

UNIVERSIDAD DE GRANADA  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DEL POTENCIAL PROBIÓTICO DE**  
***Lactobacillus plantarum C4***

Programa de Doctorado de Biología Fundamental y de Sistemas

Soumi Manitou De Montijo Prieto

Granada, 2017.

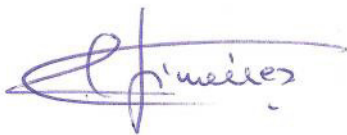
Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales  
Autora: Soumi Manitou de Montijo Prieto  
ISBN: 978-84-9163-609-0  
URI: <http://hdl.handle.net/10481/49018>

Memoria de Tesis Doctoral presentada por la Licenciada en Farmacia  
Dña. Soumi Manitou De Montijo Prieto para aspirar al grado de Doctor



Fdo.: Soumi De Montijo Prieto

VºBº La Directora:



**Fdo. Dra. María Jiménez Valera**

Catedrática de Microbiología

Facultad de Farmacia

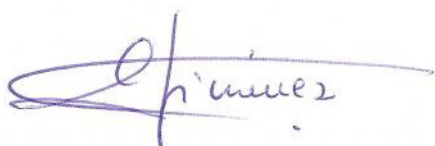
Universidad de Granada

Granada, 2017.

Universidad de Granada  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Microbiología

La directora de esta tesis y la doctoranda garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por la doctoranda bajo mi dirección y hasta donde mi conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granada, 2017.




**Fdo. Dra. María Jiménez Valera**

Catedrática de Microbiología

Facultad de Farmacia

Universidad de Granada



**La doctoranda**

Fdo.: Soumi Manitou De Montijo Prieto.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis Directores, la Profesora María y el Profesor Alfonso, por enseñarme y guiarme, por ser ejemplo de trabajo y constancia. Gracias por su comprensión, paciencia, dedicación, criterio y motivación. Han hecho fácil y llevadero lo difícil. Agradezco la suerte de haberlos tenido como mis *Maestros*.

A la Profesora Encarnación Moreno, por enseñarme tantas cosas, por recargarme de ganas con sus palabras y su sonrisa. Gracias por la cercanía y por brindarme su amistad.

A los profesores y amigos del Departamento de Microbiología, en especial al Laboratorio de Exopolisacáridos microbianos, por el apoyo brindado durante la realización de esta tesis. A Vicky, por la amistad y los buenos momentos en el laboratorio.

Un especial agradecimiento al Hospital Virgen de las Nieves de Granada, en especial a Antonio Sampedro, Javier Granger e Inés, por la oportunidad brindada y su participación activa en el desarrollo de esta tesis.

A mi familia, mi Madre y mis hermanas Mercedes y Nina, por el apoyo en todo momento, a pesar de la distancia.

A los amigos de Granada, en especial a Araceli y Manolo, por ser mi segunda familia en España, y estar siempre cerca cuando más lo necesité.

A mi David, mi compañero y soporte, por el amor y la ayuda incondicional, por estar siempre en los momentos difíciles brindándome apoyo y comprensión y también por los momentos maravillosos en esta aventura juntos en España.

A mi Sara Sofía, mi luz y mi sonrisa, mi inspiración y mi motivo de lucha.

