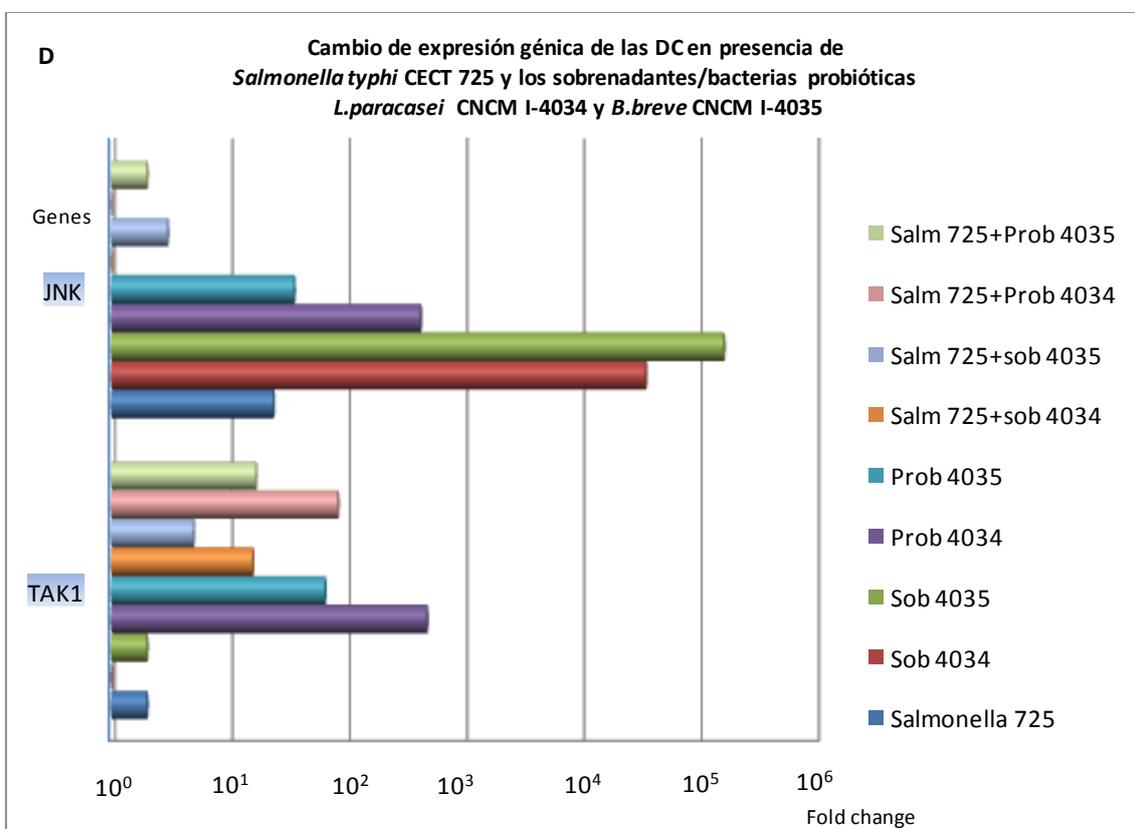
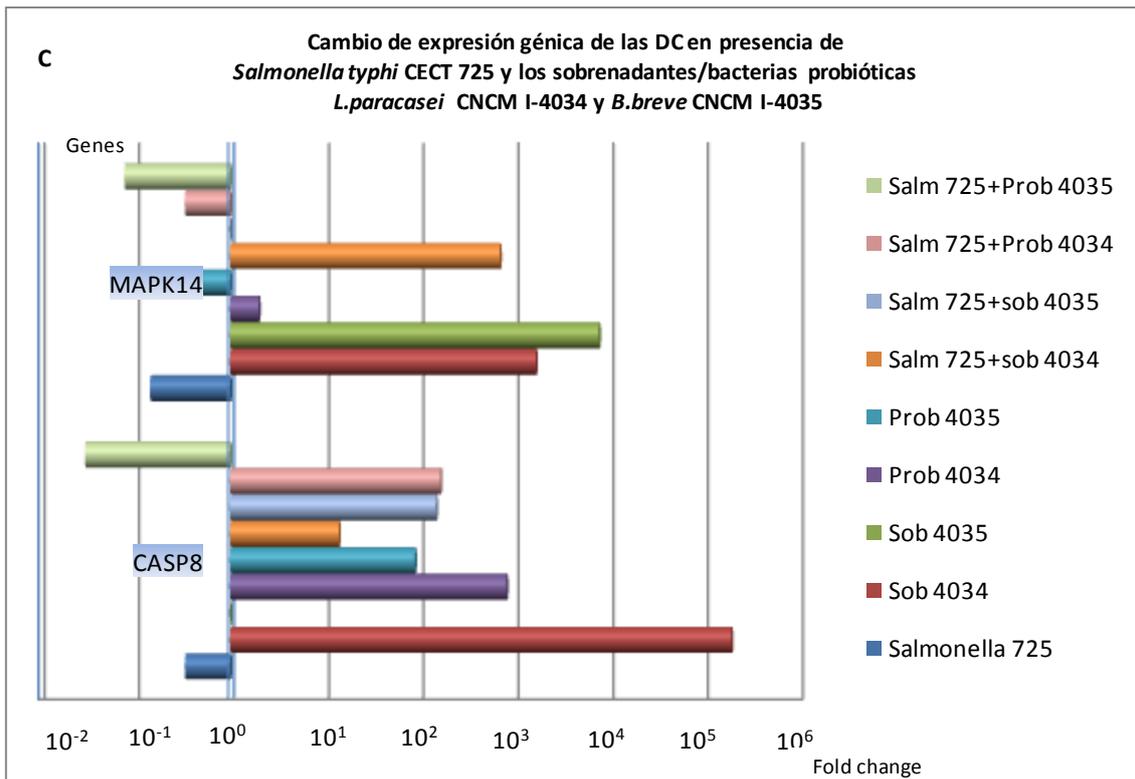


Figura 34. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes *Toll-like receptors* (TLR), *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF- κ B1*, *NF- κ BIA*, *TNF- α* e *IL-10*, de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Salmonella typhimurium* CECT 4594 y los probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036.





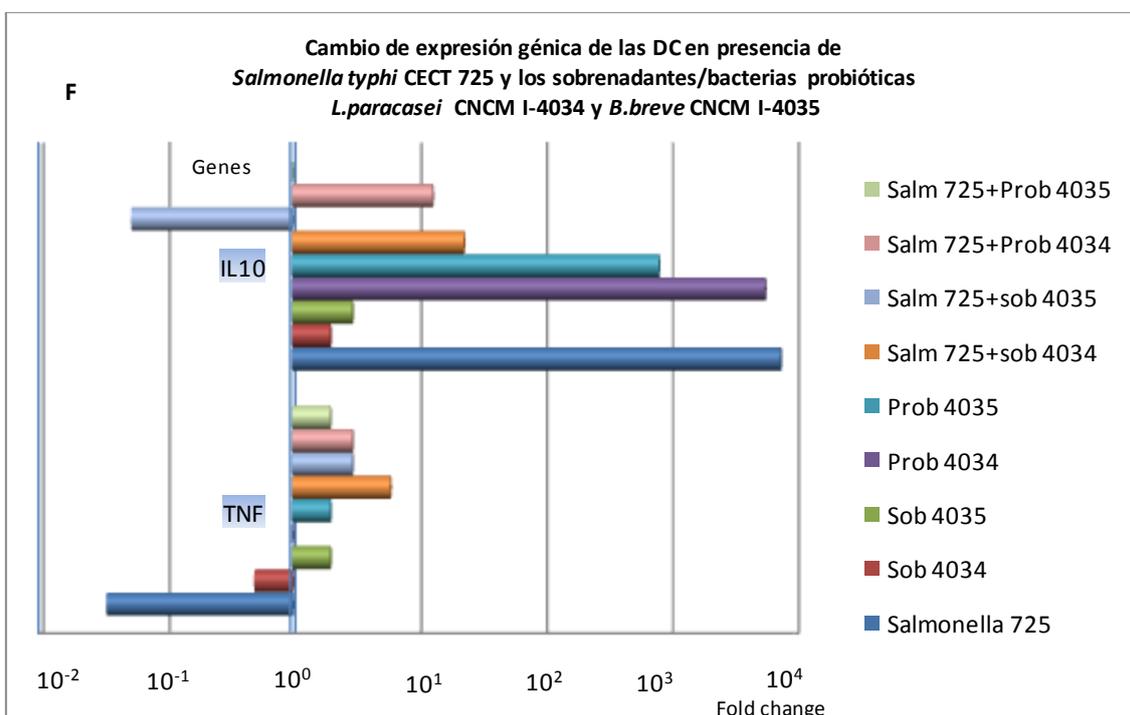
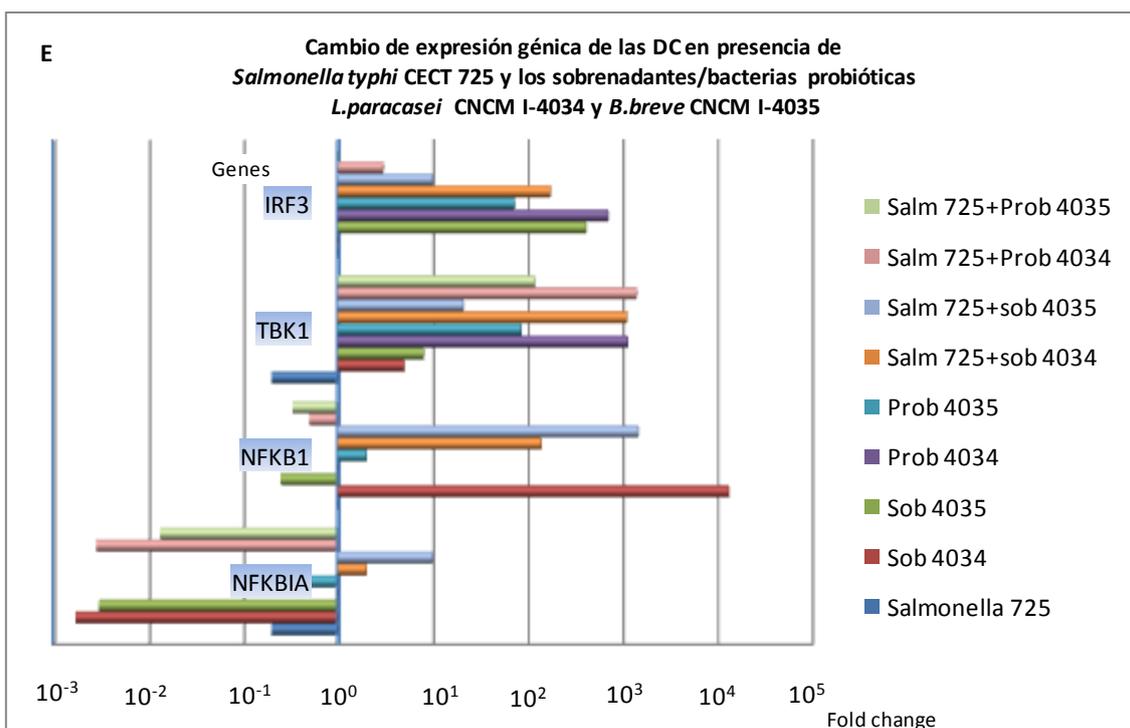


Figura 35. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1* y *TOLLIP* (B); *CASP8* y *MAPK14* (C); *TAK1* y *JNK* (D); *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1* e *NF-κBIA* (E); y *TNF-α* e *IL-10* (F), de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Salmonella typhi* CECT 725 y los sobrenadantes/bacterias probióticas *L.paracasei* CNCM I-4034 y *B.breve* CNCM I-4035.

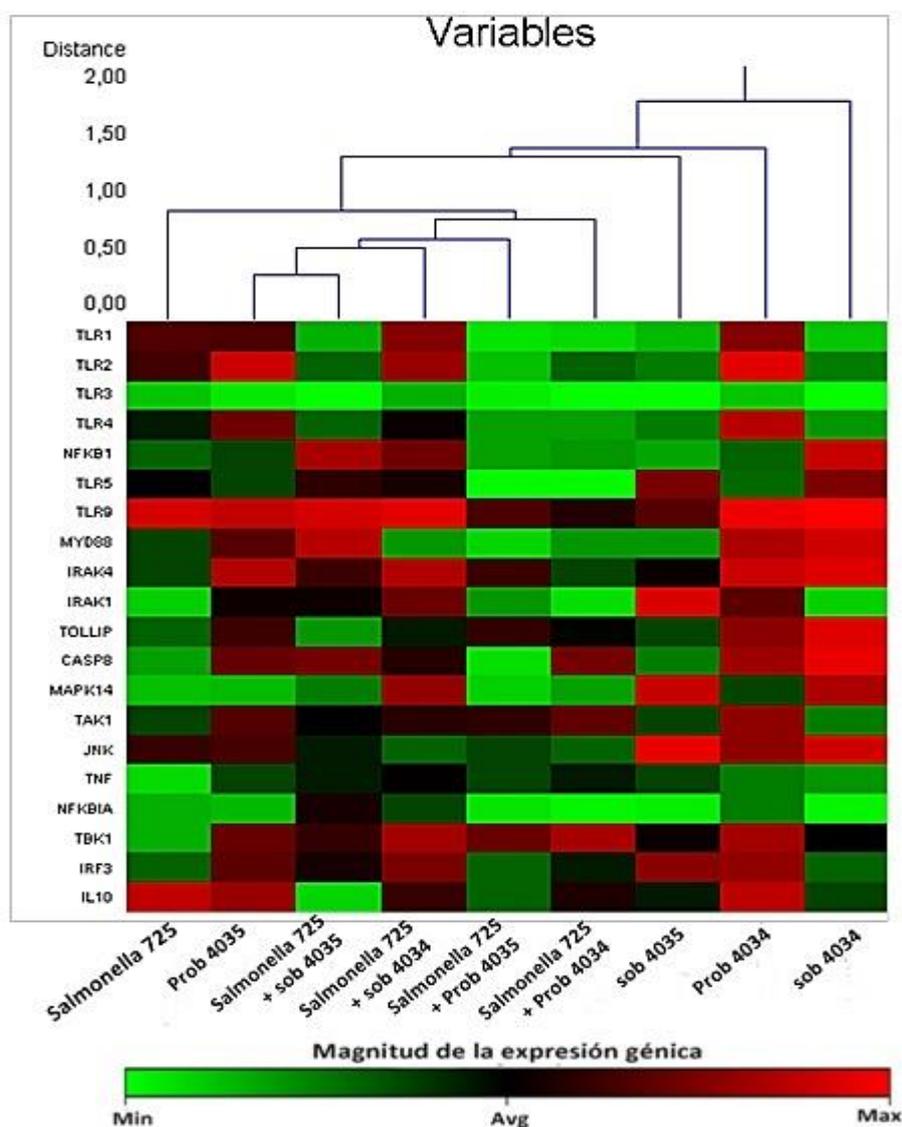


Figura 36. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes Toll-like receptors (TLR), *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1*, *NF-κBIA*, *TNF-α* e *IL-10*, de las células dendríticas (DC) estimuladas 4 horas con *Salmonella typhi* CECT 725 y los sobrenadantes/bacterias probióticas *L.paracasei* CNCM I-4034 y *B.breve* CNCM I-4035.

Experimento 2: Co-cultivo de células Caco-2 y células dendríticas, en presencia de las cepas probióticas

Determinación de citoquinas

Las citoquinas pro-inflamatorias secretadas por las células dendríticas y células caco-2 aumentan muy fuertemente en presencia de LPS y tras 4 horas de incubación con enteropatógenos en presencia de las bacterias probióticas *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036, o de sus sobrenadantes. Los aumentos tienen un rango de variación amplio y son dependientes de cepa

Se determinaron las concentraciones de las siguientes citoquinas y quimioquinas: IFN γ , IL-10, IL-1 β , IL-12 (p70 y p70+p40), IL-6, IL-8, TNF- α , IP-10(CXCL10), MCP-1(CCL2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5) y MDC (CCL22), en el sobrenadante recogido tras cuatro horas de incubación en co-cultivos de células dendríticas y células caco-2, en presencia de las bacterias probióticas de estudio (o de sus sobrenadantes tras 24 horas de cultivo, liofilizados, concentrados diez veces y neutralizados) y enterobacterias.

Las gráficas 37 a 43 representan la concentración de citoquinas liberadas por las células dendríticas y células caco-2 cuando se estimulan durante 4 h con los distintos sobrenadantes y bacterias probióticas, así como los patógenos. Los valores representan la cantidad de citoquinas liberadas, con respecto al control en tanto por uno. Para cada tratamiento, las citoquinas se dividen en dos gráficos: A, en el que se representan las interleuquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 (p70 y p70+p40) y TNF- α ; y B, en el que se representan las quimioquinas MCP-1(CCL2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10(CXCL10). En este caso, no se pudo detectar la presencia en el sobrenadante de la citoquina IFN γ .

Las citoquinas pro-inflamatorias secretadas por las células dendríticas y las células caco-2 aumentaron tras 4 horas de incubación especialmente en presencia de LPS (figura 37). Asimismo, se produjeron aumentos, aunque más moderados, con los enteropatógenos *Salmonella enterica* y *Escherichia coli* (figuras 38-42).

Todos los tratamientos provocaron un aumento en la liberación de citoquinas pro-inflamatorias por parte de las células dendríticas y caco-2. Este incremento fue muy marcado a nivel para las interleuquinas, sobre todo, IL-6 y TNF- α . Sin embargo, cabe señalar que este aumento no fue igual en todos los grupos estudiados y que varió en función del patógeno y de la cepa probiótica utilizada.

IL-6 y TNF- α son las citoquinas pro-inflamatorias más alteradas secretadas por las células dendríticas y células caco-2 en respuesta a los probióticos, o sus sobrenadantes, y a enterobacterias

El uso del sobrenadante perteneciente a la bacteria *L.paracasei* CNCM I-4034 en presencia de *Salmonella typhi* CECT 725 fue el que menos efecto tuvo en la liberación de citoquinas, afectando exclusivamente a la secreción de IL-6 e IL-8 (figura 42). Por otra parte, el sobrenadante de *L.rhamnosus* CNCM I-4036 en presencia de *E.coli* CECT 742 aumentó al doble la liberación de todas las citoquinas pro-inflamatorias (figura 38), mientras que el sobrenadante de *B.breve* CNCM I-4035 frente a *Salmonella typhi* CECT 725 pareció ser el más activo, incrementando drásticamente la producción de todas las citoquinas estudiadas (figura 42). Además, este sobrenadante fue el que generó la mayor liberación de IL-10, incluso en comparación con los probióticos.

El probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036, en presencia de los distintos patógenos: *E.coli* CECT 729 (figura 39), *E.coli* CECT 515 (figura 40) y *Salmonella typhimurium* CECT 4594 (figura 41), originó patrones similares en la secreción de citoquinas por parte de las células dendríticas y caco-2. En todos los casos, aumentaron las citoquinas pro-inflamatorias, sobre todo, IL-6 y TNF- α . Además, los valores de liberación de las citoquinas fueron muy semejantes a los producidos por el probiótico *B.breve* CNCM I-4035 en presencia de *Salmonella typhi* CECT 725 (figura 43).

El probiótico *L.paracasei* CNCM I-4034 mostró una dinámica variable en la liberación de citoquinas por parte de las células dendríticas y caco-2 en función del patógeno utilizado, *Salmonella typhi* CECT 725 (figura 43) o de *Salmonella typhimurium* CECT 4594 (figura 41). Así, cuando *Salmonella typhi* CECT 725 estuvo presente en el medio produjo una liberación de todas las citoquinas pro-inflamatorias similar a la producida por el probiótico *B.breve* CNCM I-4035 con esta misma bacteria patógena. Sin embargo, cuando interaccionó con *Salmonella typhimurium* CECT 4594 sólo afectó a la secreción de IL-6 e IL-8, además de RANTES/CCL5.

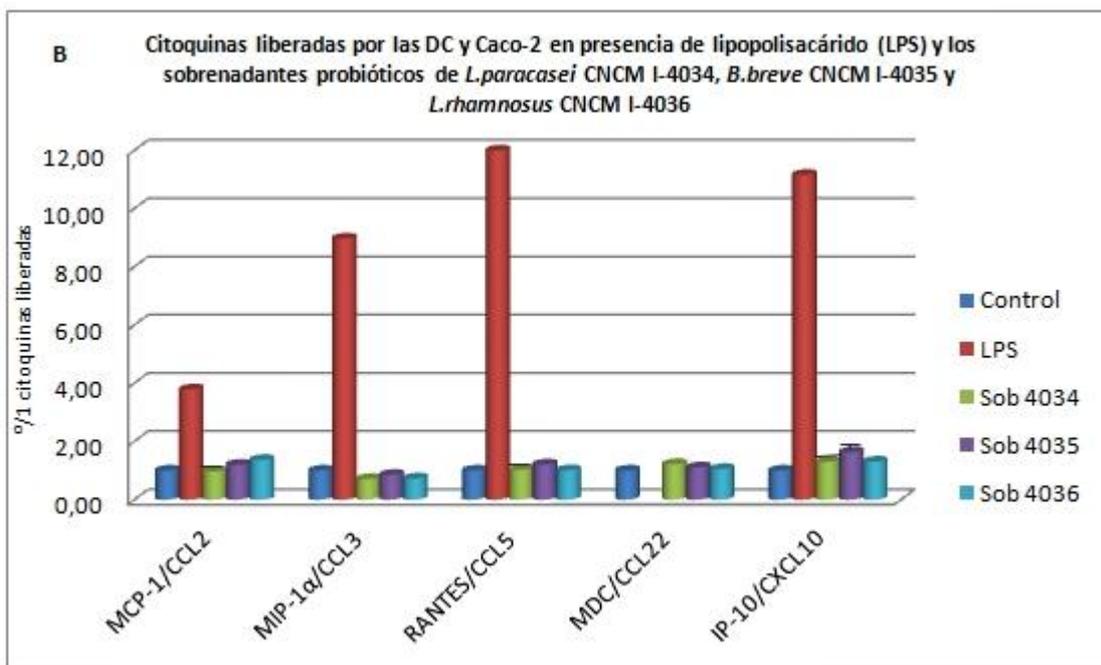
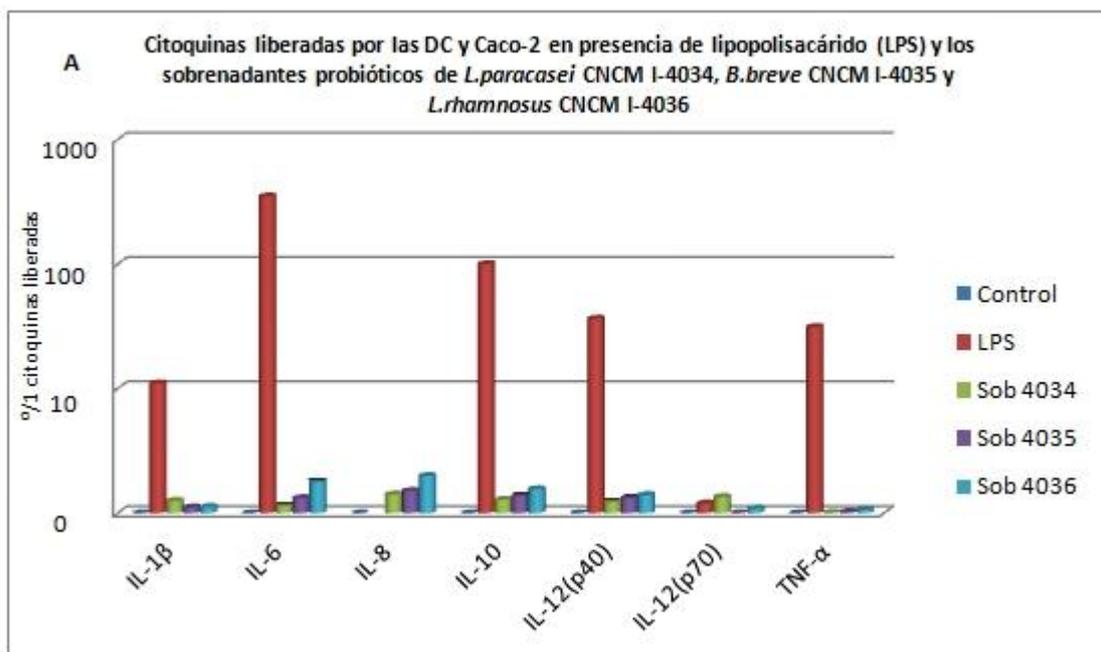


Figura 37. Valores de la liberación de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α (A), así como de las quimioquinas MCP-1 (CCL-2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10 (B), normalizados frente al control (en tanto por uno), de las células dendríticas (DC) y células Caco-2, estimuladas 4 horas con lipopolisacárido (LPS) y los sobrenadantes probióticos.

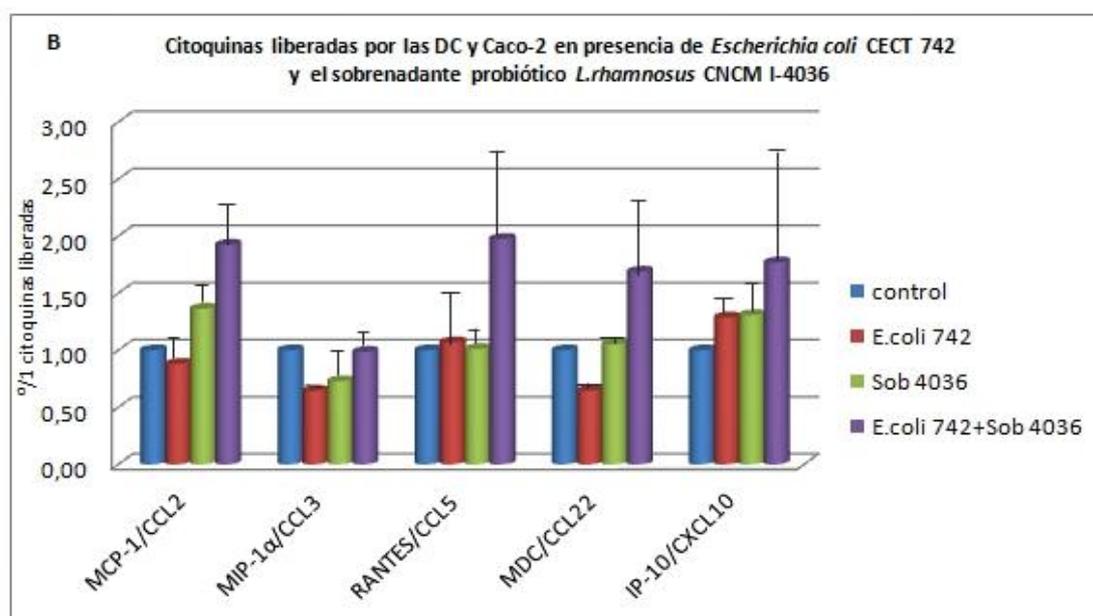
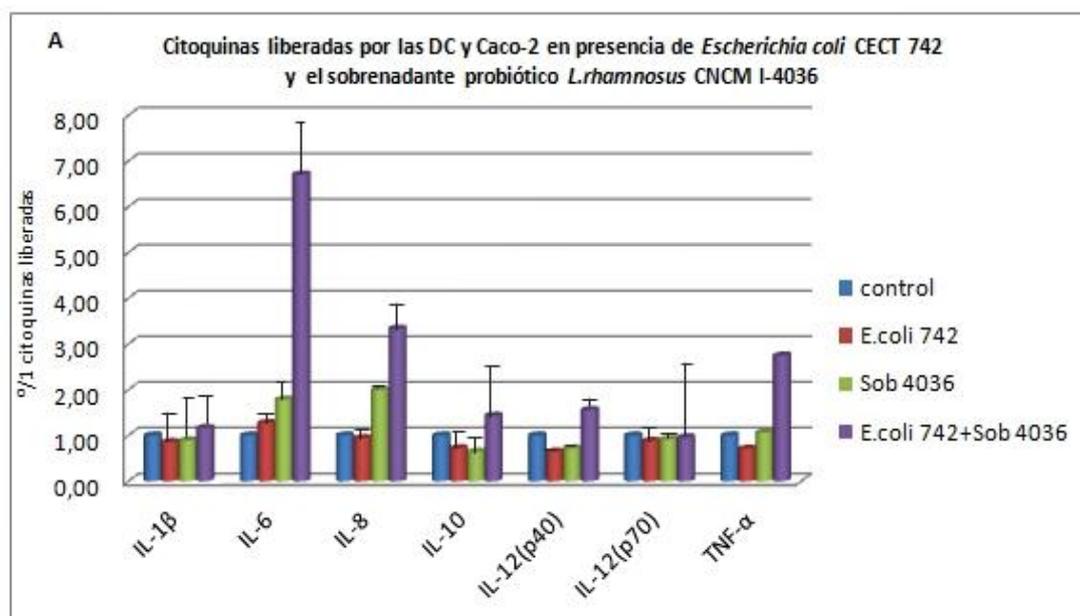


Figura 38. Valores de la liberación de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α (A), así como de las quimioquinas MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10 (B), normalizados frente al control (en tanto por uno), de las células dendríticas (DC) y células Caco-2, estimuladas 4 horas con *Escherichia coli* CECT 742 y el sobrenadante *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

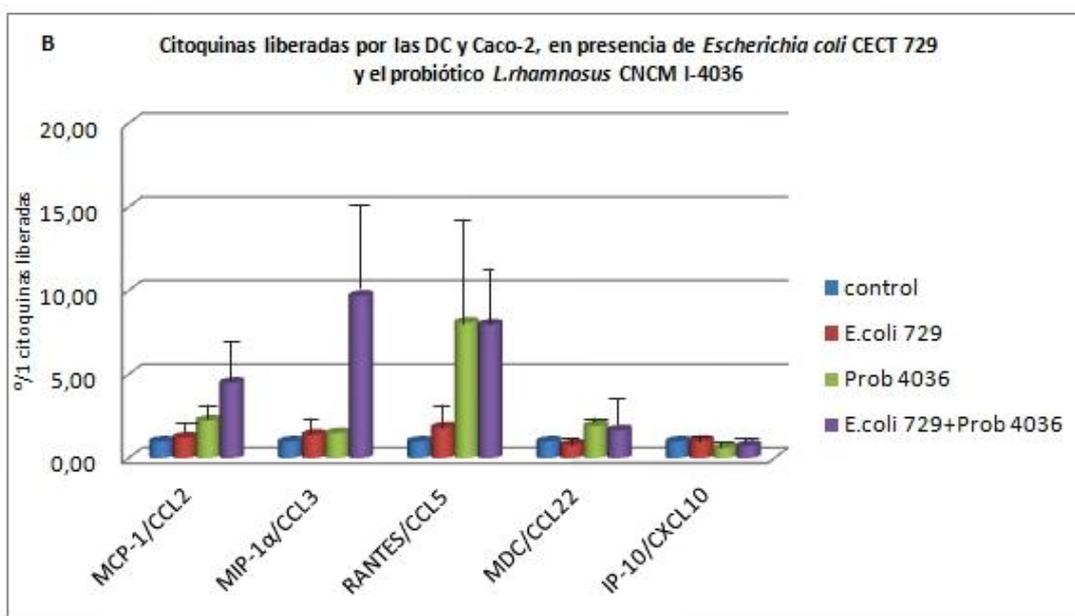
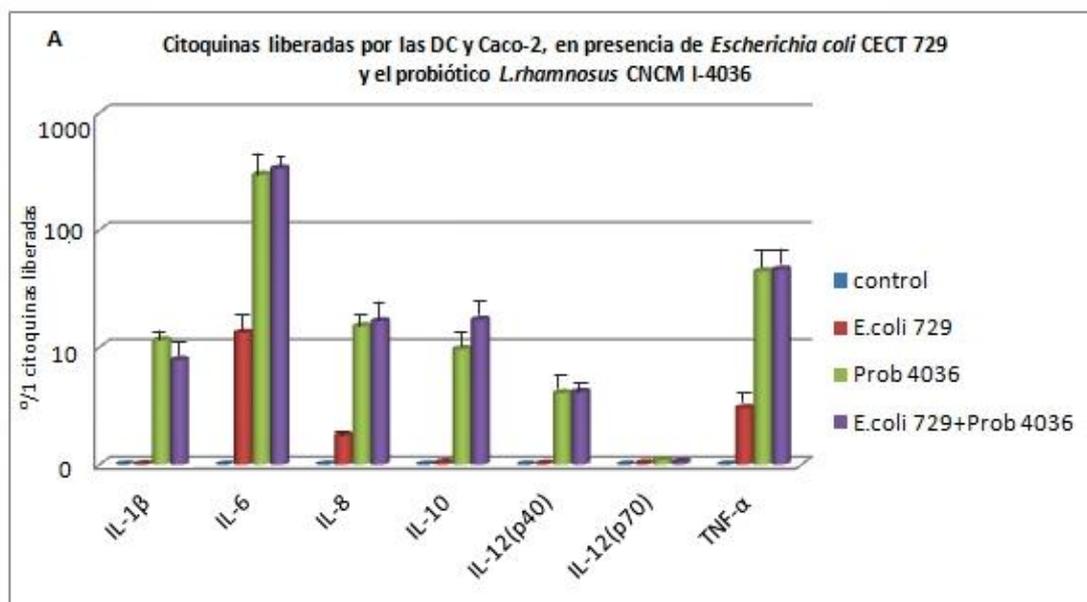


Figura 39. Valores de la liberación de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α (A), así como de las quimioquinas MCP-1 (CCL-2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10 (B), normalizados frente al control (en tanto por uno), de las células dendríticas (DC) y células Caco-2, estimuladas 4 horas con *Escherichia coli* CECT 729 y el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

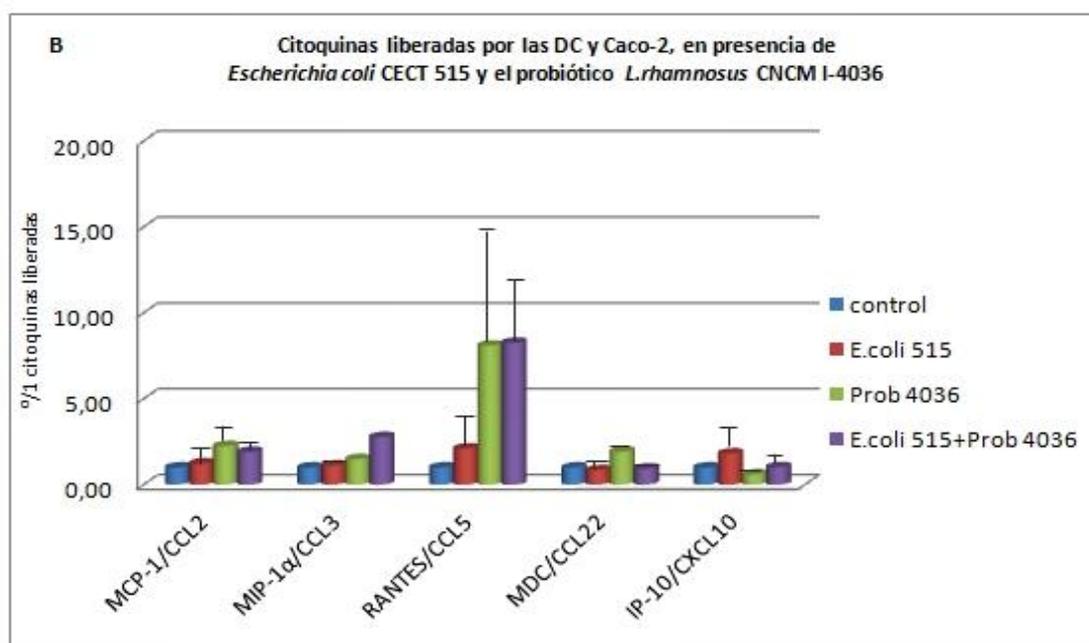
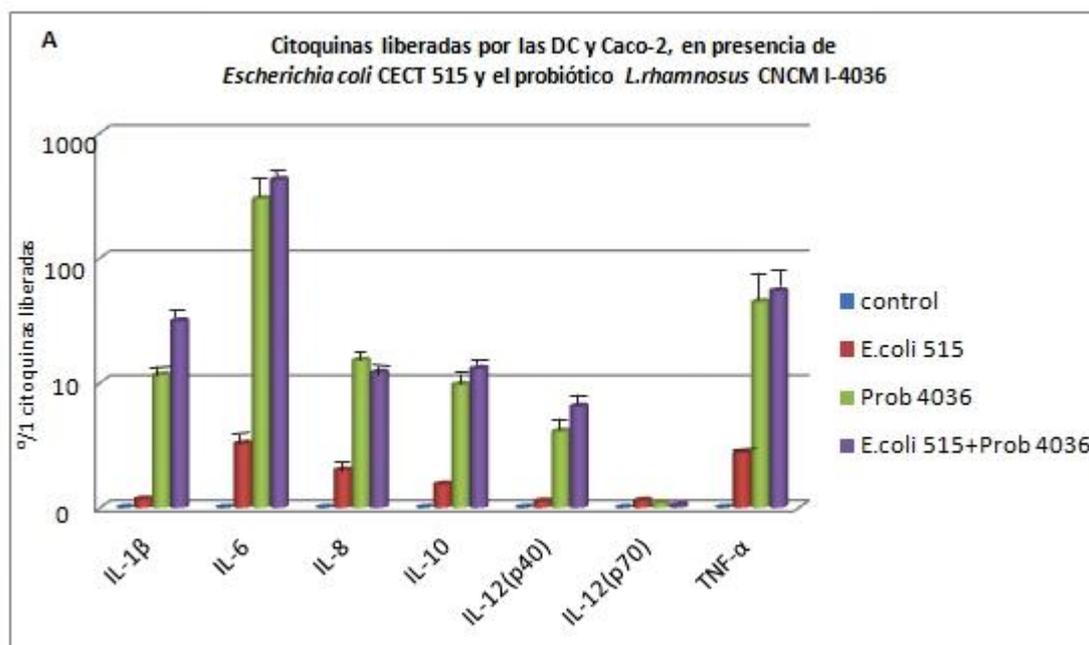


Figura 40. Valores de la liberación de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α (A), así como de las quimioquinas MCP-1 (CCL2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10 (B), normalizados frente al control (en tanto por uno), de las células dendríticas (DC) y células Caco-2, estimuladas 4 horas con *Escherichia coli* CECT 515 y el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

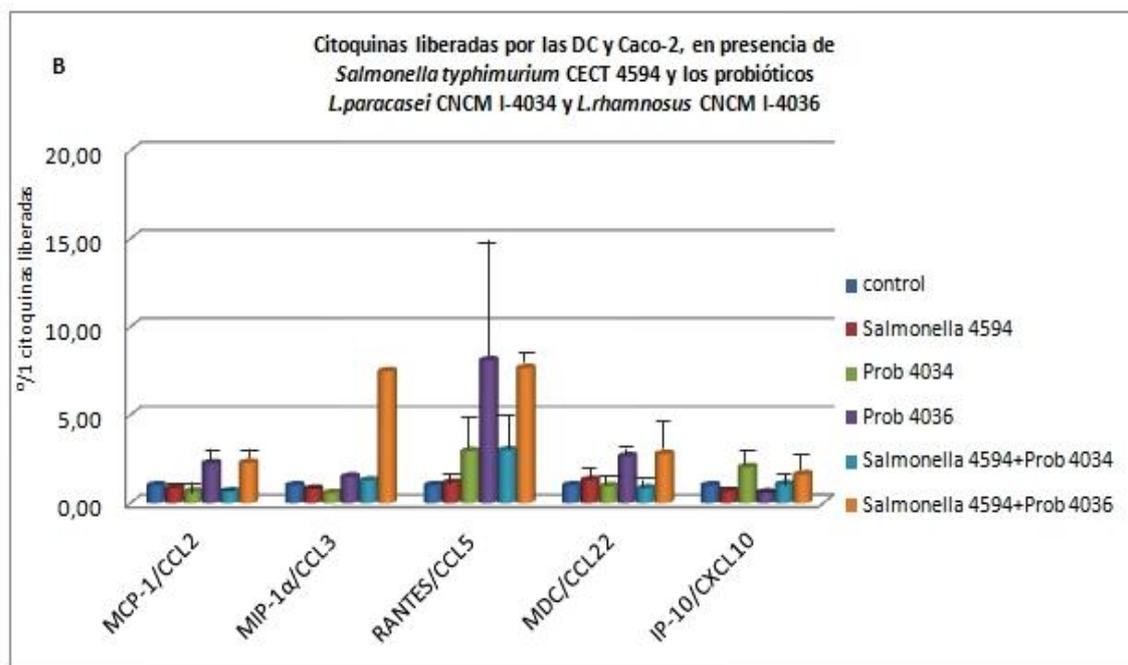
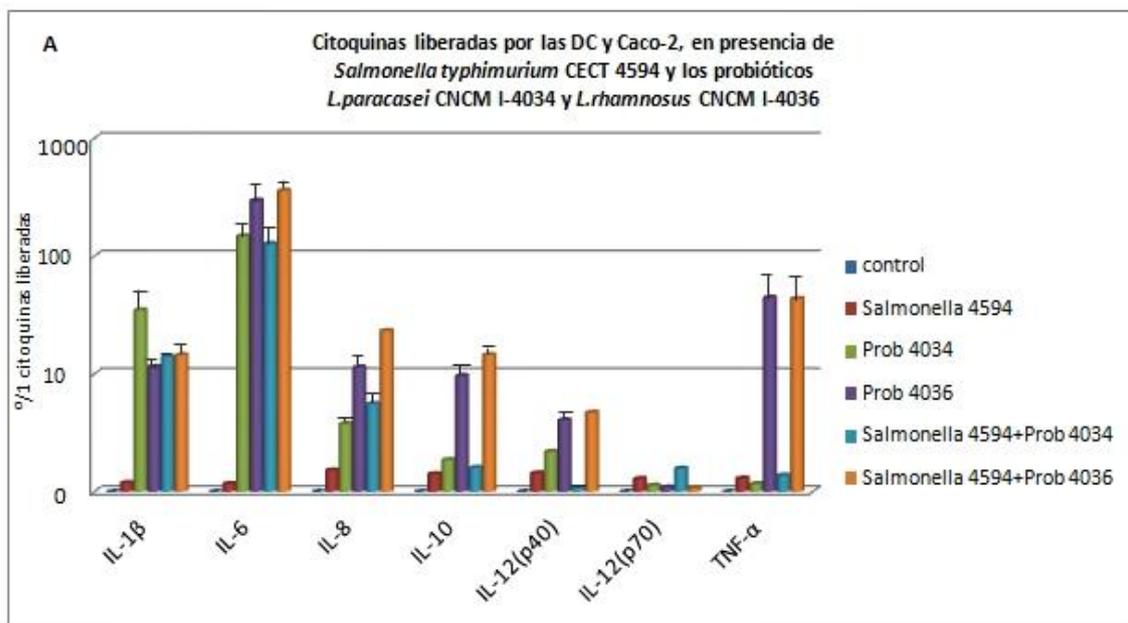


Figura 41. Valores de la liberación de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α (A), así como de las quimioquinas MCP-1 (CCL-2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10 (B), normalizados frente al control (en tanto por uno), de las células dendríticas (DC) y células Caco-2, estimuladas 4 horas con *Salmonella typhimurium* CECT 4594 y los probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

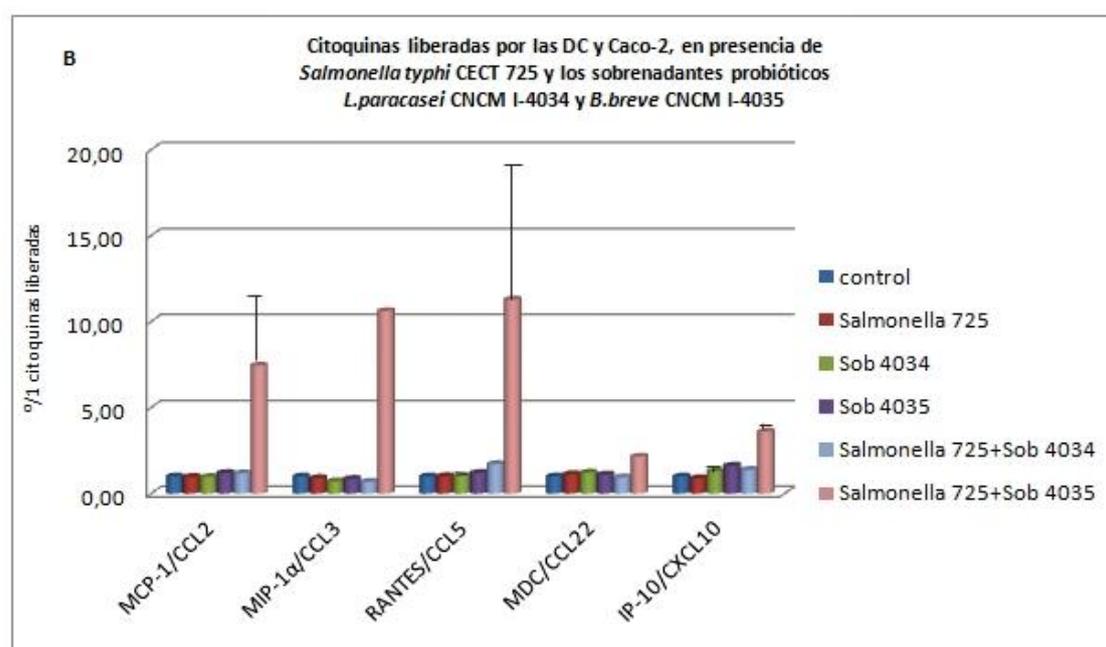
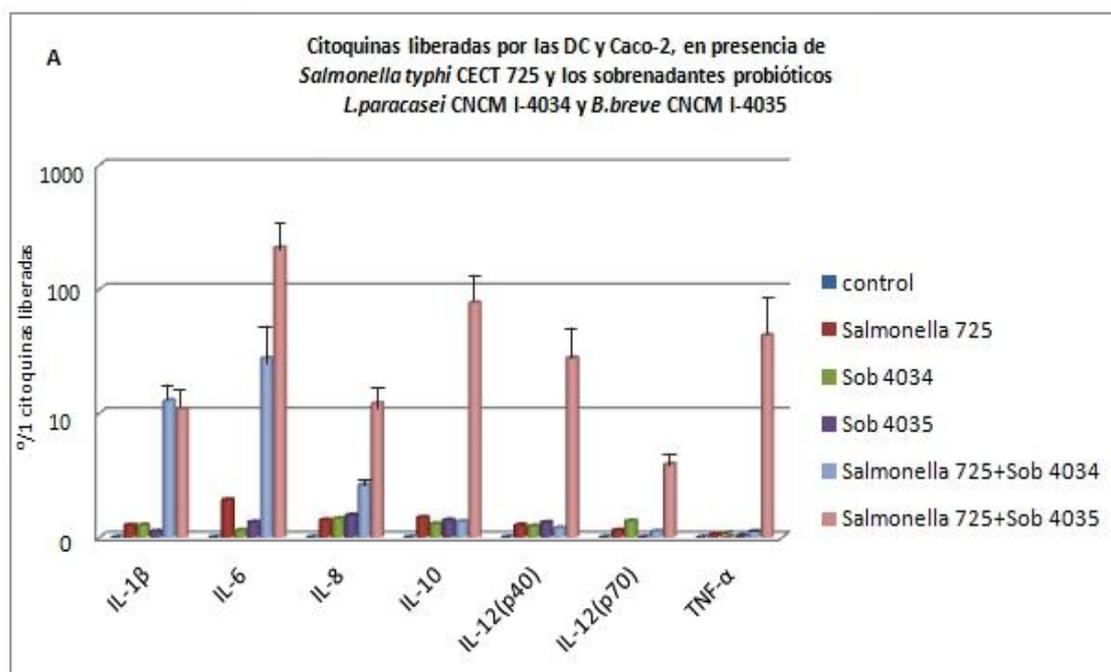


Figura 42. Valores de la liberación de citoquinas IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF- α (A), así como de las quimioquinas MCP-1 (CCL-2), MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10 (B), normalizados frente al control (en tanto por uno), de las células dendríticas (DC) y células Caco-2, estimuladas 4 horas con *Salmonella typhi* CECT 725 y los sobrenadantes de las bacterias *L.paracasei* CNCM I-4034 y *B.breve* CNCM I-4035.

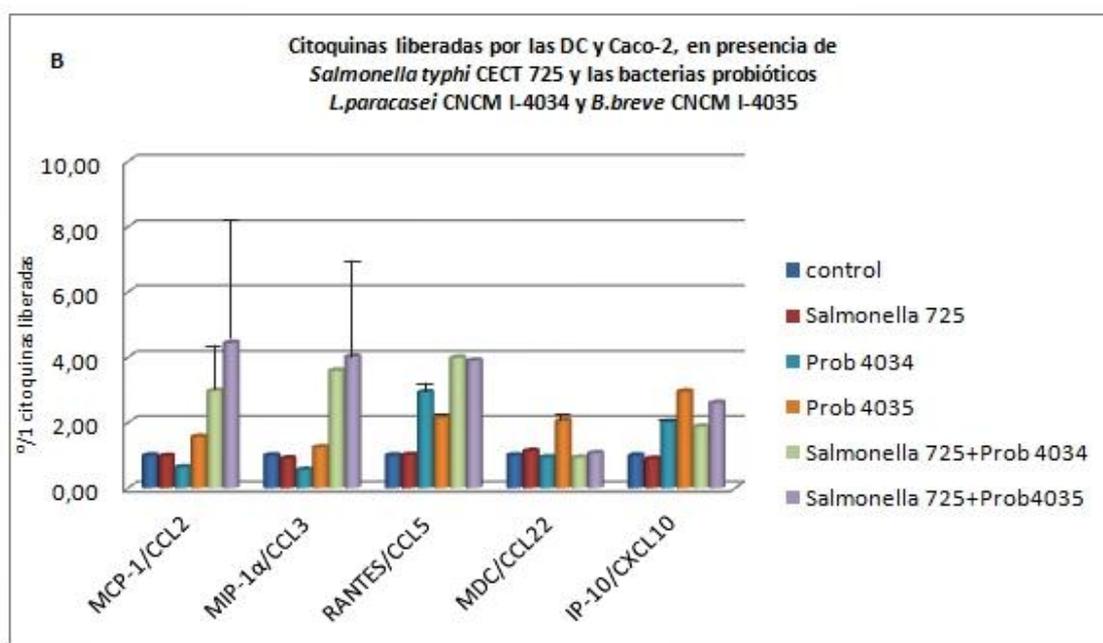
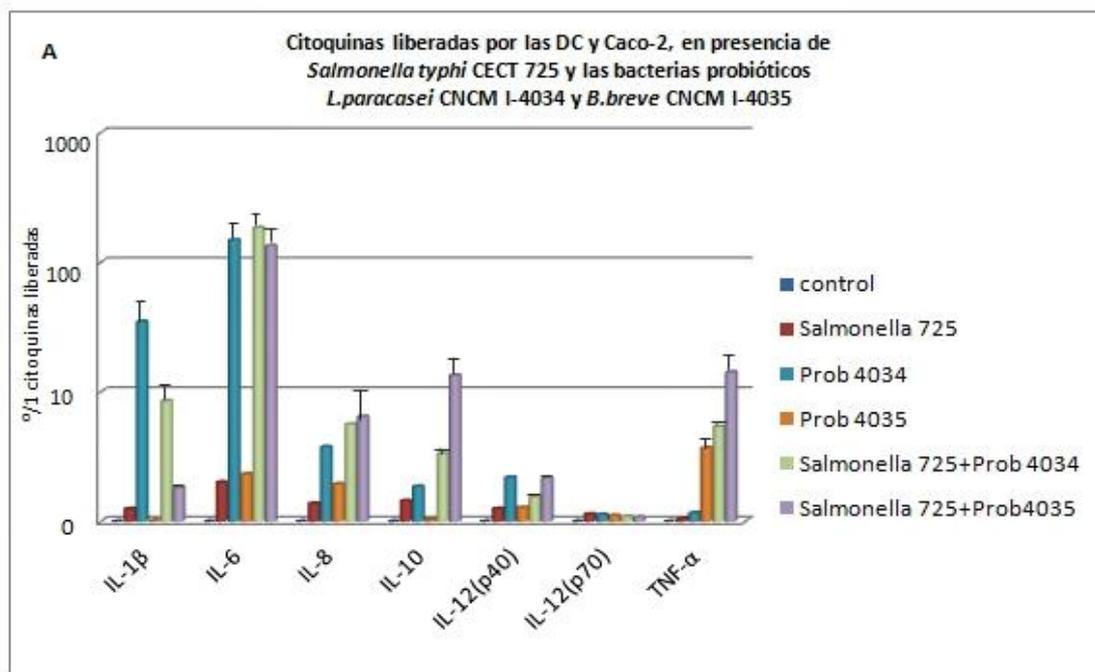


Figura 43. Valores de la liberación de citoquinas IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF-α (A), así como de las quimioquinas MCP-1 (CCL-2), MIP-1α (CCL3), RANTES (CCL5), MDC (CCL22) e IP-10 (B), normalizados frente al control (en tanto por uno), de las células dendríticas (DC) y células Caco-2, estimuladas 4 horas con *Salmonella typhi* CECT 725 y los sobrenadantes de las bacterias *L.paracasei* CNCM I-4034 y *B.breve* CNCM I-4035.

Estudio de la viabilidad celular

La viabilidad de las células dendríticas se mantiene en presencia de los probióticos o sus sobrenadantes

El método MTT permite evaluar la viabilidad celular mediante la metabolización de un compuesto cuyo producto resultante es medible colorimétricamente. El ensayo se realiza tras cuatro horas de incubación de las células dendríticas co-cultivadas en transwell en presencia de los tres probióticos de estudio: *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036. Se seleccionó este tiempo porque todos los experimentos tienen cuatro horas de incubación con los distintos tratamientos.

Los resultados de viabilidad se expresan como porcentaje de densidad óptica a 570 nm con respecto a los controles (células dendríticas sin tratar) considerando que estos últimos poseen un 100% de viabilidad.

Como se observa en la figura 44, la presencia en el medio de los probióticos no pone en peligro la viabilidad celular, que se mantiene cercana al 80% en la mayoría de los casos, respecto al control.

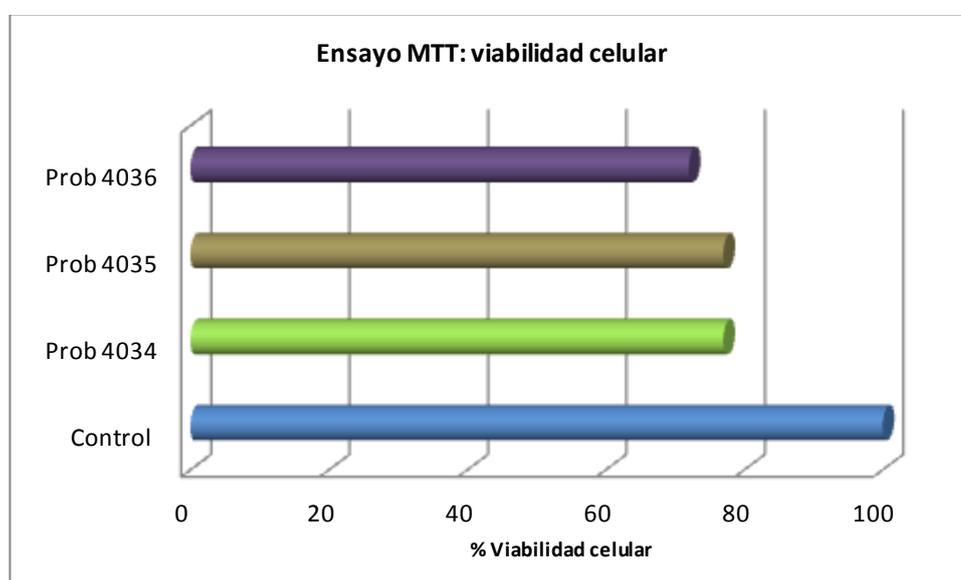


Figura 44. Ensayo de MTT para las células dendríticas co-cultivadas en *transwell* en presencia de *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 o *L.rhamnosus* CNCM I-4036, tras 4 horas de incubación. La viabilidad se representa en porcentaje, respecto al control, siendo las células dendríticas sin tratamiento el 100% de viabilidad.

Expresión génica

La presencia de los probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036, o sus sobrenadantes, en el medio produce una expresión diferencial en las células dendríticas y células caco-2 de los genes implicados en la cascada de señalización de los Toll-like receptors (TLR)

Para investigar la participación de las bacterias probióticas *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036 en la respuesta inmunitaria intestinal se ha estudiado la expresión de distintos genes implicados en la cascada de señalización de los Toll-like receptors (TLR): los receptores *TLR1*, *TLR2*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR5* y *TLR9*; la molécula adaptadora *MYD88*; *IRAK4*, *IRAK1* y *TOLLIP* como moléculas mediadoras de acción intermedia; y genes de acción final como *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1 (MAP3K7)* y *JNK*, *NF- κ B1* y *NF- κ BIA (I κ BA)*, *TBK1* e *IRF3*, y finalmente *TNF- α* e *IL-10*, en co-cultivos de células caco-2.

La expresión génica se cuantificó con el programa *RT2 Profiler PCR Array Data Analysis* versión 3.4, de *SABiosciences*. Aquellos valores que no cumplieran los criterios de eficiencia fueron eliminados, como todos aquellos con un valor $C_t > 35$.

Las figuras 45, 49, 53, 57, 61 y 65 representan el cambio de expresión o *fold change* para cada uno de los genes analizados experimentado por las células dendríticas en presencia de las bacterias probióticas o sus sobrenadantes y enteropatógenos, mientras que las figuras 47, 51, 55, 59, 63 y 67 detectan el cambio de expresión en células caco-2. El nombre de cada gen se representa en el eje X. Asimismo, se muestra un dendrograma y un gráfico en el que los valores de las variables son representados por colores o *heat map* para cada tratamiento utilizado, con objeto de conocer el grado de ordenación u homología de los resultados obtenidos para los diferentes enteropatógenos, los probióticos y sus sobrenadantes, realizados con el programa *NCSS 2007* (figuras 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66 y 68).

La exposición del sistema *transwell* a enterobacterias produjo una expresión diferencial en los dos tipos celulares. Mientras en las células dendríticas aumentó extraordinariamente la expresión de *TLR9* (figuras 49A, 53A, 57A, 61A y 65A), al igual que ocurría en el experimento 1 (figuras 27A-35A), en las células caco-2 se inhibió la expresión de este gen (figuras 51A, 55A, 59A, 63A y 67A). De hecho, es interesante destacar que en las células caco-2 se reprimió la expresión de todos los TLR en presencia de los patógenos, a excepción de *E.coli* CECT 515, en el que la expresión de los *TLR4*, *TLR3*, *TLR2* y *TLR1* fue muy alta (figura 59A) y *E.coli* CECT 729 que conservó la expresión de *TLR4* (figura 55A). De igual forma, las células caco-2 regularon a

la baja la expresión del gen *TOLLIP*, mientras que aumentaron la expresión de *CASP8* y *MYD88*, en presencia de las enterobacterias estudiadas (figuras 51, 55, 59, 63, 67: B-C). Por su parte, las células dendríticas presentaron una expresión leve/moderada de estos genes. Un efecto similar se observó analizando la expresión del gen *IL-10*, ya que mientras en las células dendríticas su expresión estaba fuertemente activada (figuras 49F, 53F, 57F, 61F y 65F), las células caco-2 manifestaron una notable represión de este gen (figuras 51F, 55F, 63F y 69F), a excepción de *E.coli* CECT 515 (figura 59F).

Cuando se estimularon las células dendríticas y caco-2 exclusivamente con los sobrenadantes probióticos la expresión diferencial continuó siendo patente. En las células dendríticas, se observó un aumento muy marcado de la expresión de *TLR9*, mientras que en las células caco-2 la expresión de este gen fue inhibida (figura 45A y 47A). Los genes *TOLLIP* y *TNF- α* originaron patrones similares de expresión en ambos tipos celulares (figuras 45B, 45F, 47B y 47F), regulados a la baja, a excepción del sobrenadante *L.rhamnosus* CNCM I-4036 que aumentó la expresión de *TOLLIP* en células dendríticas (figura 45B), pero no así en células caco-2 (figura 47B).

A la vista de los resultados, los sobrenadantes *L.paracasei* CNCM I-4034 y *B.breve* CNCM I-4035 ejercieron un efecto similar en la regulación de los genes de la cascada de los TLR (figuras 45 y 47). Así, por ejemplo, ambos inhibieron los genes *IRAK4*, *IRAK1*, *TBK1* e *IL-10* en células dendríticas y caco-2, así como manifestaron una expresión diferencial para los genes *MYD88*, *CASP8* y *TAK1*, reprimiendo su expresión en células dendríticas y regulados al alza en células caco-2. Por otro lado, si se comparan con el sobrenadante de *L.rhamnosus* CNCM I-4036, éste mostró la mayor capacidad en términos de niveles de expresión génica, siendo notablemente superior al considerar la magnitud del cambio. Además, con este sobrenadante se detectó un patrón de expresión claramente distinto para los genes *IRAK4*, *IRAK1* e *IL-10*, sobreexpresados en células dendríticas y reprimidos en las células caco-2. Esta dualidad en la expresión génica se observó claramente al analizar los dendrogramas: mientras que en las células caco-2 los tres sobrenadantes se agruparon dentro del mismo grupo (existiendo un subgrupo formado por los sobrenadantes *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036), en las células dendríticas el sobrenadante de *L.rhamnosus* constituyó un grupo único, y los sobrenadantes de *L.paracasei* y *B.breve* pertenecieron al mismo subgrupo (figuras 46 y 48).

La exposición del co-cultivo de células dendríticas y caco-2 a los probióticos o sus sobrenadantes en presencia de *E.coli* desencadenó una desmesurada expresión de *TLR9* a nivel de células dendríticas y su inhibición en las células caco-2 (figuras 49A, 51A, 53A, 55A, 57A y

59A). En presencia de *Salmonella* la sobreexpresión de *TLR9* fue patente en ambos tipos celulares, pero la magnitud del cambio fue mayor en las células dendríticas (figuras 61A, 63A, 65A y 67A).

Si se analiza cada tratamiento, se observó que tanto la exposición a *E.coli* CECT 729 como *E.coli* CECT 515 en presencia del probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036 originaron patrones similares de expresión génica, en ambos tipos celulares (figuras 53, 55, 57 y 59), resultados que no extrañan a tenor de lo observado en el experimento 1, descrito anteriormente. Así, por ejemplo, indujeron la sobreexpresión de los genes *MYD88*, *CASP8* e *IL-10* en células dendríticas, mientras que en las células caco-2 la expresión de estos genes fue moderada (figuras 53, 55, 57, 59: B, C y F). Para los genes *TAK1*, *TBK1* e *IRF3* la expresión en células dendríticas fue escasa, estando reprimidos en las células caco-2 (figuras 53, 55, 57, 59: D-E). Para el *TNF- α* ocurre la situación contraria, es decir, su expresión se reguló al alza en las células caco-2, mientras que fue nula o permaneció ligeramente inhibida en las células dendríticas (figuras 53F, 55F, 57F y 59F). En este caso, sí se observaron diferencias si se atiende a los dendrogramas, ya que para *E.coli* CECT 729 uno de los grupos estaría constituido por el probiótico *L.rhamnosus*, en la línea de lo observado en el experimento 1; mientras que para *E.coli* CECT 515 el grupo único es el patógeno (figuras 54, 56, 58 y 60).

Por otra parte, la incubación de las células dendríticas y caco-2, con el probiótico *L.rhamnosus* pero en presencia de *Salmonella typhimurium* CECT 4594, aunque hay ciertas semejanzas los patrones de expresión fueron claramente diferentes a los anteriores (figuras 61 y 63). Así, los genes *MYD88* y *CASP8* mostraron una expresión diferencial, ya que fueron inhibidos en las células dendríticas, y sobreexpresados en las células caco-2 (figuras 61B, 61C, 63B y 63C). El gen *IL-10* se expresó en ambos tipos celulares, pero la intensidad fue contraria a lo observado cuando se incubaba con la bacteria *E.coli*, ya que en este caso la mayor expresión se originó en las células caco-2 (figura 63F). De forma similar, el gen *TNF- α* se halló fuertemente expresado en las células caco-2 y ligeramente inhibido en las células dendríticas (figuras 61F y 63F). Por otra lado, si se analiza la actividad del probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036 respecto a su sobrenadante resulta interesante que, en presencia del patógeno *E.coli* CECT 742 (figura 49 y 51), el patrón de expresión fue muy similar al observado con *E.coli* 515 y 729 (figuras 53, 55, 57 y 59), aunque la magnitud del cambio fue notablemente superior cuando se utilizó el sobrenadante probiótico. Asimismo, la comparación de los genes regulados por este probiótico en presencia de los patógenos puso de manifiesto que el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036 condujo a la expresión de un mayor número de genes en presencia de *E.coli* que de *Salmonella*.

La estimulación de las células dendríticas y caco-2 con el probiótico *L.paracasei* CNCM I-4034 y el género *Salmonella* se caracterizó por la sobreexpresión de *TLR9*, así como de *TLR2* y *TLR4* en menor medida en células dendríticas y la expresión moderada de *TLR4*, *TLR3* y *TLR1* en células caco-2 (figuras 61A, 63A, 65A y 67A). Los patrones de expresión producidos por *Salmonella typhi* CECT 725 y *S. typhimurium* CECT 4594 fueron muy similares en presencia del probiótico *L.paracasei* CNCM I-4034 (figuras 61, 63, 65 y 67). Así, ambos tratamientos indujeron un aumento de la expresión de todos los genes estudiados en las células dendríticas. De igual forma, en las células caco-2 la mayoría de los genes se hallaron sobreexpresados, aunque no con la misma intensidad que en el otro tipo celular, a excepción de los genes *TOLLIP*, *IRAK4* y *TBK1*, que fueron inhibidos. En presencia del patógeno *Salmonella typhimurium* CECT 4594 los genes *JNK*, *NFκB1* e *NFκBIA* también se encontraron reprimidos (figuras 63D y 63E). Los dendrogramas de ambos patógenos confirmaron estos resultados, ya que la asociación de este probiótico con *Salmonella typhi* o *typhimurium*, fue elevada (figuras 62, 64, 66 y 68).

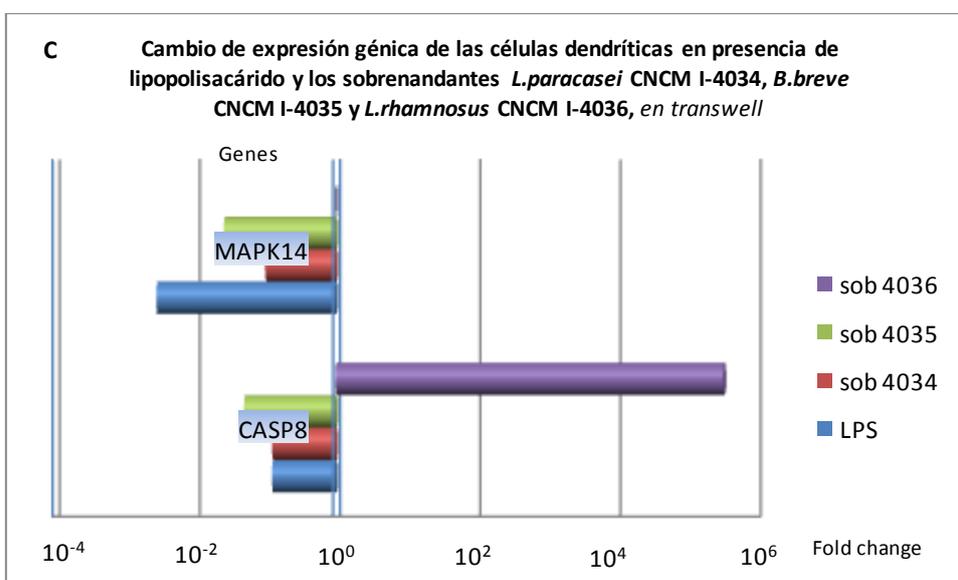
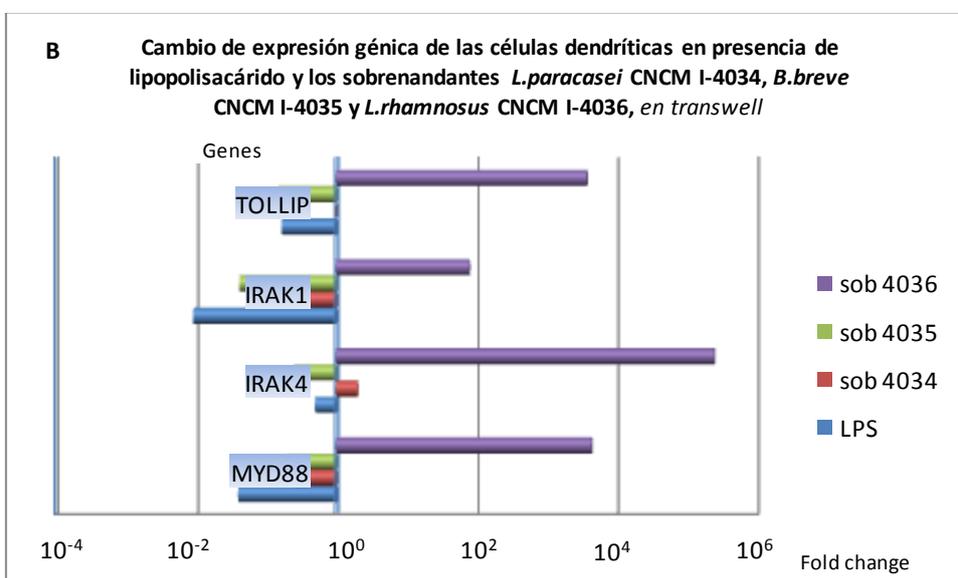
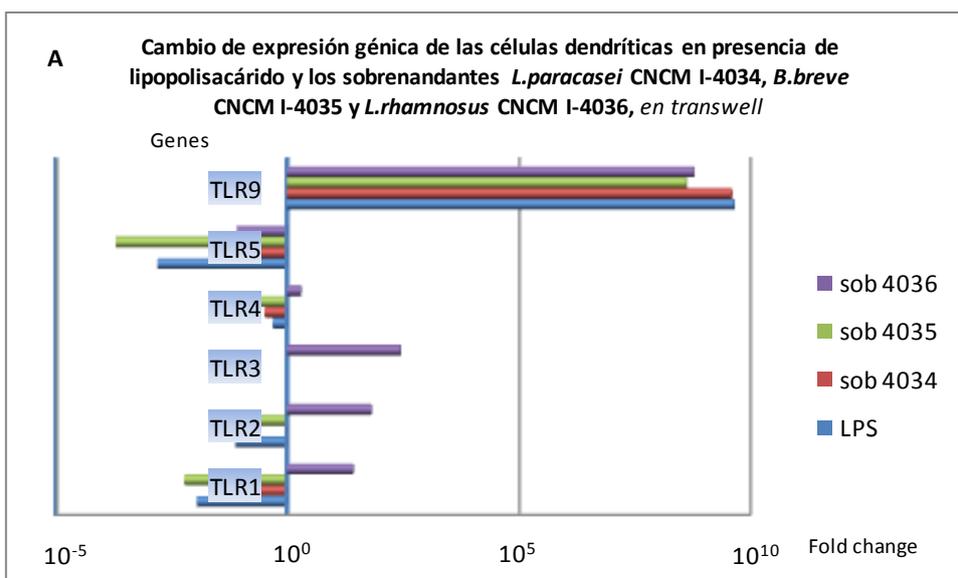
Si se comparan estos resultados con los obtenidos utilizando el sobrenadante de este probiótico, *L.paracasei* CNCM I-4034, en presencia de *Salmonella typhi* CECT 725 se observaron grandes diferencias en la mayoría de genes analizados (figura 65 y 67). Con este tratamiento, a nivel de las células dendríticas se desencadenó la sobreexpresión de *TLR9*, siendo del mismo orden que cuando se utilizó el probiótico, pero además se indujo la expresión de *TLR5*. Al igual que con el probiótico, en las células caco-2, la expresión de ambos TLR fue reprimida, pero se activó la expresión de *TLR4*, *TLR3* y *TLR1*. Asimismo, este tratamiento produjo la inhibición de los genes *IRAK1* y *JNK* en células dendríticas y caco-2. Sin embargo, se detectó una expresión diferencial para los genes *TOLLIP*, *TBK1* y *NFκB1*, reprimidos en las células caco-2 y activos en las células dendríticas. Para los genes *MYD88*, *CASP8*, *TAK1* y *NFκBIA* ocurrió el efecto contrario, ya que se expresaron activamente en las células caco-2 y fueron inhibidos en las células dendríticas. Las diferencias consideradas entre el probiótico *L.paracasei* y su sobrenadante se observaron en el dendrograma, donde este probiótico formó un grupo único (figura 66 y 68).

Por último, la exposición de las células dendríticas y caco-2 con el probiótico *B.breve* CNCM I-4035, en presencia de la bacteria *Salmonella typhi* CECT 725, estuvo acompañada de la sobreexpresión de *TLR9*, y en menor medida *TLR5*, *TLR4* y *TLR2*, en células dendríticas, manteniendo activa la expresión de *TLR3* y *TLR2* en células caco-2 (figura 65A y 67A). El patrón de expresión génica originado por este tratamiento fue muy similar al del probiótico *L.paracasei* CNCM I-4034 en presencia de este mismo enteropatógeno, tanto en las células

dendríticas como en las caco-2, incluso en términos de intensidad del cambio de la expresión génica (figuras 65 y 67). Asimismo, si se compara la expresión de estos genes cuando se utilizó el sobrenadante de *B.breve* CNCM I-4035 el patrón se conservó, a excepción del gen *TNF- α* que con el sobrenadante se encontró ligeramente reprimido (figuras 65F y 67F). Si se observa únicamente la intensidad, al contrario que ocurría en el experimento 1, los probióticos tuvieron una mayor capacidad de inducir un cambio en la expresión génica, hecho que se corroboró si se analizan los dendrogramas (figuras 66 y 68), donde los probióticos o las mezclas con los patógenos presentaron la mayor coloración, lo que da idea de su gran actividad.

Cabe destacar que la comparación de los genes regulados por los distintos probióticos y en presencia de los patógenos puso de manifiesto que la intensidad transcripcional o de la expresión génica fue mayor con el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036 que con los otros dos probióticos de estudio. Además, resulta interesante indicar que la expresión génica de las células caco-2 y células dendríticas mediada por *E.coli* fue mucho mayor que la provocada por *Salmonella*.

Finalmente, es interesante resaltar que, a tenor de los resultados, los tratamientos estimularon de distinta forma a las células dendríticas que a las células caco-2, induciendo por lo general una respuesta más intensa en las primeras.



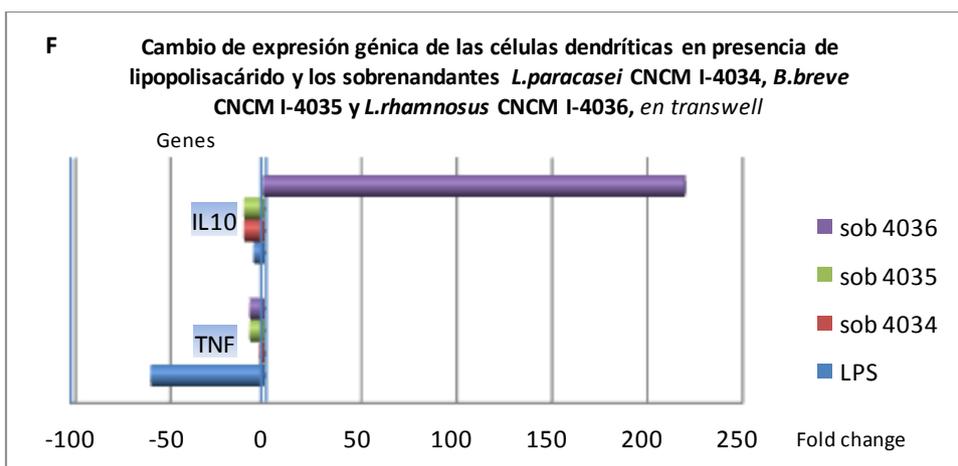
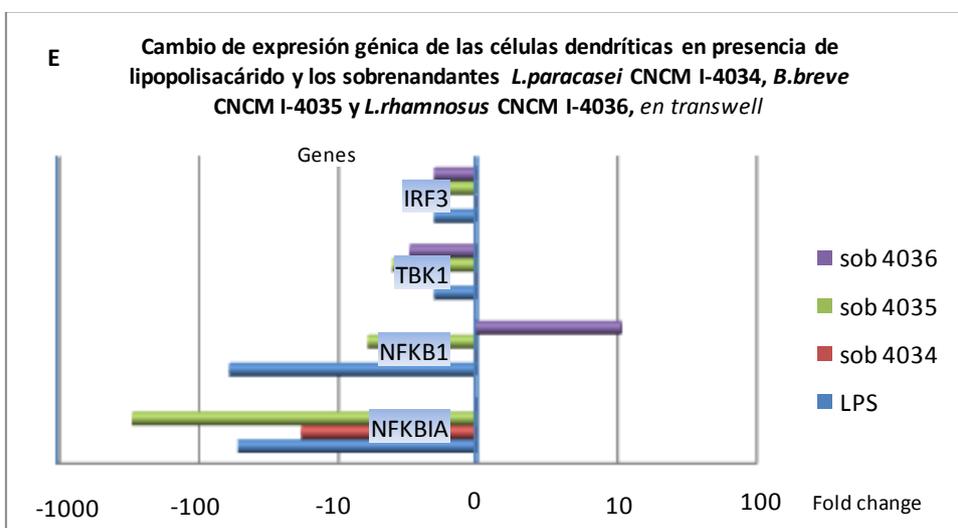
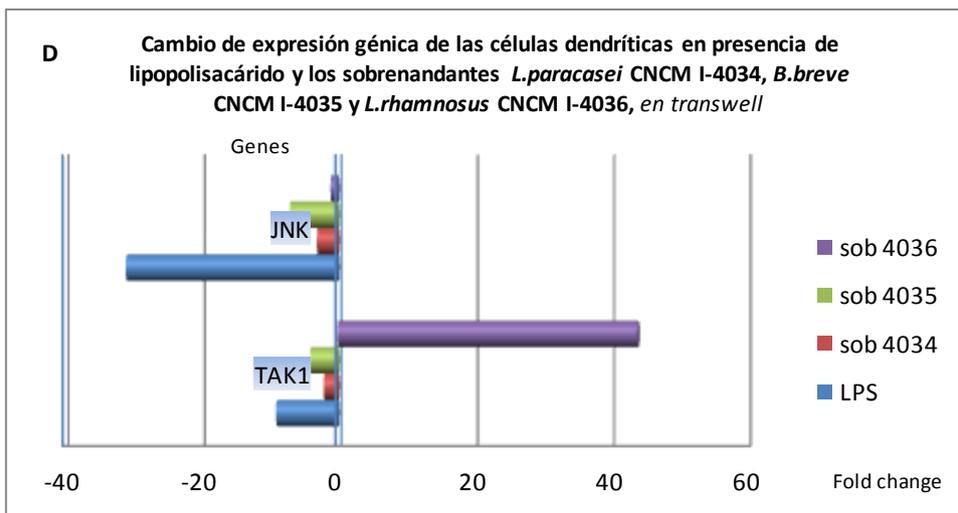


Figura 45. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1* y *TOLLIP* (B); *CASP8* y *MAPK14* (C); *TAK1* y *JNK* (D); *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1* e *NF-κBIA* (E); y *TNF-α* e *IL-10* (F), de las células dendríticas (DC), co-cultivadas en *transwell* con células caco-2, estimuladas 4 h con lipopolisacárido y los sobrenadantes probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

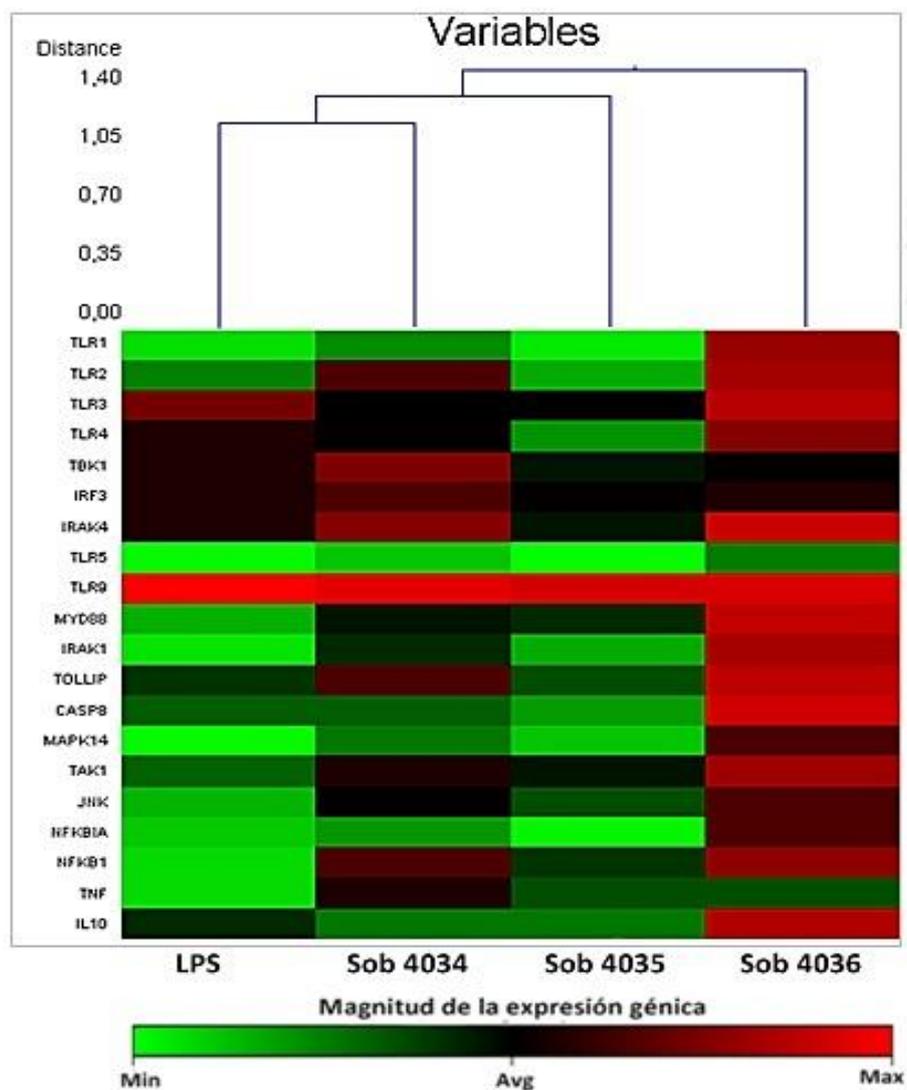
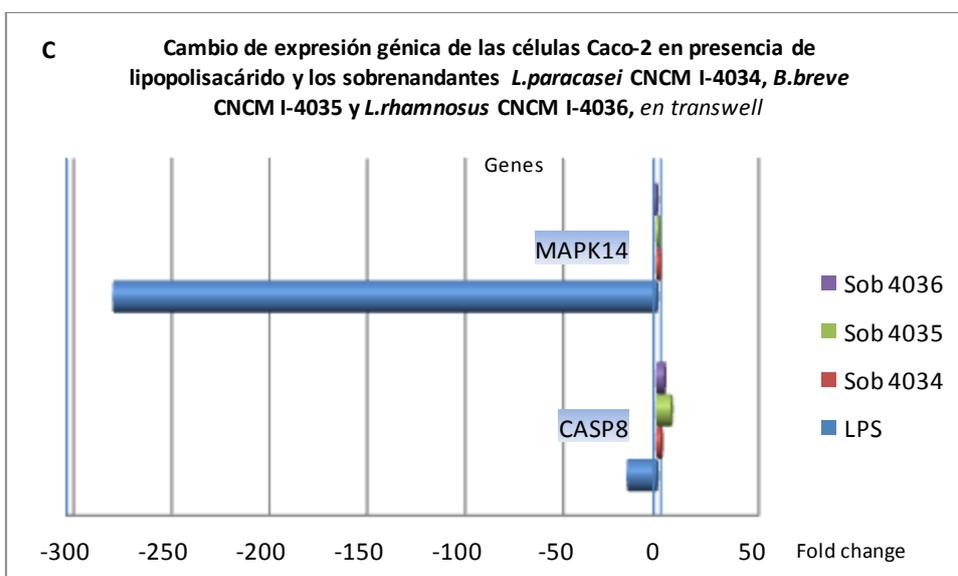
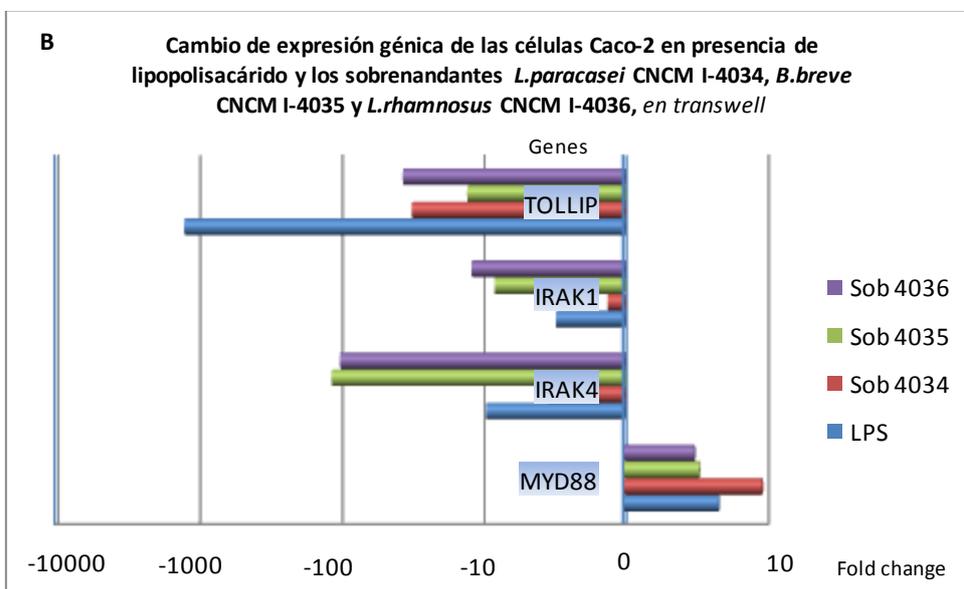
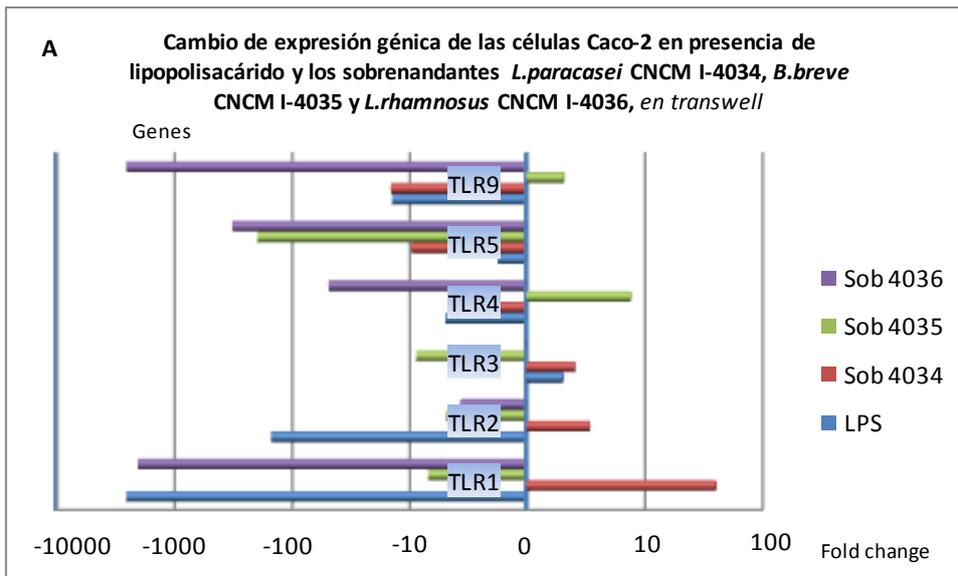


Figura 46. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes Toll-like receptors (*TLR*), *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF- κ B1*, *NF- κ BIA*, *TNF- α* e *IL-10*, de las células dendríticas (DC), co-cultivadas en *transwell* con células caco-2, estimuladas 4 h con lipopolisacárido (LPS) y los sobrenadantes probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036.



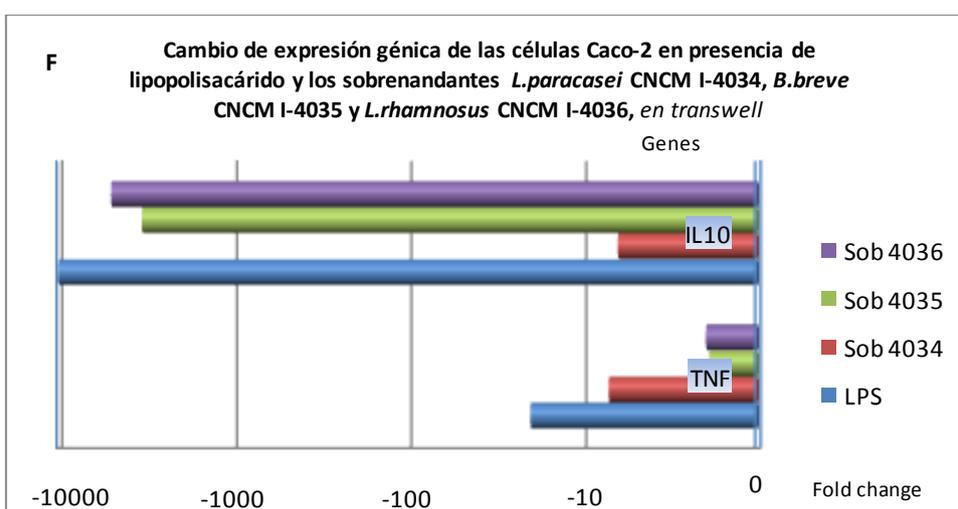
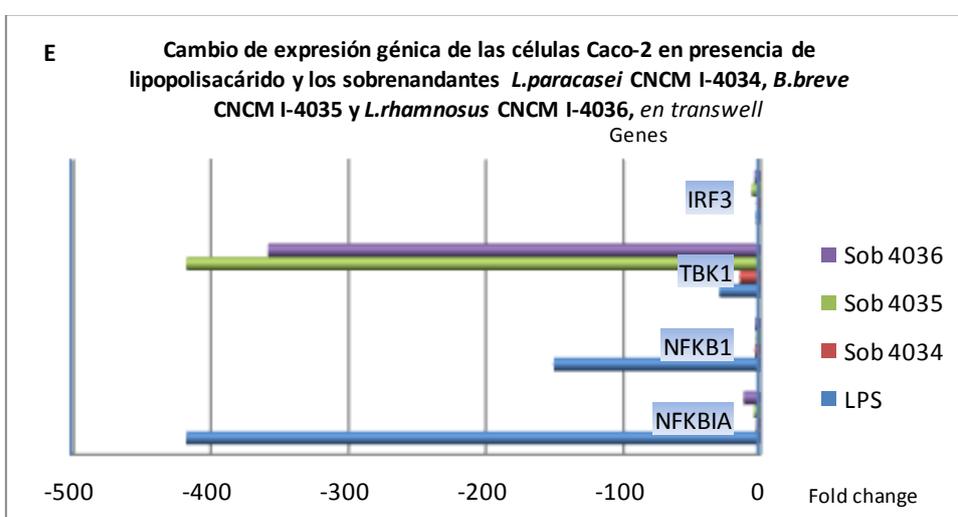
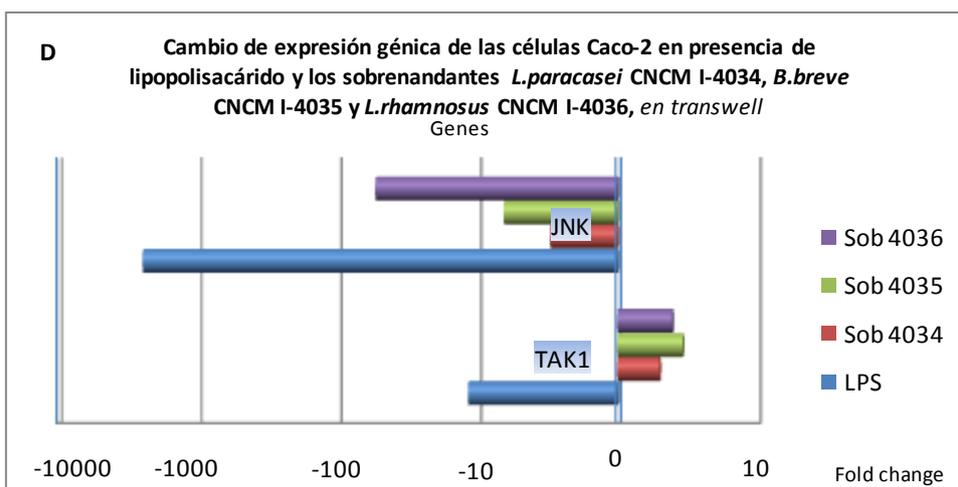


Figura 47. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1* y *TOLLIP* (B); *CASP8* y *MAPK14* (C); *TAK1* y *JNK* (D); *TBK1*, *IRF3*, *NF- κ B1* e *NF- κ BIA* (E); y *TNF- α* e *IL-10* (F), de las células Caco-2, co-cultivadas en *transwell* con las células dendríticas (DC), estimuladas 4 h con lipopolisacárido y los sobrenadantes probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

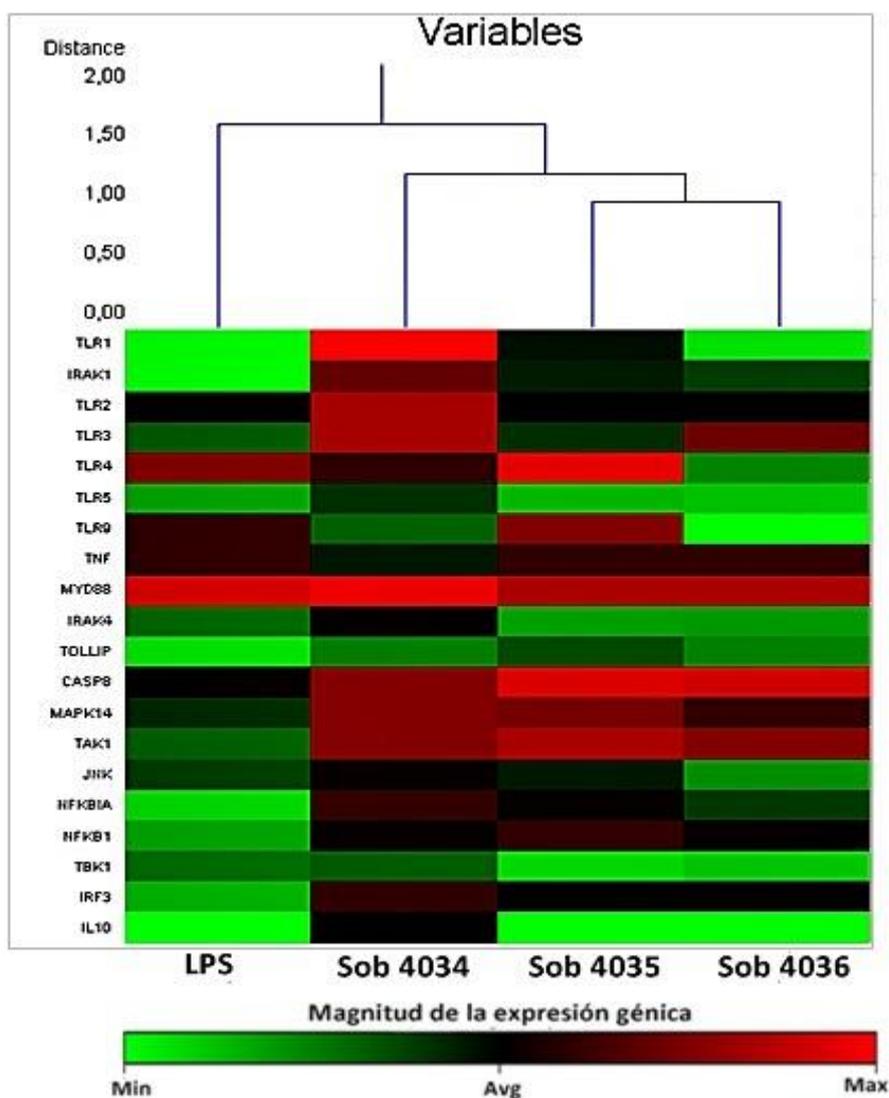
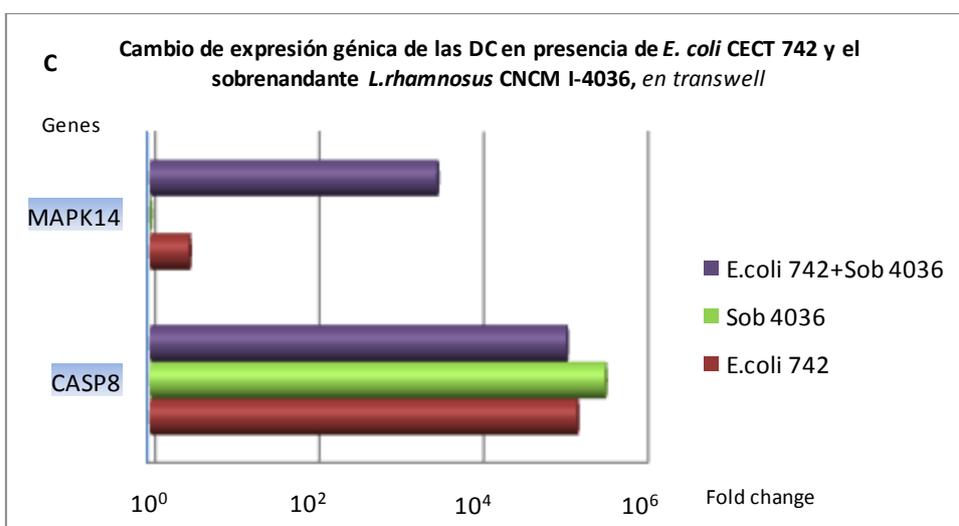
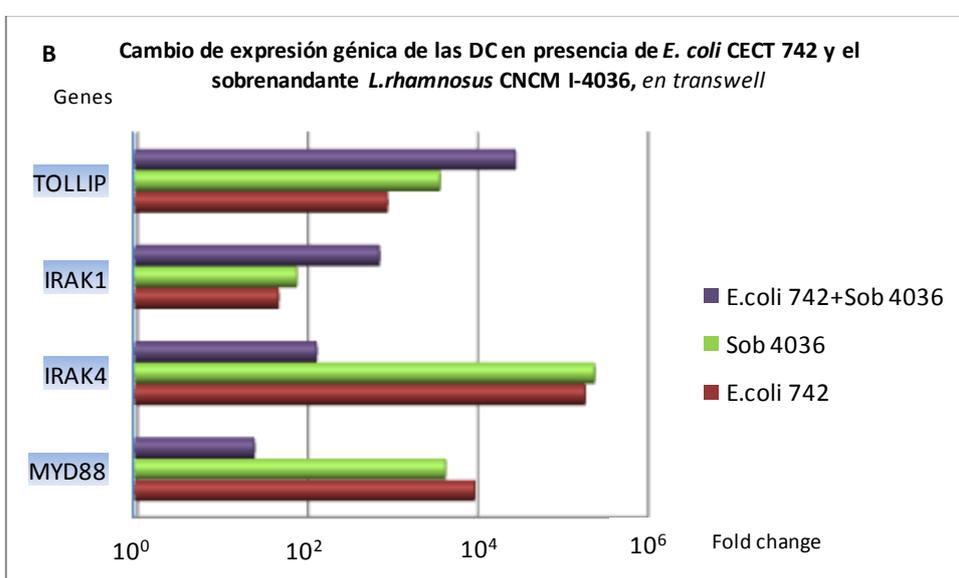
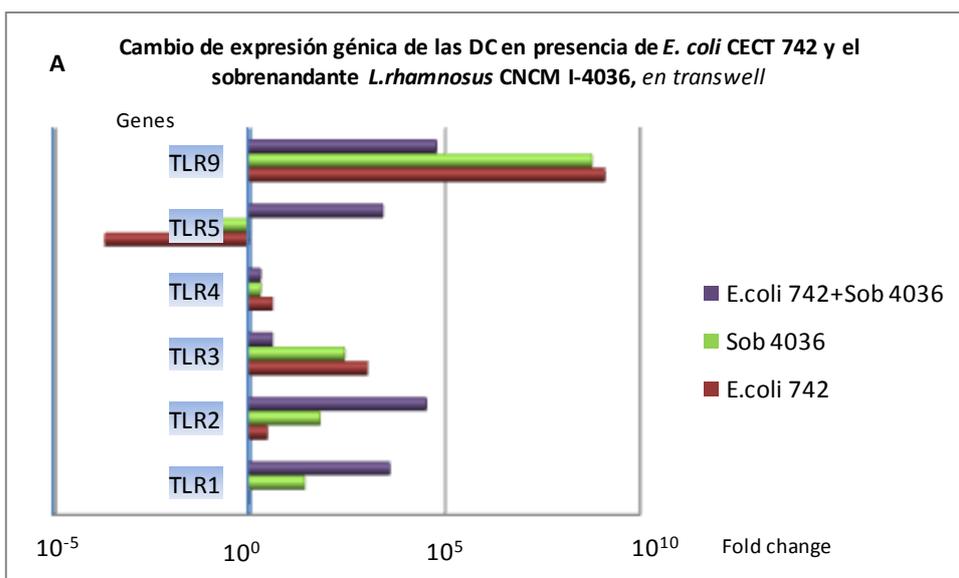


Figura 48. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes Toll-like receptors (*TLR*), *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1*, *NF-κBIA*, *TNF-α* e *IL-10*, de las células Caco-2, co-cultivadas en *transwell* con las células dendríticas (DC), estimuladas 4 h con lipopolisacárido (LPS) y los sobrenadantes probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036.