*A mi Sara Sofía*

## INDICE GENERAL

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. RESUMEN</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2. INTRODUCCIÓN</b>  | <b>5</b>  |
| 2.1. Emergencia y evolución del concepto de probiótico.                       | 7         |
| 2.1.1. Raíces del concepto de probiótico.                                     | 7         |
| 2.1.2. Los primeros microorganismos probióticos.                              | 7         |
| 2.1.3. Formulaciones del concepto de probiótico.                              | 8         |
| 2.1.4. Ubicación taxonómica de los probióticos.                               | 12        |
| 2.1.5. Situación actual.  | 14        |
| 2.2. Mecanismos de acción de los probióticos.                                 | 22        |
| 2.2.1. La microbiota intestinal y sus alteraciones: papel de los probióticos. | 22        |
| 2.2.2. Barrera de permeabilidad intestinal.                                   | 25        |
| 2.2.2.1. Efectos directos sobre el epitelio.                                  | 26        |
| 2.2.2.2. Efectos sobre la inmunidad de la mucosa.                             | 28        |
| 2.2.2.3. Efectos sobre otras bacterias comensales o patógenos.                | 28        |
| 2.2.3. Inhibición de microorganismos patógenos.                               | 28        |
| 2.2.4. Inmunomodulación.  | 29        |
| 2.2.5. Modulación de apoptosis y efectos antitumorales.                       | 30        |
| 2.3. Bioseguridad de los probióticos.   | 31        |
| 2.3.1. Identificación taxonómica del microorganismo.                          | 32        |
| 2.3.2. Estudios de colonización en el tracto gastrointestinal.                | 32        |
| 2.3.3. La expresión de resistencia a antibióticos y/o su transferencia.       | 32        |
| 2.3.4. Translocación del probiótico.  | 33        |
| 2.3.5. Estabilidad y transferencia genética.                                  | 33        |
| 2.3.6. Viabilidad de la cepa probiótica.                                      | 33        |
| 2.3.7. Patogenicidad y toxicidad.   | 34        |
| 2.3.8. Aminas biógenas.   | 34        |
| 2.4. Antecedentes de la cepa probiótica objeto del presente trabajo.          | 35        |
| <b>3. OBJETIVOS</b>   | <b>37</b> |
| <b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>  | <b>41</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| 4.1. Cepa C4 de <i>Lactobacillus plantarum</i> .  | 43        |
| 4.2. Cultivo y conservación de <i>L. plantarum</i> C4.  | 43        |
| 4.3. Bacterias patógenas.   | 44        |
| 4.4. Cultivos de células de mamífero.   | 44        |
| 4.5. Análisis estadístico de los resultados.  | 44        |
| <b>5. VIABILIDAD DE <i>Lactobacillus plantarum</i> C4 EN CONDICIONES DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL: INFLUENCIA DEL FRUCTOOLIGOSACÁRIDO PREBIÓTICO FOS E INTERACCIONES CON BACTERIAS PATÓGENAS INTESTINALES.</b> | <b>45</b> |
| 5.1. Introducción.  | 47        |
| 5.2. Objetivos.   | 52        |
| 5.3. Material y Métodos.  | 52        |
| 5.3.1. Instrumentación y equipos.   | 52        |
| 5.3.2. Reactivos y disoluciones.  | 52        |
| 5.3.3. Medios de cultivo.   | 53        |
| 5.3.4. Cepas indicadoras.   | 54        |
| 5.3.5. Crecimiento de <i>L. plantarum</i> C4 en presencia y ausencia de FOS.  | 55        |
| 5.3.6. Recuento de suspensiones bacterianas y cultivos.   | 55        |
| 5.3.7. Digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> .   | 55        |
| 5.4. Resultados y Discusión.  | 56        |
| 5.4.1. Influencia de FOS en el crecimiento de <i>L. plantarum</i> C4.   | 56        |
| 5.4.2. Resistencia de C4 al proceso de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> : influencia de FOS.  | 61        |
| 5.4.3. Comportamiento de C4 bajo condiciones gastrointestinales <i>in vitro</i> : interacciones con patógenos intestinales.   | 62        |
| 5.5. Conclusiones.  | 69        |
| <b>6. INHIBICIÓN DE <i>Clostridium difficile</i> Y SUS TOXINAS POR <i>Lactobacillus plantarum</i> C4</b>  | <b>71</b> |
| 6.1. Introducción.  | 73        |
| 6.1.1. Generalidades de <i>Clostridium difficile</i> .  | 73        |
| 6.1.2. Diagnóstico de la DACD.  | 77        |
| 6.1.2.1. Determinación de la citotoxicidad.   | 77        |
| 6.1.2.2. Detección de las toxinas A y/o B.  | 78        |
| 6.1.2.3. Detección de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH).   | 79        |
| 6.1.2.4. Detección de los genes de las toxinas A y/o B.   | 79        |
| 6.1.2.5. Cultivo toxigénico.  | 79        |