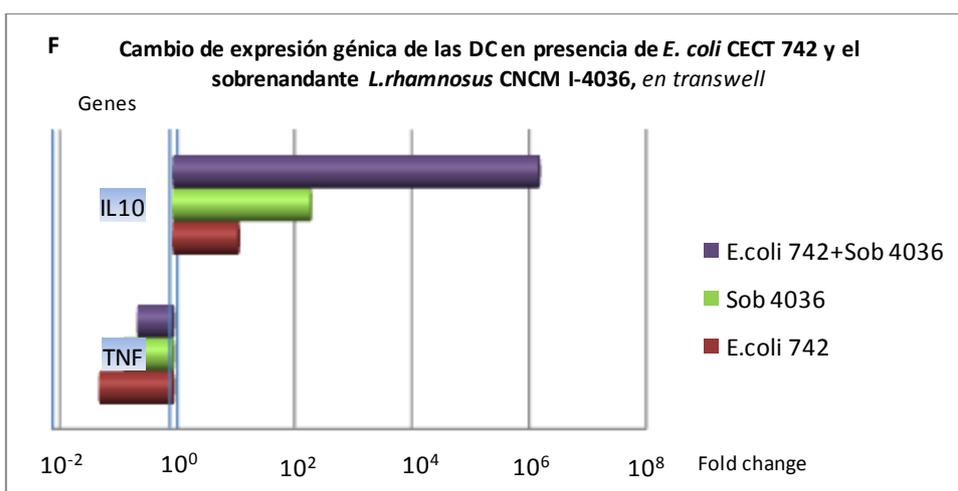
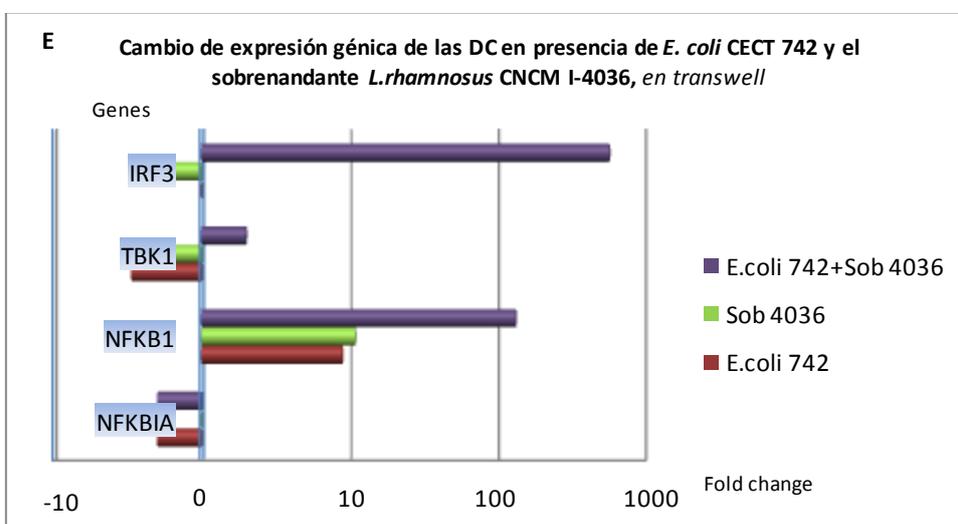
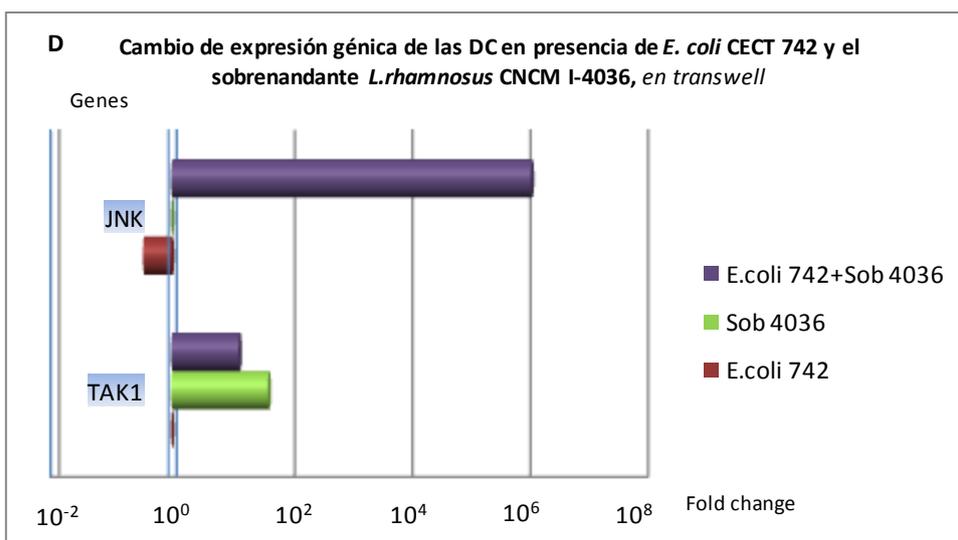


Figura 49. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); MYD88, IRAK4, IRAK1 y TOLLIP (B); CASP8 y MAPK14 (C); TAK1 y JNK (D); TBK1, IRF3, NF- κ B1 e NF- κ BIA (E); y TNF- α e IL-10 (F), de las células dendríticas (DC), co-cultivadas en *transwell* con células caco-2, estimuladas 4 h con *E.coli* CECT 742 y el sobrenadante probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

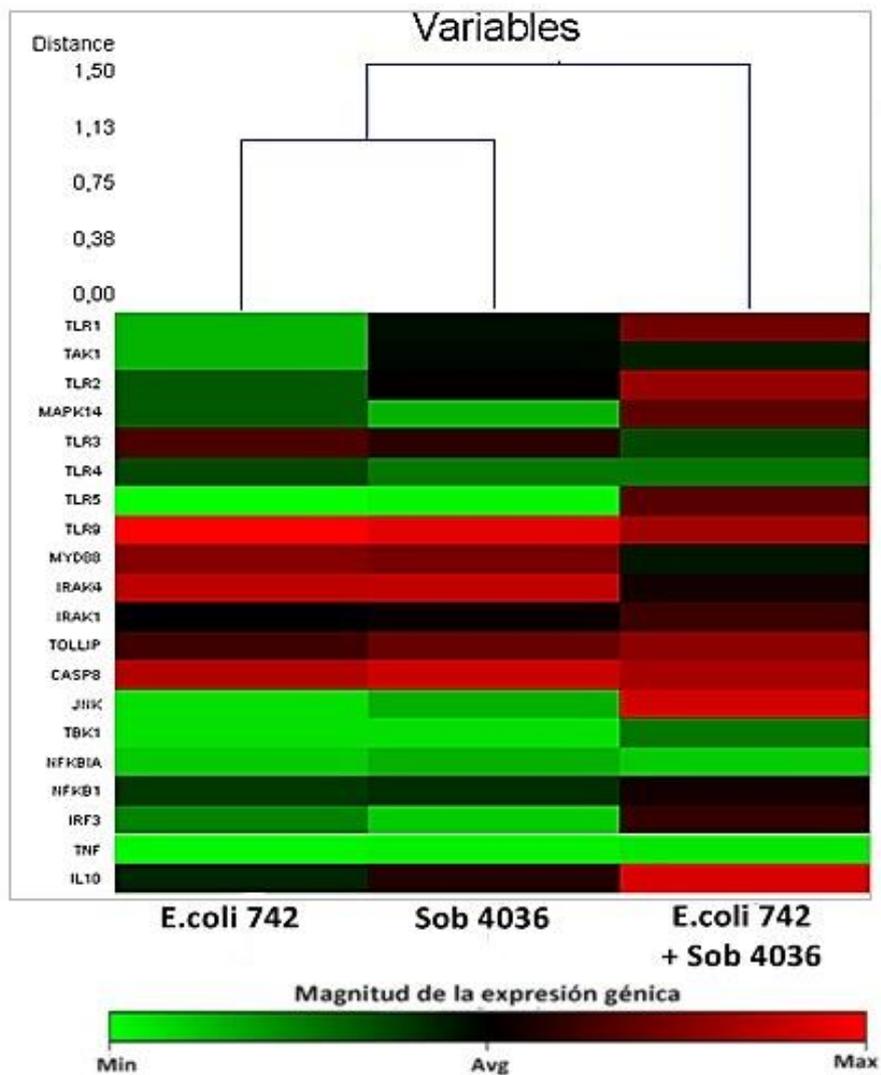
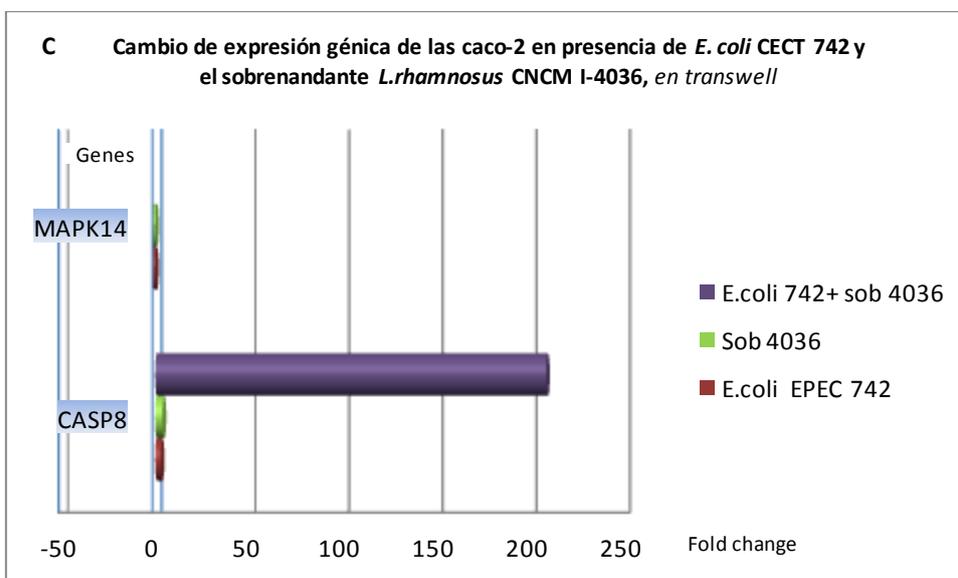
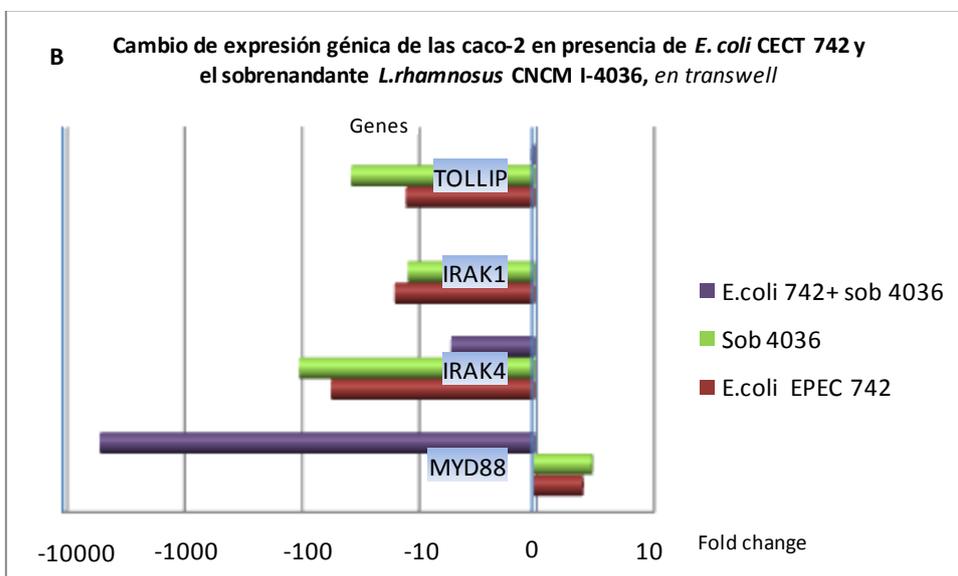
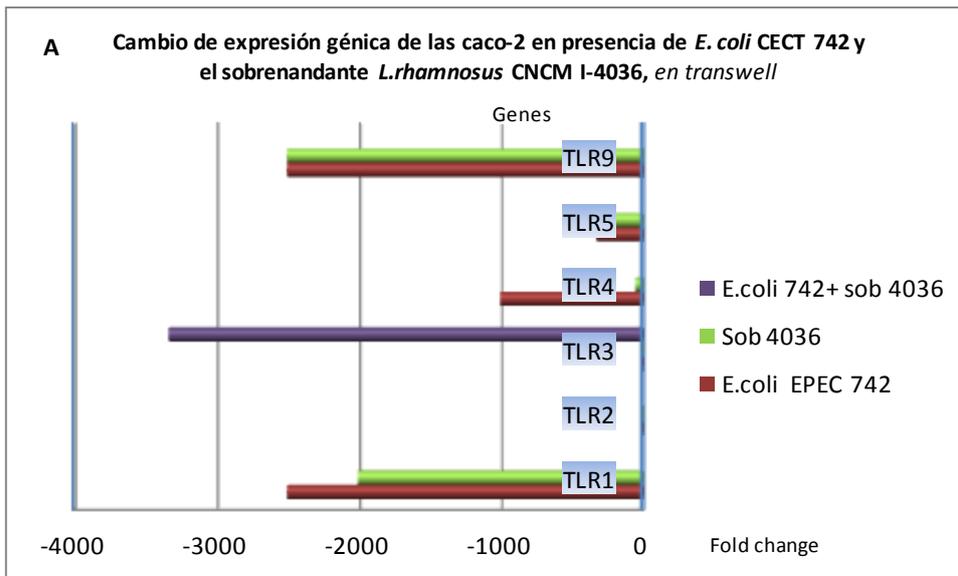


Figura 50. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes *Toll-like receptors (TLR)*, *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF- κ B1*, *NF- κ BIA*, *TNF- α* e *IL-10*, de las células dendríticas (DC), co-cultivadas en *transwell* con células caco-2, estimuladas 4 h con *E.coli* CECT 742 y el sobrenadante probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036.



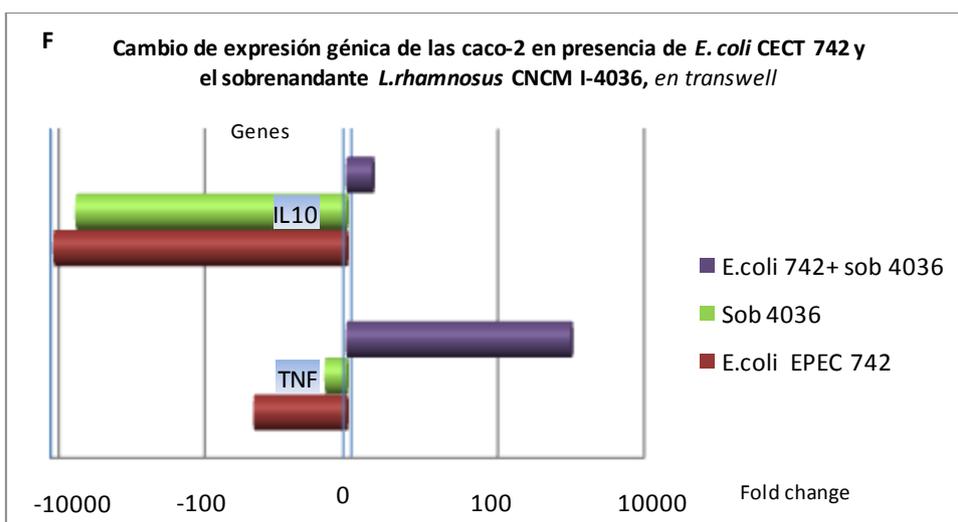
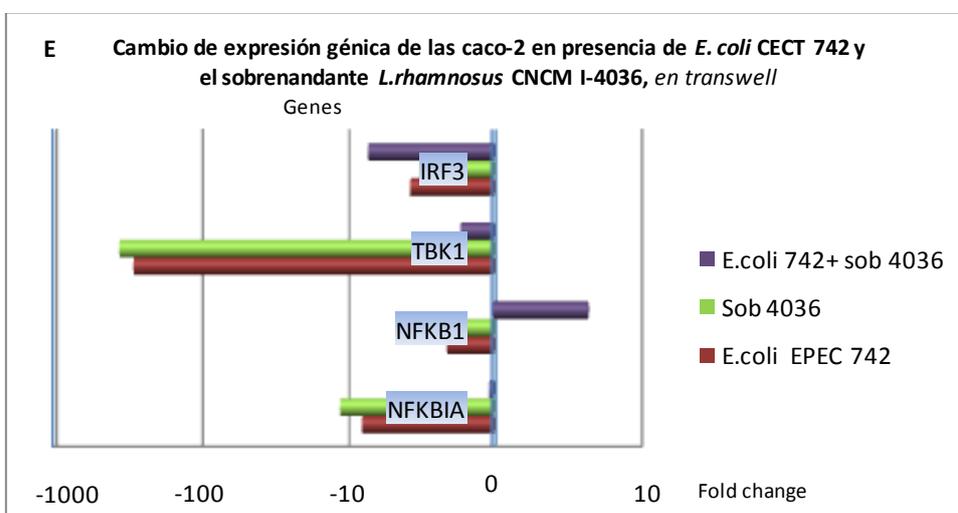
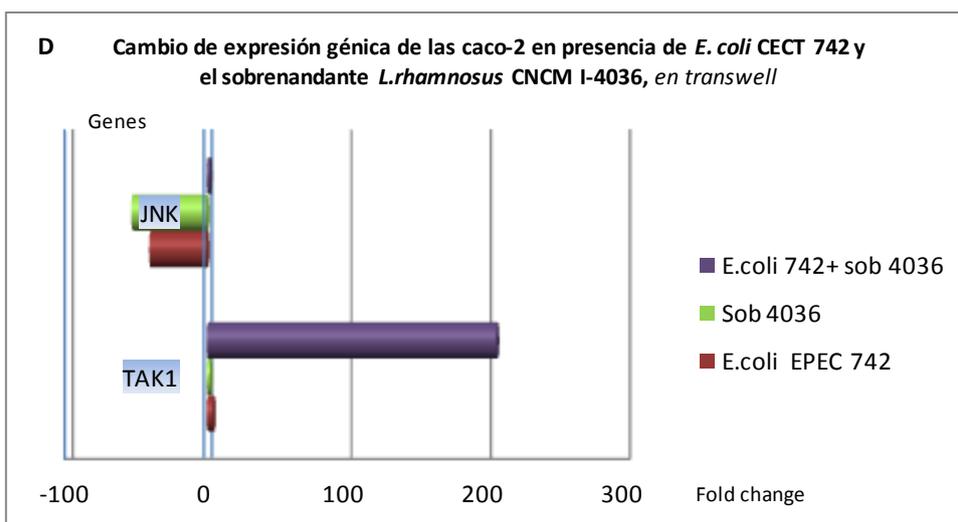


Figura 51. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); MYD88, IRAK4, IRAK1 y TOLLIP (B); CASP8 y MAPK14 (C); TAK1 y JNK (D); TBK1, IRF3, NF- κ B1 e NF- κ BIA (E); y TNF- α e IL-10 (F), de las células caco-2, co-cultivadas en transwell con células dendríticas (DC), estimuladas 4 h con *E.coli* CECT 742 y el sobrenadante probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

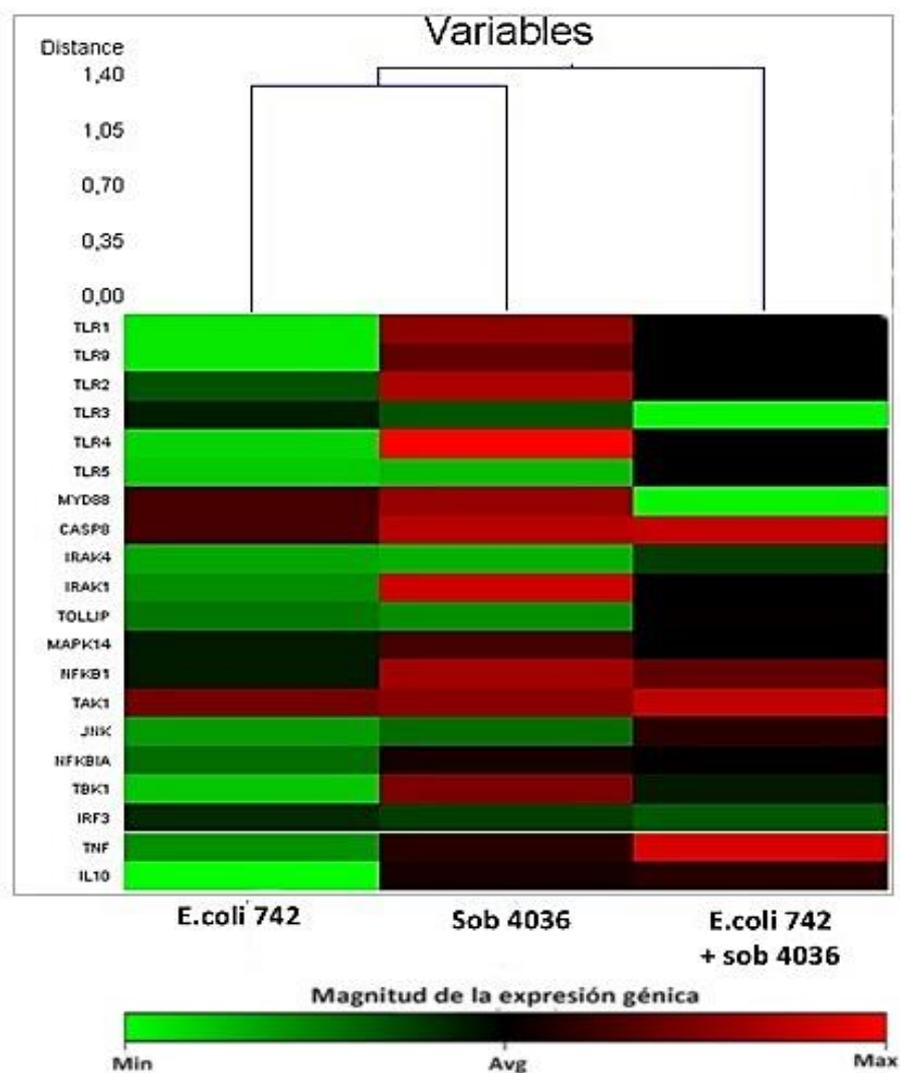
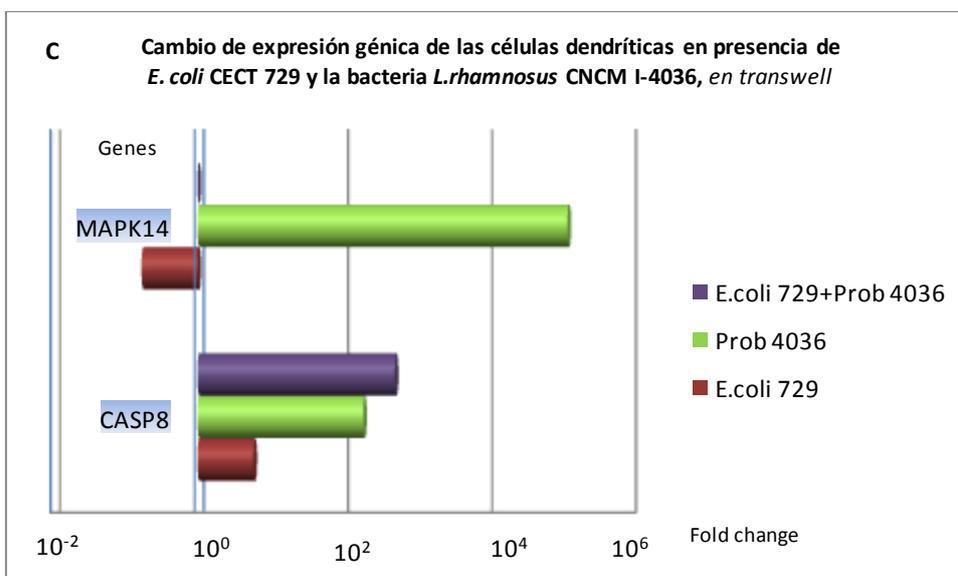
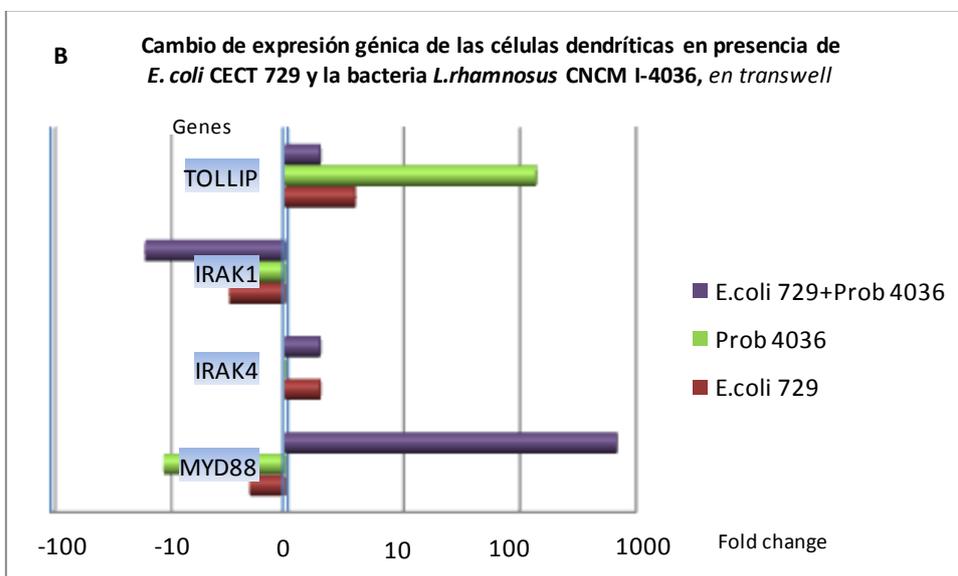
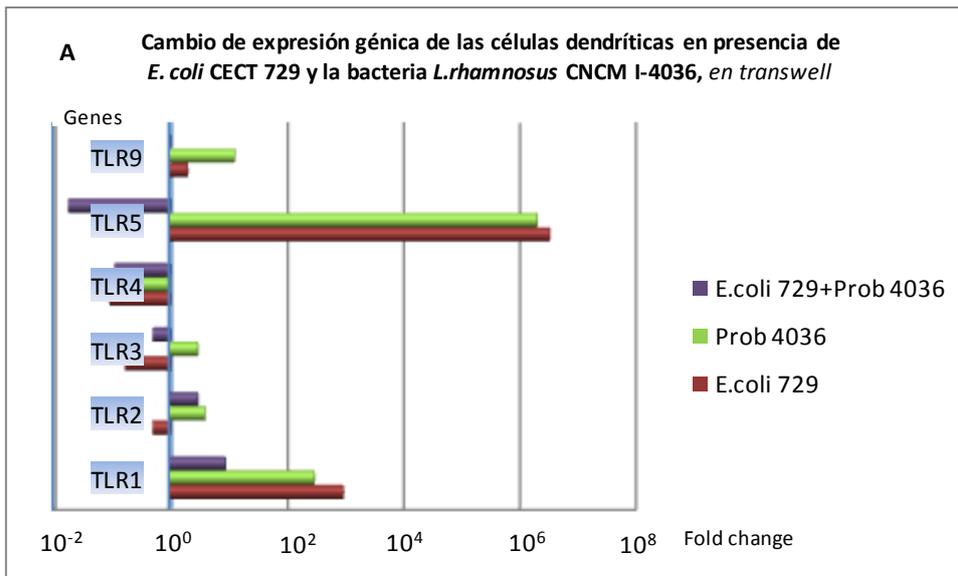


Figura 52. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes *Toll-like receptors (TLR)*, *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1*, *NF-κBIA*, *TNF-α* e *IL-10*, de las células Caco-2, co-cultivadas en *transwell* co-cultivadas en *transwell* con células dendríticas (DC), estimuladas 4 h con *E.coli* CECT 742 y el sobrenadante probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036.



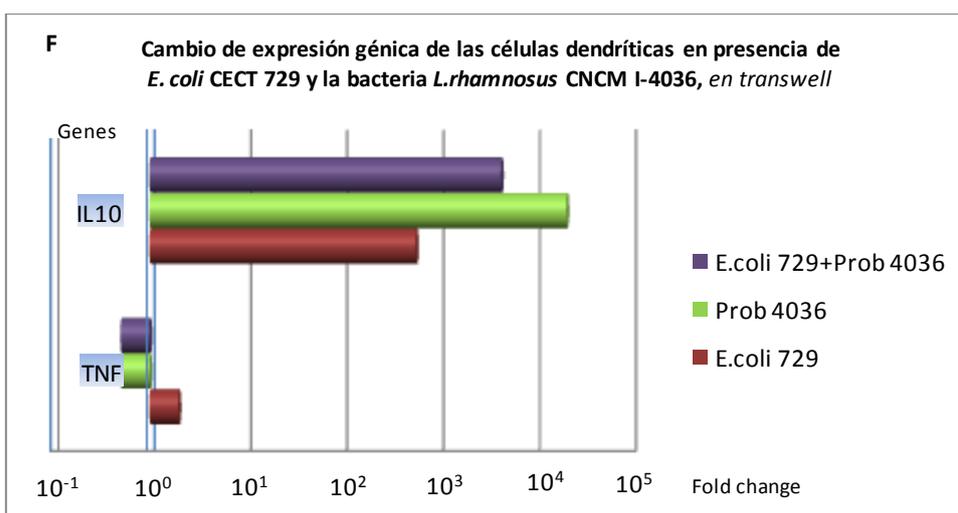
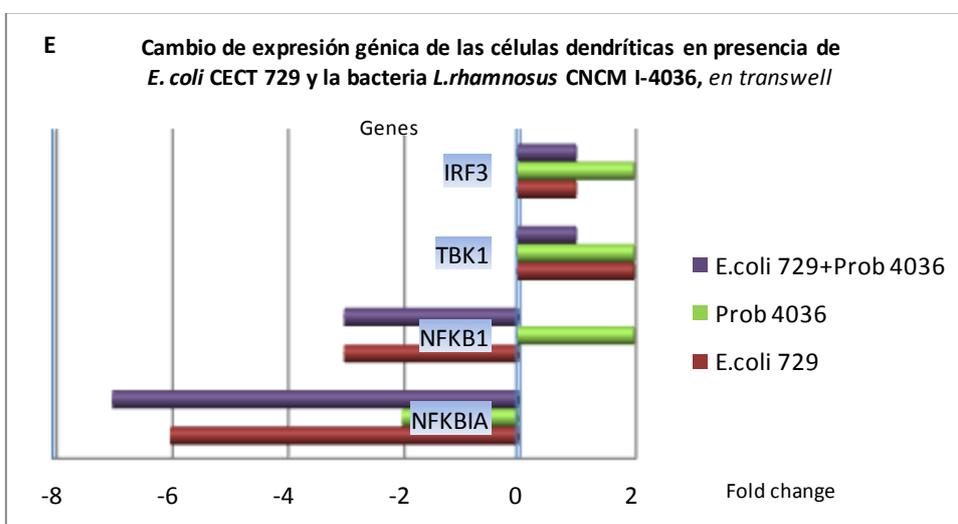
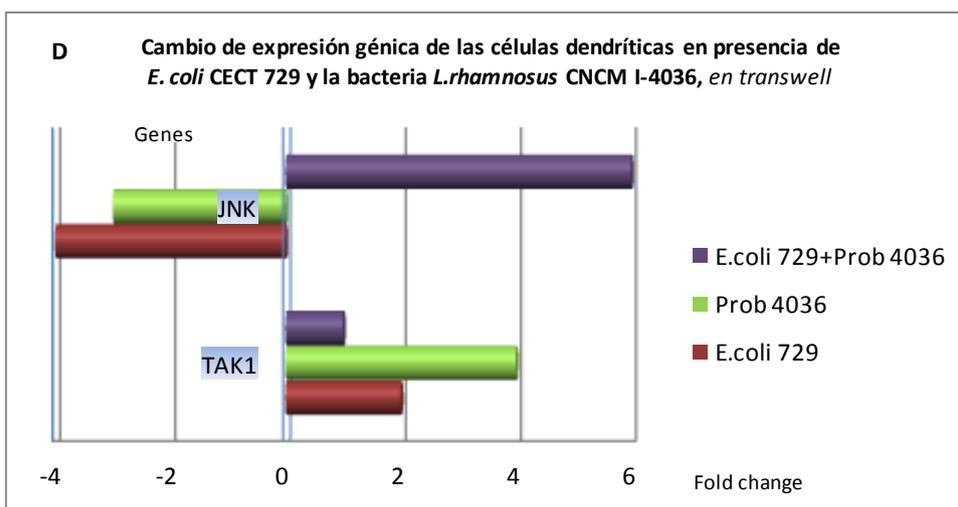


Figura 53. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1* y *TOLLIP* (B); *CASP8* y *MAPK14* (C); *TAK1* y *JNK* (D); *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1* e *NF-κBIA* (E); y *TNF-α* e *IL-10* (F), de las células dendríticas (DC), co-cultivadas en *transwell* con células caco-2, estimuladas 4 h con *E.coli* CECT 729 y la bacteria probiótica *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

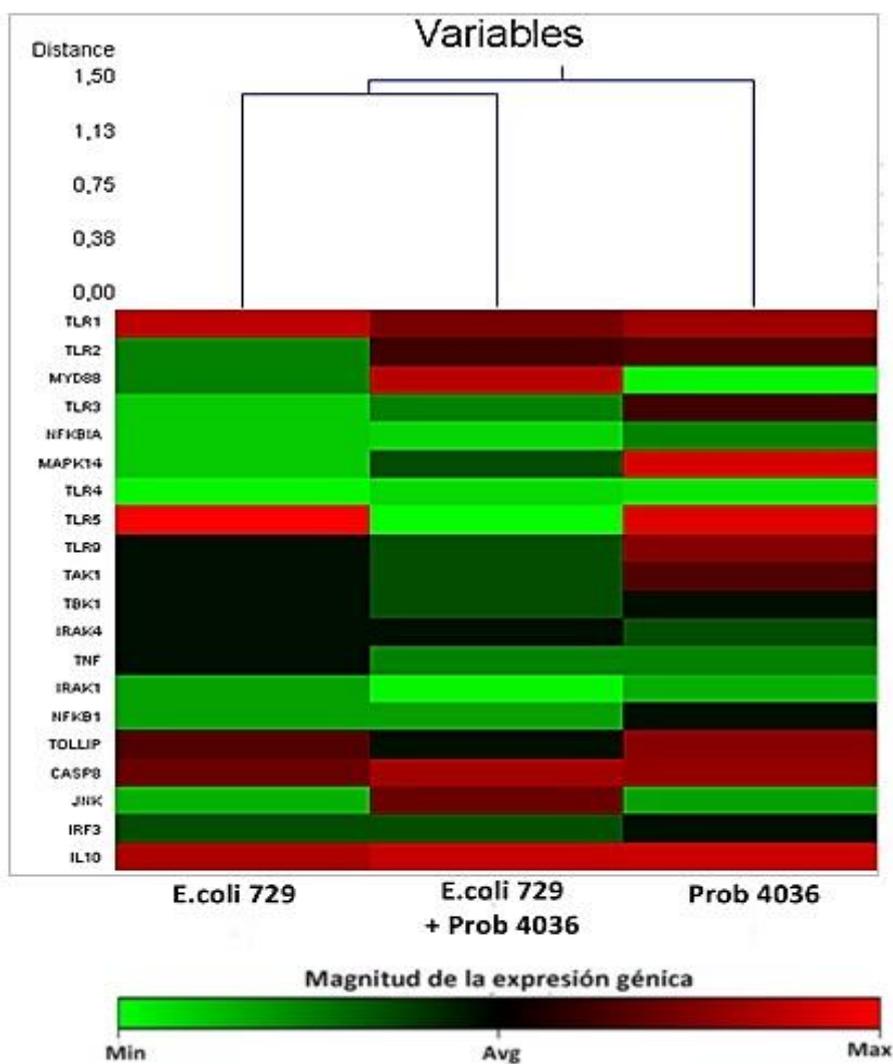
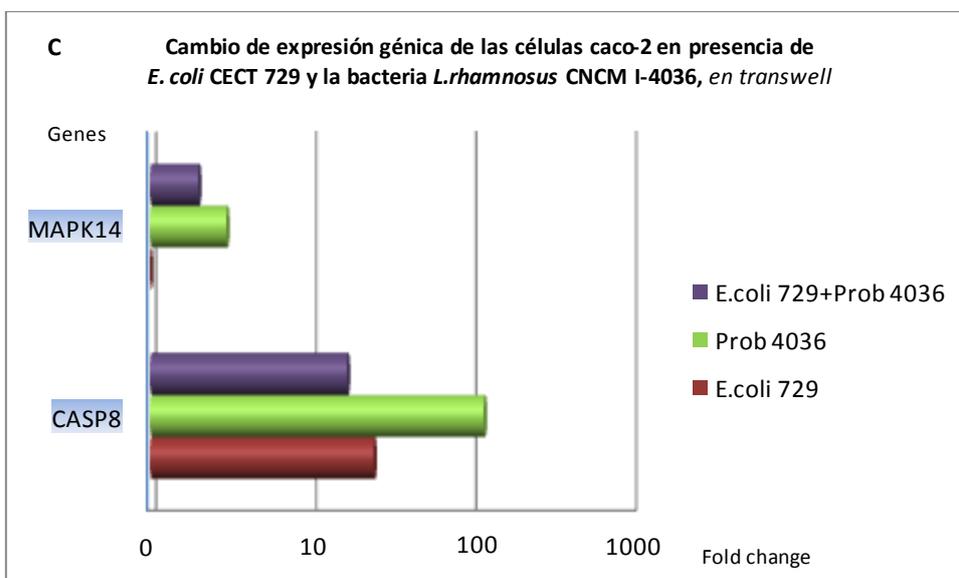
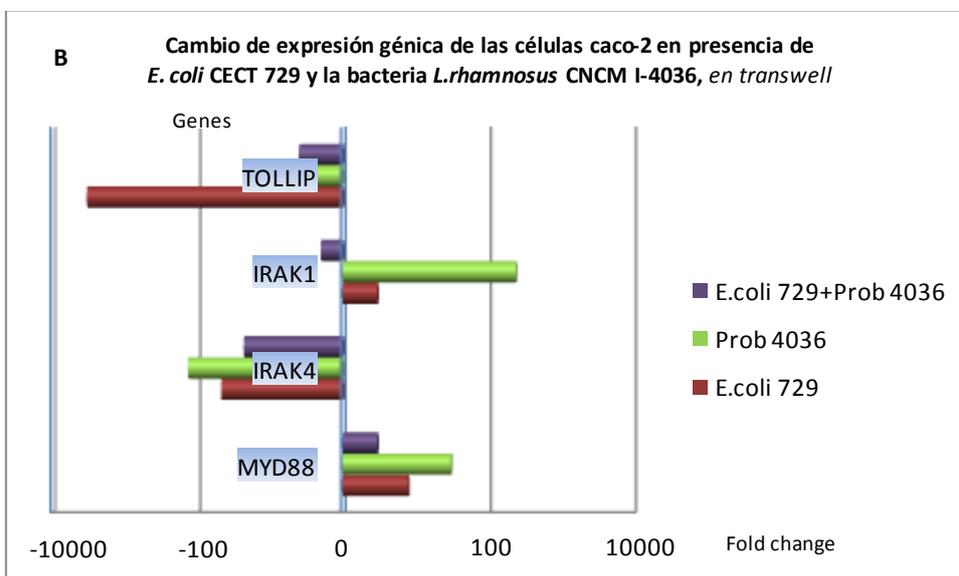
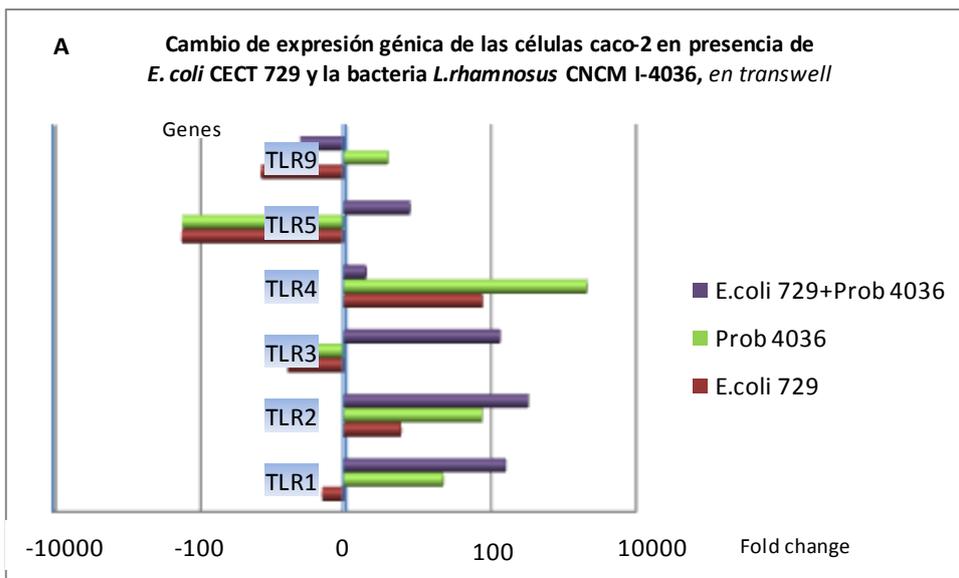


Figura 54. Visualización del Heat Map y dendrograma para los genes *Toll-like receptors* (TLR), *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF- κ B1*, *NF- κ B1A*, *TNF- α* e *IL-10*, de las células dendríticas (DC), co-cultivadas en *transwell* con células caco-2, estimuladas 4 h con *E.coli* CECT 729 y la bacteria probiótica *L.rhamnosus* CNCM I-4036.



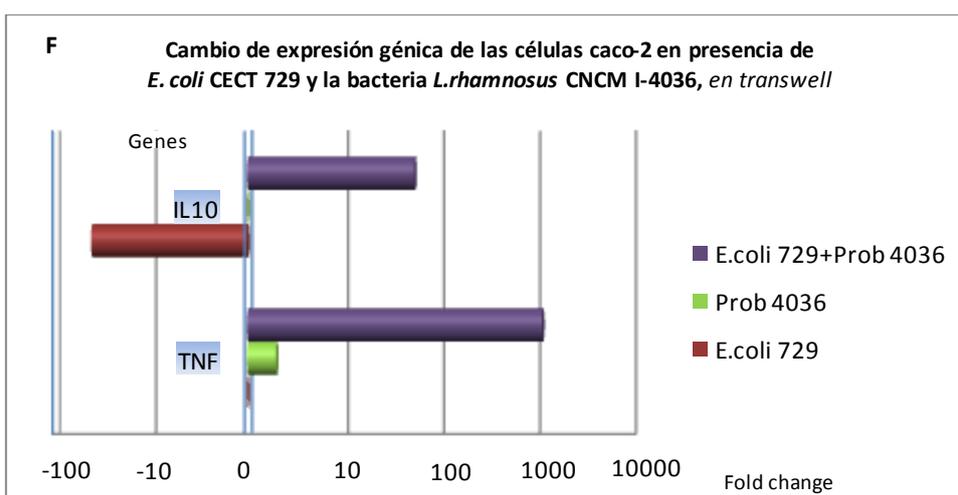
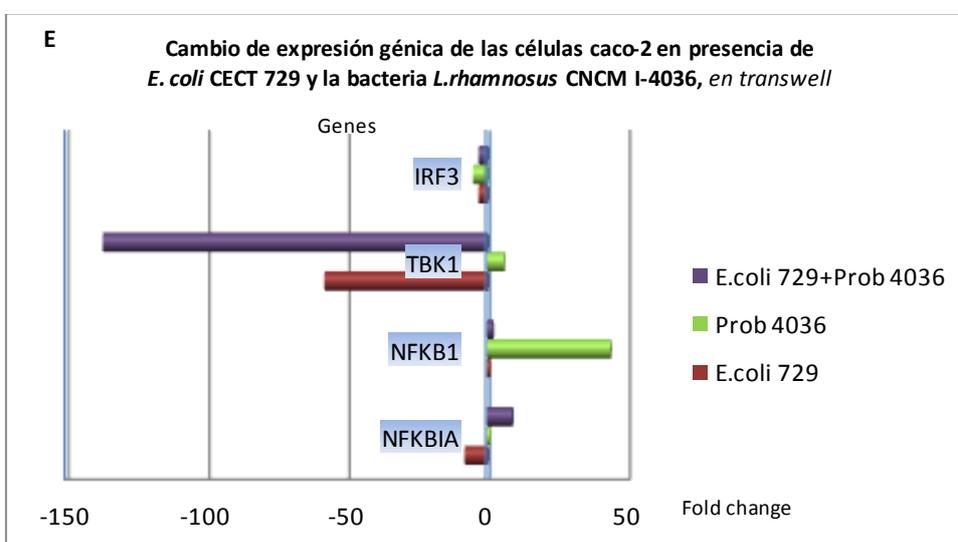
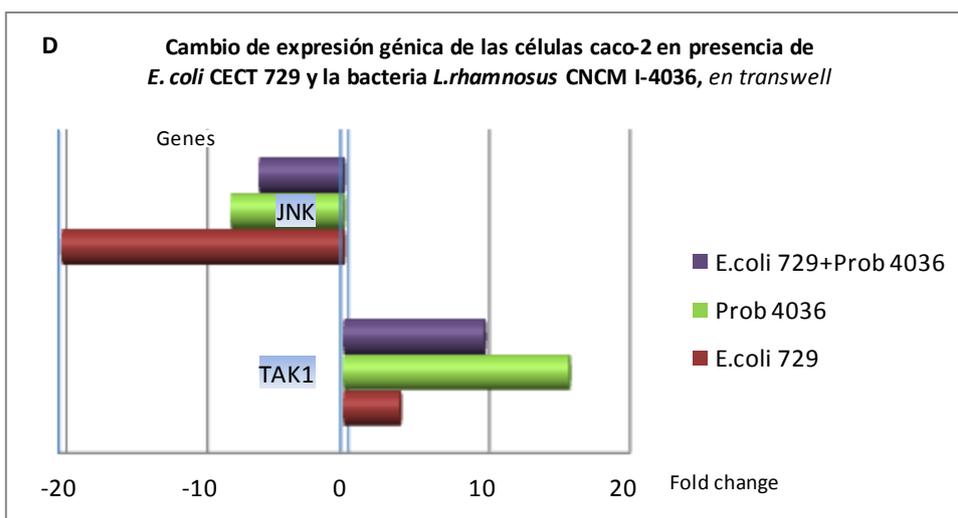


Figura 55. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1* y *TOLLIP* (B); *CASP8* y *MAPK14* (C); *TAK1* y *JNK* (D); *TBK1*, *IRF3*, *NF- κ B1* e *NF- κ BIA* (E); y *TNF- α* e *IL-10* (F), de las células caco-2, co-cultivadas en *transwell* con las células dendríticas (DC), estimuladas 4 h con *E.coli* CECT 729 y la bacteria probiótica *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

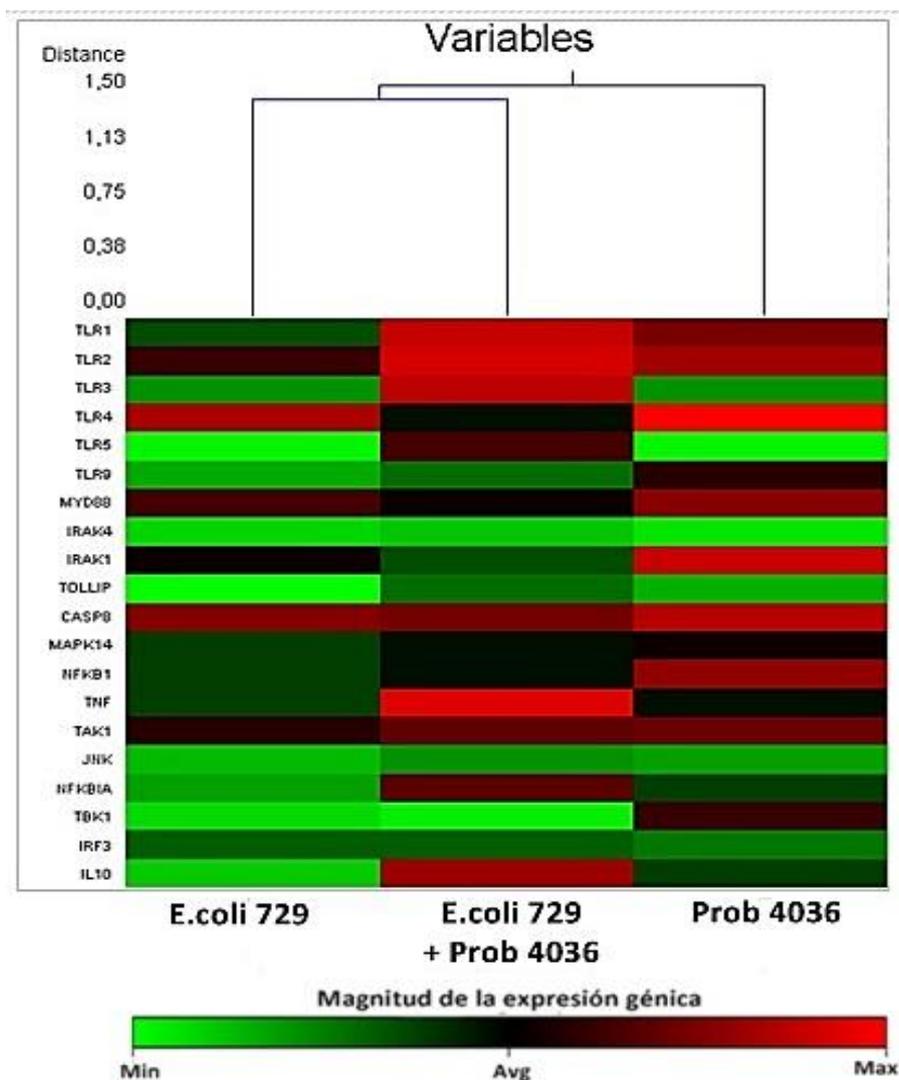
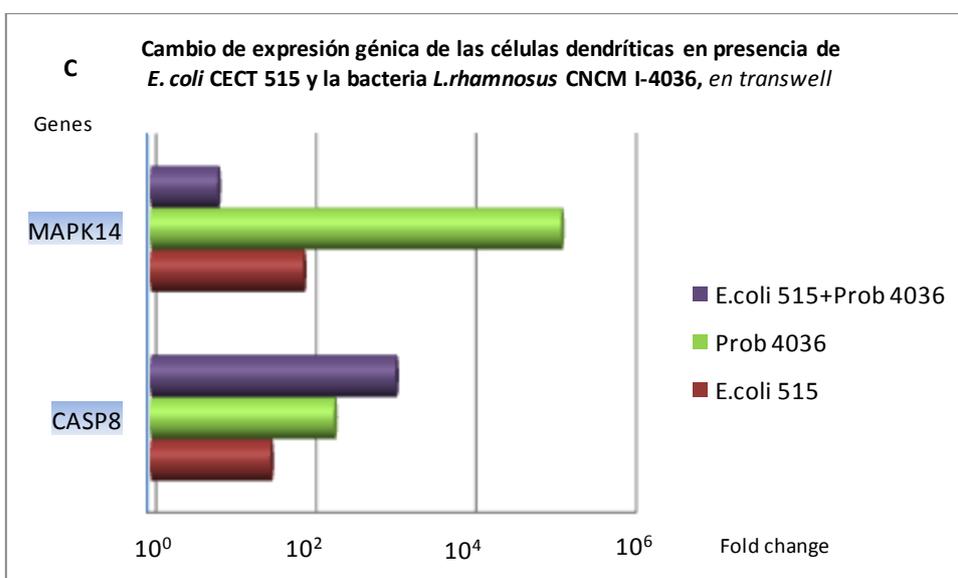
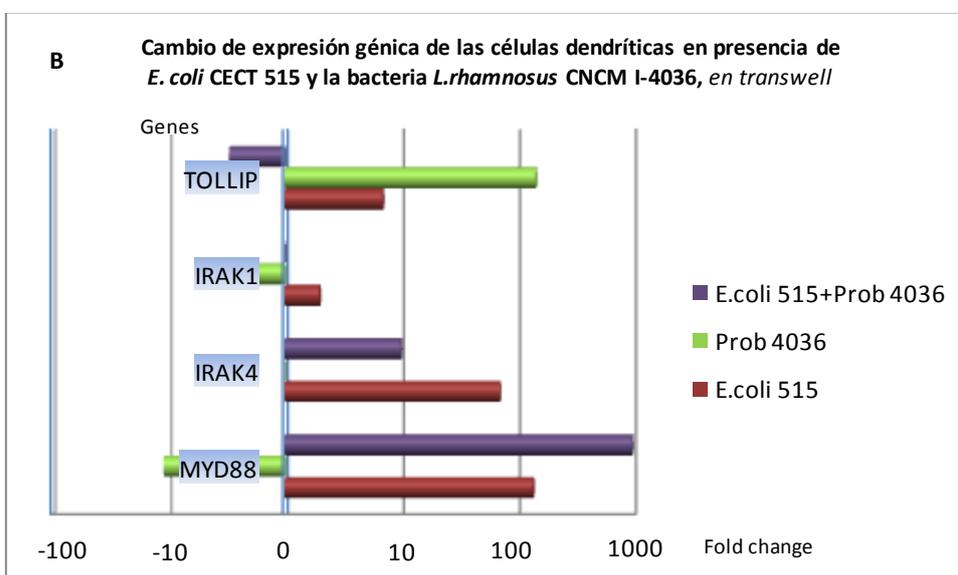
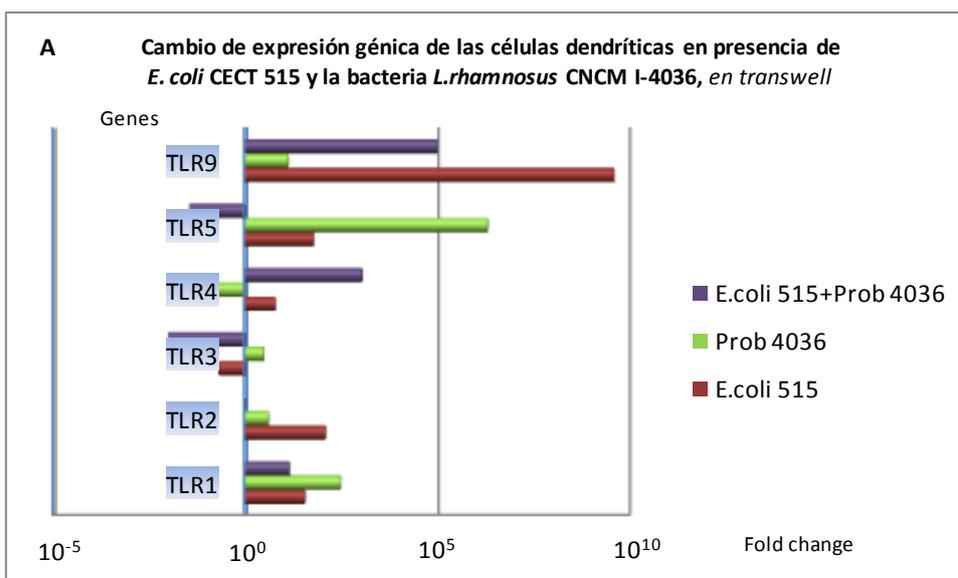


Figura 56. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes *Toll-like receptors (TLR)*, *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1*, *NF-κBIA*, *TNF-α* e *IL-10*, de las células caco-2, co-cultivadas en *transwell* con las células dendríticas (DC), estimuladas 4 h con *E.coli* CECT 729 y la bacteria probiótica *L.rhamnosus* CNCM I-4036.



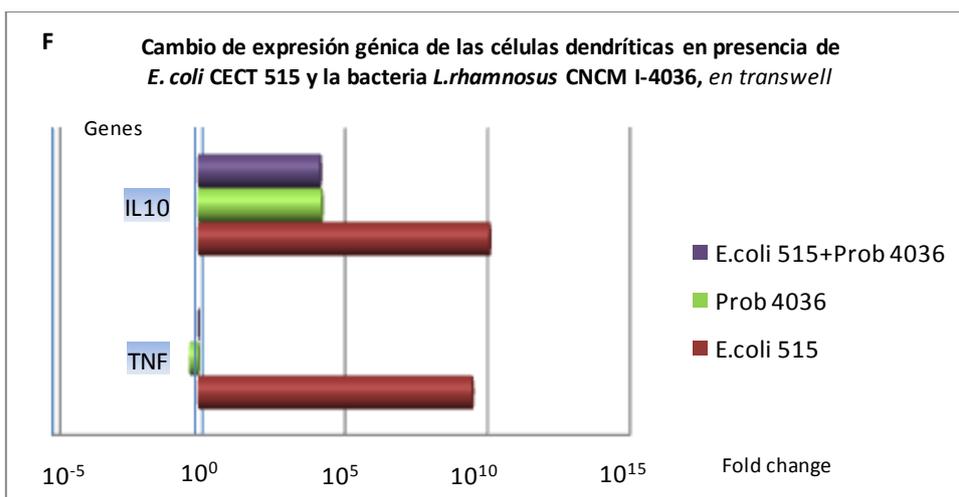
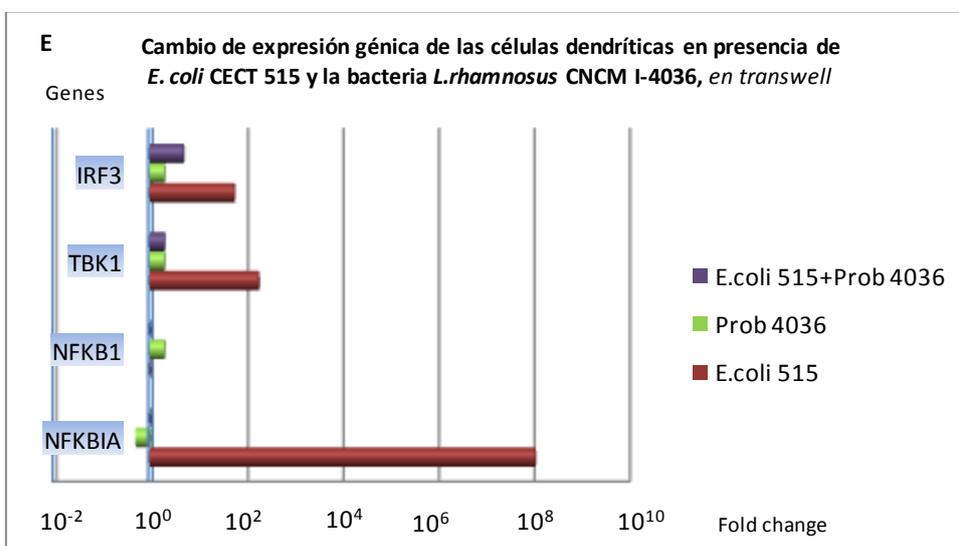
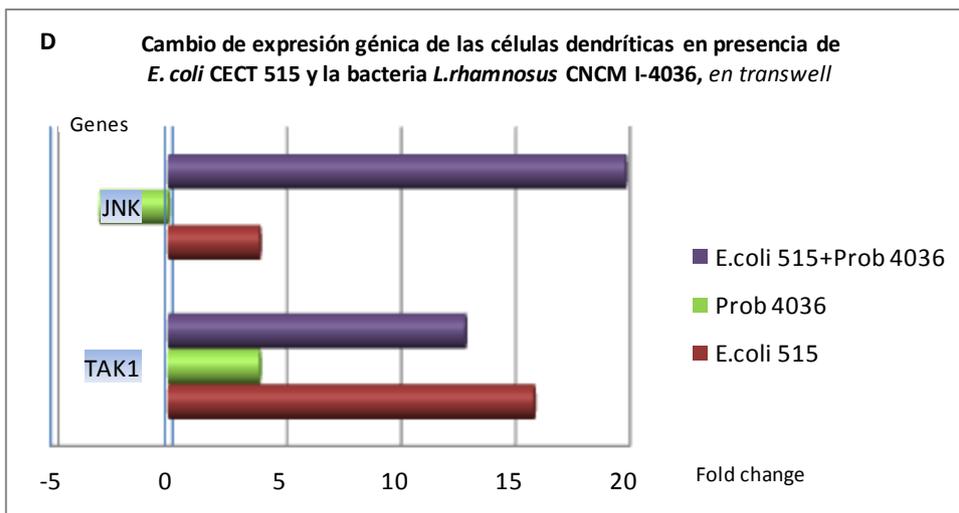


Figura 57. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); MYD88, IRAK4, IRAK1 y TOLLIP (B); CASP8 y MAPK14 (C); TAK1 y JNK (D); TBK1, IRF3, NF-κB1 e NF-κBIA (E); y TNF-α e IL-10 (F), de las células dendríticas (DC), co-cultivadas en transwell con células caco-2, estimuladas 4 h con *E.coli* CECT 515 y la bacteria probiótica *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

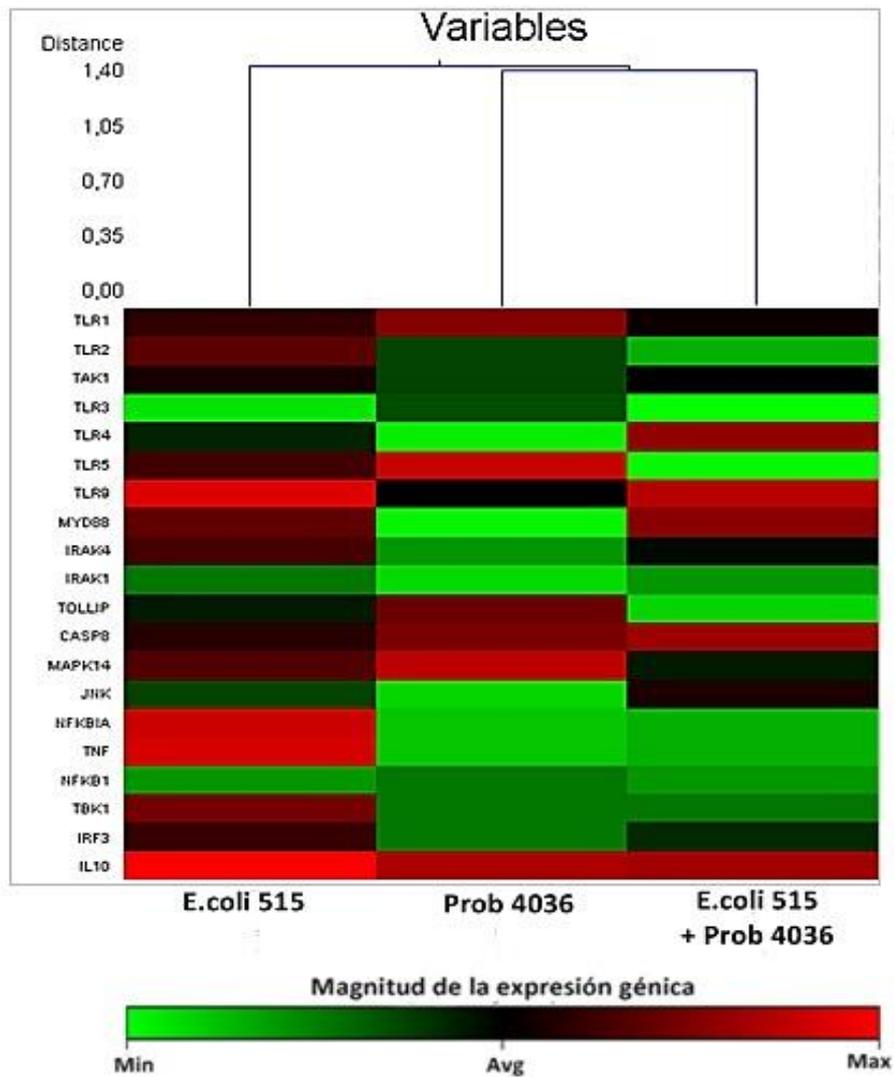
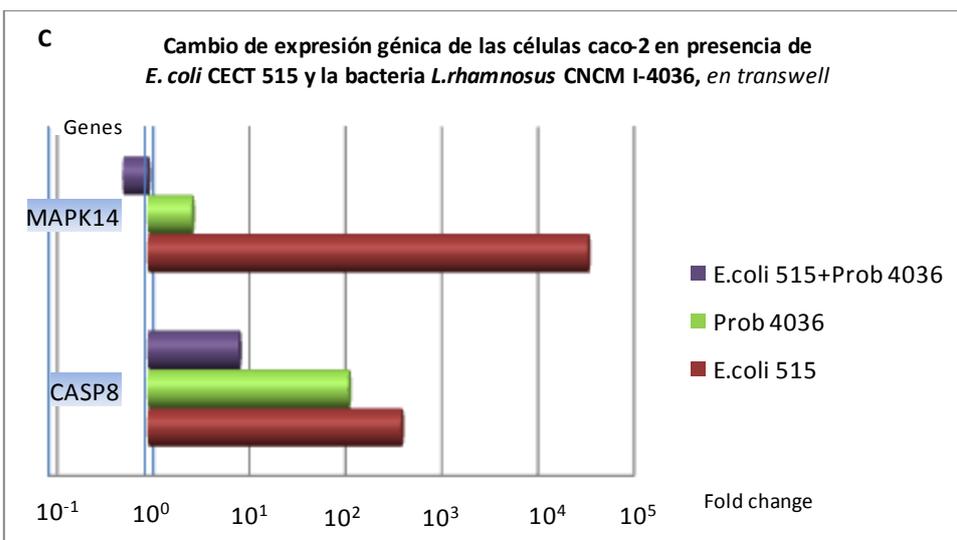
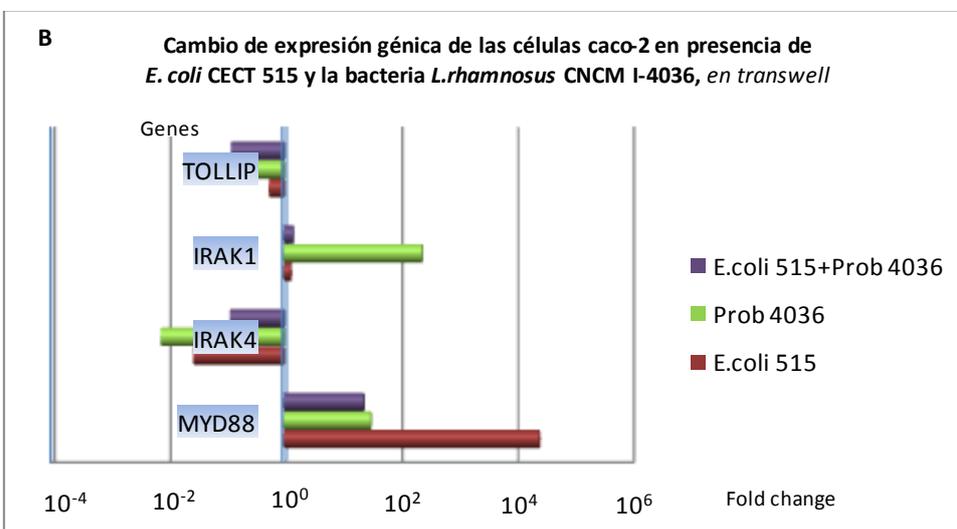
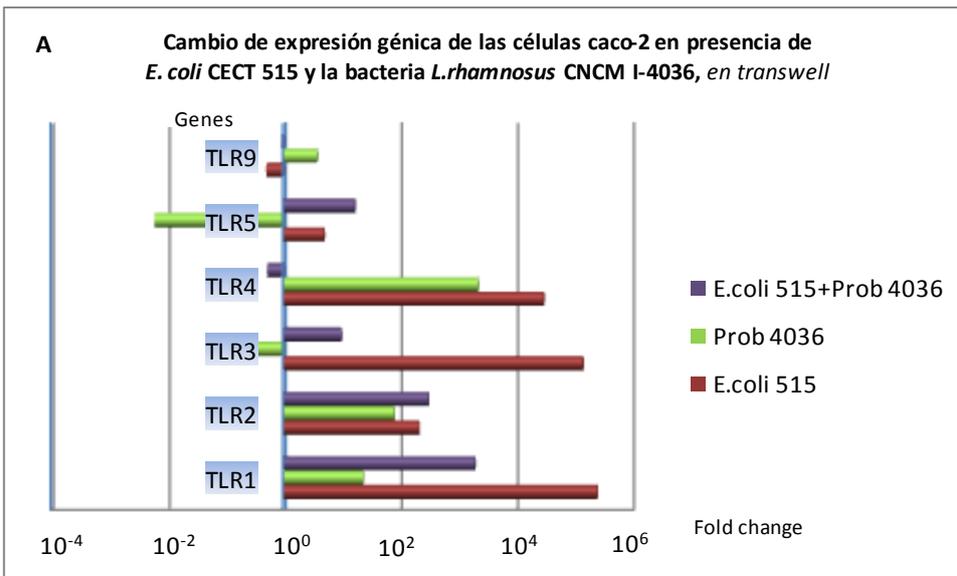


Figura 58. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes *Toll-like receptors (TLR)*, *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF- κ B1*, *NF- κ BIA*, *TNF- α* e *IL-10*, de las células dendríticas (DC), co-cultivadas en *transwell* con células *caco-2*, estimuladas 4 h con *E.coli* CECT 515 y la bacteria probiótica *L.rhamnosus* CNCM I-4036.



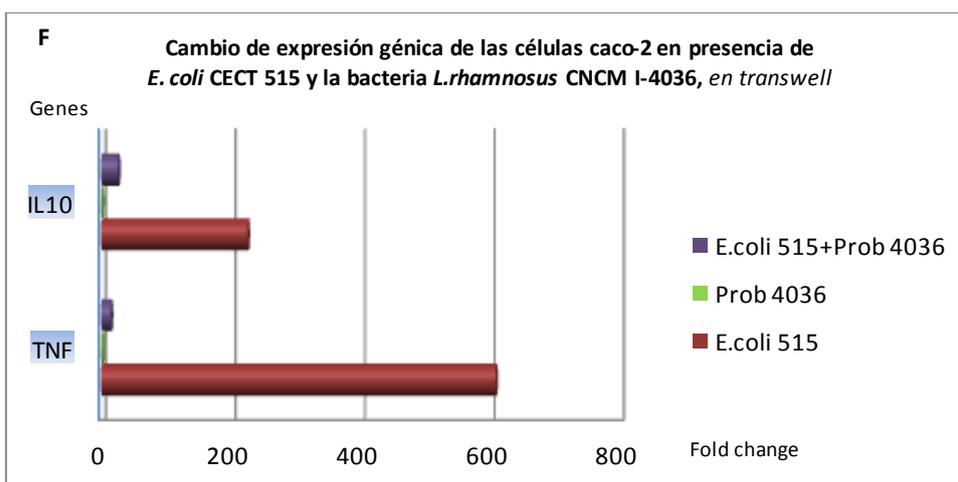
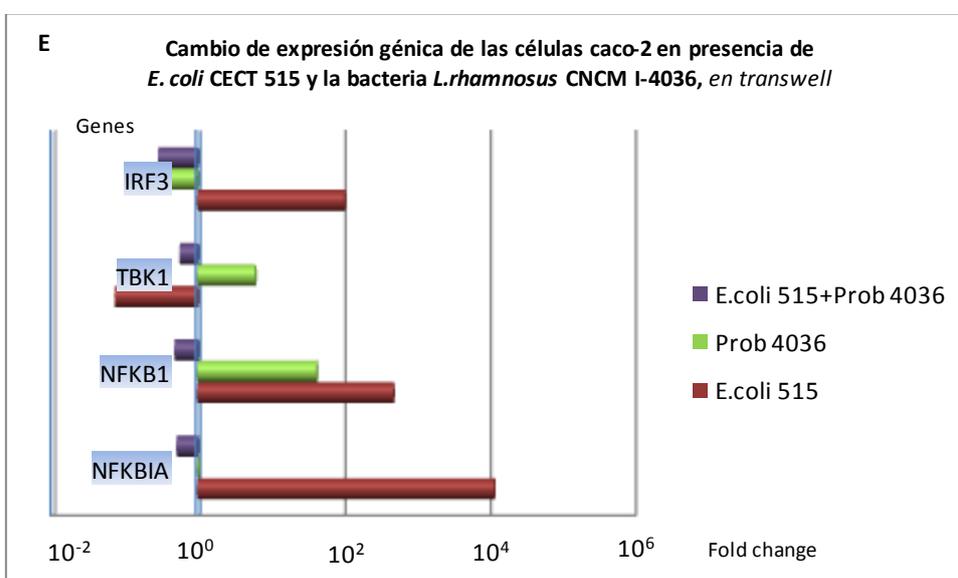
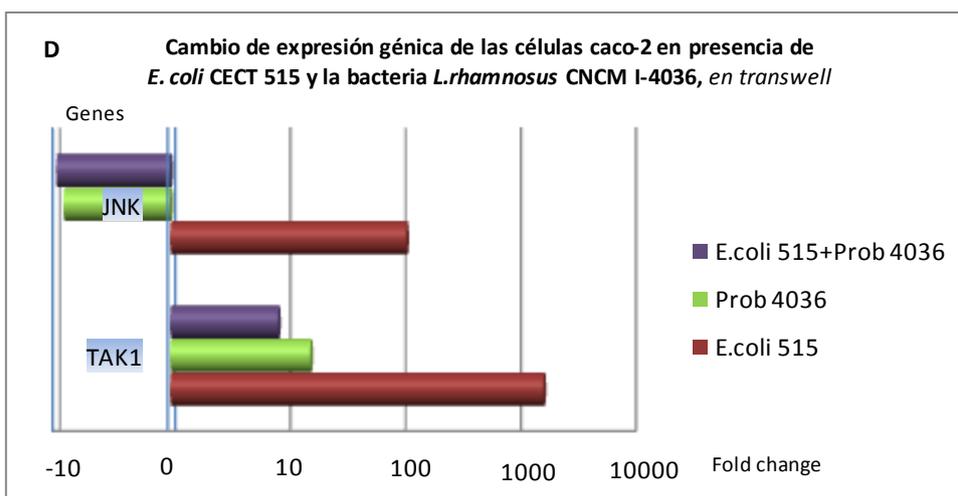


Figura 59. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); MYD88, IRAK4, IRAK1 y TOLLIP (B); CASP8 y MAPK14 (C); TAK1 y JNK (D); TBK1, IRF3, NF- κ B1 e NF- κ BIA (E); y TNF- α e IL-10 (F), de las células caco-2, co-cultivadas en transwell con de las células dendríticas (DC), estimuladas 4 h con *E.coli* CECT 515 y la bacteria probiótica *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

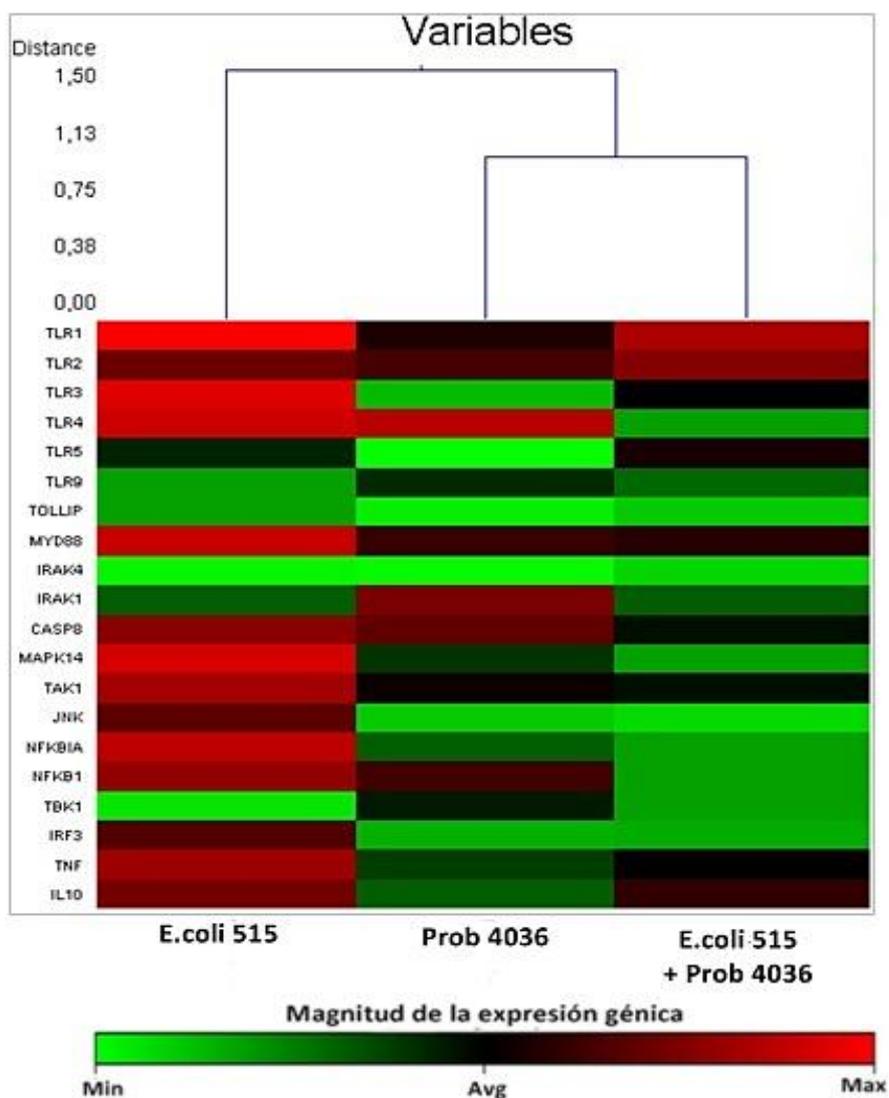
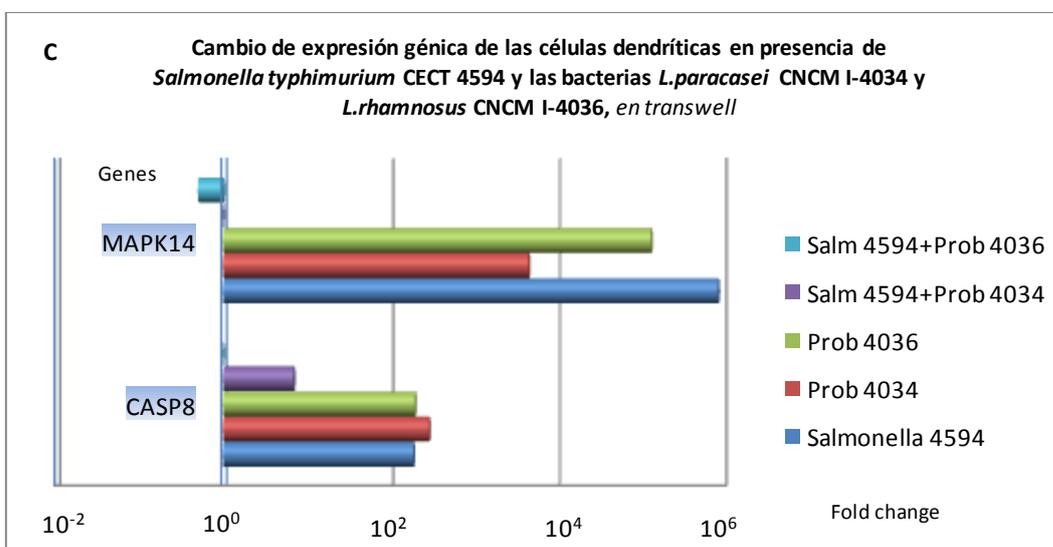
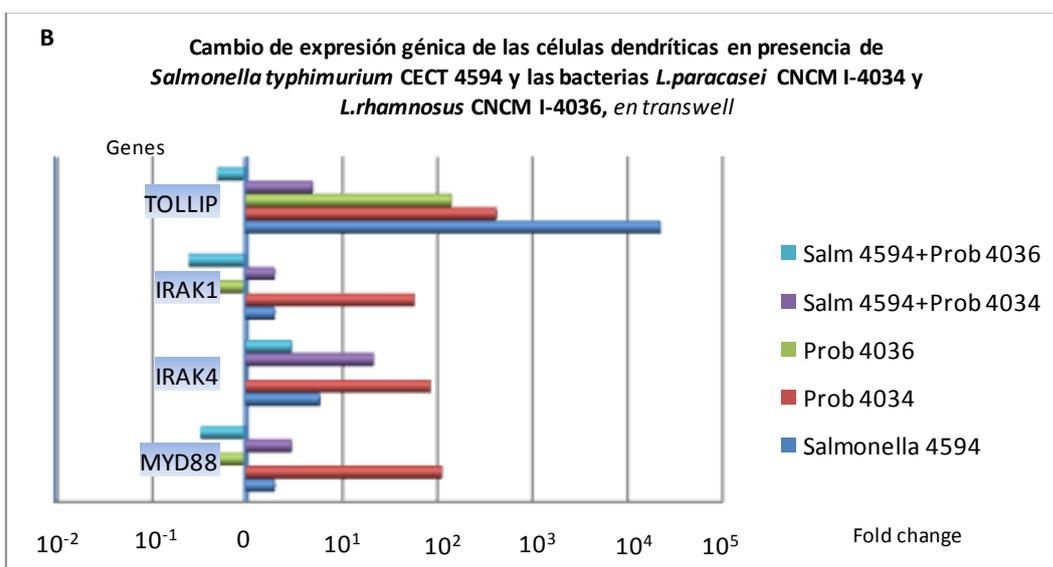
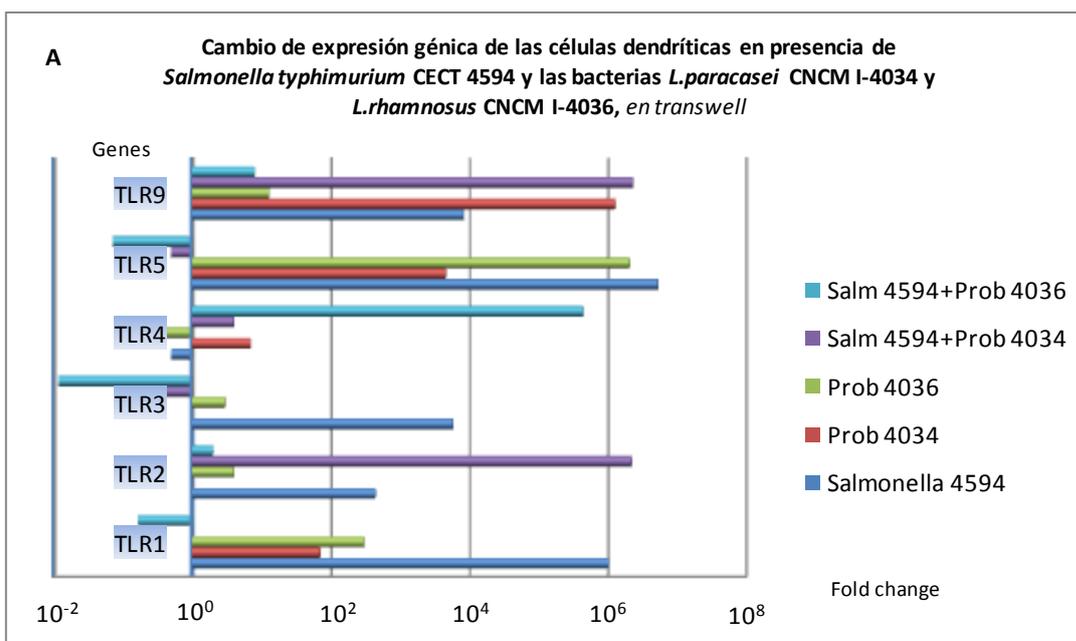


Figura 60. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes Toll-like receptors (*TLR*), *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1*, *NF-κBIA*, *TNF-α* e *IL-10*, de las células caco-2, co-cultivadas en *transwell* con las células dendríticas (DC), estimuladas 4 h con *E.coli* CECT 515 y la bacteria probiótica *L.rhamnosus* CNCM I-4036.



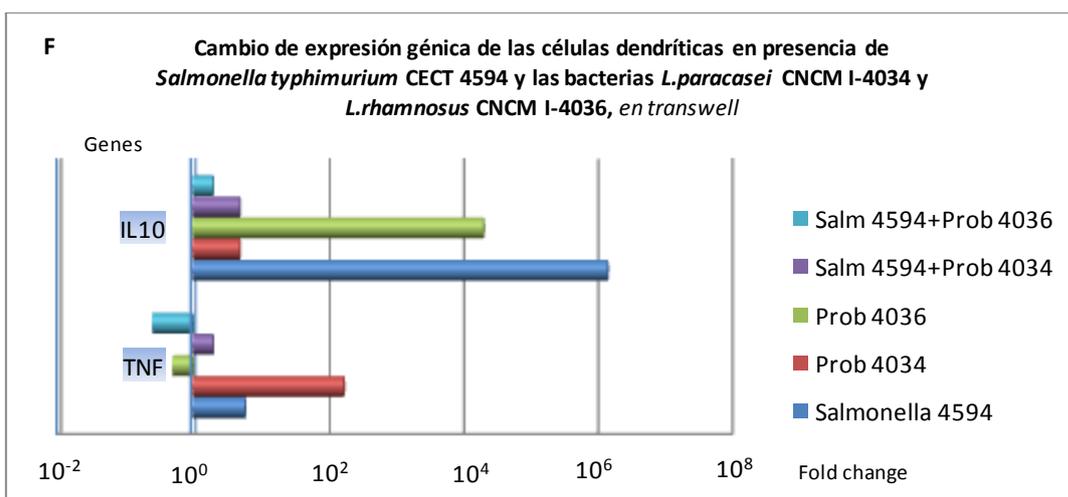
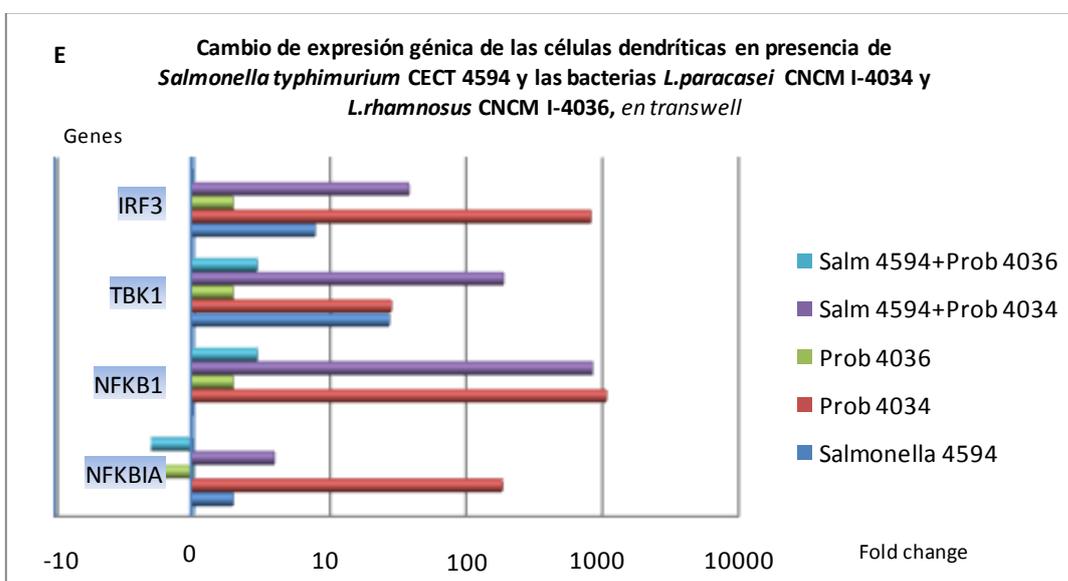
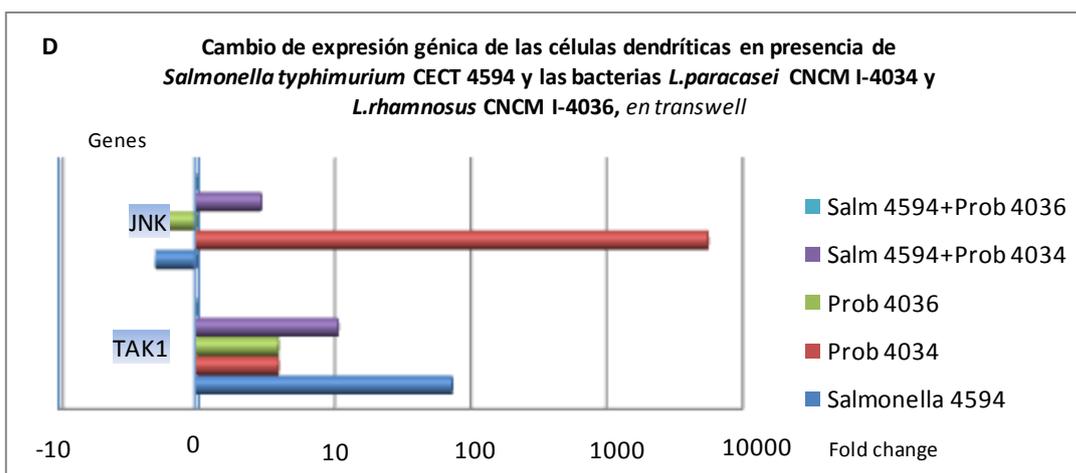


Figura 61. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); MYD88, IRAK4, IRAK1 y TOLLIP (B); CASP8 y MAPK14 (C); TAK1 y JNK (D); TBK1, IRF3, NF-κB1 e NF-κBIA (E); y TNF-α e IL-10 (F), de las células dendríticas (DC), co-cultivadas en transwell con células caco-2, estimuladas 4 h con *Salmonella typhimurium* CECT 4594 y las bacterias *L.paracasei* CNCM I-4034 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

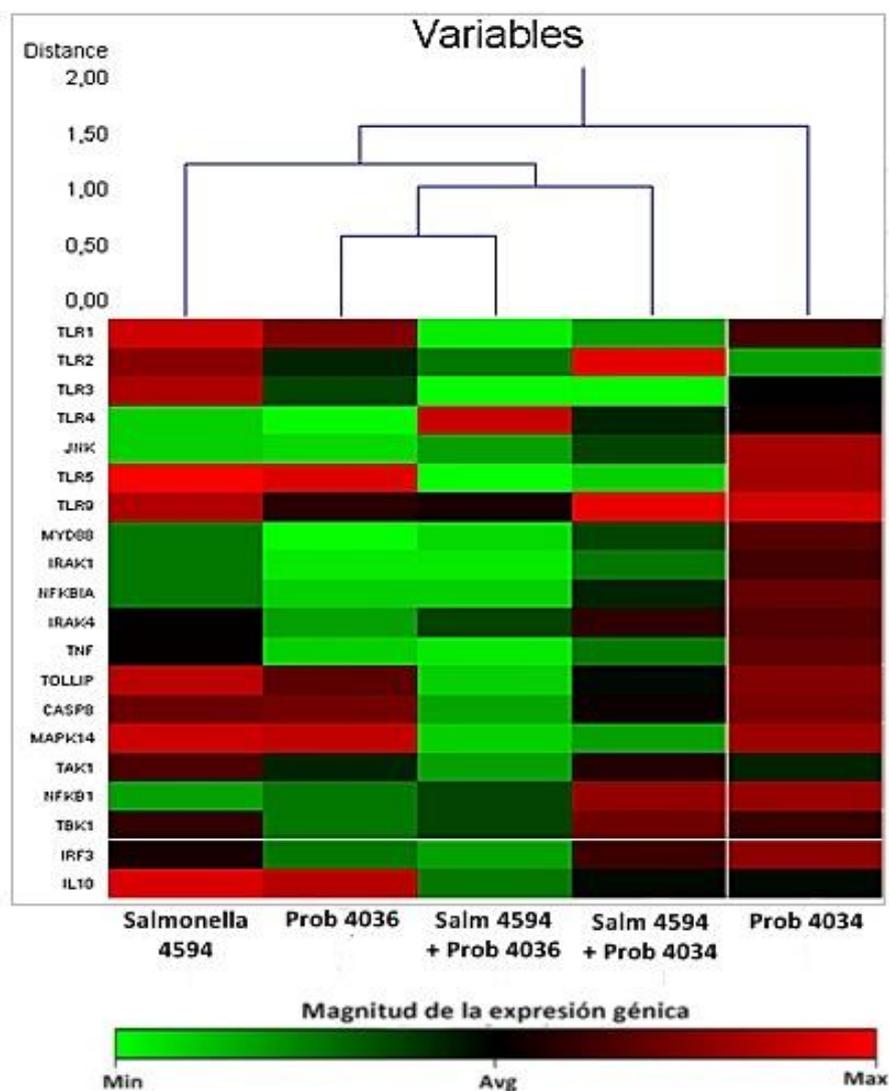
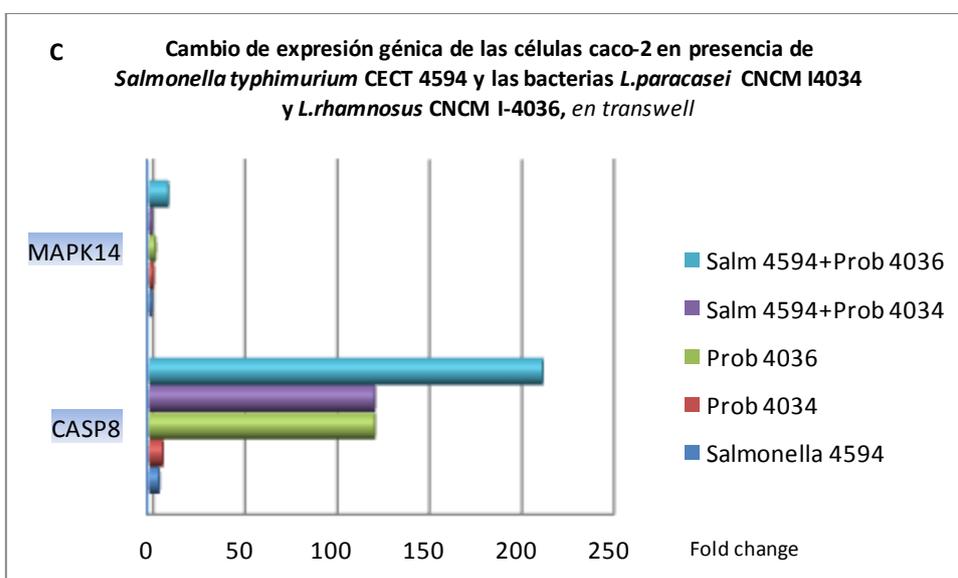
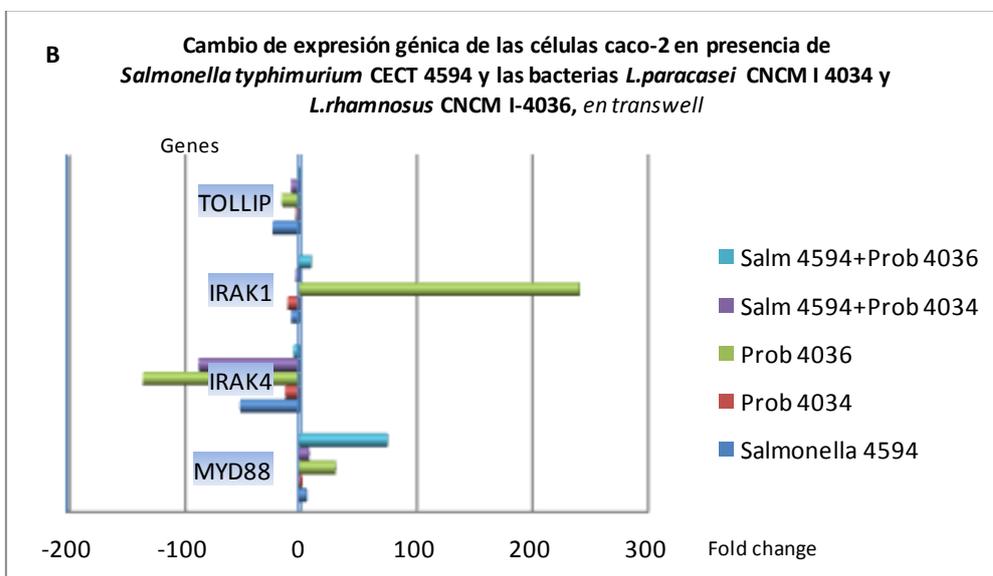
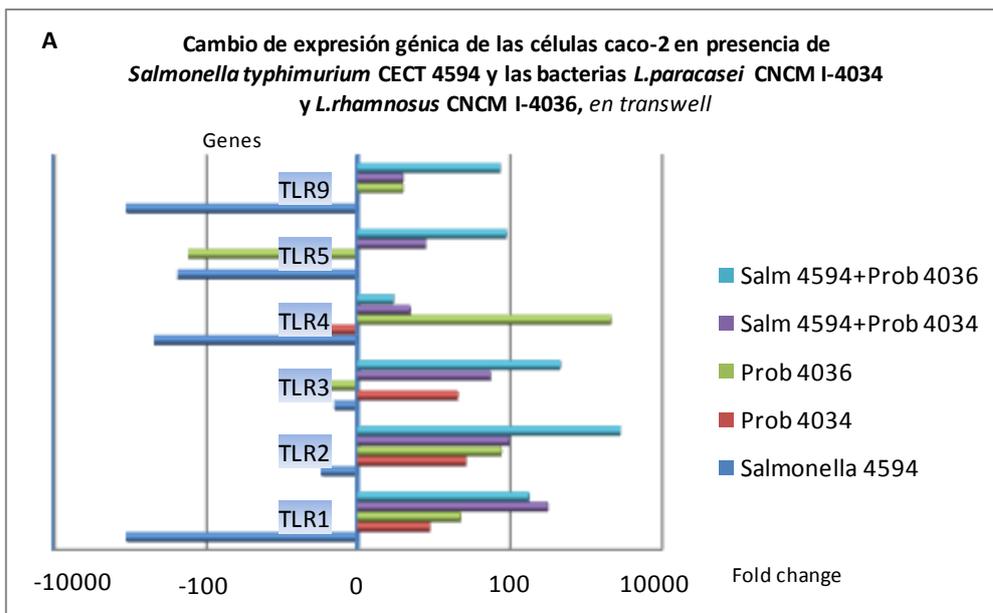


Figura 62. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes Toll-like receptors (*TLR*), *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1*, *NF-κBIA*, *TNF-α* e *IL-10*, de las células dendríticas (DC), co-cultivadas en *transwell* con células caco-2, estimuladas 4 h con *Salmonella typhimurium* CECT 4594 y las bacterias probióticas *L.paracasei* CNCM I-4034 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036.



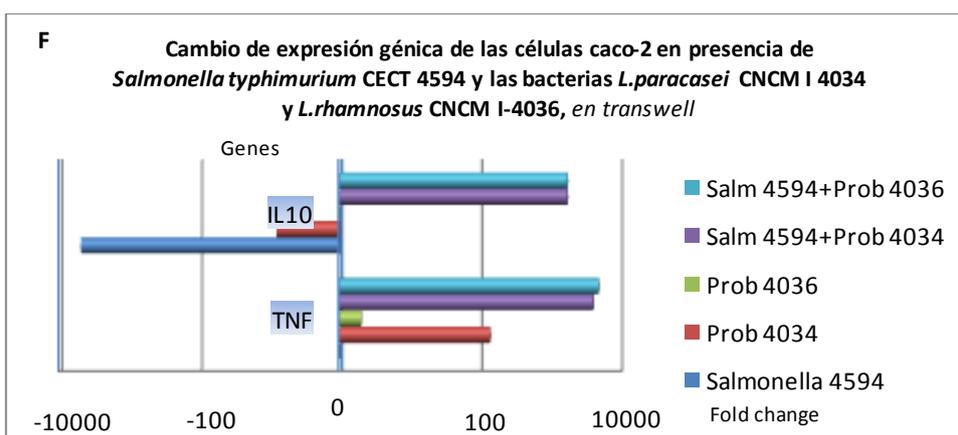
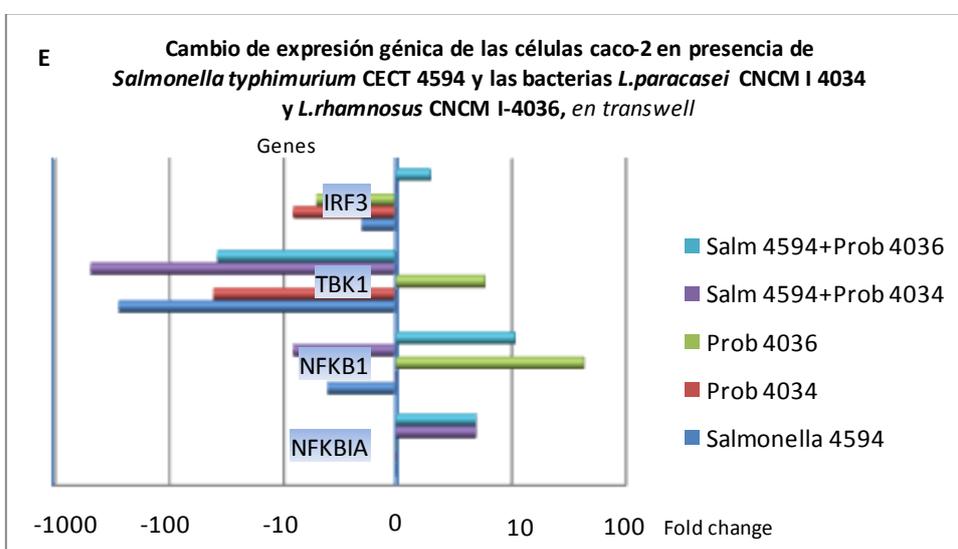
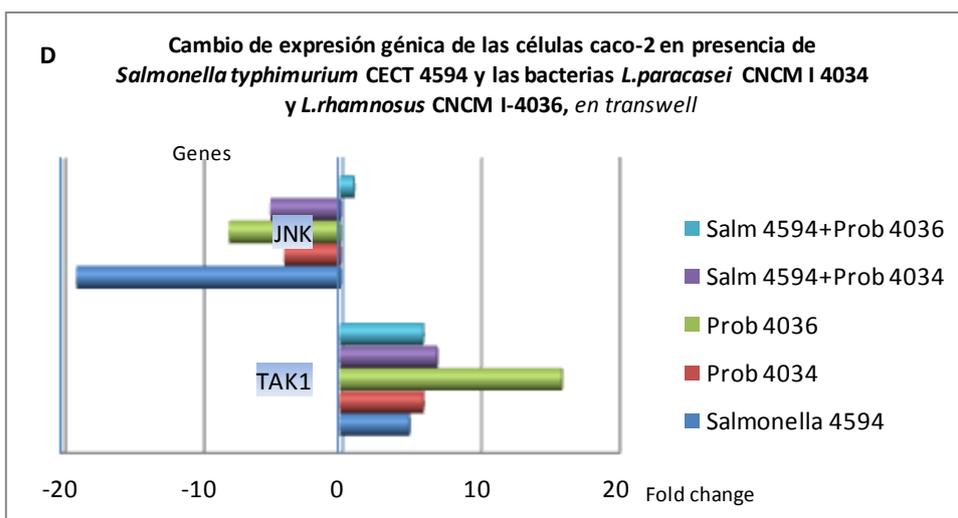


Figura 63. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); MYD88, IRAK4, IRAK1 y TOLLIP (B); CASP8 y MAPK14 (C); TAK1 y JNK (D); TBK1, IRF3, NF- κ B1 e NF- κ BIA (E); y TNF- α e IL-10 (F), de las células caco-2, co-cultivadas en *transwell* con las células dendríticas (DC), estimuladas 4 h con *Salmonella typhimurium* CECT 4594 y las bacterias *L.paracasei* CNCM I-4034 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036.