|  |           |
|--|-----------|
| 6.1.3. Tratamiento.  | 79        |
| 6.2. Objetivos.  | 81        |
| 6.3. Material y Métodos.   | 81        |
| 6.3.1. Instrumentación y equipos.  | 81        |
| 6.3.2. Medios de cultivo, reactivos y soluciones.  | 81        |
| 6.3.3. Aislado clínico de <i>C. difficile</i> toxigénico.  | 82        |
| 6.3.4. Obtención de sobrenadantes de <i>C. difficile</i> .   | 84        |
| 6.3.5. Obtención de sobrenadantes de C4.   | 84        |
| 6.3.6. Tratamiento del sobrenadante toxigénico de <i>C. difficile</i> con C4.                                    | 84        |
| 6.3.7. Determinación de la citotoxicidad.  | 85        |
| 6.3.7.1. Mantenimiento del cultivo celular.  | 85        |
| 6.3.7.2. Recuento celular.   | 86        |
| 6.3.8. Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> .   | 86        |
| 6.3.9. Cocultivo de <i>L. plantarum</i> C4 y <i>C. difficile</i> .   | 87        |
| 6.4. Resultados y Discusión.   | 88        |
| 6.4.1. Neutralización del sobrenadante toxigénico de <i>C. difficile</i>   | 88        |
| 6.4.2. Inhibición del crecimiento de <i>C. difficile</i> en cocultivo con <i>L. plantarum</i> C4                 | 89        |
| 6.5. Conclusiones.   | 91        |
| <b>7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMUTAGÉNICA DE <i>Lactobacillus plantarum</i> C4</b>                         | <b>93</b> |
| 7.1. Introducción.   | 95        |
| 7.2. Objetivos.  | 100       |
| 7.3. Material y Métodos.   | 100       |
| 7.3.1. Instrumentación y equipos.  | 100       |
| 7.3.2. Reactivos, disoluciones y medios de cultivo.  | 100       |
| 7.3.3. Muestras.   | 101       |
| 7.3.4. Preparación del filtrado fecal.   | 101       |
| 7.3.5. Tratamiento del filtrado fecal.   | 102       |
| 7.3.6. Ensayo de mutagénesis o reversión de las bacterias auxotrofas.  | 102       |
| 7.3.7. Ensayo de detección de bacterias prototrofas.   | 103       |
| 7.4. Resultados y Discusión.   | 104       |
| 7.4.1. Primeros ensayos con filtrados fecales y modificación del diseño experimental.                            | 104       |
| 7.4.2. Actividad antimutágena de <i>L. plantarum</i> C4 frente a los mutágenos azida de sodio y 2-Nitrofluoreno. | 106       |
| 7.4.3. Perspectivas para futuros ensayos.  | 110       |

|  |            |
|--|------------|
| 7.5. Conclusiones.   | 110        |
| <b>8. ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE <i>Lactobacillus plantarum</i> C4</b>  | <b>111</b> |
| 8.1. Introducción.   | 113        |
| 8.1.1. Efectos de los probióticos en la producción de citokinas.   | 119        |
| 8.1.2. Efectos beneficiosos de los probióticos sobre la inmunidad innata.  | 120        |
| 8.1.3. Efectos beneficiosos de los probióticos sobre la inmunidad adaptativa.  | 123        |
| 8.2. Objetivos.  | 125        |
| 8.3. Material y Métodos.   | 125        |
| 8.3.1. Instrumentación y equipos.  | 125        |
| 8.3.2. Reactivos, disoluciones y medios de cultivo.  | 125        |
| 8.3.3. Bacterias y condiciones de cultivo.   | 126        |
| 8.3.4. Ensayos de inmunomodulación <i>in vitro</i> .   | 127        |
| 8.3.4.1. Células.  | 127        |
| 8.3.4.2. Preparación de las suspensiones de <i>L. plantarum</i> C4.  | 128        |
| 8.3.4.3. Inoculación de las células con <i>L. plantarum</i> C4 vivo y muerto.  | 128        |
| 8.3.4.4. Inoculación con <i>L. plantarum</i> C4 y <i>Y. enterocolitica</i> IP383.  | 130        |
| 8.3.4.5. Cuantificación de citokinas.  | 131        |
| 8.3.5. Actividad inmunomoduladora de C4 sobre la capacidad de los esplenocitos de ratón para responder a mitógenos de células B y T. | 132        |
| 8.3.5.1. Animales.   | 132        |
| 8.3.5.2. Inoculación de los ratones con <i>L. plantarum</i> C4   | 132        |
| 8.3.5.2. Cultivo de esplenocitos y respuesta a mitógenos.  | 133        |
| 8.3.6. Efecto de C4 sobre la infección intestinal con <i>Y. enterocolitica</i> O9 <i>in vivo</i> .                                   | 135        |
| 8.3.6.1. Animales.   | 135        |
| 8.3.6.2. Preparación de la leche fermentada adicionada con <i>L. plantarum</i> C4.   | 135        |
| 8.3.6.3. Inoculación de los animales.  | 136        |
| 8.3.6.4. Infección experimental con <i>Y. enterocolitica</i> O9 IP383.   | 136        |
| 8.3.6.5. Detección de <i>Y. enterocolitica</i> O9 en heces y placas de Peyer.  | 136        |
| 8.3.6.6. Medición de citokinas e IgA.  | 136        |
| 8.3.6.7. Análisis estadístico.   | 137        |
| 8.4. Resultados y Discusión.   | 137        |
| 8.4.1. Actividad inmunomoduladora de <i>L. plantarum</i> C4 sobre células Raw 264.7.   | 137        |
| 8.4.2. Influencia de <i>L. plantarum</i> C4 en la capacidad de los esplenocitos para proliferar en respuesta a mitógenos.            | 143        |