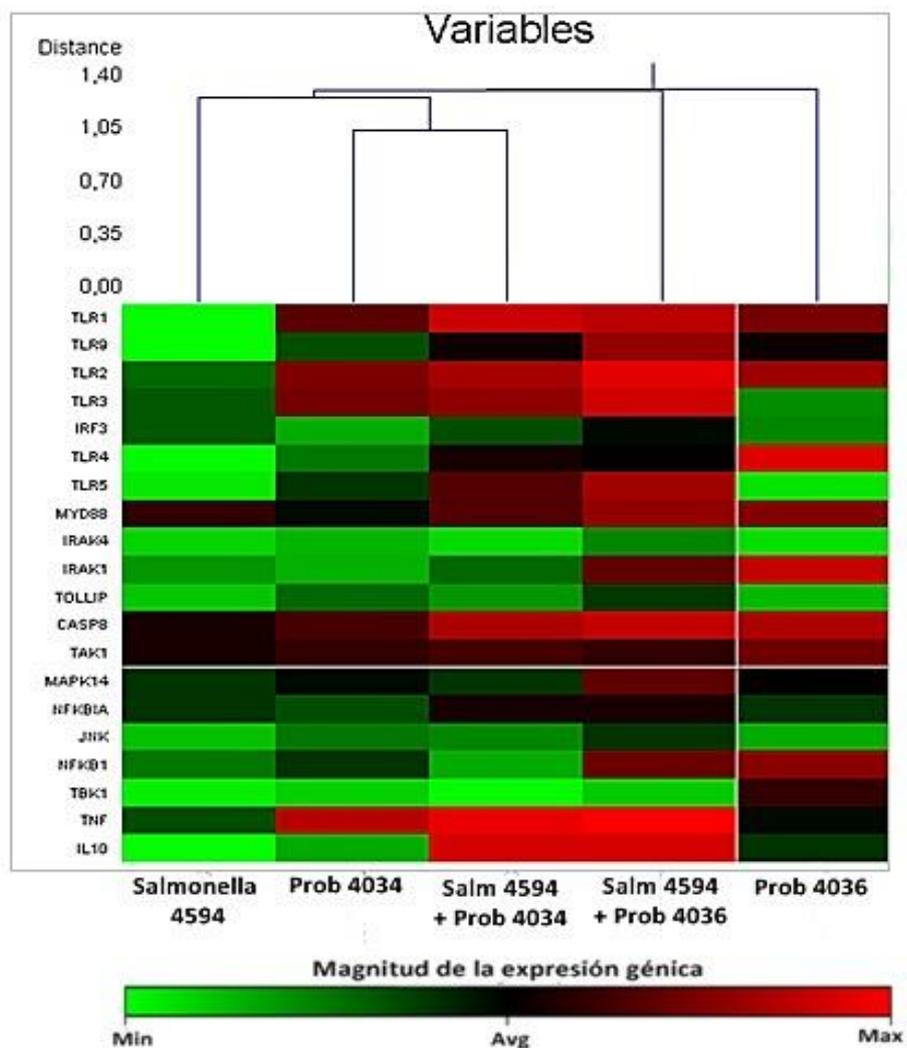
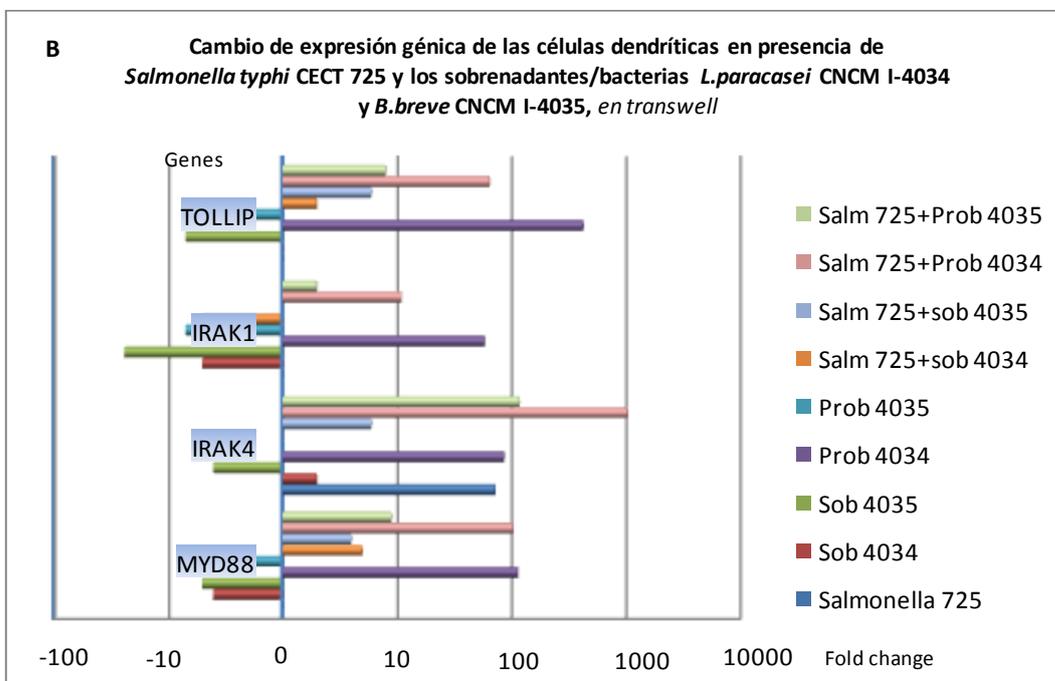
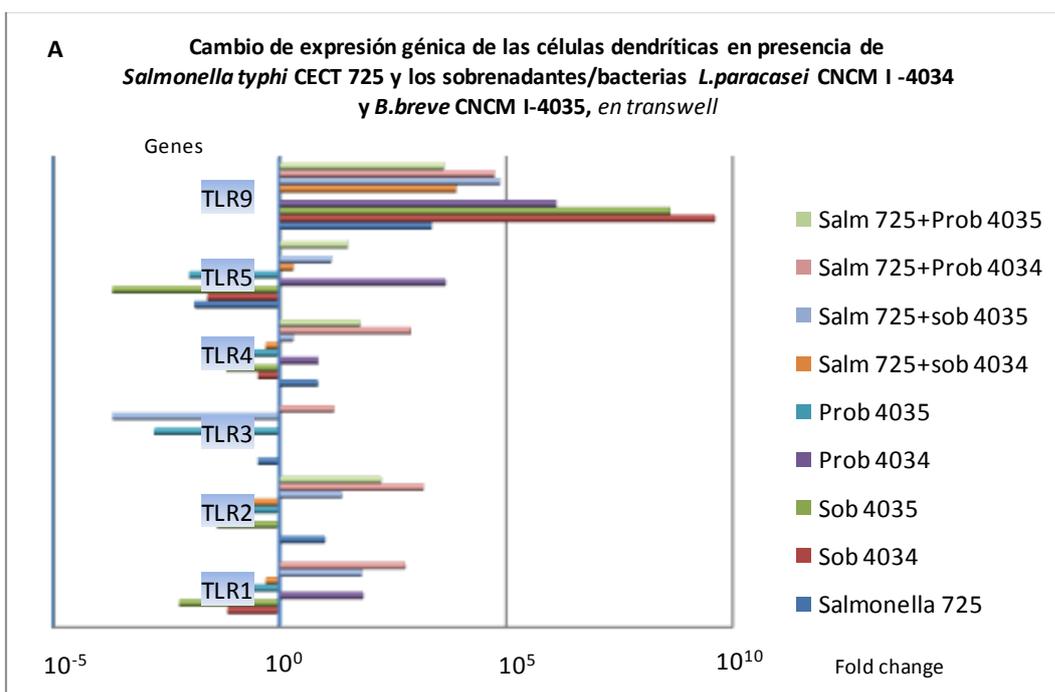
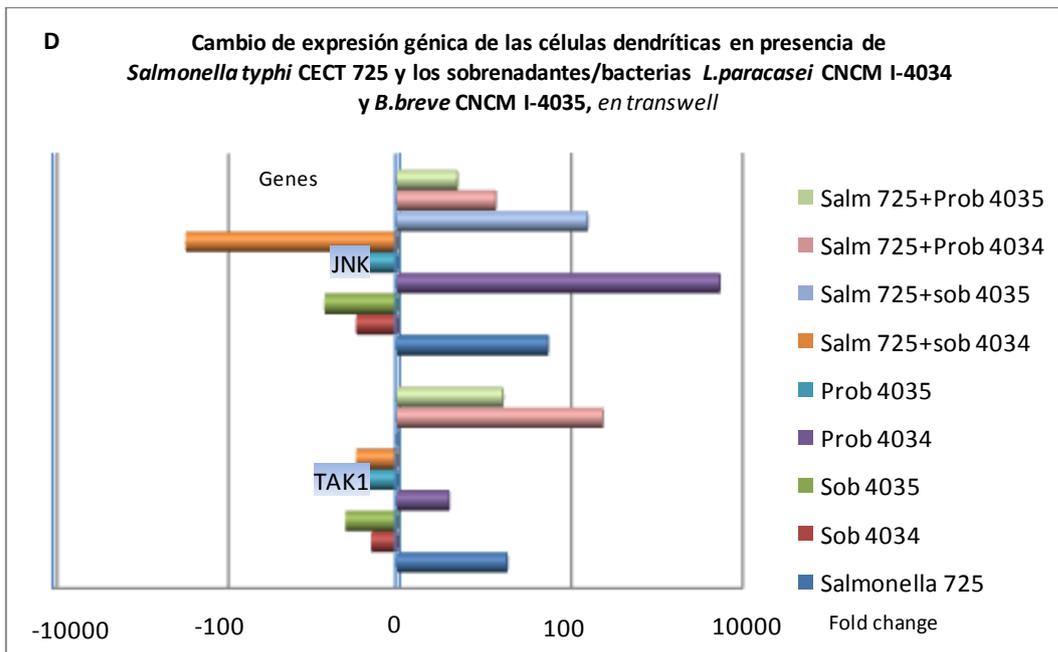
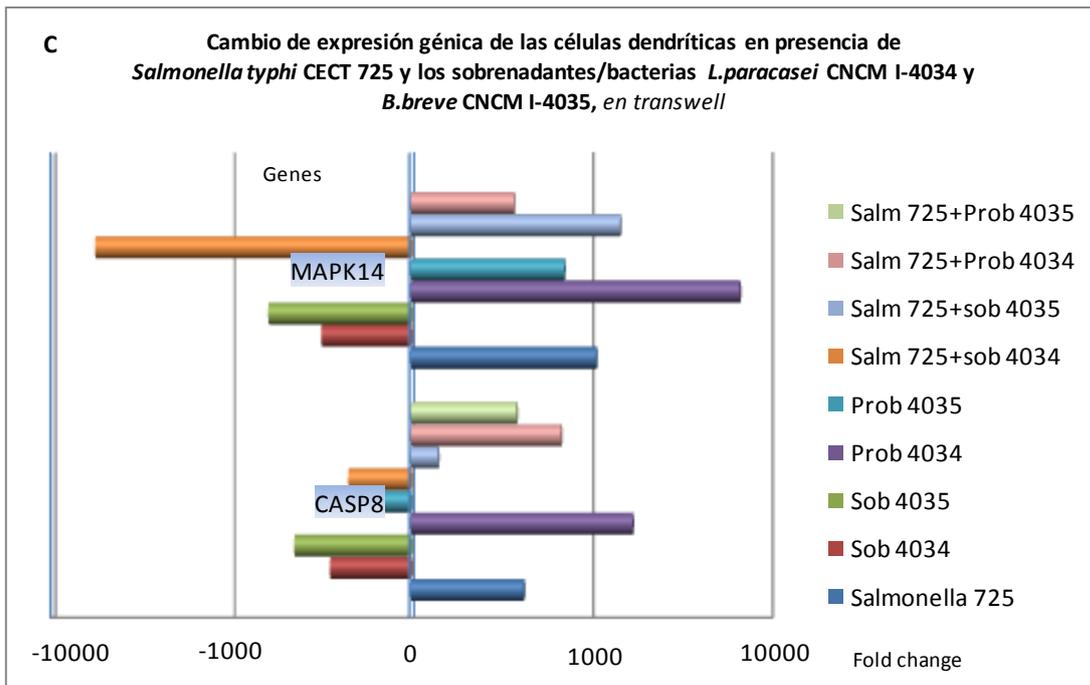


Figura 64. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes Toll-like receptors (*TLR*), *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1*, *NF-κBIA*, *TNF-α* e *IL-10*, de las células caco-2, co-cultivadas en *transwell* con las células dendríticas (DC), estimuladas 4 h con *Salmonella typhimurium* CECT 4594 y las bacterias probióticas *L.paracasei* CNCM I-4034 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036.





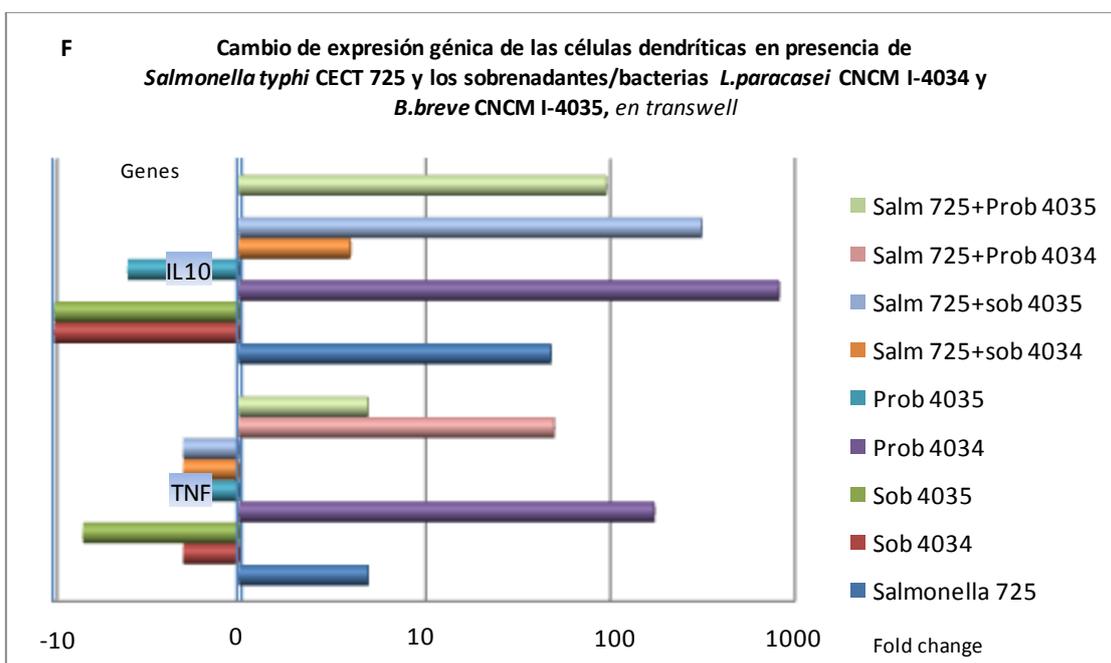
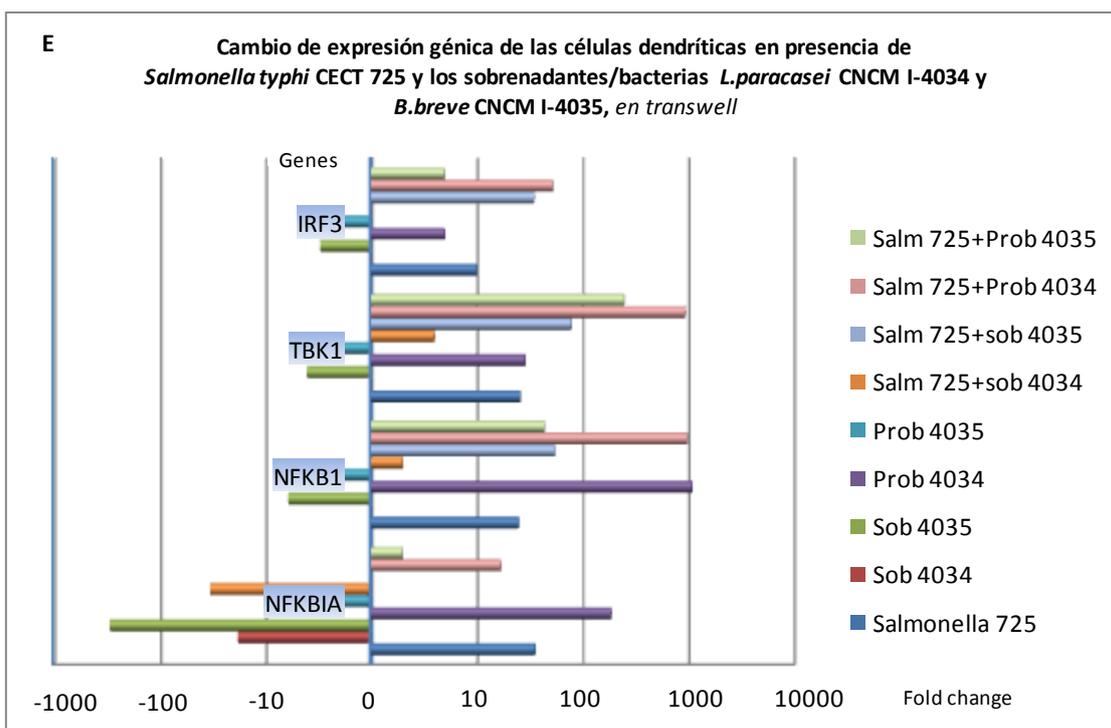


Figura 65. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1* y *TOLLIP* (B); *CASP8* y *MAPK14* (C); *TAK1* y *JNK* (D); *TBK1*, *IRF3*, *NF- κ B1* e *NF- κ BIA* (E); y *TNF- α* e *IL-10* (F), de las células dendríticas (DC), co-cultivadas en *transwell* con células caco-2, estimuladas 4 h con *Salmonella typhi* CECT 725 y los sobrenadantes/bacterias *L.paracasei* CNCM I-4034 y *B.breve* CNCM I-4035.

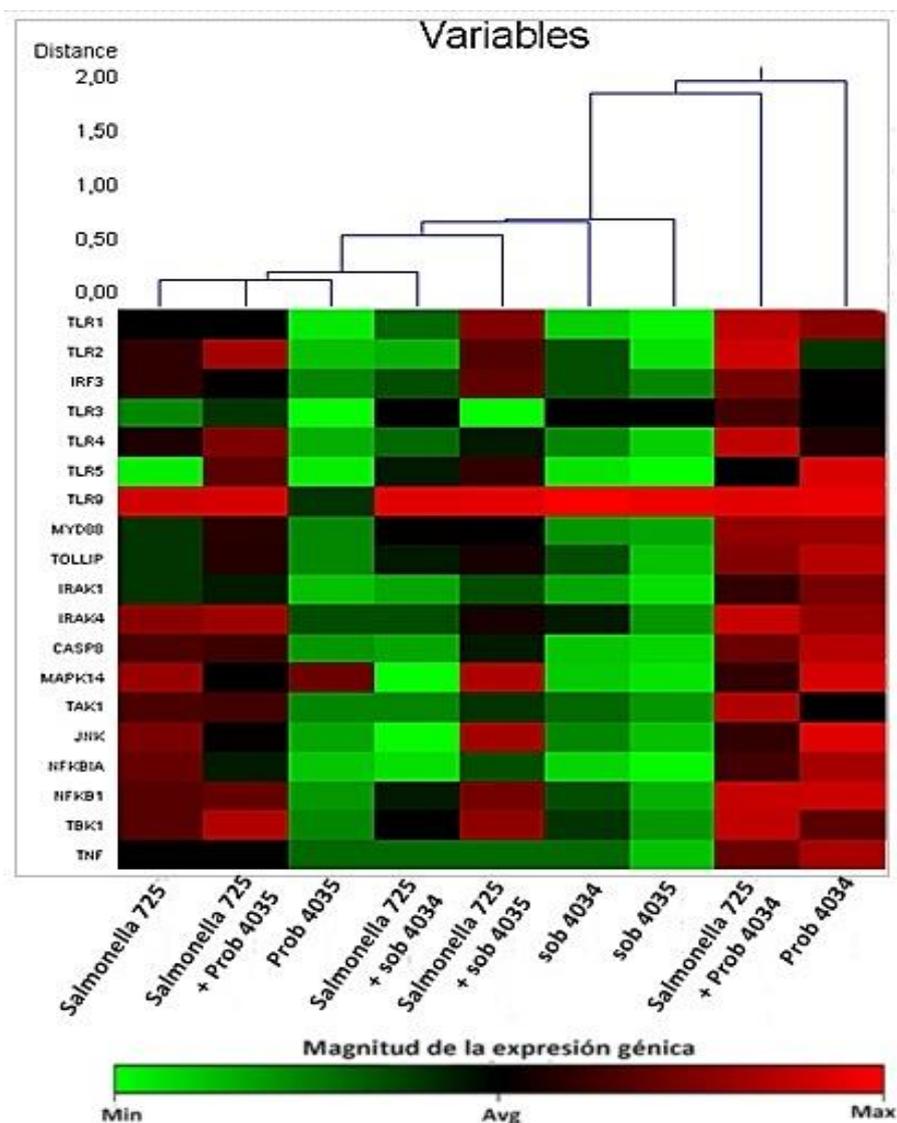
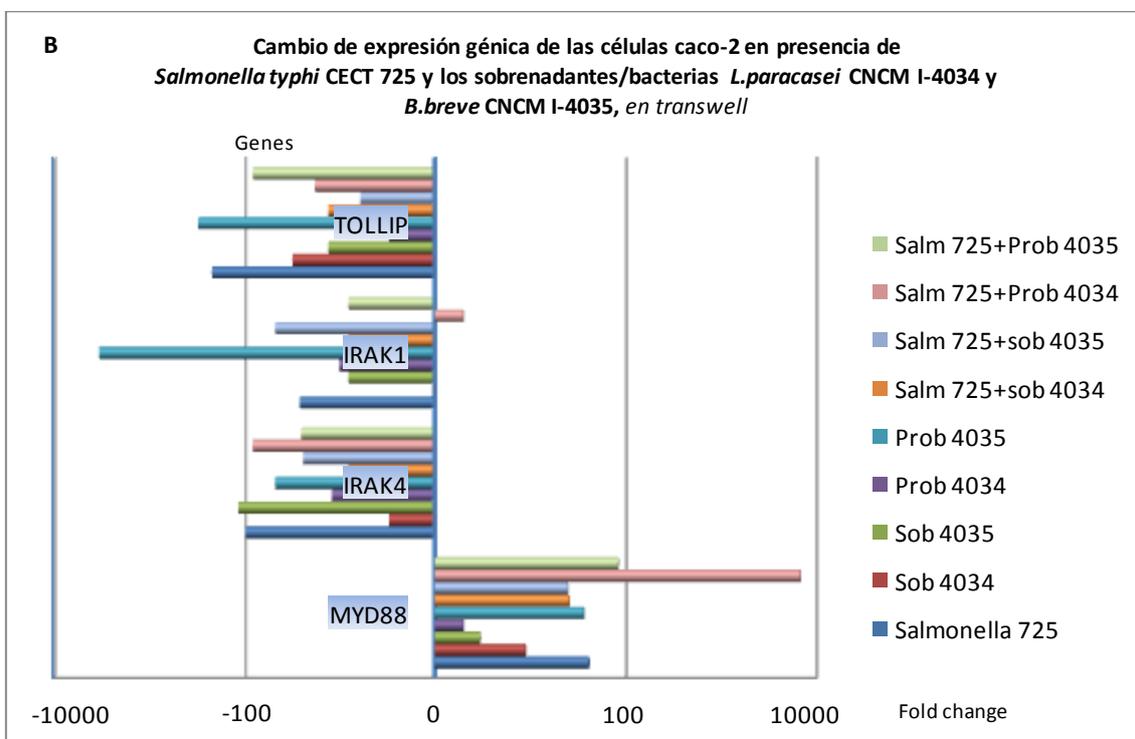
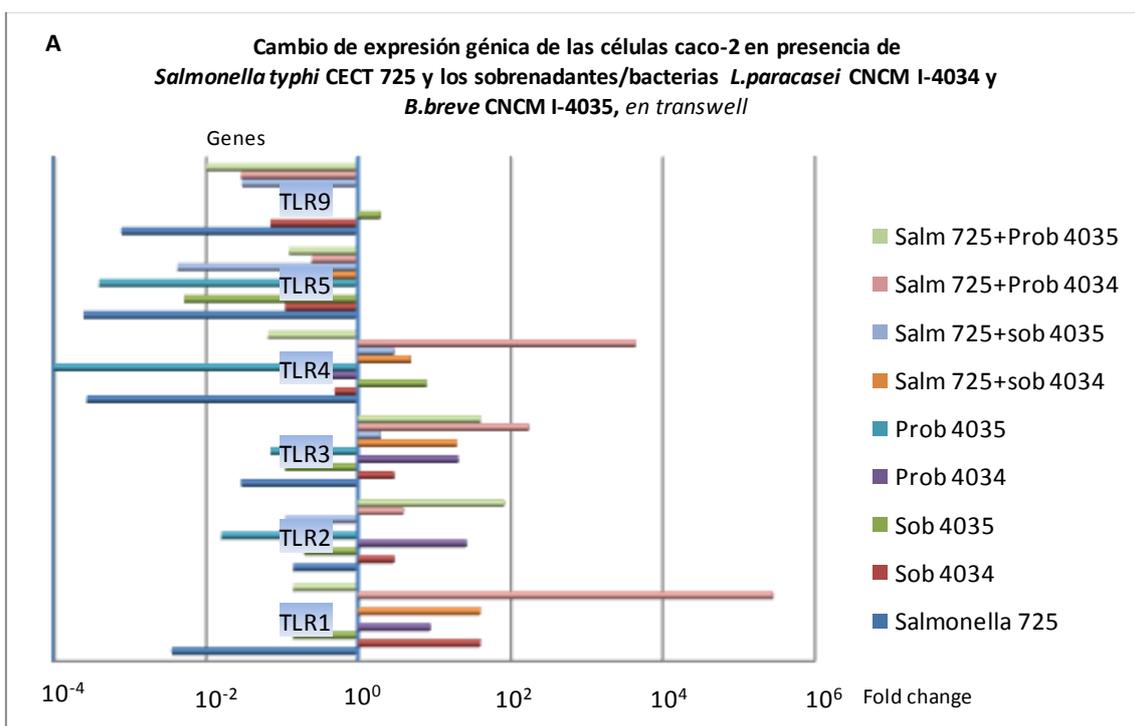
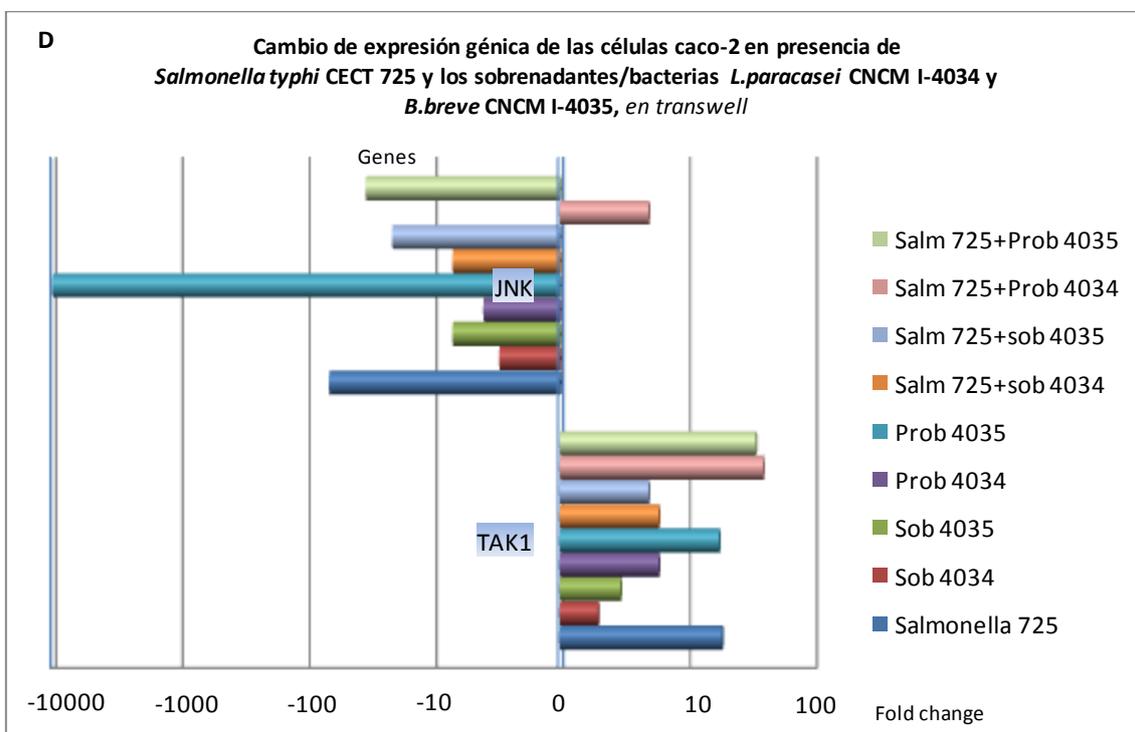
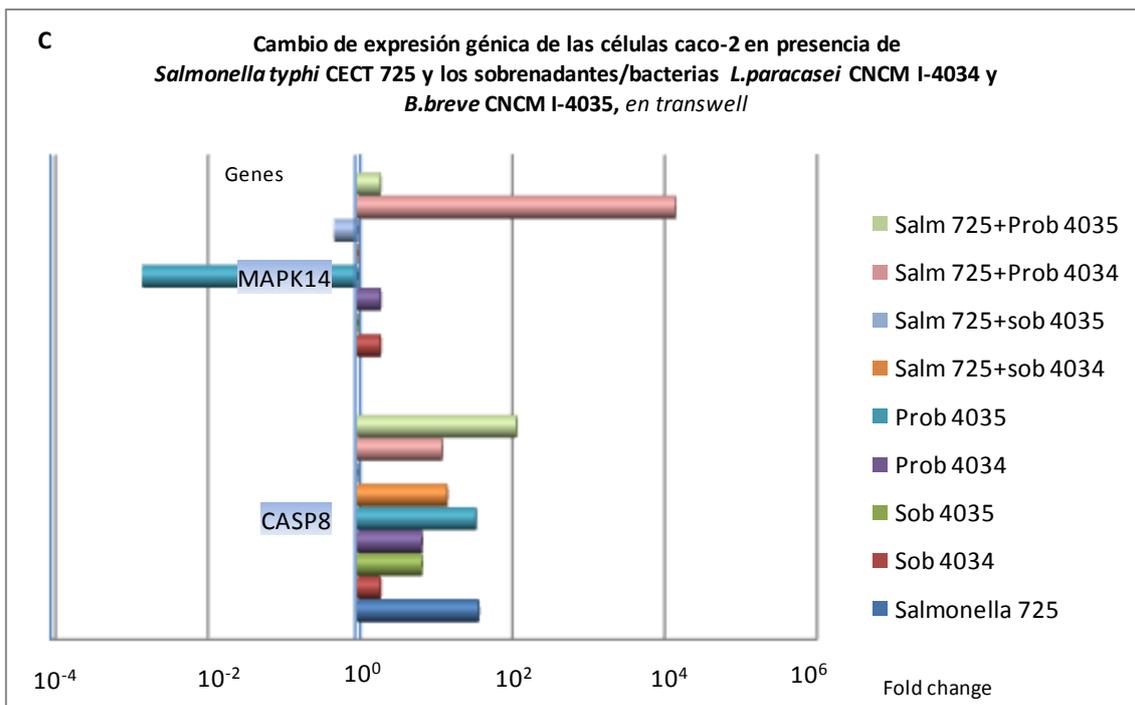


Figura 66. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes Toll-like receptors (*TLR*), *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1*, *NF-κBIA*, *TNF-α* e *IL-10*, de las células dendríticas (DC), co-cultivadas en *transwell* con células caco-2, estimuladas 4 h con *Salmonella typhi* CECT 725 y los sobrenadantes/bacterias probióticas *L.paracasei* CNCM I-4034 y *B.breve* CNCM I-4035.





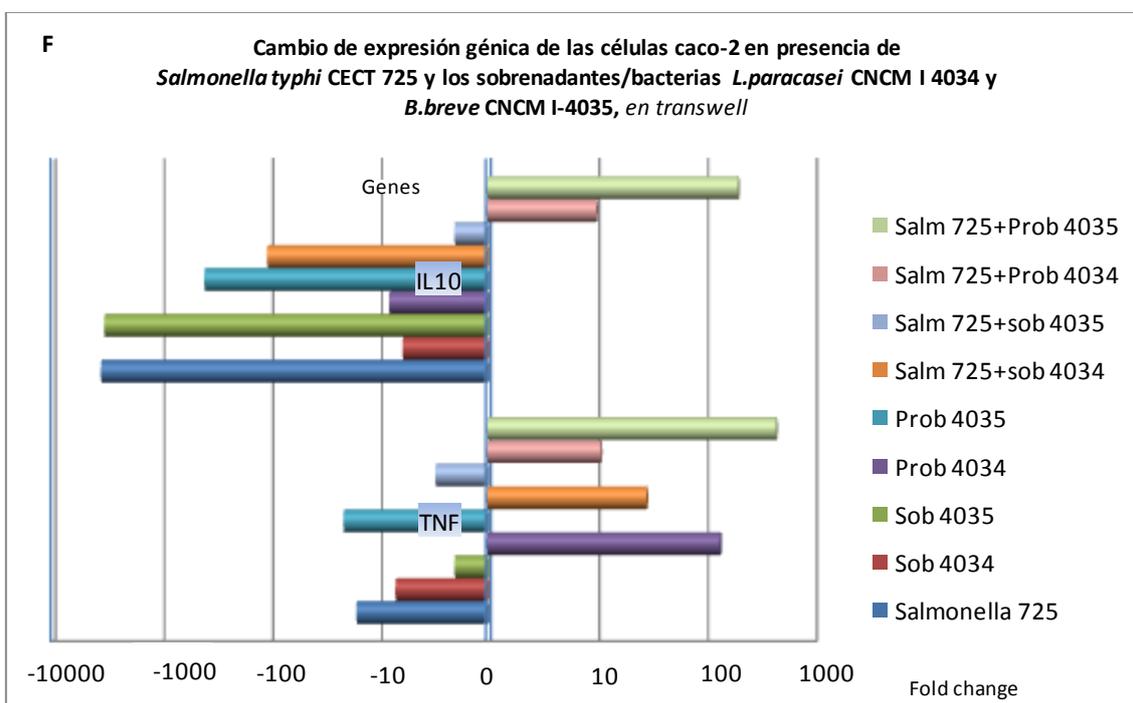
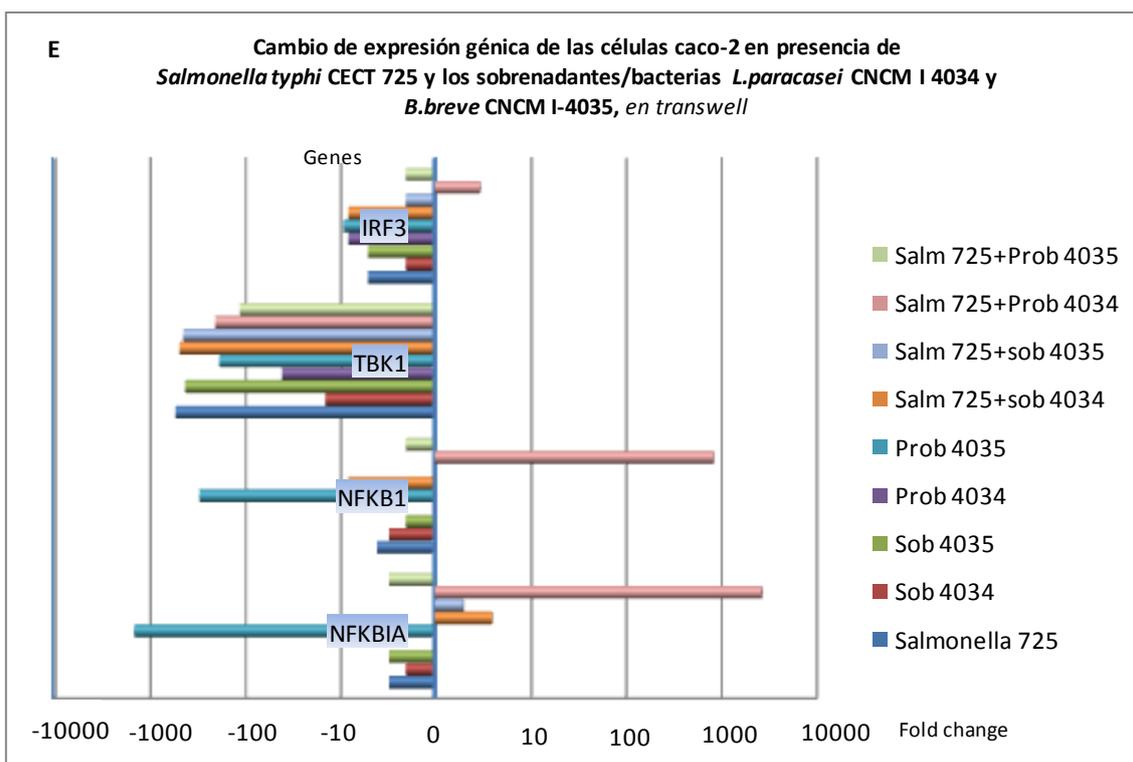


Figura 67. Valores de los cambios de expresión para los genes Toll-like receptors (TLR) (A); *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1* y *TOLLIP* (B); *CASP8* y *MAPK14* (C); *TAK1* y *JNK* (D); *TBK1*, *IRF3*, *NF- κ B1* e *NF- κ BIA* (E); y *TNF- α* e *IL-10* (F), de las células caco-2, co-cultivadas en *transwell* con las células dendríticas (DC), estimuladas 4 h con *Salmonella typhi* CECT 725 y los sobrenadantes/bacterias *L.paracasei* CNCM I-4034 y *B.breve* CNCM I-4035.

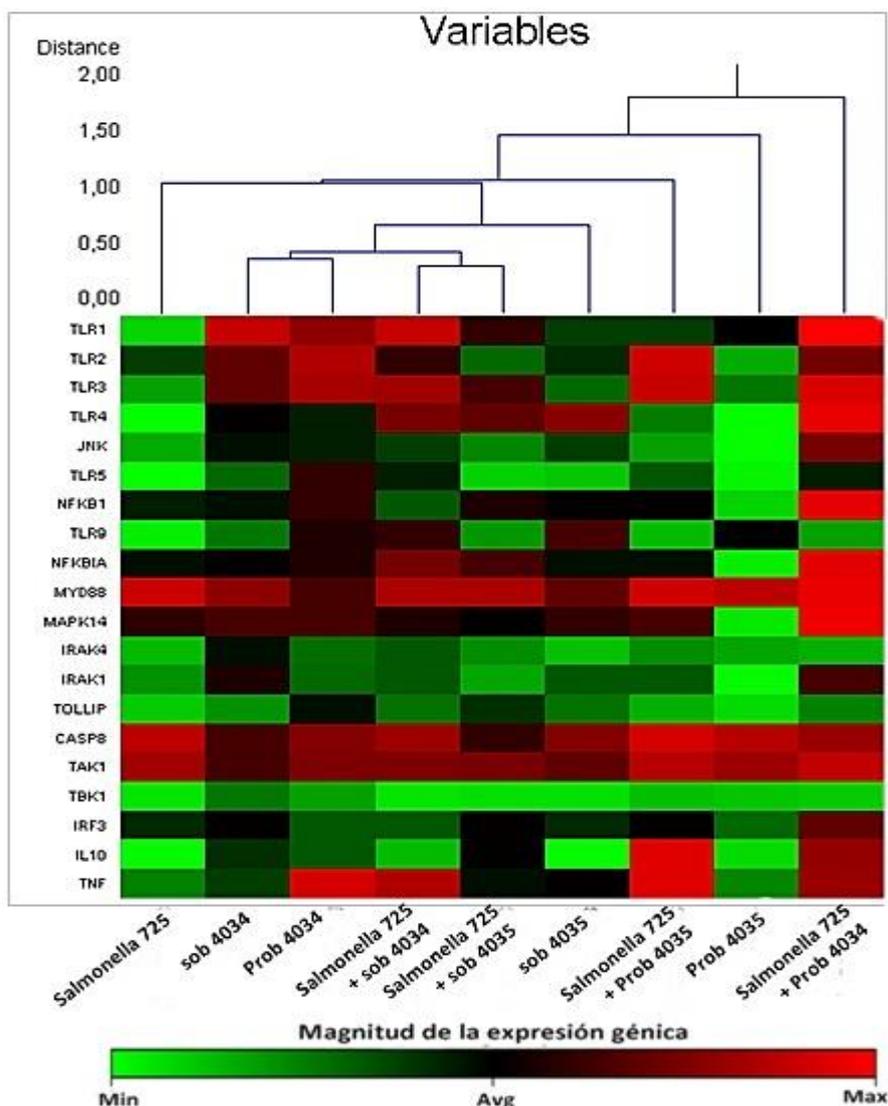


Figura 68. Visualización del *Heat Map* y dendrograma para los genes *Toll-like receptors (TLR)*, *MYD88*, *IRAK4*, *IRAK1*, *TOLLIP*, *CASP8*, *MAPK14*, *TAK1*, *JNK*, *TBK1*, *IRF3*, *NF-κB1*, *NF-κBIA*, *TNF-α* e *IL-10*, de las células caco-2, co-cultivadas en *transwell* con de las células dendríticas (DC), estimuladas 4 h con *Salmonella typhi* CECT 725 y los sobrenadantes/bacterias probióticas *L.paracasei* CNCM I-4034 y *B.breve* CNCM I-4035.

Experimento 3. Ensayo de proliferación de las células T

Los probióticos del género *Lactobacillus* estimulan la proliferación de las células T

El objetivo de este experimento es determinar la proliferación de las células T, en presencia de un número variable de células dendríticas, pre-tratadas con las cepas probióticas de estudio, es decir, *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036. La estimulación de las células dendríticas con los probióticos se realiza por un periodo de 4 horas.

Los resultados expresan el índice de estimulación de la proliferación de células T, calculado por el ratio de la absorbancia a 405 nm de las células pre-tratadas frente al control (células dendríticas y T sin tratar), utilizando un número variable de células dendríticas: 1000, 10000, 50000 y 100000 células dendríticas, y un número fijo de células T (100000 células T). Como control positivo se pre-trataron las células con fitohemaglutinina (PHA).

Las figuras 69-71 representan el índice de estimulación de cada probiótico. A la vista de los resultados, el probiótico *L.paracasei* CNCM I-4034 posee la mayor capacidad de estimulación de la proliferación de las células T (figura 69), alcanzando su máximo con el mayor número de células dendríticas en el medio. Resulta interesante destacar que, independientemente de la concentración de células dendríticas en el medio, la inducción de la proliferación de las células T es notablemente superior al control positivo en todos los casos.

Cuando se exponen las células dendríticas con el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036 (figura 71) la mayor estimulación de la proliferación de las células T se registra al alcanzar la concentración de 100000 células dendríticas, al igual que sucedía con *L.paracasei* CNCM I-4034.

El tratamiento previo de las células dendríticas con el probiótico *B.breve* CNCM I-4035 ejerce un débil efecto en la proliferación de las células T, siendo comparable al control positivo con el mayor número de células dendríticas ensayadas (figura 70). Sin embargo, en este caso, la variación del número de células dendríticas no provoca grandes diferencias en el índice de estimulación de la proliferación de las células T.

Finalmente, el análisis de los resultados, comparando los distintos tratamientos, arroja la idea que las bacterias del género *Lactobacillus* presentan una dinámica de estimulación de la proliferación de las células T similar, aunque la magnitud de este efecto es sensiblemente mayor cuando se utiliza *L.paracasei* CNCM I-4034.

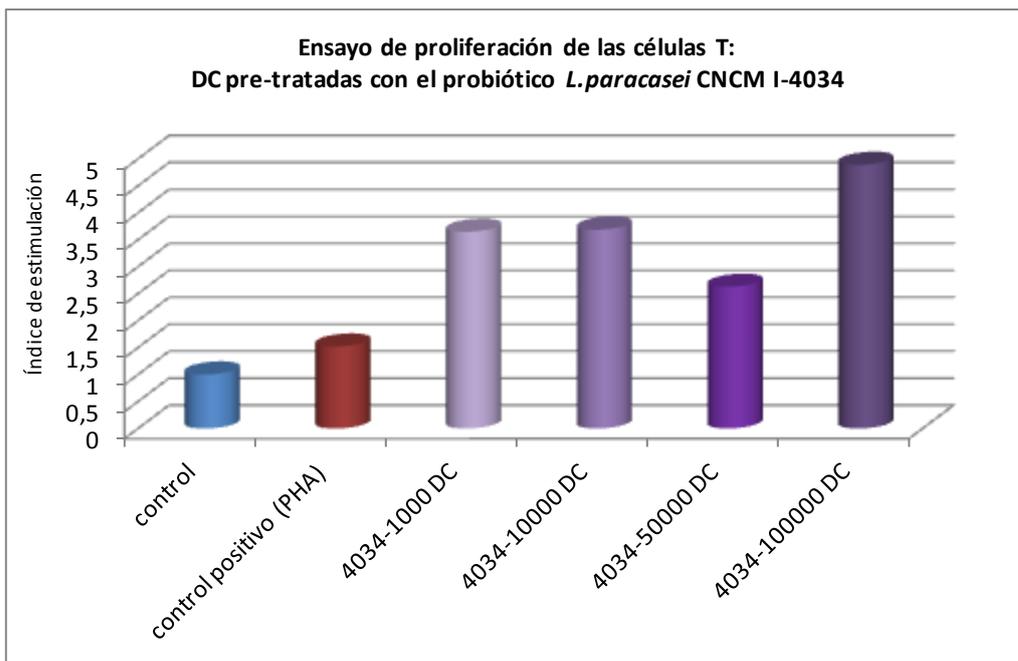


Figura 69. Ensayo de proliferación de las células T autólogas (TC), en presencia de un número variable de células dendríticas (DC) (1000, 10000, 50000 y 100000), pre-tratadas con el probiótico *L.paracasei* CNCM I-4034. Los valores expresan el índice de estimulación del tratamiento con respecto al control, células DC y TC sin tratar.

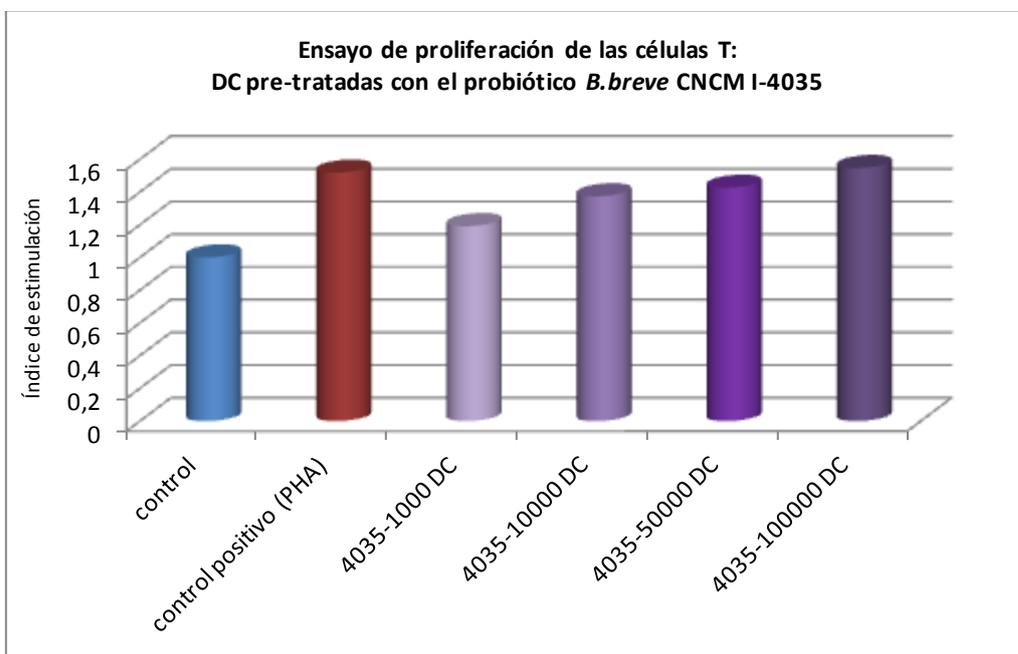


Figura 70. Ensayo de proliferación de las células T autólogas (TC), en presencia de un número variable de células dendríticas (DC) (1000, 10000, 50000 y 100000), pre-tratadas con el probiótico *B.breve* CNCM I-4035. Los valores expresan el índice de estimulación del tratamiento con respecto al control, células DC y TC sin tratar.

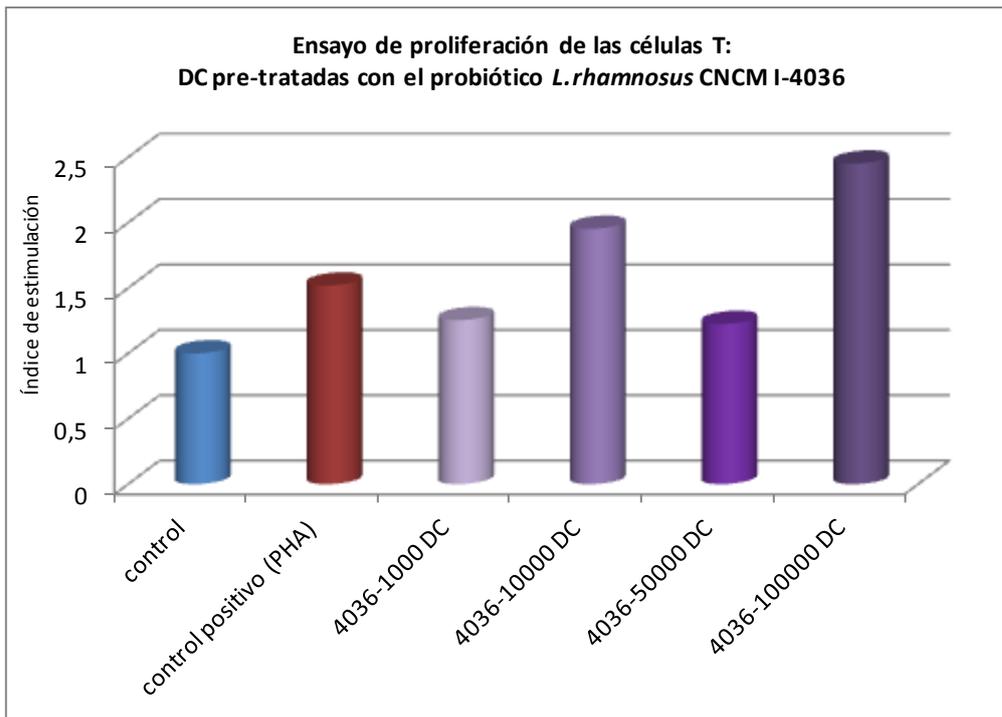


Figura 71. Ensayo de proliferación de las células T autólogas (TC), en presencia de un número variable de células dendríticas (DC) (1000, 10000, 50000 y 100000), pre-tratadas con el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036. Los valores expresan el índice de estimulación del tratamiento con respecto al control, células DC y TC sin tratar.



DISCUSIÓN

“La investigación consiste en ver todo lo que el resto ha visto y pensar lo que nadie antes ha pensado.”

Albert Szent Györgyi, Premio Nobel de Medicina en 1937

DISCUSIÓN

Para el correcto funcionamiento y defensa del organismo, es necesario que se establezca un equilibrio entre el sistema inmunitario y la microbiota intestinales (Van den Abbeele *et al.* 2011).

Los **probióticos** son microorganismos vivos que, ingeridos en cantidades suficientes, modulan o actúan sobre determinadas funciones del organismo, produciendo un efecto beneficioso, más allá del puramente nutricional, como contribuir al equilibrio de la microbiota intestinal del huésped y potenciar el sistema inmunitario (FAO, 2002). En los últimos años, se ha descrito que los probióticos poseen funciones semejantes a la microbiota residente, pudiendo modular los mecanismos de defensa inmunitarios innatos y adaptativos (Borchers *et al.* 2009). Algunas bacterias, pertenecientes principalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, presentes en alimentos fermentados, han demostrado su efecto probiótico ya que modulan el GALT potenciando la producción de Ig A, la prevención de algunas infecciones intestinales, el control de la respuesta inmunitaria inflamatoria y la reducción de niveles de factores promotores de tumores (Gobbato *et al.* 2008; De Moreno De LeBlanc *et al.* 2010).

El conocimiento profundo de los mecanismos moleculares por los cuales los probióticos interactúan con el sistema inmunitario intestinal y regulan la respuesta frente a enteropatógenos es aún desconocido y constituye el objetivo fundamental de esta tesis.

Los probióticos ensayados han sido *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036, aislados de las heces de niños alimentados exclusivamente con

leche materna. Las cepas patógenas seleccionadas pertenecen a las bacterias *Escherichia coli* y *Salmonella enterica*. Estos patógenos son responsables de la diarrea infecciosa, una de las principales causas de muerte infantil en países en desarrollo, especialmente durante el primer año de vida. Además, el género *Salmonella* puede producir un amplio rango de enfermedades, desde gastroenteritis hasta fiebres tifoideas tanto en niños como en adultos (Holoda *et al.* 2004; Köhler *et al.* 2009). Asimismo, las cepas patógenas de *E.coli* tienen especial interés ya que son la mayor causa de diarrea en humanos y animales (Vu-Khac *et al.* 2004).

Varios tipos celulares son vitales en el control de las respuestas inmunitarias intestinales y la conservación de la homeostasis intestinal: células epiteliales intestinales, células dendríticas y células T (Rescigno *et al.* 2008). Por esta razón, nuestro estudio se ha centrado en un modelo de células dendríticas humanas; co-cultivo de células dendríticas humanas y células epiteliales intestinales caco-2; y co-cultivo de células dendríticas humanas y células T autólogas.

Cabe destacar que es la **primera vez** que se realiza este tipo de estudio en este modelo celular, es decir, existen algunos trabajos en células dendríticas, pero la mayoría de ellos utilizan células mononucleares de sangre periférica (PBMC) o células dendríticas murinas. En nuestro afán por aproximarnos a la situación intestinal real y conocer en profundidad el mecanismo por el cual los probióticos son capaces de modular la respuesta inmunitaria frente a enterobacterias en el ser humano, hemos decidido utilizar células dendríticas de Langerhans humanas, obtenidas a partir de la sangre del cordón umbilical. Por todo ello, esta tesis es de especial relevancia y pionera, tanto por el modelo celular elegido como por los experimentos realizados, ya que aporta un nuevo enfoque en los trabajos hasta la fecha publicados de células dendríticas y probióticos. Además, otro aspecto novedoso es la utilización de *arrays*, o una matriz de genes, para evaluar los cambios de expresión génica, aportando una visión global de los mecanismos por los que los probióticos son capaces de inmunomodular la respuesta intestinal (Van Baarlen *et al.* 2011).

Contacto directo de células dendríticas, en presencia de probióticos y patógenos

Las células dendríticas son críticas en el inicio de la respuesta frente a bacterias, patógenas y comensales. En un estado inmaduro, estas células muestrean el microambiente, detectando la presencia de patógenos y liberando, en consecuencia, citoquinas y quimioquinas

para amplificar la respuesta inmunitaria. El papel regulador de las células dendríticas cobra vital importancia en el intestino, ya que el sistema inmunitario se encuentra íntimamente asociado a la microbiota residente, incluyendo bacterias ácido-lácticas (Rizzello *et al.* 2011). Por ello, nuestro primer estudio se ha centrado en conocer las interacciones de las células inmunitarias y los probióticos, así como el efecto que produce en ellos la presencia de enterobacterias.

Los resultados demuestran que los probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036 pueden modificar la liberación de citoquinas por parte de las células dendríticas, y que este cambio varía en función del patógeno y de la cepa probiótica, o de su sobrenadante, hecho que no es de extrañar ya que está ampliamente descrito que los efectos de los probióticos son altamente específicos y cepa-dependientes, por lo que diferentes cepas de la misma especie pueden ejercer distintos efectos en el hospedador (Aureli *et al.* 2011; Thomas & Versalovic, 2010).

Si analizamos los perfiles de citoquinas de las células dendríticas en presencia de los probióticos exclusivamente, llama extraordinariamente la atención que *B.breve* CNCM I-4035 es un potente inductor de IL-10, IL-12p40 y TNF- α . Esta respuesta coincide con lo publicado por otros autores que describen que la mayoría de cepas de *Bifidobacterium* estimulan la producción de IL-10, y, algunas son capaces de estimular IL-12 y TNF- α , siguiendo el mismo patrón que las bacterias *Gram* negativas, tal y como es nuestro caso (Borchers *et al.* 2009). Se ha sugerido que el alto contenido de citosina y guanina (CG) de las especies pertenecientes al género *Bifidobacterium*, que ronda el 60%, favorece la producción de IL-10 (Medina *et al.* 2007). Además, en consonancia con otros trabajos, no estimula IL-12 p70, efecto característico de las bifidobacterias (Weiss *et al.* 2011). Asimismo, el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036 manifiesta el mismo comportamiento, descrito también por otros autores para *L.plantarum* (Van Baarlen *et al.* 2009), pero no así *L.paracasei* CNCM I-4034, también de acuerdo con Mileti *et al.* (2009). Nuestros resultados muestran, y tal y como se ha publicado, que las cepas del género *Lactobacillus* presentan una gran heterogeneidad en la inducción de citoquinas en células dendríticas, mientras que las del género *Bifidobacterium* siguen un patrón más uniforme (Evrard *et al.* 2011).

Cuando se estimulan las células dendríticas y el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036 disminuye la mayoría de las citoquinas estudiadas en presencia de *E.coli*, CEC 515 o CECT 729, mientras que frente al género *Salmonella* no es capaz de limitar la secreción. Estos resultados coinciden con Mileti *et al.* (2009), que indica que *L.rhamnosus* GG en términos de activación de

las células dendríticas presenta un patrón similar a *Salmonella*. Si lo comparamos con su sobrenadante, éste es capaz de disminuir notablemente todas las citoquinas.

Por otra parte, el probiótico *B.breve* CNCM I-4035 no manifiesta ningún efecto en presencia de *Salmonella typhi* CECT 725, aunque resulta interesante destacar que su sobrenadante sí es capaz de producir una disminución importante en la mayoría de citoquinas, a excepción de TNF- α . Si nos fijamos en la liberación de IL-12p40, esta citoquina disminuye con todos los tratamientos ensayados, a excepción de *B.breve* CNCM I-4035 en presencia de *Salmonella typhi*. Este detalle era previsible ya que está descrito que la inducción de IL-12 se correlaciona fuertemente con la producción de TNF- α (Weiss *et al.* 2011).

Asimismo, el probiótico *L.paracasei* CNCM I-4034 disminuye drásticamente la producción de todas las citoquinas en presencia del género *Salmonella*, al igual que su sobrenadante, en consonancia con lo publicado por Mileti *et al.* (2009).

Si se analizan los resultados obtenidos, se observa claramente que la exposición de las células dendríticas a los patógenos y los probióticos de estudio, origina la liberación de TGF- β , citoquina anti-inflamatoria, pero esta secreción varía en función del probiótico. Así, *L.paracasei* CNCM I-4034 promueve la estimulación de TGF- β 2, mientras que *B.breve* CNCM I-4035 produce la liberación de TGF- β 1. Por su parte, *L. rhamnosus* CNCM I-4036 es capaz de aumentar notablemente la secreción de TGF- β 1 y TGF- β 2, en presencia de *E.coli* y *Salmonella typhimurium*. En cambio, los sobrenadantes de los probióticos aumentan la liberación de TGF- β 1. Es bien conocido que el TGF- β 1 juega un papel importante en la prevención de patologías y el control de la homeostasis intestinal (Coomes & Maloy, 2007). Por tanto, el aumento de la secreción de TGF- β 1 producido por la estimulación de los probióticos en células dendríticas podría ser un mecanismo por el cual los probióticos ejercen efectos anti-inflamatorios y contribuyen al desarrollo de inmunotolerancia. De hecho, se ha sugerido que este factor de crecimiento es clave en la maduración de células Th3 de carácter tolerogénico (Mesquita Júnior *et al.* 2010; Gómez-Llorente *et al.* 2010).

Finalmente, resulta paradójico que así como todos los sobrenadantes exhiben una extraordinaria capacidad de reducir los niveles de IL-6 en presencia de los patógenos, los probióticos *L.rhamnosus* CNCM I-4036 y *B.breve* CNCM I-4035, aunque no *L.paracasei* CNCM I-4034, no son capaces de disminuir su liberación. Además, la estimulación de IL-6 por parte de estos dos probióticos es patente en ausencia de patógenos. Esta circunstancia coincide con varios trabajos publicados en los cuales se apunta que los lactobacilos y bifidobacterias son potentes inductores de IL-6 en células dendríticas murinas y que las bacterias ácido-lácticas

muestran perfiles diferentes de citoquinas en respuesta a la estimulación (Weiss *et al.* 2011). Además, también se ha descrito que, tras la infección con *Salmonella typhimurium*, *L.casei* CRL 431 mantiene la expresión de IL-6 en el intestino delgado, incluso días después de la incubación (Castillo *et al.* 2011).

Analizando conjuntamente todos los resultados, se observa que los sobrenadantes presentan mayor capacidad en la regulación de las citoquinas en respuesta a enteropatógenos. Estos datos sugieren que las bacterias probióticas liberan algún tipo de factor de naturaleza desconocida de tipo antibacteriano, probablemente bacteriocinas, ya que en ausencia de enterobacterias los sobrenadantes no producen grandes cambios en el perfil de citoquinas liberadas por parte de las células dendríticas. Además, es importante señalar que estos sobrenadantes están concentrados diez veces, pero también, y por la misma razón, cualquier tipo de sustancia que exista en el medio de crecimiento, por tanto, sería asumible que el sobrenadante presentara una mayor actividad, como es el caso. Se descarta que la causa de esta inhibición sea compuestos ácidos, como ácido láctico o acético, productos derivados de su crecimiento, ya que los sobrenadantes utilizados se neutralizaron a pH 7.0.

Para conocer en profundidad el mecanismo por el que los probióticos inducen esta disminución de citoquinas pro-inflamatorias y regulan la respuesta inflamatoria es necesario analizar la vía de los receptores tipo *Toll* (TLR). La estimulación de los TLR genera señales intracelulares que desencadenan la activación de distintos factores de transcripción, entre los que se encuentra el NF- κ B, que induce la expresión de distintas citoquinas y quimioquinas (Thomas & Versalovic, 2010; Lakhdari *et al.* 2010). Es importante señalar que, al igual que en el caso anterior, los probióticos pueden regular de forma diferente la expresión de los TLR y de sus adaptadores, pudiendo manifestar efectos opuestos, pro- y anti-inflamatorios (Lavelle *et al.* 2010).

Nuestros resultados revelan que los probióticos o sus sobrenadantes, en presencia de las enterobacterias, expresan de forma muy marcada TLR9. De forma similar, varios trabajos describen un aumento de la expresión del TLR9 cuando se administran probióticos, como *L.johnsonii* y *L.casei* (Kingma *et al.* 2011; Castillo *et al.* 2011). Además, recientemente se ha propuesto que la estimulación apical de TLR9 en células epiteliales intestinales conduce a un estado de mayor vigilancia inmunológica (Kingma *et al.* 2011).

Un análisis en profundidad de los resultados pone de manifiesto que, en términos de magnitud, el cambio de expresión génica a nivel del *TLR9* es notablemente superior cuando se utilizan los sobrenadantes, del orden de cien veces más, que con los probióticos. En este

sentido, no hay que olvidar que los sobrenadantes son más efectivos en la disminución de las citoquinas pro-inflamatorias estudiadas, que los propios probióticos. Por todo ello, estos resultados parecen reflejar que el nivel de expresión de este TLR es determinante para la regulación de las citoquinas pro-inflamatorias, y coincide con Lavelle *et al.* (2010) que indica que este TLR es necesario para mediar en el efecto anti-inflamatorio inducido por los probióticos.

Por otra parte, y de manera esperable, los probióticos son capaces de activar la expresión de *TLR2*, ya que este TLR reconoce peptidoglicano, componente principal de las bacterias *Gram* positivas, como el género *Lactobacillus*. Por esta razón, no sorprende que la mayor activación se produzca en presencia de *L.rhamnosus* CNCM I-4036. Un efecto similar ha sido descrito por otros autores con los probióticos *L.rhamnosus* GG y *L.plantarum* BFE 1685, que aumentan la expresión de *TLR2* en células epiteliales humanas (Vizoso Pinto *et al.* 2009), y *L.casei* CRL 431, en un estudio de ratones (Castillo *et al.* 2011). Recientemente, Weiss *et al.* (2010) ha descrito que este TLR desempeña un papel fundamental en la estimulación de células dendríticas y macrófagos en presencia de bacterias pertenecientes al género *Lactobacillus*.

En consonancia con varios trabajos, nuestros resultados sugieren que los probióticos incrementan la expresión de los *TLR2* y *TLR9*, activando la inmunidad innata (Kim *et al.* 2006; Tao *et al.* 2006; Vizoso Pinto *et al.* 2009; Voltan *et al.* 2007). La estimulación de *TLR2* parece que además potencia la barrera epitelial, ya que se ha demostrado que la activación de este TLR desempeña un papel importante en la resistencia frente a la invasión bacteriana (Abreu *et al.* 2005).

En general, analizando la expresión de los todos los genes estudiados, es importante señalar que la intensidad del cambio es sustancialmente mayor en presencia de los sobrenadantes que de las bacterias probióticas, por lo que, y acorde con los resultados de citoquinas obtenidos, demuestra que los sobrenadantes tienen mayor actividad, o lo que es lo mismo, mayor capacidad en la modulación de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por parte de las células dendríticas en respuesta a los patógenos. Quizás, lo más revelador es el hecho de que los sobrenadantes libres de células, debido a la existencia de algún factor secretado por los probióticos, presente en el medio, sean capaces de inducir cambios en la expresión génica del intestino, siendo responsables en parte del efecto beneficioso de los probióticos, tal y como apuntan otros autores (Huang & Zheng, 2010; Imaoka *et al.*, 2008; Putaala *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2007). De igual forma, los resultados coinciden

con lo publicado por Adams (2010), que indica que las bacterias probióticas vivas influyen en la respuesta inmunitaria intestinal, mientras que componentes de éstas ejercen efectos anti-inflamatorios en el tracto gastrointestinal.

Si se comparan los niveles de expresión génica mediados por los sobrenadantes, se observa que el de la bacteria *L.rhamnosus* CNCM I-4036 es el que induce una mayor expresión de todos los genes implicados en la ruta estudiada, lo que, a tenor de los resultados encontrados para la secreción de citoquinas, sugiere que es el que confiere una mayor actividad. De igual forma, si se comparan los probióticos, resulta interesante destacar que esta bacteria, *L.rhamnosus* CNCM I-4036, es también la que, en niveles de intensidad, produce una mayor expresión de los genes estudiados, lo que corrobora que sea la que genera la mayor inhibición de las citoquinas liberadas en respuesta a la inflamación. Además, esta bacteria es la que produce la mayor liberación de TGF- β , citoquina anti-inflamatoria. *L.rhamnosus* CNCM I-4036, tanto la bacteria como su sobrenadante, es el que produce la mayor estimulación del TLR9, por lo que, como ya se ha mencionado, indica que este TLR es necesario para mediar en el efecto anti-inflamatorio inducido por los probióticos (Lavelle *et al.* 2010). Finalmente, comparando los efectos entre patógenos, los datos muestran que este probiótico es más activo en presencia de *E.coli* que de *Salmonella*, hecho que no extraña ya que produce una mayor expresión de TLR9, que se correlaciona con el patrón de citoquinas observado.

Co-cultivo de células dendríticas y caco-2, en presencia de probióticos y patógenos

El análisis de los perfiles de citoquinas y expresión génica producidos por las células dendríticas en presencia de los probióticos y bacterias patógenas proporciona una información muy interesante, pero si se desea conocer el mecanismo por el cual los probióticos participan en la respuesta inmunitaria ejerciendo efectos beneficiosos en el hospedador es necesario diseñar estudios adicionales. En nuestro afán por aproximarnos a la situación intestinal real, hemos simulado un sistema que simplifica la mucosa intestinal en tres elementos fundamentales: células dendríticas, células epiteliales intestinales caco-2 y bacterias. Para ello, se ha utilizado un modelo tipo *transwell*, en el que las células dendríticas humanas se cultivan en el lado basolateral, mientras que en el lado apical se cultivan las células epiteliales caco-2 y bacterias. Está suficientemente descrito que la interacción de células epiteliales intestinales y células dendríticas juega un papel crucial en la regulación de la homeostasis intestinal (Zoumpopoulou *et al.* 2009); por ello, la exposición de este modelo celular a los distintos

probióticos y enteropatógenos aporta un nuevo enfoque de la función de los probióticos y su efecto en la respuesta inmunitaria intestinal, objetivo primordial de esta tesis.

Es bien sabido que las células dendríticas humanas, derivadas de monocitos aislados de sangre periférica no poseen las mismas propiedades que las células dendríticas de la mucosa (Kellsal & Rescigno, 2004). Actualmente, los trabajos publicados utilizan células dendríticas humanas derivadas de monocitos o células dendríticas murinas. Por ello, nuestro modelo, en el que las células dendríticas utilizadas son células de Langerhans humanas, le confiere especial relevancia a esta tesis, ya que se asemeja a la situación real y puede aclarar los mecanismos por los que los probióticos, células inmunitarias y células epiteliales participan en la respuesta inmunitaria intestinal, hasta ahora desconocidos.

Si se analizan los perfiles de citoquinas liberadas de forma conjunta por células dendríticas y caco-2 en presencia de los probióticos y enterobacterias, los resultados globales muestran que todos los tratamientos aumentan la secreción de IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12p40 y TNF- α , aunque de distinta forma según el tratamiento empleado.

El uso del sobrenadante perteneciente a la bacteria *L.paracasei* CNCM I-4034 en presencia de *Salmonella typhi* CECT 725 es el que menor efecto tiene en la liberación de citoquinas, afectando exclusivamente a la secreción de IL-6 e IL-8. Por otra parte, el sobrenadante de *L.rhamnosus* CNCM I-4036 en presencia de *E.coli* CECT 742 aumenta al doble la liberación de todas las citoquinas pro-inflamatorias, mientras que el sobrenadante de *B.breve* CNCM I-4035 frente a *Salmonella typhi* CECT 725 parece ser el más activo, incrementando notablemente la producción de todas las citoquinas estudiadas. Además, este sobrenadante es el que genera la mayor liberación de IL-10, incluso en comparación con los probióticos.

El probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036, en presencia de los distintos patógenos, *E.coli* y *Salmonella typhimurium*, origina patrones similares en la secreción de citoquinas por parte de las células dendríticas y caco-2. En todos los casos, aumentan las citoquinas pro-inflamatorias, sobre todo, IL-6 y TNF- α . Además, los valores de liberación de las citoquinas son muy semejantes a los producidos por el probiótico *B.breve* CNCM I-4035 en presencia de *Salmonella typhi* CECT 725. Por su parte, el probiótico *L.paracasei* CNCM I-4034 muestra una dinámica variable en la liberación de citoquinas por parte de las células dendríticas y caco-2 en función del patógeno utilizado. Así, cuando *Salmonella typhi* CECT 725 está presente en el medio produce una liberación de todas las citoquinas pro-inflamatorias similar a la producida por el probiótico *B.breve* CNCM I-4035 con esta misma bacteria. Sin embargo, cuando

interacciona con *Salmonella typhimurium* CECT 4594 sólo ejerce su acción sobre la secreción de IL-6 e IL-8, además de RANTES/CCL5. Este patrón diferencial no sorprende ya que no puede olvidarse que los efectos que se observan son altamente específicos y cepa-dependientes, por lo que no se debe asumir que todas las cepas de una especie bacteriana comparten los mismos efectos (Thomas & Versalovic, 2010).

Valorando exclusivamente los resultados de las citoquinas, resulta destacable que la variación en el perfil de citoquinas producida por los sobrenadantes es sustancialmente inferior a la de los probióticos, detalle que no ocurría en el experimento 1. Otro hecho que llama poderosamente la atención es que los patógenos no producen un aumento importante en la liberación de citoquinas, como sería previsible, comportándose igual que los sobrenadantes de los probióticos.

Para poder interpretar estos resultados es necesario analizar la expresión génica de la cascada de señalización de los TLR, ya que como se ha mencionado anteriormente, estos receptores detectan determinados patrones en bacterias y generan señales intracelulares que activan a distintos factores de transcripción, entre los que se encuentra NF- κ B, que culminan con la expresión de determinadas citoquinas y quimioquinas (Thomas & Versalovic, 2010).

La exposición del sistema *transwell* a enterobacterias produce una expresión diferencial en los dos tipos celulares. Mientras en las células dendríticas aumenta extraordinariamente la expresión de TLR9, al igual que ocurría en el experimento 1, en las células caco-2 se inhibe la expresión de este gen. De hecho, es interesante destacar que en las células caco-2 la expresión de todos los TLR en presencia de los patógenos está reprimida, a excepción de *E.coli* CECT 515 y CECT 729 que inducen la expresión de *TLR4*. Este TLR es capaz de reconocer LPS, presente en la pared de bacterias *Gram* negativas (Lavelle *et al.* 2010). De igual forma, las células caco-2 regulan a la baja la expresión del gen *TOLLIP*, mientras que aumentan la expresión de *CASP8* y *MYD88*, en presencia de las enterobacterias estudiadas. Por su parte, las células dendríticas presentan una expresión leve/moderada de estos genes. Un efecto similar se observa si se analiza la expresión del gen *IL-10*, ya que mientras las células dendríticas tienen su expresión fuertemente activada, las células caco-2 manifiestan una notable represión de este gen, a excepción de cuando están en presencia *E.coli* CECT 515.

Cuando se estimulan las células dendríticas y caco-2 exclusivamente con los sobrenadantes probióticos la expresión diferencial sigue siendo patente. En las células dendríticas, se observa un aumento muy marcado de la expresión de *TLR9*, mientras que en las células caco-2 este gen se encuentra inhibido. Como ya se ha mencionado, varios trabajos

describen un aumento de la expresión del *TLR9* cuando se administran probióticos, como *L.johnsonii* y *L.casei*, y sugieren que la estimulación de este TLR confiere resistencia frente a una gran variedad de virus, bacterias y patógenos (Kingma *et al.* 2011; Castillo *et al.* 2011). Además, la expresión del *TLR9* es necesaria para mediar el efecto anti-inflamatorio de los probióticos (Lavelle *et al.* 2010). A la vista de los resultados, los sobrenadantes *L.paracasei* CNCM I-4034 y *B.breve* CNCM I-4035 ejercen un efecto similar en la regulación de los genes de la cascada de los TLR. Por otro lado, si los comparamos con el sobrenadante de *L.rhamnosus* CNCM I-4036, éste muestra la mayor capacidad en términos de niveles de expresión génica, siendo notablemente superior si se considera la magnitud del cambio. Si se cotejan estos resultados con el patrón de citoquinas, se observa claramente que los sobrenadantes interactúan con las células dendríticas y caco-2, por los valores de expresión génica, pero en ausencia de patógenos no las inducen a producir ninguna citoquina.

De forma previsible, la exposición del co-cultivo de células dendríticas y caco-2 a los probióticos o sus sobrenadantes en presencia de *E.coli* o *Salmonella* desencadena una desmesurada expresión de *TLR9* a nivel de células dendríticas, y su inhibición en las células caco-2. Este resultado, y tal y como se ha publicado, indica que la inducción de citoquinas depende fuertemente de la expresión de este TLR (Plantinga *et al.* 2011). Además, se observan incrementos importantes a nivel del *TLR5*, *TLR4* y *TLR2*. El *TLR5* es un mediador clave en las respuestas pro-inflamatorias frente a la flagelina de bacterias patógenas y comensales. Varios trabajos han demostrado que la administración de lactobacilos incrementa la expresión de este TLR en respuesta a *Salmonella* (Vizoso Pinto *et al.* 2009; Castillo *et al.* 2011). Además, está descrito que la flagelina activa la ruta de las MAP-quinasas en células epiteliales intestinales (Zanello *et al.* 2011). Por otra parte, como ya se ha mencionado, el *TLR4* es capaz de reconocer LPS, presente en la pared de bacterias Gram negativas (Lavelle *et al.* 2010) y juega un papel fundamental en la defensa frente a *Salmonella* (Castillo *et al.* 2011). El *TLR2*, en cambio, reconoce peptidoglicano, componente fundamental de la pared de bacterias Gram positivas, como el género *Lactobacillus*. Su activación no sólo afecta a la liberación de citoquinas, sino que además se ha descrito que potencia la función de barrera del epitelio intestinal, ya que aumenta la resistencia transepitelial frente al ataque de patógenos (Abreu *et al.* 2005).

Con el fin de poder establecer una posible interpretación, combinando los perfiles de citoquinas y los cambios de expresión génica, a continuación se analizan los resultados expuestos en función del sobrenadante o la bacteria probiótica utilizada.

Por una parte, atendiendo tanto a los cambios de expresión génica como a las citoquinas cuando se tratan las células con los sobrenadantes procedentes de los probióticos, en presencia o ausencia de enterobacterias, resulta sorprendente que **los sobrenadantes sólo manifiestan su actividad, traducida en expresión de citoquinas, en respuesta a patógenos**. Es decir, aunque los sobrenadantes produzcan un cambio de expresión diferencial de los genes involucrados en la respuesta inmunitaria, no inducen la producción de citoquinas, pro- o anti-inflamatorias. Este hallazgo es absolutamente relevante por distintos motivos, detallados a continuación.

Por una parte revela que los probióticos utilizados en el presente trabajo producen alguna sustancia de naturaleza desconocida, liberada al medio, que estimula la respuesta inmunitaria innata sólo en presencia de patógenos (Mileti *et al.* 2009), ya que activa la expresión de los *TLR9*, *TLR5*, *TLR4* y *TLR2*, que se traduce en un aumento de la producción de las citoquinas estudiadas. Por tanto, los sobrenadantes de los probióticos potencian la respuesta inmunitaria a través de un mecanismo mediado por la ruta de señalización de los TLR, que modula la inflamación inducida por patógenos (Yan & Polk, 2011). Otro aspecto importante es que ni las células dendríticas ni las caco-2 reconocen nuestros sobrenadantes como patogénicos, ya que no liberan citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a ellos. Finalmente, y quizás el hallazgo más importante, es que estos sobrenadantes, exentos de células, presentan enormes ventajas clínicas frente al uso de bacterias vivas, ya que tienen una vida media larga y son más seguros, por lo que pueden administrarse a sistemas inmunitarios deprimidos, sin riesgo para la salud del paciente (Adams, 2010). Todos estos beneficios hacen que estos sobrenadantes tengan especial interés desde el punto de vista clínico y puedan usarse con fines terapéuticos, ya que son capaces de inhibir la acción de *E.coli* y *Salmonella*. Esta capacidad antibacteriana ha sido descrita por nuestro grupo de investigación mediante ensayos de competencia en medio líquido, demostrando que los sobrenadantes inhiben a cepas de *E.coli* y *Salmonella* de manera altamente específica y dependiente de cepa. Aunque estos resultados aún no han sido publicados, se encuentran recogidos en la patente derivada del aislamiento de las cepas probióticas, a partir de las heces de niños alimentados exclusivamente con leche materna, e identificadas como especies nuevas por el Instituto Pasteur (Vieites *et al.* PCT AX090006WO; Bermúdez-Brito *et al.* 2011).

Como se ha mencionado, el sobrenadante de *B.breve* CNCM I-4035 es el más activo en la producción de citoquinas por parte de las células dendríticas y caco-2, en presencia de *Salmonella*. Estos resultados concuerdan con los datos obtenidos por Hoarau *et al.* (2006), que describe que el sobrenadante de *B.breve* modula la actividad de las células dendríticas

incrementando la producción de IL-10 e IL-12, por un mecanismo asociado a la estimulación del TLR2. Este autor sugiere que las células dendríticas manifestarían un perfil regulador, que controlaría el balance de la respuesta Th1/Th2.

Cabe remarcar que este efecto inmunomodulatorio de los sobrenadantes sólo se observa en presencia de patógenos. Por ello, y tal como apuntan varios autores, parece que es necesario el uso de bacterias probióticas intactas para regular la producción de citoquinas por las células dendríticas (Putala *et al.* 2010; Taverniti & Guglielmetti, 2011).

Por otra parte, si nos detenemos a nivel de los probióticos, tanto en presencia como en ausencia de patógenos, exhiben un patrón de citoquinas similar, siendo *B.breve* CNCM I-4035 el que produce un efecto más leve y *L.rhamnosus* CNCM I-4036 el más activo. A priori, estos resultados parecen contradictorios a tenor de lo observado en el primer experimento ya que sería previsible que los probióticos disminuyeran las citoquinas pro-inflamatorias en presencia de enterobacterias. Sin embargo, en un análisis profundo, los valores de citoquinas son muy similares a los obtenidos anteriormente en cultivos de células dendríticas exclusivamente, aunque en este caso la diferencia radica en que los patógenos no exhiben ese patrón. Por eso, parece que aumentan las citoquinas inflamatorias, cuando realmente no es así. Por tanto, y en virtud de los resultados, **la activación de las células dendríticas es la responsable del patrón de citoquinas observado** y, por tanto, las que poseen un papel determinante en la respuesta inmunitaria intestinal.

Como se ha descrito, un aspecto que llama la atención es que la presencia de los patógenos no genera un patrón de citoquinas típico, es decir, un aumento de las citoquinas inflamatorias, tal y como ocurría en el experimento 1 y de acuerdo con lo publicado por otros autores en un sistema tipo *transwell* (Vossenkämper *et al.* 2010; Zoumpopoulou *et al.* 2009), aunque no hay que olvidar que ninguno de ellos ha utilizado el mismo tipo celular que nosotros. A tenor de lo observado en el primer experimento, las células dendríticas responden aumentando considerablemente las citoquinas inflamatorias en respuesta a patógenos en contacto directo. Además, nuestro grupo ha realizado experimentos previos en células epiteliales intestinales caco-2 y los mismos tratamientos, dando como resultado el mismo patrón, es decir, las células caco-2 liberan IL-8 y TNF- α en respuesta a *E.coli* y *Salmonella* (Vieites *et al.* PCT AX090006WO; Muñoz *et al.* 2011). Por todo ello, los resultados sugieren que la membrana de células epiteliales intestinales caco-2 actúa como barrera e impide que los patógenos la atraviesen y activen a las células dendríticas, que sólo manifiestan actividad si alguna de ellas se adhirió a la membrana y contacta directamente con el patógeno (Rimoldi *et*

al. 2006). Otro detalle que corrobora esta hipótesis es el hecho de que en presencia de los patógenos no se libera ninguna citoquina típicamente de células dendríticas, como CCL2 o CCL3, por tanto, esto indica que los patógenos no son capaces de cruzar la membrana y activar a las células dendríticas (Zoumpopoulou *et al.* 2009). En este sentido, serían las células epiteliales intestinales caco-2 las únicas responsables del patrón de citoquinas que observamos en presencia de patógenos, lo que explicaría que el incremento no sea del orden esperado, ya que, como se ha discutido, las células dendríticas no estarían activas. Asimismo, en otro trabajo, Rimoldi *et al.* (2005b), describe que las células epiteliales intestinales en presencia de patógenos liberan factores que estimulan la activación de las células dendríticas, pero que depende de la invasividad bacteriana, lo que reitera la idea que los patógenos estudiados no son capaces de penetrar la membrana de células caco-2. Además, y de acuerdo a los resultados de expresión génica, parece que las células epiteliales intestinales caco-2 estimulan a las células dendríticas y guían la respuesta frente a patógenos hacia un proceso apoptótico, debido al aumento de la expresión del gen *CASP8*, o incrementando la expresión de *NF-κBIA*, inhibidor de NF-κB, que no podría translocarse al núcleo y desencadenar la expresión de citoquinas y quimioquinas.

De acuerdo con estos criterios, las bacterias probióticas sí activan a las células dendríticas, bien porque ellas mismas sean capaces de atravesar la membrana de células epiteliales intestinales caco-2, hecho bien descrito ya que las células dendríticas emiten dendritas que llegan hasta el lumen intestinal (Rimoldi *et al.* 2006) o bien cualquier componente que produzcan, incrementando la producción de IL-6 y en menor medida el resto de las citoquinas estudiadas. Por esta razón, es patente que nuestros probióticos muestran una gran actividad sobre las células inmunitarias, activando al sistema inmunitario intestinal (Dogi *et al.* 2008).

Los datos reflejan que los probióticos inducen un patrón similar de la producción de citoquinas en ausencia o presencia de los patógenos. Este efecto se caracteriza por una elevadísima producción de IL-6, acompañada en menor medida de IL-1β, IL-8, IL-10, IL-12p40 y TNF-α. Se observa claramente que la producción de IL-10 regula negativamente la liberación de IL-12p70 (Mileti *et al.* 2009). Estos resultados, en consonancia con un trabajo reciente de Evrard *et al.* (2011), sugieren que estos probióticos potencian respuestas pro-inflamatorias (IL-8, TNF-α) y reguladoras (IL-6, IL-1β). En este mismo artículo, este autor propone que *L.rhamnosus* Lcr35 potencia respuestas Th1 y Th17, aspecto que podríamos tener en cuenta en estudios posteriores.

Por otra parte, *B.breve* CNCM I-4035 no induce la producción de IL-12 en ausencia del patógeno, mientras que los probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036 sí aumentan su liberación. La secreción de IL-12 indica un cambio en la polarización hacia una respuesta Th1. Este comportamiento ha sido demostrado en bacterias del género *Lactobacillus* como *L.casei*, *L.reuteri*, *L.rhamnosus* GG, descritos como potentes inductores de una respuesta Th1 (Christensen *et al.* 2002; Mohamadzadeh *et al.* 2005). En nuestro caso, *L.rhamnosus* CNCM I-4036 es el que induce la mayor secreción de IL-12p40, como de TNF- α , algo previsible ya que está descrito que la inducción de IL-12 se correlaciona fuertemente con la producción de TNF- α (Weiss *et al.* 2011).

Sin embargo, si se analizan las concentraciones de citoquinas, la inducción de IL-6 es el efecto más importante, del orden de cien veces más que las otras citoquinas liberadas. Por tanto, esta citoquina debe tener un papel primordial en la respuesta y sugiere que los probióticos estudiados manifiestan una respuesta reguladora.

Tal y como se ha publicado, las células dendríticas de la mucosa humana inducen respuestas del tipo Th2. Además, la producción constitutiva de IL-6 es característica de las células dendríticas de las Placas de Peyer, que ayuda al desarrollo de células plasmáticas productoras de Ig A (Rimoldi *et al.* 2005). Varios trabajos en murinos apuntan que los lactobacilos y bífidobacterias son potentes inductores de IL-6 en células dendríticas, así como en las Placas de Peyer (Weiss *et al.* 2011; Harata *et al.* 2009). Asimismo, se ha descrito la mucosa intestinal parece mantener un estado “no inflamatorio” caracterizado por la liberación de citoquinas que favorecen el reclutamiento de células Th2 y T reguladoras, al igual que monocitos, que secretan citoquinas como CCL2/MCP-1 y CCL22/MDC, acorde con nuestros resultados, mientras evitan la polarización a respuestas del tipo Th1. Esta inducción en la respuesta parece regular la homeostasis intestinal (Rimoldi *et al.* 2005b; Westendorf *et al.* 2010). Por todo ello, y a la vista de los resultados, los probióticos estudiados favorecen una respuesta T reguladora, y no Th1, aunque también se liberen simultáneamente otras citoquinas como IL-8 y TNF- α , ya que esta secreción no es suficiente para contrarrestar la producción de IL-6 y generar una respuesta pro-inflamatoria. La ausencia total de IFN γ parece confirmar que estos probióticos no generan una respuesta Th1 (Akiho *et al.* 2011).

Asimismo, es bien sabido que las citoquinas anti-inflamatorias IL-6, IL-10 y TGF- β son necesarias para mantener las poblaciones de células B productoras de Ig A (Castillo *et al.* 2011; Feng *et al.* 2011). Además, esta molécula, Ig A, actúa como agente inhibidor de patógenos e induce respuestas inmunitarias asociadas a la producción de citoquinas antiinflamatorias

(Corthesy *et al.* 2007). Sin embargo, a pesar de participar en la respuesta frente a infecciones, el papel más relevante de la Ig A es mantener una relación simbiótica o mutualista no inflamatoria entre el hospedador y la microbiota (Feng *et al.* 2011; Hansen *et al.* 2010). En este sentido, nuestros resultados coinciden con lo publicado por Uematsu *et al.* (2008) que describe que la presencia de la microbiota intestinal influye en la producción de Ig A en el intestino. Además, este autor propone que la inducción de Ig A ocurre a través de un mecanismo mediado por el TLR5. Si se analizan nuestros resultados, los probióticos aumentan considerablemente la expresión de este TLR, no así los sobrenadantes, por lo que esto parece indicar que los probióticos estudiados activan al TLR5, que ayuda a la producción de Ig A y, por tanto, **estos probióticos no sólo median la respuesta inmunitaria innata, sino que además potencian la respuesta inmunitaria adaptativa**. Además, y en consecuencia, **los probióticos refuerzan la función de barrera del epitelio intestinal**, gracias a esta producción de Ig A, que limita el acceso de bacterias patógenas (Hooper & Macpherson, 2010). En este contexto, un trabajo reciente de Feng *et al.* (2011), propone que la Ig A secretada se une a las bacterias lumbinales, evitando la penetración de éstas o de sus componentes a través del epitelio intestinal y, en consecuencia, previniendo así que las bacterias circulen hasta tejidos linfoides secundarios y desencadenen respuestas sistémicas. Por tanto, y de acuerdo con estos investigadores, el sistema inmunitario intestinal produce grandes cantidades de Ig A frente a la microbiota comensal intestinal; esta acción contribuye a que los antígenos bacterianos estén limitados a nivel de la mucosa, evitando el reconocimiento por parte del sistema inmunitario sistémico, y en consecuencia, el desarrollo de un estado inflamatorio (Feng *et al.* 2011). Asimismo, la producción de IL-10 observada contribuye a la generación de células T reguladoras (Rutella & Locatelli, 2011) y favorece una respuesta Th2 (Amrouche *et al.* 2006). Por otra parte, la presencia de las otras citoquinas liberadas puede ayudar a, como apuntan algunos autores, a mantener al sistema en un estado de vigilancia o para cuando el hospedador las necesite (Castillo *et al.* 2011), así como a conservar la homeostasis intestinal (Mizoguchi *et al.* 2008). Además, la activación de NF- κ B ayudaría a evitar el desarrollo de una inflamación sistémica (Pagnini *et al.* 2010). Finalmente, si se analizan conjuntamente los resultados obtenidos para los probióticos y sus sobrenadantes, y en la línea de lo publicado por Adams (2010), las bacterias probióticas vivas parecen modular la respuesta inmunitaria intestinal, mientras que componentes de éstas ejercen efectos anti-inflamatorios en el tracto gastrointestinal.

Por otra parte, los resultados muestran que los probióticos son capaces de disminuir las citoquinas pro-inflamatorias en presencia de enterobacterias. Como se ha mencionado

anteriormente, la presencia de las caco-2 ejerce de barrera y no permite que los patógenos activen a las células dendríticas y aumenten la liberación de citoquinas, por lo que distorsiona los resultados. Por tanto, un aspecto muy interesante es que los probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* exhiben propiedades antibacterianas. Además, la disminución de las citoquinas pro-inflamatorias confirmaría que estos probióticos intentan conservar la homeostasis intestinal, favoreciendo respuestas tipo Th2 y T reguladoras.

Por último, y en virtud de los resultados obtenidos, se propone el siguiente modelo hipotético (Figura 72), que describe los mecanismos de acción de los probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036 y su impacto en el microambiente formado por células epiteliales intestinales y células dendríticas. Estos probióticos han demostrado que ejercen efectos beneficiosos para el hospedador ya que inhiben la acción de enterobacterias a través de distintos mecanismos: 1. la producción de sustancias antimicrobianas, de naturaleza aún desconocida, aunque se descarta que este efecto sea debido a compuestos ácidos derivados de su crecimiento, ya que como se ha detallado anteriormente los sobrenadantes de las bacterias probióticas han sido neutralizados; 2. mediante fenómenos de exclusión competitiva, al unirse las bacterias probióticas al epitelio intestinal impiden la adhesión de bacterias patógenas, siendo este paso requisito necesario para desarrollar su patogenicidad; 3. la modulación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas, a través de la ruta de señalización de los TLR, y como resultado potencian la función de barrera, gracias a la inducción de Ig A, que actúa como agente neutralizante de los patógenos. Quizás este último punto sea el más relevante ya que los probióticos exhiben propiedades inmunomoduladoras incluso en ausencia de bacterias patógenas, lo que los hace muy interesantes para su aplicación en clínica. Por último, cabe destacar que Feng & Elson (2011) y Feng *et al.* (2011), proponen un modelo hipotético semejante al nuestro y sugieren que la producción de Ig A y células T reguladoras en el intestino refuerza el mutualismo entre el hospedador y la microbiota intestinal, evitando así que se desencadene un proceso inflamatorio que perturbe a las bacterias residentes y disminuya la resistencia frente a patógenos. Por tanto, y en este contexto, se propone un modelo hipotético que gracias a la producción de Ig A, células T reguladoras y los probióticos mantiene la homeostasis intestinal y protege al hospedador frente a patógenos, y que es más efectivo que cualquiera de estos elementos en solitario.

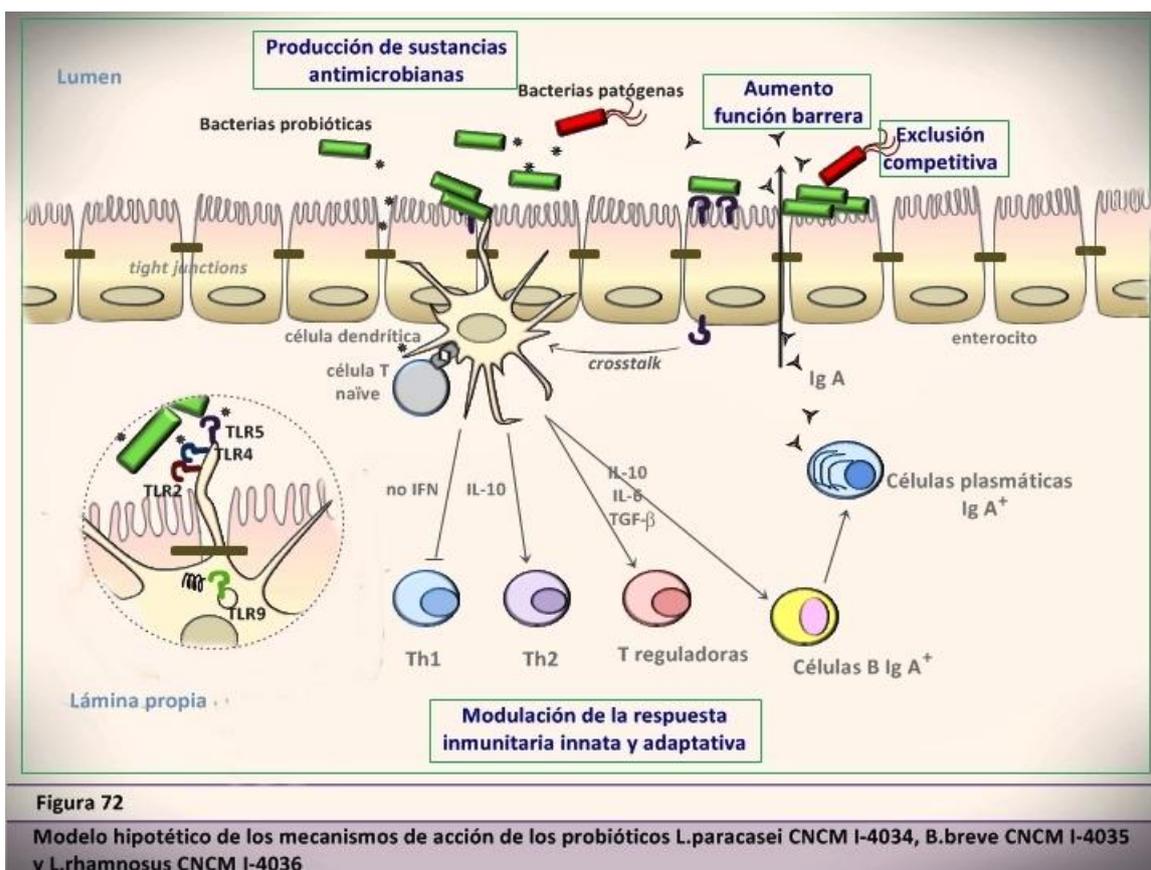


Figura 72

Modelo hipotético de los mecanismos de acción de los probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036

En conjunto, parece lógico pensar que la interacción de las células dendríticas, células epiteliales intestinales y bacterias probióticas produce la liberación de citoquinas, tanto pro- y anti-inflamatorias, que regulan la homeostasis intestinal, para mantener un estado neto no inflamatorio. Es importante resaltar que el hecho de que no exista inflamación, no significa que sea un estado ausente de respuesta (Yan & Polk, 2011). Actualmente, existe una gran controversia entre científicos que apoyan que las bacterias comensales son ignoradas por el sistema inmunitario intestinal, mientras otros sostienen que son toleradas (Rescigno, 2009; Artis, 2008; Yan & Polk, 2011). A tenor de los resultados expuestos, es patente que los probióticos y bacterias comensales interactúan con el sistema inmunitario intestinal gracias a la acción conjunta de células epiteliales intestinales y células inmunitarias. Como producto de esta interacción, se liberan grandes cantidades de Ig A, que limitan a la microbiota al lumen intestinal, evitando respuestas sistémicas no compatibles con el bienestar intestinal. Finalmente, la homeostasis intestinal parece ser el resultado de un equilibrio entre estos elementos.

Muchos trabajos avalan que los ensayos *in vitro* se correlacionan extraordinariamente con los experimentos *in vivo* (Rutella & Locatelli, 2011). El desarrollo de estudios *in vivo* que

confirmer los resultados obtenidos en la presente tesis es el futuro de nuestras investigaciones. Asimismo, la utilización de cultivos de organoides, obtenidos a partir de células madre humanas de intestino delgado, y estos probióticos, puede ayudar a corroborar los resultados expuestos y a conocer otros aspectos de la respuesta inmunitaria hasta ahora desconocidos.

Asimismo, es de especial interés caracterizar la sustancia liberada por estos probióticos y que manifiesta una potente actividad bacteriana. Además, el estudio de otros factores como la linfopoyetina del estroma tímico (TSLP) o el ácido retinoico, que juegan un papel importante en la diferenciación de células dendríticas, puede aportar más información relacionada con el mecanismo por el cual los probióticos modulan la respuesta inmunitaria intestinal.

Ensayo de proliferación de las células T

A la vista de los resultados, el probiótico *L.paracasei* CNCM I-4034 posee la mayor capacidad de estimulación de la proliferación de las células T. Resulta interesante destacar que, independientemente de la concentración de células dendríticas en el medio, la inducción de la proliferación de las células T es notablemente superior al control positivo en todos los casos. Cuando se exponen las células dendríticas con el probiótico *L.rhamnosus* CNCM I-4036 la mayor estimulación de la proliferación de las células T se registra al alcanzar la concentración de 100000 DC. Nuestros datos coinciden con lo publicado por Mohamadzadeh *et al.* (2005), que describen que los lactobacilos inducen fuertemente la proliferación de células T autólogas CD4⁺ y CD8⁺.

El tratamiento previo de las células dendríticas con el probiótico *B.breve* CNCM I-4035 ejerce un débil efecto en la proliferación de las células T, siendo comparable al control positivo con el mayor número de células dendríticas ensayadas.

Estas diferencias en la estimulación de la proliferación de células T resultan lógicas ya que los probióticos poseen distintas habilidades en la estimulación del sistema inmunitario y muestran un efecto altamente específico y cepa-dependiente (Mileti *et al.* 2009).

Actualmente, no existen datos respecto al uso de probióticos, células dendríticas y células T autólogas, por lo que estos resultados requieren estudios posteriores para dilucidar

los mecanismos que provocan esta estimulación de las células T. El estudio de la expresión génica y la medida de citoquinas en co-cultivos de células dendríticas, previamente tratadas con los probióticos (o sus sobrenadantes) y en presencia de enterobacterias, y células T puede ayudar a completar la visión global de la participación de las bacterias probióticas en la respuesta inmunitaria intestinal.



CONCLUSIONES

CONCLUSIONS

“Estamos impulsados por la insaciable curiosidad habitual del científico, y nuestro trabajo es un encantador juego.”

Murray Gell-Mann, Premio Nobel de Física en 1969

CONCLUSIONES/CONCLUSIONS

Primera/First

Las células dendríticas disminuyen de forma global la producción de varias citoquinas pro-inflamatorias, como IL-8 y TNF- α , y quimioquinas, como CCL2 y CCL5, en respuesta a la estimulación con los probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036, o sus sobrenadantes, en presencia de las enterobacterias *E.coli* y *Salmonella*. Esta disminución es altamente específica y dependiente de cepa. En contacto directo con las células dendríticas, los sobrenadantes muestran mayor capacidad de regulación de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias en respuesta a enteropatógenos que los propios probióticos.

*Human dendritic cells exhibit a decreased secretion of pro-inflammatory cytokines, such IL-8 and TNF- α , and chemokines, like CCL2 and CCL5, in response to stimulation with the probiotics *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 and *L.rhamnosus* CNCM I-4036, or their supernatants, in the presence of the enteropathogens *E.coli* and *Salmonella*. This decrease occurs in a strain-specific manner. Remarkably, supernatants were more effective in the induction of reduced pro-inflammatory cytokines, compared with probiotics.*

Segunda/Second

En un modelo de co-cultivo tipo *transwell*, la exposición de células dendríticas y caco-2, estimuladas con los probióticos, *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036, y enterobacterias, pone de manifiesto que las células dendríticas son las responsables del patrón de citoquinas exhibido en respuesta a estas bacterias. Tanto en presencia como en ausencia de enterobacterias, los probióticos originan un patrón de citoquinas similar y se caracteriza por la inducción de IL-6 y, en menor medida, de IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12p40 y TNF- α . En cambio, los sobrenadantes sólo activan a las células dendríticas en presencia de patógenos.

Co-incubation of dendritic and caco-2 cells in a transwell system, stimulated with the probiotics, L.paracasei CNCM I-4034, B.breve CNCM I-4035 and L.rhamnosus CNCM I-4036, and enteropathogens, shows that dendritic cells are responsible for the cytokine pattern displayed in response to these bacteria. In addition, cytokine profile is similar upon probiotics stimulation, in the presence or absence of pathogens and is characterized by a high level of IL-6 and varying levels of IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12p40 and TNF- α . Nevertheless, probiotic supernatants are unable to induce cytokine secretion when pathogens were absent.

Tercera/Third

En un sistema de co-cultivo tipo *transwell*, formado por células caco-2 y células dendríticas, los patógenos *E.coli* y *Salmonella* no activan a las células dendríticas, ya que la producción de citoquinas observada es muy pequeña. Por tanto, parece que las células caco-2 actúan como una barrera frente a patógenos, evitando su penetración a través de la membrana y, en consecuencia, la activación de las células dendríticas.

In a transwell system, formed with Caco-2 and dendritic cells, *E.coli* and *Salmonella* were unable to activate dendritic cells, as the cytokine profile observed was really low. Hence, Caco-2 cells, seems to act as a barrier against pathogens, avoiding dendritic cells activation and therefore dendritic cells cytokine production.

Cuarta/Fourth

Los probióticos *Lparacasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036, y sus sobrenadantes, potencian la respuesta inmunitaria a través de un mecanismo mediado por la ruta de señalización de los TLR, en concreto, aumentando fuertemente la expresión de *TLR9*, *TLR5*, *TLR4* y *TLR2* en células dendríticas, que modulan la inflamación inducida por patógenos. La actividad de los probióticos y sobrenadantes se correlaciona con el grado de expresión de *TLR9*, siendo *L.rhamnosus* CNCM I-4036 el que manifiesta la mayor actividad.

The probiotics L.paracasei CNCM I-4034, B.breve CNCM I-4035 and L.rhamnosus CNCM I-4036, and their supernatants, enhance the innate immunity through the activation of TLR signalling pathway. They all induced a strong gene transcription of TLR9, TLR5, TLR4 and TLR2, modulating pathogen-induced inflammation. The activity of probiotics and their supernatants is related with TLR9 expression levels, being L.rhamnosus CNCM I-4036 which shows the highest activity.

Quinta/Fifth

Las células dendríticas, pre-tratadas con los lactobacilos, *L.paracasei* CNCM I-4034 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036, estimulan la proliferación de células T autólogas.

Dendritic cells, pre-treated with Lactobacilli, L.paracasei CNCM I-4034 and L.rhamnosus CNCM I-4036, stimulate autologous T cell proliferation.

Conclusión general/General conclusion

Los resultados obtenidos en esta Tesis indican fehacientemente que los probióticos *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I.4035 y *L.rhamnosus* CNCM I-4036 poseen propiedades inmunomoduladoras. La regulación de la expresión de los genes implicados en la cascada de señalización de los TLR en células inmunitarias es un importante mecanismo por el cual estos probióticos exhiben esta capacidad. La respuesta innata y adaptativa es modificada por los probióticos, pero es cepa-dependiente. La interacción de células epiteliales intestinales, células dendríticas y los probióticos ayuda al mantenimiento de la homeostasis intestinal, gracias a la liberación de citoquinas y factores como IL-10 y TGF- β , conocidos inductores de células T reguladoras y de la producción Ig A.

La capacidad de los probióticos de modular la respuesta inmunitaria intestinal representa un factor decisivo para su posible aplicación terapéutica en la prevención y el tratamiento de enfermedades tanto de naturaleza infecciosa como crónica.

These findings show a role of probiotics, L.paracasei CNCM I-4034, B.breve CNCM I-4035 and L.rhamnosus CNCM I-4036, in immunomodulation of the host immune system. Regulation of gene expression of TLR signalling pathway in immune cells is one of the major mechanism underlying probiotic action leading to immunomodulation. Innate and adaptive responses can be modulated by probiotic bacteria in a strain-specific manner. Physiological interaction between epithelial cells, dendritic cells and bacteria maintains gut homeostasis; in fact, increased secretion of some factors like IL-10 and TGF- β would affect the generation of T regulatory cells and Ig A production.

The potential of probiotics to modulate immune responses may represent an important factor for their therapeutic application in the prevention and treatment of infectious and non-communicable diseases.



SUMMARY

“Scientific research consists in seeing what everyone else has seen, but thinking what no one else has thought.”

Albert Szent-Györgyi, Nobel Prize in Medicine in 1937

SUMMARY

There is an increasing interest and demand for probiotics today, after a long story of a safe use in fermented dairy products, due to greater recognition of its beneficial effects to human gut health (Liong, 2011). Probiotics, derived from the Greek and meaning ‘for life’ (Quigley, 2008), are “live microorganisms, which, when consumed in adequate amounts, confer a health benefit on the host”, according to the Food and Agricultural Organization of the United Nations and the World Health Organization (FAO/WHO, 2001). The strains most frequently used as probiotics are lactic acid bacteria and belong to the genera *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* (Gourbeyre *et al.* 2011).

Results of evidence-based analysis from human studies and animal models suggest that probiotics have potential clinical effectiveness on many diseases (Yan & Polk, 2011). Indeed, probiotics have been reported to suppress diarrhea (Lye *et al.* 2009), alleviate lactose intolerance (Pelletier *et al.* 2001) and postoperative complications (Woodard *et al.* 2009), exhibit antimicrobial (Karska-Wysocki *et al.* 2010) and anticolorrectal cancer activities (Liong, 2008; Rafter *et al.* 2007), reduce irritable bowel symptoms (Moayyedi *et al.* 2010) and prevent inflammatory bowel disease (Golowczyc *et al.* 2007) (fig. 73).

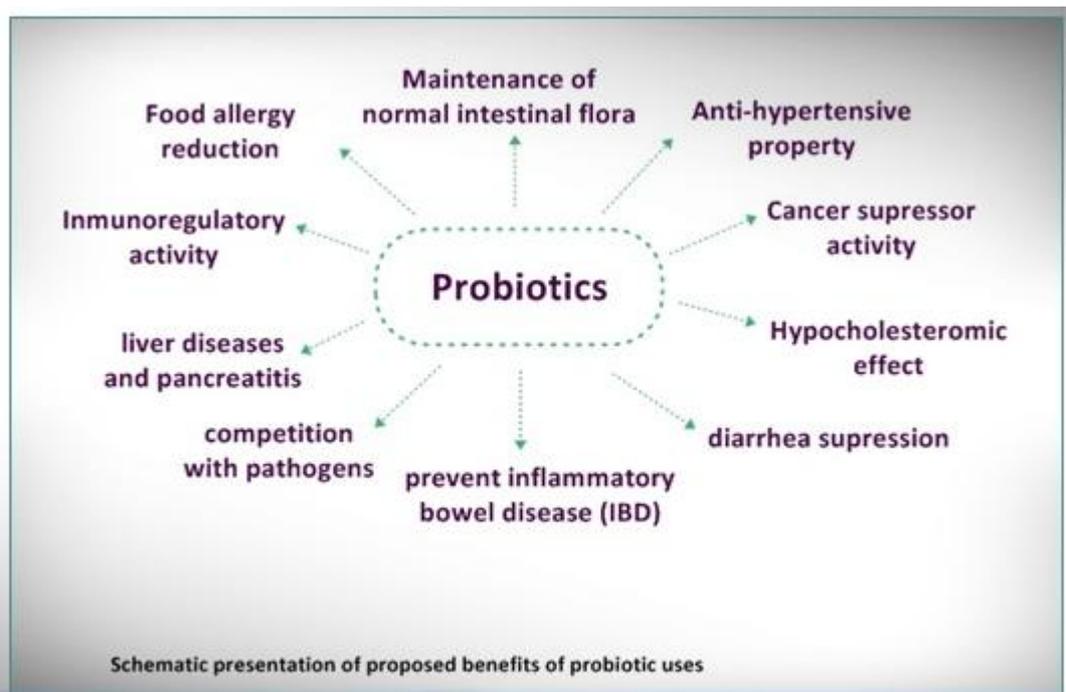


Fig. 73. Schematic presentation of proposed benefits of probiotic uses

Several mechanisms have been suggested for the probiotic strains function towards mucosa, including secretion of antimicrobial products, resistance colonization of pathogens, enhance and maintain barrier function, modulation of epithelial cell signal transduction and innate and adaptive immunomodulation. It is becoming apparent that these effects are conveyed in a strain-specific manner (Collado *et al.* 2009). However, the exact mechanisms by which probiotics generate the health-promoting activities, and particularly the way in which they affect dendritic and intestinal epithelial cells immune response, are not fully understood and the main objective of this thesis.

One of the mechanisms of probiotic activity could work through the activation of innate system (Dogi *et al.* 2010), including both suppression and stimulation of host immune responses (Pagnini *et al.* 2010). Commensal bacteria seem to prevent or attenuate inflammation by regulating the NF κ B activation pathway (Kelly *et al.* 2004; Petrof *et al.* 2009). Recognition of probiotic bacteria by mammalian pattern-recognition receptors such as Toll-like receptors (TLRs), NOD-like receptors (NLRs) and Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin (DC-SIGN) provides a platform for modulation of local innate as well as systemic adaptive immune responses in the host (Niess & Reinecker, 2005a,b; Maldonado Galdano & Perdigón, 2006; Rachmilewitz *et al.* 2004; Rakoff-Nahoum *et al.* 2006; Stagg *et al.* 2003).

Accordingly, we investigated the capacity of probiotic bacteria *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 to modulate human dendritic cells function and how they response against pathogenic bacteria, namely *E.coli* and *Salmonella*. Probiotic strains were isolated from infant feces and selected based on their probiotic properties, such as resistance to gastrointestinal juices, biliary salts, NaCl and low pH, as well as adhesion to intestinal mucus and sensitivity to antibiotics. Dendritic cells were supplied from MatTek Co., generated from umbilical cord blood CD34⁺ progenitor cells (hematopoietic stem cells). For this reason, these dendritic cells are more responsive than monocyte-derived dendritic cells.

Interestingly, some probiotics secrete factors, antimicrobials, that in addition to having an impact on virulence gene expression in pathogenic bacteria (Collado *et al.* 2009; Medellin-Pena *et al.* 2007) can also affect the gene expression in the host epithelium (Yan *et al.* 2007). We therefore studied the effects of not only the intact bacterial cells but also probiotic secreted metabolites. In order to obtain the supernatants, probiotic strains were grown anaerobically at 37 °C in Man Rogosa Sharpe medium (MRS) for 18 hours. Supernatants were neutralized to pH 6.5 and 10x concentrated. MRS medium was supplemented with 0.05 % cysteine to favor *B.breve* growth.

Dendritic cells were directly challenged by addition of bacteria: probiotics, pathogens or both. LPS was used as a positive control. After 4 hours incubation, the medium was removed and replaced with new medium, containing cytokines and antibiotics. After 20 hours, culture supernatants were collected for cytokine analysis and cells were removed for RNA extraction. The goal of this first experiment is to examine the ability of these probiotics/supernatants to activate dendritic cells directly.

This research is mainly focused on comparing the expression pattern of genes involved in TLR signalling pathway and the cytokine profile. For this aim, we used gene array analysis that is a new approach to evaluate the probiotic effects on immune cells, which provided an overall view of the changes in gene expression patterns of probiotic-human dendritic cells and the cytokines were measured by immunoassay, with a MILLIplex™ kit using the Luminex 200 system.

Our data indicate that probiotic bacteria and their supernatants are able to induce the cytokine profile in a strain-specific manner. In terms of cytokine production, dendritic cells decreased all the pro-inflammatory cytokines, such IL-8 and TNF- α , and chemokines, like CCL2 and CCL5, in response to stimulation with probiotics and enteropathogens. Remarkably,

supernatants were more effective in the induction of reduced pro-inflammatory cytokines, compared with probiotics. In this respect, supernatants were able to reduce IL-6 secretion in response to enteropathogens, whereas the addition of probiotics maintained the same amount as when pathogens were absent. Within this context, probiotic strains are described as potent inducers of IL-6 production (Weiss *et al.* 2011). As a reflection of these differences, and regarding that supernatants were 10x-concentrated, it seems that these probiotics secrete metabolites or factors exhibiting anti-inflammatory capacities.

We also were interested in the expression pattern of members of the TLR signalling pathway, thus TLRs regulate a variety of different genes, including those that function as transcriptional activators, like NF κ B, its induction culminates in the expression of wide variety of cytokines (Round *et al.* 2010). Probiotics, *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 and *L.rhamnosus* CNCM I-4036, or their supernatants, have been shown to possess a differential ability to regulate the Toll-like receptor pathway in a strain-specific manner. They all induced a strong gene transcription of *TLR2* and *TLR9*. These results are in agreement with previous works showing that the activation of *TLR2* and *TLR9* enhance innate immunity (Kim *et al.* 2006; Ruiz *et al.* 2005; Tao *et al.* 2006; Vizoso Pinto *et al.* 2009; Voltan *et al.* 2007). Interestingly, it has been described that TLR9 signaling was required to mediate the anti-inflammatory effect of probiotics (Lavelle *et al.* 2010). In this case, supernatants were more potent as inducers of *TLR9* expression than probiotics. In consequence, this could explain that they were more effective suppressing pro-inflammatory cytokines.

Continuing with this research is known that probiotics can interact either directly with dendritic cells or indirectly via the action of epithelial cells. Recently, it has been shown that intestinal homeostasis is regulated by a tight crosstalk between epithelial cells and immune cells, in particular with dendritic cells (Zoumpopoulou *et al.* 2009). Furthermore, several papers demonstrated that the typical phenotype of mucosal dendritic cells can be obtained after co-culture with polarized epithelial cells, creating a "tolerogenic" environment (Butler *et al.* 2006; Rimoldi *et al.* 2005b). As mentioned above, we previously showed that probiotic strains have the ability to activate dendritic cells directly and exhibit strain-specific immunomodulatory capacities. Therefore, it was interesting to evaluate whether probiotics could modulate dendritic cells function through epithelial barrier interaction. To achieve this goal, we used an *in vitro* transwell co-culture model. This system allowed us to simplify the mucosal barrier to just 3 players: caco-2 cells (intestinal epithelial cells), human dendritic cells and probiotics/pathogens, in a spatial arrangement similar to that found *in vivo*. We investigated how selected lactic acid bacteria, in comparison to co-incubations with

pathogenic *E. coli* and *Salmonella* strains, could impact on dendritic cells function, across an intestinal epithelial cell line barrier. In addition, we examined the effect of probiotic supernatants, because the mucous barrier is largely impermeable to bacterial cells and under physiological conditions no direct physical contact between bacteria and intestinal epithelial cells presumably exists (Swidsinski *et al.* 2007), thus secreted molecules could penetrate the mucous barrier more easily than whole bacterial cells.

Briefly, caco-2 cells were cultured on the upper side of membrane for 15-21 days, to confluence. The transwell inserts were positioned upside down and a drop containing 50000 dendritic cells was placed onto the membrane. Dendritic cells were allowed to adhere for 4 hours. Afterward, the transwell inserts were inverted and bacteria/supernatants were added from the apical side and co-cultured with dendritic cells at the lower chamber. After 4 hours incubation, we removed the medium and replaced with a new one, containing cytokines and antibiotics for 20 hours. At this point, we collected culture supernatants for cytokine analysis and cells for RNA extraction. We also included LPS as a positive control. To carry out this study, and using the same techniques as our first experiment, we focused on comparing the expression pattern of genes involved in TLR signalling pathway and the cytokine profile.

Surprisingly, the first outcome of the encounter of dendritic cells and intestinal epithelial cells with pathogens and probiotics was the up-regulation of the cytokine secretion, particularly IL-6. This result was unexpected, compared with our previous study. Moreover, and conversely as reported by Zoumpoulou *et al.* (2009) and Vossenkämper *et al.* (2010), intestinal epithelial cells and dendritic cells were poorly responsive to the pathogens *E.coli* and *Salmonella*. Interestingly, these pathogens were not able to induce dendritic cells chemokines, as CCL22 or CCL2. This suggests that these pathogens could not penetrate across the epithelial layer. At this point, as opposed to the direct assay, just caco-2 cells were sensing pathogenic bacteria and releasing cytokines. Thus, this could explain the low cytokine profile observed by dendritic and intestinal epithelial cells upon stimulation with pathogens. As reported by Rimoldi *et al.* (2005) only invasive bacteria induced dendritic cells activation. Taking together, these results confirm that intestinal epithelial cells act as a barrier, avoiding dendritic cells activation and therefore dendritic cells cytokine production.

In terms of cytokine production, there was no difference when probiotic supernatants were added to this system. In contrast, in the presence of pathogenic bacteria, the supernatants manifested activity. Consequently, these probiotic secreted molecules could penetrate the epithelial barrier and activate dendritic cells. In fact, supernatants up-regulated *TLR9*, *TLR5*,

TLR4 and *TLR2*, modulating pathogen-induced inflammation. This suggests that intestinal epithelial cells and dendritic cells are able to distinguish probiotic supernatants as non-pathogenic without inducing inflammatory reactions (Putala *et al.* 2010). In addition, these supernatants exhibited antimicrobial properties, due to the inhibition of *E.coli* and *Salmonella* strains. Taking this into account, the use of these supernatants has attractive advantages; such products would be very safe and have a long-shelf life (Adams, 2010).

On another hand, as we have shown the addition of probiotics revealed a cytokine profile by dendritic and intestinal epithelial cells which was essentially indistinguishable from probiotics cytokine profile by dendritic cells of our first experiment. Hence, this confirms that in this situation probiotics and dendritic cells contact directly. We could exclude that cytokine secretion by dendritic/intestinal epithelial cells was not due to probiotic secreted factors because addition of probiotic supernatants generated only negligible cytokine production.

In addition to this, dendritic/intestinal epithelial cells cytokine profile was similar upon probiotics stimulation, in the presence or absence of pathogens. Thus, probiotics have antimicrobial properties that inhibit *E.coli* and *Salmonella* strains effects. Also, it seems that the action of probiotics could be a dual one. In agreement with Adams (2010) live probiotic cells influence both the gastrointestinal microflora and the immune response whilst the components of dead cells exert an anti-inflammatory response in the gastrointestinal tract. Following our results, this pattern was characterized by a high level of IL-6 and varying levels of IL-1 β , IL-8, IL-10, IL-12p40 and TNF- α . Because the expression of IL-8, TNF- α and IL-6 is regulated by NF κ B (Vossenkämper *et al.* 2010), the first outcome is that these probiotics enhance the innate immunity defense by NF κ B activation, rather than suppression, as reported by Pagnini *et al.* 2010. Furthermore, it has been reported that activation of NF κ B plays a beneficial role in epithelial cells (Greten *et al.* 2004). In contrast, a common held belief is that non-pathogenic bacteria and probiotic bacteria exert opposing effects to those induced by pathogens, including suppression of pro-inflammatory cytokines. Our findings, in agreement with Artis (2008), indicate that commensals are not ignored by the immune system; rather they are tolerated via a concerted action of epithelial cells and immune cells. Moreover, these results suggest that the capacity of bacteria to induce pro-inflammatory signals through the epithelial barrier is not linked to their pathogenic or commensal status (Zoumpopoulou *et al.* 2009).

Dendritic cells are critical players in both innate and adaptive immunity since they are the most potent antigen-presenting cells and have the ability to activate naïve T cells (Borchers *et*

al. 2009). Within this context, cytokine release by dendritic cells is important to drive the polarization of T cells towards Th1, Th2, Th17 or T regulatory cells (Mileti *et al.* 2009). Our results indicate that these probiotics enhance pro-inflammatory (IL-8, TNF- α) and regulatory responses (IL-1 β , IL-6, IL-10), in accordance with Evrard *et al.* (2011). Additionally, several studies underscore the importance of “physiologic inflammation” induced by commensal flora, both for the development of immune gut system and for the response to pathogenic bacteria (Pagnini *et al.* 2010).

However, the greatest amount of IL-6, more than 100-fold in comparison with other cytokines, suggests that this interleukin may have a key role in immune gut response. On the other hand, it is known that Th1 responses critically depend on the ability of dendritic cells to produce IL-12 and characterized by the production of IFN γ (Borchers *et al.* 2009). Nevertheless, we could not detect IFN γ and IL-12p70. Therefore, it seems that these probiotics may promote regulatory responses, instead of Th1. These probiotic strains may activate dendritic cells that could direct T cells to assume regulatory functions and thereby induce oral tolerance (Mowat, 2003; Bilsborough & Viney, 2004). Accordingly, it is known that intestinal dendritic cells can induce B cells to undergo isotype switching to Ig A (Westendorf *et al.* 2010) and IL-6, TGF- β and IL-10 are required to maintain Ig A (+) B cell populations (Castillo *et al.* 2011). In addition, the increased of Ig A by B cells serves as neutralizing agent enabling pathogens exclusion and induces immune responses associated with the production of anti-inflammatory cytokines (Corthesy *et al.* 2007). Although Ig A has been shown to participate in host responses against infections, the major role of Ig A is to maintain a balance between the host and microbiota (Feng *et al.* 2011; Hansen *et al.* 2010). Taking this into account, and in agreement with Uematsu *et al.* (2008), microbiota influences Ig A production in the gut. This author proposes that commensal bacteria induce Ig A through a mechanism mediated by TLR5. Following our results, these probiotics increased *TLR5* expression. Hence, these bacteria are able to modulate innate immunity and adaptive immunity. Consequently, they also reinforce epithelial barrier function, because secreted Ig A limits bacterial association with the intestinal epithelial surface and restricts the penetration of pathogens across the gut epithelium (Hooper & Macpherson, 2010). Taking this into account, Feng & Elson (2011) propose that secreted Ig A binds to luminal bacteria, precluding the penetration of bacteria or their components across the epithelium, which prevent the bacteria from entering systemic lymphoid tissues. Altogether, and in agreement with Feng *et al.* (2011), suggests that microbiota antigens are limited to the intestinal lumen, avoiding systemic immune responses.

Furthermore, the production of IL-10 would help in the generation of regulatory cells and Th2 responses (Rutella & Locatelli, 2011; Amrouche *et al.* 2006). Other cytokines detected, such IL-8 and TNF- α , may exert protective functions in normal gut homeostasis and intestinal epithelial integrity (Mizoguchi *et al.* 2008; Castillo *et al.* 2011). The activation of NF κ B is similar protective for the development of systemic inflammation (Pagnini *et al.* 2010).

Finally, we propose a hypothetic model (Fig. 74) that describes the mechanisms of probiotics *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 and *L.rhamnosus* CNCM I-4036 and how they interact with dendritic and epithelial intestinal cells. These probiotics have been shown antimicrobial properties due to inhibition of enteropathogens through different mechanisms: 1. Production of inhibitory compounds; 2. Competitive exclusion; 3. Modulation of innate and adaptive responses through TLR signalling pathway that increase Ig A production, and consequently, enhance epithelial barrier function. Hence, we suggest, in agreement with several authors, that Ig A production, T regulatory cells and microbiota protect the host from pathogen infections and maintain the gut homeostasis.

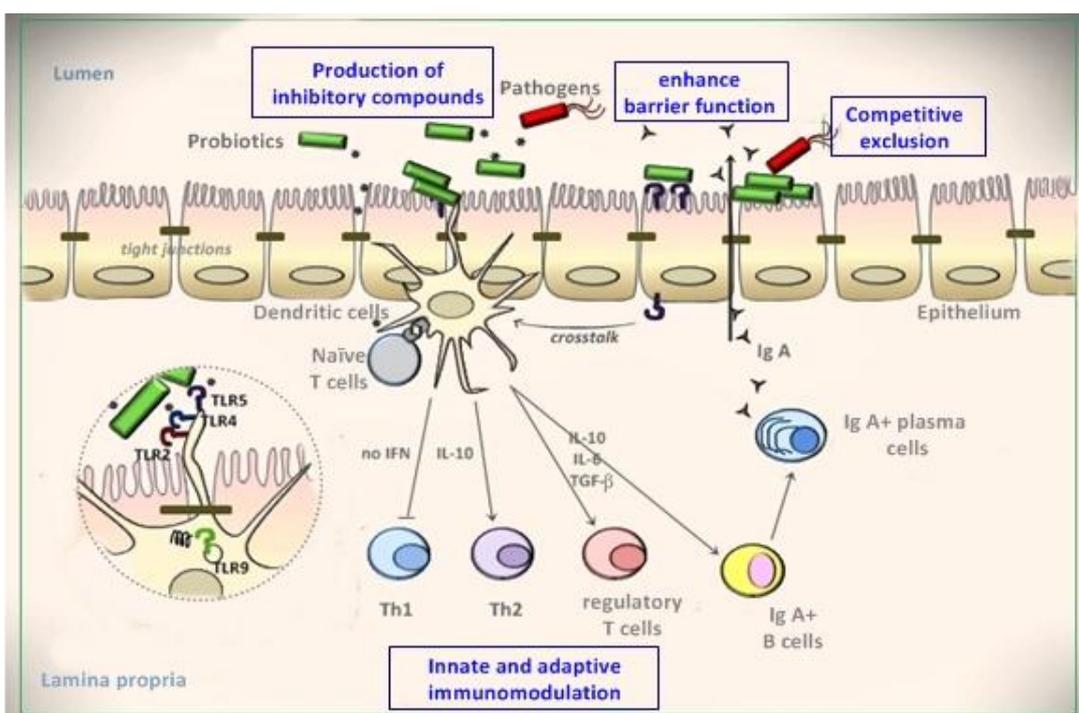


Figura 72

Hypothetic model of the mechanisms of the probiotics *L.paracasei* CNCM I-4034, *B.breve* CNCM I-4035 and *L.rhamnosus* CNCM I-4036, in the gut

Follow-up studies of other mediators that could be involved in the gut immune response, such thymic stromal lymphopoiectin (TSLP) and retinoic acid may help to complete the multifaceted

prospects of intestinal homeostasis and the impact of probiotics in this network of dendritic and intestinal epithelial cells.

Finally, we investigated the impact of these probiotic strains on T cell proliferation. Dendritic cells affect the adaptive response by priming T cells to proliferate, become activated, and produce cytokines. Our findings, in agreement with Mohamadzadeh *et al.* (2005) indicate that lactobacilli strains enhanced the proliferation of autologous T cells, confirming their capacity to enhance priming of T cells. *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 exhibited the highest capacity to increase T cell proliferation. In contrast, low T cell proliferation was detected in autologous T cells when co-cultured with dendritic cells activated with *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035. However, the mechanism for this unusual property remains to be defined.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCE LIST

- Abrahamsson TR, Jakobsson T, Böttcher MF, Fredrikson M, Jenmalm MC, Björkstén B, et al. Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a doubleblind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1174-80
- Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 2005; 174: 4453-60
- Acheson DW, Luccioli S. Microbial-gut interactions in health and disease. *Mucosal immune responses. Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 387-404
- Adams CA. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr Res Rev* 2010; 23: 37-46
- Adlerberth I, Cerquetti M, Poilane I, et al. Mechanisms of colonisation and colonisation resistance of the digestive tract. *Microl Ecol Health Dis* 2000; 11: 223-39
- Akiho H, Ihara E, Motomura Y, Nakamura K. Cytokine-induced alterations of gastrointestinal motility in gastrointestinal disorders. *World J Gastrointest Pathophysiol* 2011; 2: 72-81
- Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 2006; 124: 783-801
- Alemka A, Clyne M, Shanahan F, Tompkins T, Corcionivoschi N, Bourke B. Probiotic Colonization of the Adherent Mucus Layer of HT29MTXE12 Cells Attenuates *Campylobacter jejuni* Virulence Properties. *Infect Immun.* 2010; 78: 2812-22
- Alverdy JC, Chang EB. The re-emerging role of the intestinal microflora in critical illness and inflammation: why the gut hypothesis of sepsis syndrome will not go away. *J Leukoc Biol* 2008; 83: 461-6
- Amrouche T, Boutin Y, Prioult G, Fliss I. Effects of bifidobacterial cytoplasm, cell wall and exopolysaccharide on mouse lymphocyte proliferation and cytokine production. *Int Dairy J* 2006; 16: 70-80

Anderson JW, Gilliland SE. Effect of fermented milk (yogurt) containing *Lactobacillus acidophilus* L1 on serum cholesterol in hypercholesterolemic humans. *J Am. Coll. Nutr* 1999; 18: 43-50

Anderson RC, Cookson AL, McNabb WC, Park Z, McCann MJ, Kelly WJ, Roy NC. *Lactobacillus plantarum* MB452 enhances the function of the intestinal barrier by increasing the expression levels of genes involved in tight junction formation. *BMC Microbiol* 2010; 10: 316

Apostolou E, Kirjavainen PV, Saxelin M, Rautelin H, Valtonen V, Salminen SJ, Ouwehand AC. Good adhesion properties of probiotics: a potential risk for bacteremia? *FEMS Immunol Med Microbiol* 2001; 31: 35-9

Aranceta J, Gil A. *Alimentos funcionales y salud en las etapas infantil y juvenil*. Ed Panamericana 2010

Are A, Aronsson L, Wang S, Greicius G, Lee YK, Gustafsson JA, Pettersson S, Arulampalam V. *Enterococcus faecalis* from newborn babies regulate endogenous PPAR γ activity and IL-10 levels in colonic epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 1943-8

Artis D. Epithelial-cell recognition of commensal bacteria and maintenance of immune homeostasis in the gut. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 411-20

Atarashi K, Umesaki Y, Honda K. Microbial influence on T cell subset development. *Semin Immunol* 2011; 23:146-53

Aureli P, Capurso L, Castellazzi AM, Clerici M, Giovannini M, Morelli L, Poli A, Pregliasco F, Salvini F, Zuccotti GV. Probiotics and health: An evidence-based review. *Pharmacol Res* 2011

Ayehunie S, Snell M, Child M, Klausner M. A plasmacytoid dendritic cell (CD123+/CD11c-) based assay system to predict contact allergenicity of chemicals. *Toxicology* 2009; 264: 1-9

Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 979-84

Bai AP, Ouyang Q, Xiao XR, Li SF. Probiotics modulate inflammatory cytokine secretion from inflamed mucosa in active ulcerative colitis. *Int J Clin Pract* 2006; 60: 284-8

Bai AP, Ouyang Q, Zhang W, Wang CH, Li SF. Probiotics inhibit TNF α -induced interleukin-8 secretion of HT29 cells. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 455-457

Barbosa T, Rescigno M. Host-bacteria interactions in the intestine: homeostasis to chronic inflammation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med* 2010; 2: 80-97

Barrie A, Rgueiro M. Biologic therapy in the management of extraintestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 1424-9

Basu S, Chatterjee M, Ganguly S, Chandra PK. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG in persistent diarrhea in Indian children: a randomized controlled trial. *J Clin Gastroenterol* 2007; 41: 756-60

- Bayne CJ Origins and evolutionary relationships between the innate and adaptive arms of immune systems. *Integr Comp Biol* 2003, 43: 293-9
- Bevins CL, Salzman NH. Paneth cells, antimicrobial peptides and maintenance of intestinal homeostasis. *Nat Rev Microbiol* 2011
- Bermúdez-Brito M, S. Muñoz, Gómez Llorente, Matencio E, Romero F, Gil A. *Lactobacillus rhamnosus* CNGM I-4036 as an inhibitor of enteropathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* growth.[Abstract] *Ann Nutr Metab* 2011; 58: 88-9
- Bezirtzoglou E, Stavropoulou E. Immunology and probiotic impact of the newborn and young children intestinal microflora. *Anaerobe* 2011
- Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, Perez-Perez G, Blaser MJ, Relman DA. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 732-7
- Bilsborough J, Viney JL. In vivo enhancement of dendritic cell function. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1029: 83-7
- Binns C, Lee MK. The use of Probiotics to Prevent Diarrhea in Young Children Attending Child Care Centers: A Review. *J Exp Clin Med* 2010; 2: 269-273
- Björkstén B. et al. Allergy development and the intestinal microflora during the first year of life. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: 516-520
- Boesten R, Schuren F, Ben Amor K, Haarman M, Knol J, De Vos WM. *Bifidobacterium* population analysis in the infant gut by direct mapping of genomic hybridization patterns: potential for monitoring temporal development and effects of dietary regimens. *Microb Biotechnol* 2010
- Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* 2009; 44: 26-46
- Bosscher D, Breynaert A, Pieters L, Hermans N. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60: 5-11
- Bouskra D, Brezillon C, Berard M, Werts C, Varona R, Boneca IG, Eberl G. Lymphoid tissue genesis induced by commensals through NOD1 regulates intestinal homeostasis. *Nature* 2008; 456: 507-10
- Brandtzaeg P. Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions. *Scand J Immunol* 2009; 70: 505-15
- Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M. TLR-signaling Networks: An Integration of Adaptor Molecules, Kinases, and Cross-talk. *J Dent Res* 2010

Butler M, Ng CY, Van Heel DA, Lombardi G, Lechler R, Playford RJ, Ghosh S. Modulation of dendritic cell phenotype and function in an in vitro model of the intestinal epithelium. *Eur J Immunol* 2006; 36: 864-74

Caballero-Franco C. et al. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G315-G22

Candela M, Pema F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M, Brigidi P. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: Adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol* 2008; 125: 286-92

Castillo NA, Perdigón G, de Moreno de Leblanc A. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol* 2011

Cencic A, Langerholc T. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology-a review. *Int J Food Microbiol* 2010; 141: S4-14

Cerf-Bensussan N, Gaboriau-Routhiau V. The immune system and the gut microbiota: friends or foes? *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 735-44

Cerutti A, Rescigno M. The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity* 2008; 28: 740-50

Chahine BG, Bahna SL. The role of the gut mucosal immunity in the development of tolerance versus development of allergy to food. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2010; 10: 394-9

Chang ZL. Important aspects of Toll-like receptors, ligands and their signaling pathways. *Inflamm Res* 2010; 5: 791-808

Cehade M, Mayer L. Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 3-12

Chen CC et al. Probiotics have clinical, microbiologic, and immunologic efficacy in acute infectious diarrhea. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29: 135-8

Chen J, Cai W, Feng Y. Development of intestinal bifidobacteria and lactobacilli in breast-fed neonates. *Clin Nutr* 2007; 26: 559-66

Claesson MJ, van Sinderen D, O'Toole PW. The genus *Lactobacillus*-a genomic basis for understanding its diversity. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 269: 22-8

Coconnier MH, Lievin V, Lorrot M, Servin AL. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* LB against intracellular *Salmonella enterica* serovar typhimurium infecting human enterocyte-like Caco-2/TC-7 cells. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 1152-7

- Cognigni P, Bailey AP, Miguel-Aliaga I. Enteric neurons and systemic signals couple nutritional and reproductive status with intestinal homeostasis. *Cell Metab* 2011; 13: 92-104
- Collado MC, Donat E, Ribes-Koninckx C, Calabuig M, Sanz Y. Specific duodenal and faecal bacterial groups associated with paediatric coeliac disease. *J Clin Pathol* 2009; 62: 264-69
- Collado MC, Gueimonde M, Hernández M, Sanz Y, Salminen S. Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *J Food Prot* 2005; 68: 2672-8
- Collado MC, Gueimonde M, Salminen S. Probiotics in Adhesion of Pathogens: Mechanisms of Action. *Bioactive Foods in Promoting Health* 2010; 353-70
- Collado MC, Isolauri E, Salminen S, Sanz Y. The impact of probiotic on gut health. *Curr Drug Metab* 2009; 10: 68-78
- Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. In vitro analysis of probiotic strains combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Res Int* 2007; 40: 629-36
- Conroy Me, Shi HN, Walker WA. The longterm health effects of neonatal microbial flora. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2009; 9: 197-201
- Coombes JL, Maloy KJ. Control of intestinal homeostasis by regulatory T cells and dendritic cells. *Semin Immunol* 2007; 19: 116-126
- Coombes JL, Powrie F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 435-46
- Coombes JL, Siddiqui KR, Arancibia-Cárcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkaid Y, Powrie F. A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J Exp Med* 2007; 204: 1757-64
- Corr SC et al. Bacteriocin production as a mechanism for the antiinfective activity of *Lactobacillus salivarius* UCC118. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 7617-21
- Corr SC, Hill C, Gahan CG. Understanding the mechanisms by which probiotics inhibit gastrointestinal pathogens. *Adv Food Nutr Res* 2009; 56: 1-15
- Corthésy B, Gaskins HR, Mercenier A. Cross-talk between probiotic bacteria and the host immune system. *J Nutr* 2007; 137: 781S-790S
- Christensen HR, Frøkiaer H, Pestka JJ. Lactobacilli differentially modulate expression of cytokines and maturation surface markers in murine dendritic cells. *J Immunol* 2002; 168: 171-8
- Cristofaro P, Opal SM. Role of Toll-like receptors in infection and immunity: clinical implications. *Drugs* 2006; 66: 15-29

Czerucka D, Dahan S, Mograbi B, Rossi B, Rampal P. *Saccharomyces boulardii* preserves the barrier function and modulates the signal transduction pathway induced in enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Infect Immun* 2000; 68: 5998-6004

Darfeuille-Michaud A et al. High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004; 127: 412-21

Davies JM, Sheil B, Shanahan F. Bacterial signalling overrides cytokine signalling and modifies dendritic cell differentiation. *Immunology* 2009; 128: 805-15

De LeBlanc Ade M, Castillo NA, Perdigon G. Anti-infective mechanisms induced by a probiotic *Lactobacillus* strain against *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection. *Int J Food Microbiol* 2010; 138: 223-31

De Moreno de LeBlanc A, Chaves S, Carmuega E, Weill R, Antoine J, Perdigon G. Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. *Immunobiology* 2008; 213: 97-108

De Moreno de LeBlanc A, Matar C, Perdigon G. The application of probiotics in cancer. *Br J Nutr* 2007; 98: S105-10

De Moreno de LeBlanc A, Perdigon G. Reduction of beta-glucuronidase and nitroreductase activity by yoghurt in a murine colon cancer model. *Biocell* 2005; 29: 15-24

De Preter V, Hamer HM, Windey K, Verbeke K. The impact of pre- and/or probiotics on human colonic metabolism: Does it affect human health? *Mol Nutr Food Res* 2011; 55: 46-57

De Saussure PP. Management of the returning traveler with diarrhea. *Therap Adv Gastroenterol* 2009; 2: 367-75

De Vrese M, Marteau PR. Probiotics and prebiotics: effects on diarrhea. *J Nutr* 2007; 137: 803S-11S

De Vrese M, Rautenberg P, Laue C, Koopmans M, Herremans T, Schrezenmeir J. Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination. *Eur J Nutr* 2005; 44: 406-13

De Vrese M, Schrezenmeir J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2008; 111: 1-66

Delcenserie V, Martel D, Lamoureux M, Amiot J, Boutin Y, Roy D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr Issues Mol Biol* 2008; 10: 37-54

Dethlefsen L, Eckburg PB, Bik EM, Relman DA. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol Evol* 2006; 21: 517-23

Dethlefsen L, McFall-Ngai M, Relman DA. An ecological and evolutionary perspective on human-microbe mutualism and disease. *Nature* 2007; 449: 811-8

- Dogi CA, Galdeano CM, Perdígón G. Gut immune stimulation by non pathogenic Gram(+) and Gram(-) bacteria: comparison with a probiotic strain. *Cytokine* 2008; 41: 223-31
- Dogi CA, Weill F, Perdígón G. Immune response of non-pathogenic gram(+) and gram(-) bacteria in inductive sites of the intestinal mucosa study of the pathway of signaling involved. *Immunobiology* 2010; 215: 60-9
- Dominguez-Bello MG et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc. Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 11971-5
- Dubin PJ, Kolls JK. Th17 cytokines and mucosal immunity. *Immunol Rev* 2008; 226: 160-71
- Duerkop BA, Vaishnava S, Hooper LV. Immune responses to the microbiota at the intestinal mucosal surface. *Immunity* 2009; 31: 368-76
- Dykstra NS, Hyde L, Adawi D, Kulik D, Ahrne S, Molin G, Jeppsson B, Mackenzie A, Mack DR. Pulse probiotic administration induces repeated small intestinal Muc3 expression in rats. *Pediatr Res* 2011; 69: 206-11
- Eberl G, Lochner M. The development of intestinal lymphoid tissues at the interface of self and microbiota. *Mucosal Immunol* 2009; 2: 478-85
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, Gill SR, Nelson KE, Relman DA. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308: 1635-8
- Edelson BT, KC W, Juang R, Kohyama M, Benoit LA, Klekotka PA, Moon C, Albring JC, Ise W, Michael DG, Bhattacharya D, Stappenbeck TS, Holtzman MJ, Sung SS, Murphy TL, Hildner K, Murphy KM. Peripheral CD103+ dendritic cells form a unified subset developmentally related to CD8alpha+ conventional dendritic cells. *J Exp Med* 2010; 207: 823-36
- Elmadfa I, Klein P, Meyer AL. Immune-stimulating effects of lactic acid bacteria in vivo and in vitro. *Proc Nutr Soc* 2010; 69: 416-20
- Elson CO, Cong Y, Qi F, Hershberg RM, Targan SR. Molecular approaches to the role of the microbiota in inflammatory bowel disease. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1072: 39-51
- Engel MA, Becker C, Reeh PW, Neurath MF. Role of sensory neurons in colitis: increasing evidence for a neuroimmune link in the gut. *Inflamm Bowel Dis* 2010
- Eun CS, Han DS, Lee SH, Jeon YC, Sohn JH, Kim YS, et al. Probiotics may reduce inflammation by enhancing peroxisome proliferator activated receptor γ activation in HT-29 cells. *Korean J Gastroenterol* 2007; 49: 139-46
- Evrard B, Coudeyras S, Dosgilbert A, Charbonnel N, Alamé J, Tridon A, Forestier C. Dose-dependent immunomodulation of human dendritic cells by the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35. *PLoS One* 2011; 6: e18735
- FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including poder milk with live lactic acid bacteria; 2001. www.fao.org

FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food, 2002

Feng T, Elson CO. Adaptive immunity in the host-microbiota dialog. *Mucosal Immunol* 2011; 4: 15-21

Feng T, Elson CO, Cong Y. Treg cell-Ig A axis in maintenance of host immune homeostasis with microbiota. *Int Immunopharmacol* 2011; 11: 589-592

Ferrer Lorente B, Dalmau Serra J Alimentos funcionales: Probióticos. *Acta Pediatr Esp* 2001; 59: 150-5

Floch MH. The effect of probiotics on host metabolism: the microbiota and fermentation. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: S19-21

Fogli-Cawley JJ, Dwyer JT, Saltzman E, McCullough ML, Troy LM, Meigs JB, Jacques PF. The 2005 dietary guidelines for Americans and risk of the metabolic syndrome. *J Clin Nutr* 2007; 86: 1193-201

Forchielli ML, Walker WA. The role of gut-associated lymphoid tissues and mucosal defence. *Br J Nutr* 2005; 93: S41-8

Forestier C, De Champs C, Vatoux C, Joly. Probiotic activities of *Lactobacillus casei rhamnosus*: In vitro adherence to intestinal cells and antimicrobial properties. *Res Microbiol* 2001; 152: 167-73

Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 13780-5

Frick JS, Schenk K, Quitadamo M, Kahl F, Koberle M, Bohn E, Aepfelbacher M, Autenrieth IB. *Lactobacillus fermentum* attenuates the proinflammatory effect of *Yersinia enterocolitica* on human epithelial cells. *Inflamm Bowel Dis* 2007; 13: 83-90

Fries PN, Griebel PJ Mucosal dendritic cell diversity in the gastrointestinal tract. *Cell Tissue Res* 2010

FuFoSe. Scientific concepts of functional foods in Europe. *Br J Nutr* 1999; 81: s1-27

Fukushima M, Yamada A, Endo T, Nakano M. Effects of A Mixture of Organisms, *Lactobacillus acidophilus* or *Streptococcus faecalis* on D6-Desaturase Activity in The Livers of Rats Fed A Fat- and Cholesterol-Enriched Diet. *Nutrients* 1999; 15: 373-8

Fuller R. History and development of probiotics. In R. Fuller, *Probiotics, the scientific basis* 1992; 1-8

Fuller R. Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol* 1989; 66: 365-78

- Galdeano CM, Perdigon G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J Appl Microbiol* 2004; 97: 673-81
- Ganguly D, Chamilos G, Lande R, Gregorio J, Meller S, Facchinetti V, Homey B, Barrat FJ, Zal T, Gilliet M. Self-RNA-antimicrobial peptide complexes activate human dendritic cells through TLR7 and TLR8. *J Exp Med* 2009; 206: 1983-94
- Gantier MP, Tong S, Behlke MA, Xu D, Phipps S, Foster PS, Williams BRG. TLR7 is involved in sequence-specific sensing of single-stranded RNAs in human macrophages. *J Immunol* 2008; 180: 2117-24
- Gardiner GE, Casey PG, Casey G, Lynch PB, Lawlor PG, Hill C, Fitzgerald GF, Stanton C, Ross RP. Relative ability of orally administered *Lactobacillus murinus* to predominate and persist in the porcine gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 1895-906
- Gareau MG, Sherman PM, Walker WA. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010; 7: 503-14
- Garrett WS, Gordon JI, Glimcher LH. Homeostasis and inflammation in the intestine. *Cell* 2010; 140: 859-70
- Genovese KJ, Anderson RC, Harvey RB, Nisbet DJ. Competitive exclusion treatment reduces the mortality and fecal shedding associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in nursery-raised neonatal pigs. *Can J Vet Res* 2000; 64: 204-7
- Gil A, Rueda R. Interaction of early diet and the development of the immune system. *Nutr Res Rev* 2002; 15: 263-92
- Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006; 312: 1355-9
- Giovannini M et al. A randomized prospective double blind controlled trial on effects of long-term consumption of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in pre-school children with allergic asthma and/or rhinitis. *Pediatr Res* 2007; 62: 215-20
- Gobbato N, Maldonado Galdeano C, Perdigón G. Study of some of the mechanisms involved in the prevention against *Salmonella enteritidis* serovar typhimurium infection by lactic acid bacteria. *Food Agric Immunol* 2008; 19: 11-23
- Golowczyc MA, Mobili P, Garrote GL, Abraham AG, De Antoni GL. Protective action of *Lactobacillus kefir* carrying S-layer protein against *Salmonella enterica* serovar enteritidis. *Int J Food Microbiol* 2007; 118: 264-73
- Gómez-Llorente C, Muñoz S, Gil A. Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Proc Nutr Soc* 2010; 69: 381-9
- Gourbeyre P, Denery S, Bodinier M. Probiotics, prebiotics, and synbiotics: impact on the gut immune system and allergic reactions. *J Leukoc Biol* 2011

Granato D, Bergonzelli GE, Pridmore RD, Marvin L, Rouvet M, Corthesy-Theulaz IE. Cell surface-associated elongation factor TU mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infect Immun* 2004; 72: 2160-9

Greer JB, O'Keefe SJ. Microbial induction of immunity, inflammation and cancer. *Front Physiol* 2011; 1: 168

Greten FR, Eckmann L, Greten TF, Park JM, Li ZW, Egan LJ, Kagnoff MF, Karin M. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004; 118: 285-96

Gueimonde M, Jalonen L, He F, et al. Adhesion and competitive inhibition and displacement of human enteropathogens by selected lactobacilli. *Food Res Int* 2006; 39: 467-71

Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. Breastmilk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology* 2007; 92: 64-6

Gupta V, Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol* 2009; 27:202-9

Haas T, Metzger J, Schmitz F, Heit A, Müller T, Latz E, Wagner H. The DNA sugar backbone 2' deoxyribose determines Toll-like receptor 9 activation. *Immunity* 2008; 28: 315-23

Hahn BH, Grossman J, Chen W, MacMahon M. The pathogenesis of the atherosclerosis in autoimmune rheumatic diseases: roles of inflammation and dyslipidemia. *J Autoimmun* 2007; 28: 69-75

Han L, Man C, Lv X, Wang M, Zhang G, Liu Y, Jiang Y. *Lactobacillus acidophilus* NCFM affects host adhesion-related gene expression after adhering to host. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 2011; 51: 609-14

Hansen J, Gulati A, Sartor RB. The role of mucosal immunity and host genetics in defining intestinal commensal bacteria. *Curr Opin Gastroenterol* 2010; 26: 564-71

Hanson LA, Silfverdal SA. The mother's immune system is a balanced threat to the foetus, turning to protection of the neonate. *Acta Paediatr* 2009; 98: 221-8

Harata G, He F, Kawase M, Hosono A, Takahashi K, Kaminogawa S. Differentiated implication of *Lactobacillus GG* and *L. gasseri* TMC0356 to immune responses of murine Peyer's patch. *Microbiol Immunol* 2009; 53: 475-80

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: 1602-9

Hattori M, Taylor TD. The human intestinal microbiome: a new frontier of human biology. *DNA Res* 2009; 16: 1-12

Hayden MS, West AP, Ghosh S. NF-kappaB and the immune response. *Oncogene* 2006; 25: 6758-6780

- He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J, Shan M, Chadburn A, Villanacci V, Plebani A et al. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 2007; 26: 812-26
- Heil F, Hemmi H, Hochrein H, Ampenberger F, Kirschning C, Akira S, Lipford G, Wagner H, Bauer S. Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004; 303: 1526-9
- Henderson P, van Limbergen JE, Schwarze J, Wilson DC. Function of the intestinal epithelium and its dysregulation in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17:382-95
- Herbrand H, Bernhardt G, Forster R, Pabst O. Dynamics and function of solitary intestinal lymphoid tissue. *Crit Rev Immunol* 2008; 28: 1-13
- Hickson M, D'Souza AL, Muthu N, Rogers TR, Want S, Rajkumar C, Bulpitt CJ. Use of probiotic *Lactobacillus* preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. *BMJ* 2007; 335: 80
- Hilton E, Kolakowski P, Singer C, Smith M. Efficacy of *Lactobacillus* GG as a Diarrheal Preventive in Travelers. *J Travel Med* 1997; 4: 41-43
- Hirano J, Yoshida T, Sugiyama T, Koide N, Mori I, Yokochi T. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 405-9
- Hoarau C, Lagaraine C, Martin L, Velge-Roussel F, Lebranchu Y. Supernatant of *Bifidobacterium breve* induces dendritic cell maturation, activation, and survival through a Toll-like receptor 2 pathway. *J Allergy Clin Immunol* 2006; 117: 696-702
- Holoda E, Vu-Khac H, Andrasková S, Chomová Z, Wantrubová A, Krajnák M, Pilipinec E. PCR assay for detection and differentiation of K88ab (1), K88ab (2), K88ac, and K88ad fimbrial adhesins in *E. coli* strains isolated from diarrheic piglets. *Folia Microbiol* 2005; 50: 107-12
- Holzapfel W H, Haberer P, Geisen R, Bjorkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 365S-73S
- Hooper LV, Gordon JI. Commensal host-bacterial relationships in the gut. *Science* 2001; 292: 1115-8
- Hooper LV, Macpherson AJ Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* 2010; 10: 159-69
- Hopkins MJ, Macfarlane GT. Changes in predominant bacterial populations in human faeces with age and with *Clostridium difficile* infection. *J Med Microbiol* 2002; 51: 448-54
- Horie M, Ishiyama A, Fujihira-Ueki Y, Sillanpa J, Korhonen TK, Toba T. Inhibition of the adherence of *Escherichia coli* strains to basement membrane by *Lactobacillus crispatus* expressing an S-layer. *J Appl Microbiol* 2002; 92: 396-403

Hörmannspenger G, Haller D. Molecular crosstalk of probiotic bacteria with the intestinal immune system: clinical relevance in the context of inflammatory bowel disease. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 63-73

Hua MC, Lin TY, Lai MW, Kong MS, Chang HJ, Chen CC. Probiotic Bio-Three induces Th1 and anti-inflammatory effects in PBMC and dendritic cells. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3529-40

Huang SH, He L, Zhou Y, Wu CH, Jong A. *Lactobacillus rhamnosus* GG Suppresses Meningitic *E. coli* K1 Penetration across Human Intestinal Epithelial Cells In vitro and Protects Neonatal Rats against Experimental Hematogenous Meningitis. *Int J Microbiol* 2009

Huang Y, Zheng Y. The probiotic *Lactobacillus acidophilus* reduces cholesterol absorption through the down-regulation of Niemann-Pick C1-like 1 in Caco-2 cells. *Br J Nutr* 2010; 103: 473-8

Iannitti T, Palmieri B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. *Clin Nutr* 2010; 29: 701-25

Imaoka A, Shima T, Kato K, Mizuno S, Uehara T, Matsumoto S, Setoyama H, Hara T, Umesaki Y. Anti-inflammatory activity of probiotic *Bifidobacterium*: Enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2511-6

Indrio F, Neu J The intestinal microbiome of infants and the use of probiotics. *Curr Opin Pediatr* 2011; 23: 145-50

Ioannou S, Voulgarelis M. Toll-like receptors, tissue injury, and tumorigenesis. *Mediators Inflamm* 2010; pii: 581837

Isaacs K, Herfarth H. Role of probiotic therapy in IBD. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 1597-605

Ishii H, Isomoto H, Shikuwa S, Hayashi T, Inoue N, Yamaguchi N, Ohnita K, Nanashima A, Ito M, Nakao K, Kohno S. Peyer's Patches in the Terminal Ileum in Ulcerative Colitis: Magnifying Endoscopic Findings. *J Clin Biochem Nutr* 2010; 46: 111-8

Ishikawa H, Tanaka K, Maeda Y, Aiba Y, Hata A, Tsuji NM, Koga Y, Matsumoto T. Effect of intestinal microbiota on the induction of regulatory CD25+ CD4+ T cells. *Clin Exp Immunol* 2008; 153: 127-35

Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsén B, Lahti K, Nissén M, Taskinen MR, Groop L. Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 2001; 24: 683-9

Ivanov II, Frutos Rde L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, Finlay BB, Littman DR. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe* 2008; 4: 337-49

Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010; 327:291-5

- Izquierdo E, Medina M, Ennahar S, Marchioni E, Sanz Y. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains. *Curr Microbiol* 2008; 56: 613-8
- Ji GE. Probiotics in primary prevention of atopic dermatitis. *Forum Nutr* 2009; 61:117-28
- Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 2004; 126: 1358-73
- Jin MS, Lee JO. Structures of the Toll-like receptor family and its ligand complexes. *Immunity* 2008; 29: 182-91
- Joffre O, Nolte MA, Sporri, R, Reis E Sousa C. Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2009; 227: 234-47
- Johnson-Henry KC, Hagen KE, Gordonpour M, Tompkins TA, Sherman PM. Surface-layer protein extracts from *Lactobacillus helveticus* inhibit enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adhesion to epithelial cells. *Cell Microbiol* 2007; 9: 356-67
- Jones ML, Chen H, Ouyang W, Metz T, Prakash S. Microencapsulated Genetically Engineered *Lactobacillus plantarum* 80 (pCBH1) for Bile Acid Deconjugation and Its Implication in Lowering Cholesterol. *J BioMed Biotechnol* 2004; 1: 61-9
- Jutel M, Akdis CA. T-cell subset regulation in atopy. *Curr Allergy Asthma Rep* 2011; 11: 139-45
- Kalliomaki M et al. Probiotics in primary prevention of atopic diseases: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* 2001; 357: 1076-9
- Kamada N, Maeda K, Inoue N, Hisamatsu T, Okamoto S, Hong KS, Yamada T, Watanabe N, Tsuchimoto K, Ogata H, Hibi T. Non pathogenic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inhibits signal transduction in intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 2008; 76: 214-20
- Kang JY, Nan X, Jin MS, Youn SJ, Ryu YH, Mah S, Han SH, Lee H, Paik SG, Lee JO. Recognition of lipopeptide patterns by Toll-like receptor 2-Toll-like receptor 6 heterodimer. *Immunity* 2009; 31: 873-84
- Karska-Wysocki B, Bazo M, Smoragiewicz W. Antibacterial activity of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbiol Res* 2010; 165: 674-86
- Kawagoe T, Sato S, Matsushita K, Kato H, Matsui K, Kumagai Y, Saitoh T, Kawai T, Takeuchi O, Akira S. Sequential control of Toll-like receptor-dependent responses by IRAK1 and IRAK2. *Nat Immunol* 2008; 9: 684-91
- Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: Update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373-84

Kekkonen RA, Sysi-Aho M, Seppanen-Laakso T, Julkunen I, Vapaatalo H, Oresic M, et al. Effect of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG intervention on global serum lipidomic profiles in healthy adults. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 3188-94

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: 104-12

Kelly D, King T, Aminov R. Importance of microbial colonization of the gut in early life to the development of immunity. *Mutat Res* 2007; 622: 58-69

Kelsall BL. Innate and adaptive mechanisms to control pathological intestinal inflammation. *J Pathol* 2008; 214: 242-59

Kelsall BL, Rescigno M. Mucosal Dendritic Cells in Immunity and Inflammation. *Nat Immunol* 2004; 5: 1091-5

Keshav S. Paneth cells: leukocyte-like mediators of innate immunity in the intestine. *J Leukoc Biol* 2006; 80: 500-8

Khoo JJ, Forster S, Mansell A. Toll-like receptors as interferon-regulated genes and their role in disease. *J Interferon Cytokine Res* 2011; 31: 13-25

Kim Y, Han KS, Imm JY, Oh S, You S, Park S, Kim SH. Inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* lysates on the cytotoxic activity of Shiga-like toxin 2 produced from *Escherichia coli* O157:H7. *Lett Appl Microbiol* 2006; 43: 502-7

Kim YG, Ohta T, Takahashi T, et al. Probiotic *Lactobacillus casei* activates innate immunity via NF-kappaB and p38 MAP kinase signaling pathways. *Microbes Infect* 2006; 8: 994-1005

Kimoto H, Ohmomo S, Okamoto T. Cholesterol Removal from Media by Lactococci. *J DairySci* 2002; 85: 3182-8

Kingma SD, Li N, Sun F, Valladares RB, Neu J, Lorca GL. *Lactobacillus johnsonii* N6.2 stimulates the innate immune response through Toll-like receptor 9 in Caco-2 cells and increases intestinal crypt Paneth cell number in biobreeding diabetes-prone rats. *J Nutr* 2011; 141: 1023-8

Klingberg TD, Budde BB. The survival and persistence in the human gastrointestinal tract of five potential probiotic lactobacilli consumed as freeze-dried cultures or as probiotic sausage. *Int J Food Microbiol* 2006; 109: 157-9

Köhler H. Salmonellosis in young infants. *Klin Padiatr* 2009; 221: 54-6

Kranich J, Maslowski KM, Mackay CR. Commensal flora and the regulation of inflammatory and autoimmune responses. *Semin Immunol* 2011; 23: 139-45

Kukkonen K, Savilahti E, Haahtela T, Juntunen-Backman K, Korpela R, Poussa T, et al. Probiotics and prebiotic galacto-oligosaccharides in the prevention of allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 192-8

- Kumar H, Kawai T, Akira S. Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 2011; 30: 16-34
- Kumar H, Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and innate immunity. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 388: 621-5
- Kumar M, Kumar A, Nagpal R, Mohania D, Behare P, Verma V, Kumar P, Poddar D, Aggarwal PK, Henry CJ, Jain S, Yadav H. Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *Int J Food Sci Nutr* 2010; 61: 473-96
- Kumar A, Wu H, Collier-Hyams LS, Hansen JM, Li T, Yamoah K, et al. Commensal bacteria modulate cullin-dependent signaling via generation of reactive oxygen species. *EMBO J* 2007; 26: 4457-66
- Ladero V, Fernandez M, Alvarez MA. Isolation and identification of tyramine-producing enterococci from human fecal samples. *Can J Microbiol* 2009; 55: 215-8
- Lakhdari O, Cultrone A, Tap J, Gloux K, Bernard F, Ehrlich SD, Lefèvre F, Doré J, Blottière HM. Functional metagenomics: a high throughput screening method to decipher microbiota-driven NF- κ B modulation in the human gut. *PLoS One* 2010; 5: e13092
- Lan RY, Selmi C, Gershwin ME. The regulatory, inflammatory, and T cell programming roles of interleukin-2 (IL-2). *J Autoimmun* 2008; 31: 7-12
- Langerhans P. Über die nerven der menschlichen haut. *Arch Pathol Anatom* 1868; 44: 325-37
- Lanning DK, Rhee KJ, Knight KL. Intestinal bacteria and development of the B-lymphocyte repertoire. *Trends Immunol* 2005; 26: 419-25
- Laparra JM, Sanz Y. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett Appl Microbiol* 2009; 49: 695-701
- Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S, Rodriguez JM, Boza J, Xaus J Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breastmilk. *Br J Nutr* 2007; 98: S96-100
- Lavelle EC, Murphy C, O'Neill LA, Creagh EM. The role of TLRs, NLRs, and RLRs in mucosal innate immunity and homeostasis. *Mucosal Immunol* 2010; 3: 17-28
- Lavoie PM, Huang Q, Jolette E, Whalen M, Nuyt AM, Audibert F, Speert DP, Lacaze-Masmonteil T, Soudeyns H, Kollmann TR. Profound lack of interleukin (IL)-12/IL-23p40 in neonates born early in gestation is associated with an increased risk of sepsis. *J Infect Dis* 2010; 202: 1754-63
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Genes and molecules of *Lactobacillus* supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev* 2008; 72: 728-64
- Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SC. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 171-84
- LeBlanc JG, Matar C, Valdez JC et al. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *J Dairy Sci* 2002; 85: 2733-42

Lee J, Kim Y, Yun HS, Kim JG, Oh S, Kim SH. Genetic and proteomic analysis of factors affecting serum cholesterol reduction by *Lactobacillus acidophilus* A4. *Appl Environ Microbiol* 2010; 4829-35

Lee JH, Kim MJ, Jeong DW, Kim M, Kim JH, Chang HC, Chung DK, Kim HY, Kim KH, Lee HJ. Identification of bacteriocin-producing *Lactobacillus paraplantarum* first isolated from kimchi. *J Microbiol Biotechnol* 2005; 15: 428-33

Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* 2010; 330: 1768-73

Lee YK, Puong KY, Ouwehand AC, Salminen S. Displacement of bacterial pathogens from mucus and Caco-2 cell surface by lactobacilli. *J Med Microbiol* 2003; 52: 925-930

Leffler DA, Lamont JT. Treatment of *Clostridium difficile*-associated disease. *Gastroenterology* 2009; 136: 1899-912

Lenaerts K, Bouwman FG, Lamers WH, Renes J, Mariman EC. Comparative proteomic analysis of cell lines and scrapings of the human intestinal epithelium. *BMC Genomics* 2007; 8: 91

Lenoir-Winjkooop I, Sanders ME, Cabana MD, Caglar E, Corthier G, Rayes N, Sherman PM, Timmerman HM, Vaneechoutte M, Van Loo J, Wolvers DA. Probiotic and prebiotic influence beyond the intestinal tract. *Nutr Rev* 2007; 65: 469-89

Levite M. Neurotransmitters activate T-cells and elicit crucial functions via neurotransmitter receptors. *Curr Opin Pharmacol* 2008; 8: 460-71

Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 11070-5

Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science* 2008; 320: 1647-51

Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6: 776-88

Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006; 124: 837-48

Lilly DM & Stillwell RH. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965; 147: 747-8

Lin PW, Myers LE, Ray L, Song SC, Nasr TR, Berardinelli AJ, et al. *Lactobacillus rhamnosus* blocks inflammatory signaling in vivo via reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 1205-11

Lin PW, Nasr TR, Berardinelli AJ, Kumar A, Neish AS. The probiotic *Lactobacillus* GG may augment intestinal host defense by regulating apoptosis and promoting cytoprotective responses in the developing murine gut. *Pediatr Res* 2008; 64: 511-6

- Lin SC, Lo YC, Wu H. Helical assembly in the MyD88-IRAK4- IRAK2 complex in TLR/IL-1R signaling. *Nature* 2010; 465: 885-90
- Lin WH, Yu B, Jang SH, Tsen HY. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe* 2007; 13: 107-13
- Liong MT. Probiotics: a critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesterolemic, and perimenopausal treatments. *Nutr Rev* 2007; 6: 316-28
- Liong MT. Probiotics: Biology, Genetics and Health aspects. *Microbiol Monographs* 2011
- Liong MT. Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutr Rev* 2008; 66: 192-202
- Liu G, Zhao Y. Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4⁺CD25⁺T cells. *Immunology* 2007; 122: 149-56
- Liu K, Nussenzweig MC. Development and homeostasis of dendritic cells. *Eur J Immunol* 2010; 40: 2099-102
- Liu K, Victora GD, Schwickert TA et al. *In vivo* analysis of dendritic cell development and homeostasis. *Science* 2009; 324: 392-7
- Lonnermark E et al. Intake of *Lactobacillus plantarum* reduces certain gastrointestinal symptoms during treatment with antibiotics. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: 106-12
- López P, Gueimonde M, Margolles A, Suárez A. Distinct *Bifidobacterium* strains drive different immune responses *in vitro*. *Int J Food Microbiol* 2010; 138: 157-65
- López-Gigosos R, Garcia-Fortea P, Calvo MJ, Reina E, Diez-Diaz R, Plaza E. Effectiveness and economic analysis of the whole cell/recombinant B subunit (WC/rbs) inactivated oral cholera vaccine in the prevention of traveller's diarrhoea. *BMC Infect Dis* 2009; 16: 9: 65
- Lorea Baroja M et al. Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clin Exp Immunol* 2007; 149: 470-79
- Lotz M, Ménard S, Hornef M. Innate immune recognition on the intestinal mucosa. *Int J Med Microbiol* 2007; 297: 379-92
- Loures FV, Pina A, Felonato M, Calich VLG. TLR2 is a negative regulator of Th17 cells and tissue pathology in a pulmonary model of fungal infection. *J Immunol* 2009; 183: 1279-90
- Lundin A, Bok CM, Aronsson L, Björkholm B, Gustafsson JA, Pott S, Arulampalam V, Hibberd M, Rafter J, Pettersson S. Gut flora, Toll-like receptors and nuclear receptors: a tripartite communication that tunes innate immunity in large intestine. *Cell Microbiol* 2008; 10: 1093-103
- Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23: 445-9
- Ly NP, Litonjua A, Gold DR, Celedón JC. Gut microbiota, probiotics, and vitamin D: Interrelated exposures influencing allergy, asthma, and obesity? *J Allergy Clin Immunol* 2011

Lye HS, Kuan CY, Ewe JA, Fung WY, Liong MT. The improvement of hypertension by probiotics: effects on cholesterol, diabetes, renin, and phytoestrogens. *Int J Mol Sci* 2009; 10: 3755-75

Lye HS, Rusul G, Liong MT. Removal of Cholesterol by Lactobacilli via Incorporation of and Conversion to Coprostanol. *J Dairy Sci* 2010; 93: 1383-92

Llopis M, Antolin M, Carol M, Borrueal N, Casellas F, Martinez C, Espín-Basany E, Guarner F, Malagelada JR. Lactobacillus casei downregulates commensals' inflammatory signals in Crohn's disease mucosa. *Inflamm Bowel Dis* 2009; 15: 275-83

Ma D, Forsythe P, Bienenstock J. Live Lactobacillus rhamnosus [corrected] is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. *Infect Immun* 2004; 72: 5308-14

Macdonald TT, Monteleone G. Immunity, inflammation and allergy in the gut. *Science* 2005; 307: 1920-5

Macdonald TT, Monteleone I, Fantini MC, Monteleone G. Regulation of homeostasis and inflammation in the intestine. *Gastroenterology* 2011; 140: 1768-75

Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between comensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004; 4: 478-85

Madsen K. Probiotics and the immune response. *J Clin Gastroenterol* 2006; 40: 232-4

Magalhaes JG, Tattoli I, Girardin SE. The intestinal epithelial barrier: how to distinguish between the microbial flora and pathogens. *Semin Immunol* 2007; 19: 106-15

Maldonado-Contreras AL, McCormick BA. Intestinal epithelial cells and their role in innate mucosal immunity. *Cell Tissue Res* 2011; 343: 5-12

Maldonado Galdeano C & Perdígón G. The probiotic bacterium Lactobacillus casei induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vaccine Immunol* 2006; 13: 219-226

Mariat D et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol* 2009; 9: 123

Martens EC, Chiang HC, Gordon, JI. Mucosal glycan foraging enhances fitness and transmission of a saccharolytic human gut bacterial symbiont. *Cell Host Microbe* 2008; 4: 447-57

Martin R, Jimenez E, Heilig H, Fernandez M, Martin LM, Zoetendal EG, Rodriguez JM. Isolation of bifidobacteria from breastmilk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 965-9

Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 2005; 122: 107-18

- Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008; 453: 620-5
- McFarland LV. Antibiotic-associated diarrhea: epidemiology, trends and treatment. *Future Microbiol* 2008; 3: 563-78
- McFarland LV. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol* 2006; 101: 812-22
- McFarland LV. Systematic review and metaanalysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 2202-22
- McFarland LV. Update on the changing epidemiology of *Clostridium difficile*-associated disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2008; 5: 40-8
- Medellin-Peña MJ, Wang H, Johnson R, Anand S, Griffiths MW. Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. *Appl Environ Microbiol* 2007; 73: 4259-67
- Medina M, Izquierdo E, Ennahar S, Sanz Y. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium longum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin Exp Immunol* 2007; 150: 531-8
- Mesquita Júnior D, Araújo JA, Catelan TT, Souza AW, Cruvinel Wde M, Andrade LE, Silva NP. Immune system -part II: basis of the immunological response mediated by T and B lymphocytes. *Rev Bras Reumatol* 2010; 50: 552-80
- Mileti E, Matteoli G, Iliev ID, Rescigno M. Comparison of the immunomodulatory properties of three probiotic strains of *Lactobacilli* using complex culture systems: prediction for in vivo efficacy. *PLoS One* 2009; 4: e7056
- Miyoshi Y, Okada S, Uchimura T, Satoh E. A mucus adhesion promoting protein, Map A, mediates the adhesion of *Lactobacillus reuteri* to Caco-2 human intestinal epithelial cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 2006; 70: 1622-8
- Mizoguchi E et al. TNF receptor type I-dependent activation of innate responses to reduce intestinal damage-associated mortality. *Gastroenterology* 2008; 134: 470-80
- Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, Quigley EM. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* 2010; 59: 325-32
- 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: 2880-5
- Mollet B, Rowland I. Functional foods: at the frontier between food and pharma. *Curr Opin in Biotechnol* 2002; 13: 483-5
- Mora JR, Iwata M, Eksteen B, Song SY, Junt T, Senman B, et al. Generation of guthoming IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* 2006; 314: 1157-60

Moretó M, Pérez-Bosque A. Dietary plasma proteins, the intestinal immune system, and the barrier functions of the intestinal mucosa. *J Anim Sci* 2009; 87: E92-100

Moretta A, Marcenaro E, Parolini S, Ferlazzo G, Moretta L. NK cells at the interface between innate and adaptive immunity. *Cell Death Differ* 2008; 15: 226-33

Morris AE, Liggitt HD, Hawn TR, Skerrett SJ. Role of Toll-like receptor 5 in the innate immune response to acute *P. aeruginosa* pneumonia. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2009; 297:L1112-9

Mowat AM. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 331-41

Mukherjee S, Vaishnava S, Hooper LV. Multi-layered regulation of intestinal antimicrobial defense. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65: 3019-27

Müller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nat Immunol* 2010; 11:21-7

Muñoz S, Bermúdez-Brito M, Gómez-Llorente C, Bernal M, Ortuño-Díaz I, Gil A. *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 decreases inflammatory responses induced by enterotoxigenic *Escherichia coli* in Caco-2 cells. [Abstract]*Ann Nutr Metab* 2011; 58: 122

Murgas Torrazza R, Neu J. The developing intestinal microbiome and its relationship to health and disease in the neonate. *J Perinatol* 2011; 31: S29-34

Murosaki S, Muroyama K, Yamamoto Y, Yoshikai Y. Antitumor effect of heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 through restoration of impaired interleukin-12 production in tumor-bearing mice. *Cancer Immunol Immunother* 2000; 49: 157-64

Nakamura N et al. Molecular ecological analysis of faecal bacterial populations from term infants fed formula supplemented with selected blends of prebiotics. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 1121-8

Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology* 2009; 136: 65-80

Nesser JR, Granato D, Rouvet M, et al. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology* 2000; 10: 1193-9

Ng SC, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Intestinal dendritic cells: their role in bacterial recognition, lymphocyte homing, and intestinal inflammation. *Inflamm Bowel Dis* 2010; 16:1787-807

Nguyen TDT, Kang JH, Lee MS. Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a Potential Probiotic Bacterium with Cholesterol-Lowering Effects. *Int J Food Microbiol* 2007; 113: 358-61

Niess JH, Reinecker HC. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005a; 307: 254-8

Niess JH, Reinecker HC. Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol* 2005b; 21: 687-91

- Nijhuis LE, Olivier BJ, de Jonge WJ. Neurogenic regulation of dendritic cells in the intestine. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 2002-8
- Novak N, Bieber T. Dendritic cells as regulators of immunity and tolerance. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: S370-4
- O'Flaherty S, Ross RP, Meaney W, Fitzgerald GF, Elbreki MF, Coffey A. Potential of the polyvalent anti-Staphylococcus bacteriophage K for control of antibiotic-resistant staphylococci from hospitals. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 1836-42
- O'Hara AM, Shanahan F. Gut microbiota: mining for therapeutic potential. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 274-84
- O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO* 2006; 7: 688-93
- Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S, Lara-Villoslada F, Fonollá J, Navas M, Rodríguez JM, Xaus J Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* 2007; 23: 254-60
- Ooi LG, Liong MT. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: a review of in vivo and in vitro findings. *Int J Mol Sci* 2010; 11: 2499-522
- Ouwehand AC, Parhiala R, Salminen S et al. Influence of the endogenous mucosal microbiota on the adhesion of probiotic bacteria in vitro. *Microb Ecol* 2004; 16: 202-4
- Pacifici R. T cells: critical bone regulators in health and disease. *Bone* 2010; 47: 461-71
- Pagnini C, Saeed R, Bamias G, Arseneau KO, Pizarro TT, Cominelli F. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 454-9
- Pai R, Kang G. Microbes in the gut: a digestible account of host-symbiont interactions. *Indian J Med Res* 2008; 128: 587-94
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol* 2007; 5: e177
- Parker RB. Probiotics, the other half of the story. *Ani Nutr Health* 1974; 29: 4-8
- Pedone CA, Amaud CC, Postaire ER, Bouley CF, Reinert P. Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *Int J Clin Pract* 2000; 54: 568-71
- Pelletier X, Laure-Boussuge S, Donazzolo Y. Hydrogen excretion upon ingestion of dairy products in lactose-intolerant male subjects: importance of the live flora. *Eur J Clin Nutr* 2001; 55: 509-12
- Penders J, Thijs C, Vink C, Stelma FF, Snijders B, Kummeling I, Van den Brandt PA, Stobberingh EE. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* 2006; 118: 511-21

Peron JP, de Oliveira AP, Rizzo LV. It takes guts for tolerance: the phenomenon of oral tolerance and the regulation of autoimmune response. *Autoimmun Rev* 2009; 9: 1-4

Petrof EO. Probiotics and Gastrointestinal Disease: Clinical Evidence and Basic Science. *Antiinflamm Antiallergy Agents Med Chem*. 2009; 8: 260-269

Petrof EO, Claud EC, Sun J, Abramova T, Guo Y, Waypa TS, He SM, Nakagawa Y, Chang EB. Bacteria-free solution derived from *Lactobacillus plantarum* inhibits multiple NF- κ B pathways and inhibits proteasome function. *Inflamm Bowel Dis* 2009

Petzke MM, Brooks A, Krupna MA, Mordue D, Schwartz I. Recognition of *Borrelia burgdorferi*, the Lyme disease spirochete, by TLR7 and TLR9 induces a type I IFN response by human immune cells. *J Immunol* 2009; 183: 5279-92

Plantinga TS, van Maren WW, van Berghenhenegouwen J, Hameetman M, Nierkens S, Jacobs C, de Jong DJ, Joosten LA, van't Land B, Garssen J, Adema GJ, Netea MG. Differential Toll-like receptor recognition and induction of cytokine profile by *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus* strains of probiotics. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18: 621-8

Pham M, Lemberg DA, Day AS. Probiotics: sorting the evidence from the myths. *Med J Aust* 2008; 188: 304-8

Pillai A, Nelson R. Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 1: CD004611

Piotrowska M, Zakowska Z. The elimination of Ochratoxin A by lactic acid bacteria strains. *Polish J Microbiol* 2005; 54: 279-86

Possemiers S, Bolca S, Verstraete W, Heyerick A. The intestinal microbiome: A separate organ inside the body with the metabolic potential to influence the bioactivity of botanicals. *Fitoterapia* 2010

Pronio A et al. Probiotic administration in patients with ileal pouch-anal anastomosis for ulcerative colitis is associated with expansion of mucosal regulatory cells. *Inflamm Bowel Dis* 2008; 14: 662-8

Putala H, Barrangou R, Leyer GJ, Ouwehand AC, Hansen EB, Romero DA, Rautonen N. Analysis of the human intestinal epithelial cell transcriptional response to *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius*, *Bifidobacterium lactis* and *Escherichia coli*. *Benef Microbes* 2010; 1: 283-95

Putala H, Salusjarvi T, Nordstrom M, Saarinen M, Ouwehand AC, Bech HE, Rautonen N. Effect of four probiotic strains and *Escherichia coli* O157:H7 on tight junction integrity and cyclooxygenase expression. *Res Microbiol* 2008; 159: 692-8

Qin J et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464: 59-65

Quigley EM. Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacol Res* 2010; 61: 213-8

- Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 2004; 126: 520-8
- Rafter J, Bennett M, Caderni G, Clune Y, Hughes R, Karlsson PC, Klinder A, O’Riordan M, O’Sullivan GC, Pool-Zobel B, Rechkemmer G, Roller M, Rowland I, Salvadori M, Thijs H, Van Loo J, Watzl B, Collins JK. Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. *Am J Clin Nutr* 2007; 85: 488-96
- Rajilic-Stojanovic M, Heilig HGJ, Molenaar D, Kajander K, Surakka A, Smidt H, De Vos WM. Development and application of the human intestinal tract chip, a phylogenetic microarray: analysis of universally conserved phylotypes in the abundant microbiota of young and elderly adults. *Environ Microbiol* 2009, 11: 1736-51
- Rakoff-Nahoum S, Hao L, Medzhitov R. Role of toll-like receptors in spontaneous commensal-dependent colitis. *Immunity* 2006; 25: 319-329
- Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Innate immune recognition of the indigenous microbial flora. *Mucosal Immunol* 2008; 1: S10- S14
- Raman M, Milestone AN, Walters JR, Hart AL, Ghosh S. Vitamin D and gastrointestinal diseases: inflammatory bowel disease and colorectal cancer. *The rap Adv Gastroenterol* 2011; 4: 49-62
- Rautava S, Salminen S, Isolauri E. Specific probiotics in reducing the risk of acute infections in infancy—a randomised, double-blind, placebocontrolled study. *Br J Nutr* 2009; 101: 1722-6
- Reid G, Burton J Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes Infect* 2002; 4: 319-24
- Reid G, Younes JA, Van der Mei HC, Gloor GB, Knight R, Busscher HJ. Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities. *Nat Rev Microbiol* 2010
- Rescigno M, Di Sabatino A. Dendritic cells in intestinal homeostasis and disease. *J Clin Invest* 2009; 119: 2441-50
- Rescigno M, Lopatin U, Chieppa M. Interactions among dendritic cells, macrophages, and epithelial cells in the gut: implications for immune tolerance. *Curr Opin Immunol* 2008; 20: 669-75
- Rescigno M. The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends Immunol* 2011; 32: 256-64
- Resta SC. Effects of probiotics and commensals on intestinal epithelial physiology: implications for nutrient handling. *J Physiol* 2009; 587: 4169-74
- Resta-Lenert S, Barrett KE. Probiotics and commensals reverse TNF α - and IFN γ -induced dysfunction in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2006; 130: 731-746
- Rhee SH. Basic and translational understandings of microbial recognition by toll-like receptors in the intestine. *J Neurogastroenterol Motil* 2011; 17: 28-34

Rimoldi M, Chieppa M, Larghi P, Vulcano M, Allavena P, Rescigno M. Monocyte-derived dendritic cells activated by bacteria or by bacteria-stimulated epithelial cells are functionally different. *Blood* 2005a; 106: 2818-26

Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, Nespoli A, Viale G, Allavena P, Rescigno M. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol* 2005b; 6: 507-14

Rizzello V, Bonaccorsi I, Dongarrà ML, Fink LN, Ferlazzo G. Role of natural killer and dendritic cell crosstalk in immunomodulation by commensal bacteria probiotics. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011: 473097

Robinson CJ, Bohannan BJ, Young VB. From structure to function: the ecology of host-associated microbial communities. *Microbiol Mol Biol Rev* 2010; 74: 453-76

Romeo MG, Romeo DM, Trovato L, Oliveri S, Palermo F, Cota F, Betta P. Role of probiotics in the prevention of the enteric colonization by *Candida* in preterm newborns: incidence of late-onset sepsis and neurological outcome. *J Perinatol* 2010

Roda G, Sartini A, Zambon E, Calafiore A, Marocchi M, Caponi A, Belluzzi A, Roda E. Intestinal epithelial cells in inflammatory bowel diseases. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4264-71

Roselli M, Finamore A, Nuccitelli S, Carnevali P, Brigidi P, Vitali B, Nobili F, Rami R, Garaguso I, Mengheri E. Prevention of TNBS-induced colitis by different *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains is associated with an expansion of gd T and regulatory T cells of intestinal intraepithelial lymphocytes. *Inflamm Bowel Dis* 2009

Rosslund E, Langsrud T, Granum PE, Sorhaug T. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *Int J Food Microbiol* 2005; 98: 193-200

Round JL, Mazmanian SK. Inducible Foxp3⁺ regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 12204-9

Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 313-23

Ruiz PA, Hoffmann M, Szcesny S, Blaut M, Haller D. Innate mechanisms for *Bifidobacterium lactis* to activate transient pro-inflammatory host responses in intestinal epithelial cells after the colonization of germ-free rats. *Immunology* 2005; 115: 441-50

Ruszczynski M, Radzikowski A, Szajewska H. Clinical trial: effectiveness of *Lactobacillus rhamnosus* (strains e/N, Oxy and Pen) in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 28: 154-61

Rutella S, Locatelli F. Intestinal dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2011; 17: 3761-75

Rynda A, Maddaloni M, Mierzejewska D, et al. Low-dose tolerance is mediated by the microfold cell ligand, reovirus protein sigma1. *J Immunol* 2008; 180: 5187-200

- Salminen S, Nybom S, Meriluoto J, Collado MC, Vesterlund S, El-Nezami H. Interaction of probiotics and pathogens-benefits to human health? *Curr Opin Biotechnol* 2010; 21: 157-67
- Salzman NH. Microbiota-immune system interaction: an uneasy alliance. *Curr Opin Microbiol* 2011; 14: 99-105
- Sanchez, B, Bressollier P, Urdaci MC. Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular crosstalking with the host. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008; 54: 1-17
- Sanz Y, Nadal I, Sánchez E. Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections. *Recent Pat Antiinfect Drug Disc* 2007; 2: 148-56
- Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008; 134: 577-94
- Savage DC. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annu Rev Microbiol* 1977; 31: 107-33
- Scarpellini E, Campanale M, Leone D, Purchiaroni F, Vitale G, Lauritano EC, Gasbarrini A. Gut microbiota and obesity. *Intern Emerg Med* 2010; 5: S53-6
- Scharl M, Rogler G. Microbial sensing by the intestinal epithelium in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Int J Inflam* 2010; 2010: 671258
- Schenk M, Müller C. The mucosal immune system at the gastrointestinal barrier. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2008; 22: 391-409
- Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, Oelschlaeger TA, Stange EF, Fellermann K. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun* 2007; 75: 2399-407
- Schlee M. et al. Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte β -defensin 2. *Clin Exp Immunol* 2008; 151: 528-35
- Schloss PD, Handelsman J Status of the microbial census. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004; 68: 686-91
- Schreibelt G, Tel J, Sliepen KH, Benitez-Ribas D, Figdor CG, Adema GJ, de Vries IJ. Toll-like receptor expression and function in human dendritic cell subsets: implications for dendritic cell-based anti-cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother* 2010; 59: 1573-82
- Segawa S, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kobayashi N, Shigyo T, Kohgo Y. Probiotic-Derived Polyphosphate Enhances the Epithelial Barrier Function and Maintains Intestinal Homeostasis through Integrin-p38 MAPK Pathway. *PLoS One* 2011; 6: e23278
- Sekirov I, Russell SL, Antunes LC, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev* 2010; 90: 859-904

Servin AL, Coconnier MH. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Prac Res Clin Gastroenterol* 2003; 17: 741-54

Servin AL. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28: 405-40

Shale M, Ghosh S. How intestinal epithelial cells tolerise dendritic cells and its relevance to inflammatory bowel disease. *Gut* 2009; 58: 1291-9

Sharma R, Young C, Neu J Molecular modulation of intestinal epithelial barrier: contribution of microbiota. *J Biomed Biotechnol* 2010: 305879

Shida K, Nanno M. Probiotics and immunology: separating the wheat from the chaff. *Trends Immunol* 2008; 29: 565-73

Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007; 7: 19-30

Sibartie S, O'Hara AM, Ryan J, Fanning A, O'Mahony J, O'Neill S, Sheil B, O'Mahony L, Shanahan F. Modulation of pathogen-induced CCL20 secretion from HT-29 human intestinal epithelial cells by commensal bacteria. *BMC Immunol* 2009; 10: 54

Sigalet DL, Wallace L, De Heuval E, Sharkey KA. The effects of glucagon-like peptide 2 on enteric neurons in intestinal inflammation. *Neurogastroenterol Motil* 2010; 22: 1318- e350

Singh N, Thangaraju M, Prasad PD, Martin PM, Lambert NA, Boettger T, Offermanns S, Ganapathy V. Blockade of dendritic cell development by bacterial fermentation products butyrate and proprionate through a transporter (Slc5a8)-dependent inhibition of histone deacetylases. *J BiolChem* 2010; 285: 27601-8

Singh V, Singh K, Amdekar S, Singh DD, Tripathi P, Shama GL, Yadav H. Innate and specific gut-associated immunity and microbial interference. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2009; 55: 6-12

Sipos F, Muzes G, Galamb O, Spisák S, Krenács T, Tóth K, Tulassay Z, Molnár B. The possible role of isolated lymphoid follicles in colonic mucosal repair. *Pathol Oncol Res* 2010; 16: 11-8

Smits HH, Engering A, VanderKleij D, DeJong EC, Schipper K, VanCapel 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 non integrin. *J Allergy Clin Immunol* 2005; 115: 1260-7

Sobhani I, Tap J, Roudot-Thoraval F, Roperch JP, Letulle S, Langella P, Corthier G, Van Nhieu JT, Furet JP. Microbial Dysbiosis in Colorectal Cancer (CRC) Patients. *PLoS One* 2011; 6: 16393

Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermúdez-Humaran LG, Gratadoux JJ, Blugeon S, Bridonneau C, Furet JP, Corthier G, Grangette C, Vasquez N, Pochart P, Trugnan G, Thomas G, Blottiere HM, Dore J, Marteau P, Seksik P, Langella P. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 16731-6

- Soloff AC, Barratt-Boyes SM. Enemy at the gates: dendritic cells and immunity to mucosal pathogens. *Cell Res* 2010; 20: 872-85
- Sonnenburg JL, Angenent LT, Gordon JI. Getting a grip on things: how do the communities of bacterial symbionts become established in our intestine? *Nat Immunol* 2004; 5: 569-73
- Spoerl S, Li XC. Regulatory T cells and the quest for transplant tolerance. *Discov Med* 2011; 11: 25-34
- Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* 2003; 52: 1522-9
- Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF, Van Sinderen D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. *Curr Opin in Biotechnol* 2005; 16: 198-203
- Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15451-5
- Stecher B, Hardt WD. The role of microbiota in infectious disease. *Trends Microbiol* 2008; 16: 107-14
- Steinman L. A rush to judgment on Th17. *J Exp Med* 2008; 205: 1517-22
- Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice: Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137: 1142-62
- Stockinger S, Hornef MW, Chassin C. Establishment of intestinal homeostasis during the neonatal period. *Cell Mol Life Sci* 2011
- Strober W. The multifaceted influence of the mucosal microflora on mucosal dendritic cell responses. *Immunity* 2009; 31: 377-388
- Strober W, Murray PJ, Kitani A, Watanabe T. Signalling pathways and molecular interactions of NOD1 and NOD2. *Nature Rev Immunol* 2006; 6: 9-20
- Sudo N, et al. An oral introduction of intestinal bacteria prevents the development of a long-term Th2-skewed immunological memory induced by neonatal antibiotic treatment in mice. *Clin Exp Allergy* 2002; 32: 1112-6
- Surawicz CM, Alexander J Treatment of refractory and recurrent *Clostridium difficile* infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2011
- Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, Engelhardt H, Bengmark S, et al. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* 2007; 56: 343-350
- Takahashi I, Noshi T, Yuki Y, Kiyono H. New horizon of mucosal immunity and vaccines. *Curr Opin Immunol* 2009; 21: 352-8
- Takahashi K. Interaction between the intestinal immune system and commensal bacteria and its effect on the regulation of allergic reactions. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74: 691-5

- Takeda K, Okumura K. Effects of a fermented milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on the human NK-cell activity. *J Nutr* 2007; 137: 791S-3S
- Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140: 805-20
- Tao Y, Drabik KA, Waypa TS, Musch MW, Alverdy JC, Schneewind O, Chang EB, Petrof EO. Soluble factors from *Lactobacillus GG* activate MAPKs and induce cytoprotective heat shock proteins in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol* 2006; 290: 1018-30
- Taverniti V, Guglielmetti S. The immunomodulatory properties of probiotic microorganisms beyond their viability (ghost probiotics: proposal of paraprobiotic concept). *Genes Nutr* 2011; 6: 261-74
- Taylor AL et al. Probiotic supplementation for the first 6 months of life fails to reduce the risk of atopic dermatitis and increases the risk of allergen sensitization in high-risk children: a randomized controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 184-91
- Taylor SN, Basile LA, Ebeling M, Wagner CL. Intestinal permeability in preterm infants by feeding type: mother's milk versus formula. *Breastfeed Med* 2009; 4: 11-5
- Tezuka H, Ohteki T. Regulation of intestinal homeostasis by dendritic cells. *Immunol Rev* 2010; 234: 247-58
- Thomas CM, Versalovic J. Probiotics-host communication: Modulation of signaling pathways in the intestine. *Gut Microbes* 2010; 1: 148-163
- Tien MT, Girardin SE, Regnault B, Le Bourhis L, Dillies MA, Coppee JY, et al. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2005; 176: 1228-37
- Tiihonen K, Ouwehand AC, Rautonen N. Human intestinal microbiota and healthy ageing. *Ageing Res Rev* 2010; 9: 107-16
- Tissier H. Recherches sur la flore intestinale normale des enfants âgés d'un an à cinq ans. *Ann l'Institute Pasteur* 1908; 22: 189-207
- Todoriki K, Mukai T, Sato S, Toba T. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 154-9
- Tsai CC, Hsieh HY, Chiu HH, Lai YY, Liu JH, Yu B, et al. Antagonistic activity against *Salmonella* infection in vitro and in vivo for two *Lactobacillus* strains from swine and poultry. *Int J Food Microbiol* 2005; 102: 185-94
- Tseng PH, Matsuzawa A, Zhang W, et al. Different modes of ubiquitination of the adaptor TRAF3 selectively activate the expression of type I interferons and proinflammatory cytokines. *Nat Immunol* 2010; 11: 70-5
- Tsuji M, Suzuki K, Kinoshita K, Fagarasan S. Dynamic interactions between bacteria and immune cells leading to intestinal IgA synthesis. *Semin Immunol* 2008; 20: 59-66

- Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI. Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 2008; 3: 213-23
- Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457: 480-4
- Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009; 9: 799-809
- Turróni F, van Sinderen D, Ventura M. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *Int J Food Microbiol* 2010
- Uematsu S, Fujimoto K, Jang MH, Yang BG, Jung YJ, Nishiyama M, Sato S, Tsujimura T, Yamamoto M, Yokota Y, Kiyono H, Miyasaka M, Ishii KJ, Akira S. Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5. *Nat Immunol* 2008; 9: 769-76
- Usman HA. Bile Tolerance, Taurocholate Deconjugation, and Binding of Cholesterol by *Lactobacillus gasserii* Strains. *J Dairy Sci* 1999; 82: 243-8
- Vael C, Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr* 2009; 21: 794-800
- Vaishampayan PA, Kuehl JV, Froula JL, Morgan JL, Ochman H, Francino MP. Comparative metagenomics and population dynamics of the gut microbiota in mother and infant. *Genome Biol Evol* 2010; 2: 53-66
- Valdés-Ramos R, Martínez-Carrillo BE, Aranda-González II, Guadarrama AL, Pardo-Morales RV, Tlatempa P, Jarillo-Luna RA. Diet, exercise and gut mucosal immunity. *Proc Nutr Soc* 2010; 69: 644-50
- Van Baarlen P, Troost F, van der Meer C, Hooiveld G, Boekschoten M, et al. Microbes and Health Sackler Colloquium: Human mucosal in vivo transcriptome responses to three lactobacilli indicate how probiotics may modulate human cellular pathways. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108: 4562-9
- Van Baarlen P, Troost FJ, van Hemert S, van der Meer C, de Vos WM, de Groot PJ, Hooiveld GJ, Brummer RJ, Kleerebezem M. Differential NF-kappaB pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 2371-6
- Van den Abbeele P, Van de Wiele T, Verstraete W, Sam P. The host selects mucosal and luminal associations of co-evolved gut microbes: a novel concept. *FEMS Microbiol Rev* 2011
- Van't Land B, Schijf MA, Martin R, Garssen J, van Bleek GM. Influencing mucosal homeostasis and immune responsiveness: The impact of nutrition and pharmaceuticals. *Eur J Pharmacol* 2011
- Van Wijk F, Knippels L. Initiating mechanisms of food allergy: Oral tolerance versus allergic sensitization. *Biomed Pharmacother* 2007; 61: 8-20

Varol C, Vallon-Eberhard A, Elinav E, Aychek T, Shapira Y, Luche H, Fehling HJ, Hardt WD, Shakhar G, Jung S. Intestinal lamina propria dendritic cell subsets have different origin and functions. *Immunity* 2009; 31: 502-12

Vasiljevic T, Shah NP. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J* 2008; 18: 714-28

Veluswamy H, Suryawala K, Sheth A, Wells S, Salvatierra E, Cromer W, Chaitanya GV, Painter A, Patel M, Manas K, Zwank E, Boktor M, Baig K, Datti B, Mathis MJ, Minagar A, Jordan PA, Alexander JS. African-American inflammatory bowel disease in a Southern U.S. health center. *BMC Gastroenterol* 2010; 10: 104

Vieites Fernández JM, Muñoz Quezada S, Llamas Company I, Maldonado Lozano J, Romero Braquehais F, Suárez García A, Bermúdez-Brito M, Gómez-Llorente C, Gil A. (2010) PCT AX090006WO.

Vijay-Kumar M et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. *Science* 2010; 328: 228-31

Vinderola G, Perdigon G, Duarte J, Farnworth E, Matar C. Effects of the oral administration of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus kefirifaciens* on the gut mucosal immunity. *Cytokine* 2006; 36: 254-60

Vizoso Pinto MG, Rodriguez Gomez M, Seifert S, Watzl B, Holzapfel WH, Franz CM. Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. *Int J Food Microbiol* 2009; 33: 86-93

Voedisch S, Koenecke C, David S, Herbrand H, Förster R, Rhen M, Pabst O. Mesenteric lymph nodes confine dendritic cell-mediated dissemination of *Salmonella enterica* serovar typhimurium and limit systemic disease in mice. *Infect Immun* 2009; 77: 3170-80

Vollmers HP, Brandlein S. Natural antibodies and cancer. *J Autoimmun* 2007; 29: 295-302

Voltan S, Castagliuolo I, Elli M, Longo S, Brun P, D'Inca R, Porzionato A, Macchi V, Palu G, Sturniolo GC, Morelli L, Martines D. Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. *Clin Vaccine Immunol* 2007; 14: 1138-48

Vossenkämper A, Marchès O, Fairclough PD, Warnes G, Stagg AJ, Lindsay JO, Evans PC, Luong le A, Croft NM, Naik S, Frankel G, MacDonald TT. Inhibition of NF- κ B signaling in human dendritic cells by the enteropathogenic *Escherichia coli* effector protein NleE. *J Immunol* 2010; 185: 4118-27

Vu-Khac H, Holoda E, Majerciak M, Gaspar G, Pilipcinec E. Genotyping of fimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains isolated from Slovak piglets suffering from diarrhea. *Folia Microbiol* 2004; 49: 59-63

Walter J. Ecological role of lactobacilli in the gastrointestinal tract: implications for fundamental and biomedical research. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 4985-96

- Wang TT, Dabbas B, Laperriere D, Bitton AJ, Soualhine H, Tavera-Mendoza LE, Dionne S, Servant MJ, Bitton A, Seidman EG, Mader S, Behr MA, White JH. Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D₃ of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease. *J Biol Chem* 2010; 285: 2227-31
- Waskow C, Liu K, Darrasse-Jèze G, Guermonprez P, Ginhoux F, Merad M, Shengelia T, Yao K, Nussenzweig M. The receptor tyrosine kinase Flt3 is required for dendritic cell development in peripheral lymphoid tissues. *Nat Immunol* 2008; 9: 676-83
- Watowich SS, Liu YJ. Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunol Rev* 2010; 238: 76-92
- Weiss G, Christensen HR, Zeuthen LH, Vogensen FK, Jakobsen M, Frøkiær H. Lactobacilli and bifidobacteria induce differential interferon- β profiles in dendritic cells. *Cytokine* 2011; 56: 520-30
- Weiss G, Rasmussen S, Zeuthen LH, Nielsen BN, Jarmer H, Jespersen J, et al. Lactobacillus acidophilus induces virus immune defence genes in murine dendritic cells by a Toll-like receptor-2-dependent mechanism. *Immunology* 2010; 131: 268-81
- Wen L, Ley RE, Volchkov PY, Stranges PB, Avanesyan L, Stonebraker AC, Hu C, Wong FS, Szot GL, Bluestone JA et al. Innate immunity and intestinal microbiota in the development of Type 1 diabetes. *Nature* 2008; 455: 1109-13
- Wershil BK, Furuta GT. Gastrointestinal mucosal immunity. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: S380-3
- Wesch D, Peters C, Oberg HH, Pietschmann K, Kabelitz D. Modulation of $\gamma\delta$ T cell responses by TLR ligands. *Cell Mol Life Sci* 2011
- West NP, Pyne DB, Kyd JM, Renshaw GMC, Fricker P, Cripps AW. The effect of exercise on innate mucosal immunity. *Br J Sports Med* 2008
- West NP, Pyne DB, Peake JM, Cripps AW. Probiotics, immunity and exercise: a review. *Exerc Immunol Rev* 2009; 15: 107-26
- Westendorf AM, Fleissner D, Hansen W, Buer J. T cells, dendritic cells and epithelial cells in intestinal homeostasis. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 11-8
- Weston S et al. Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomized controlled trial. *Arch Dis Child* 2005; 90: 892-7
- Wickens K, Black PN, Stanley TV, Mitchell E, Fitzharris P, Tannock GW, et al; Probiotic Study Group. A differential effect of 2 probiotics in the prevention of eczema and atopy: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 788-94
- Willing BP, Gill N, Finlay BB. The role of the immune system in regulating the microbiota. *Gut Microbes* 2010; 1: 213-23

Wine E, Gareau MG, Johnson-Henry K, Sherman PM. Strain-specific probiotic (*Lactobacillus helveticus*) inhibition of *Campylobacter jejuni* invasion of human intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* 2009; 300: 146-52

Winkler P, Ghadimi D, Schrezenmeir J, Kraehenbuhl JP. Molecular and cellular basis of microflora-host interactions. *J Nutr* 2007; 137: 756S-72S

Wohlgemuth S, Loh G, Blaut M. Recent developments and perspectives in the investigation of probiotic effects. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 3-10

Wollowski I, Rechkemmer G, Pool-Zobel BL. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 451S-5S

Woodard GA, Encarnacion B, Downey JR, Peraza J, Chong K, Hernandez-Boussard T, Morton JM. Probiotics improve outcomes after Roux-en-Y gastric bypass surgery: a prospective randomized trial. *J Gastrointest Surg* 2009; 13: 1198-204

Woof JM, Mestecky J Mucosal immunoglobulins. *Immunol Rev* 2005; 206: 64-82

Wullt, M., Gagslatt, M. L. & Odenhold, I. *Lactobacillus plantarum* 299v for the treatment of recurrent *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a double-blind placebo-controlled trial. *Scand. J Infect Dis* 2003; 35: 365-7

Xiao JZ, Kondo S, Takahashi N, Miyaji K, Oshida K, Hiramatsu A, Iwatsuki K, Kokubo S, Hosono A. Effects of Milk Products Fermented by *Bifidobacterium longum* on Blood Lipids in Rats and Healthy Adult Male Volunteers. *J Dairy Sci* 2003; 86: 2452-61

Yamamoto M, Takeda K. Current views of toll-like receptor signaling pathways. *Gastroenterol Res Pract* 2010; 2010: 240365

Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK, Polk DB. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* 2007; 132: 562-75

Yan F, Polk DB. Probiotics and immune health. *Curr Opin Gastroenterol* 2011; 27: 496-501

Zanello G, Berri M, Dupont J, Sizaret PY, D'Inca R, Salmon H, Meurens F. *Saccharomyces cerevisiae* modulates immune gene expressions and inhibits ETEC-mediated ERK1/2 and p38 signaling pathways in intestinal epithelial cells. *PLoS One* 2011; 6: e18573

Zeuthen LH, Fink LN, Metzdorff SB, Kristensen MB, Licht TR, Nellemann C, Frøkiaer H. *Lactobacillus acidophilus* induces a slow but more sustained chemokine and cytokine response in naïve foetal enterocytes compared to commensal *Escherichia coli*. *BMC Immunol* 2010; 11: 2

Zhang C, Zhang M, Wang S, Han R, Cao Y, Hua W, Mao Y, Zhang X, Pang X, Wei C, Zhao G, Chen Y, Zhao L. Interactions between gut microbiota, host genetics and diet relevant to development of metabolic syndromes in mice. *ISME J* 2010; 4: 232-41

Zhang H, DiBaise JK, Zuccolo A, Kudrna D, Braidotti M, Yu Y, Parameswaran P, Crowell MD, Wing R, Rittmann BE, Krajmalnik-Brown R. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 2365-70

Zhang L, Li N, Caicedo R, Neu J. Alive and dead *Lactobacillus rhamnosus* GG decrease tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 production in Caco-2 cells. *J Nutr* 2005; 135: 1752-6

Zhang W, Azevedo MS, Gonzalez AM, Saif LJ, Van Nguyen T, Wen K, Yousef AE, Yuan L. Influence of probiotic *Lactobacilli* colonization on neonatal B cell responses in a gnotobiotic pig model of human rotavirus infection and disease. *Vet Immunol Immunopathol* 2008; 122: 175-81

Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008; 112: 1557-69

Zoumpoulou G, Tsakalidou E, Dewulf J, Pot B, Grangette C. Differential crosstalk between epithelial cells, dendritic cells and bacteria in a co-culture model. *Int J Food Microbiol* 2009; 131: 40-51