|   |            |
|---|------------|
| 8.4.3. Efectos del tratamiento con <i>L. plantarum</i> C4 en la infección experimental con <i>Y. enterocolitica</i> O9 en el ratón.   | 146        |
| 8.4.4. Efectos del tratamiento con <i>L. plantarum</i> C4 en la producción intestinal de citocinas e IgA en ratones no infectados e infectados con <i>Y. enterocolitica</i> O9. | 147        |
| 8.4.5. Efectos del tratamiento con <i>L. plantarum</i> C4 sobre los niveles plasmáticos de citocinas en ratones no infectados e infectados con <i>Y. enterocolitica</i> O9.     | 150        |
| 8.5. Conclusiones.  | 155        |
| <b>9. CONCLUSIONES</b>  | <b>157</b> |
| <b>10. BIBLIOGRAFÍA</b>   | <b>161</b> |

## INDICE DE TABLAS

|            |   |     |
|------------|---|-----|
| Tabla 2.1. | Propiedades de los oligosacáridos no digeribles más comunes.                      | 11  |
| Tabla 2.2. | Principales microorganismos usados como agentes probióticos.                      | 12  |
| Tabla 5.1. | Componentes de la solución gástrica.  | 53  |
| Tabla 5.2. | Componentes de la solución intestinal.  | 53  |
| Tabla 5.3. | Composición del medio LPSM.   | 54  |
| Tabla 5.4. | Composición del caldo mínimo.   | 54  |
| Tabla 6.1. | Clasificación de las ICD según la gravedad de la enfermedad.                      | 76  |
| Tabla 6.2. | Métodos de detección y diagnóstico de laboratorio de <i>C. difficile</i> .        | 78  |
| Tabla 6.3. | Suplemento del medio MEM.   | 85  |
| Tabla 6.4. | Antibiosis de <i>L. plantarum</i> C4 sobre <i>C. difficile</i> en medio líquido   | 90  |
| Tabla 7.1. | Características genotípicas de las cepas TA98 y TA100.                            | 98  |
| Tabla 7.2. | Componentes del kit Muta-ChromoPlate™.  | 101 |
| Tabla 7.3. | Componentes de la mezcla de reacción.   | 102 |
| Tabla 7.4. | Filtrados fecales tratados y no tratados con C4 y controles.                      | 103 |
| Tabla 7.5. | Crecimiento de <i>S. typhimurium</i> en TSA post-incubación en filtrados fecales. | 105 |
| Tabla 8.1. | Suplementos del medio RPMI.   | 127 |
| Tabla 8.2. | Suplementación del medio RPMI 1640 para esplenocitos.                             | 133 |
| Tabla 8.3. | Número de esplenocitos en ratones testigos y tratados con C4.                     | 143 |
| Tabla 8.4. | Ejemplo del cálculo de la proliferación de esplenocitos.                          | 144 |

## INDICE DE FIGURAS

|              |   |    |
|--------------|---|----|
| Figura 2.1.  | Ubicación de los géneros <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> en los taxones superiores del dominio Bacteria.  | 13 |
| Figura 2.2.  | Efectos de las bacterias probióticas sobre la función de la barrera epitelial intestinal.   | 26 |
| Figura 5.1.  | Regiones del intestino grueso humano con actividades bacterianas correspondientes y diferencias fisiológicas.   | 48 |
| Figura 5.2.  | Estructura química de fructooligosacáridos. (a) 1-kestosa, (b) nistosa, (c) 1- $\beta$ -fructo-furanosil-nistosa.   | 50 |
| Figura 5.3.  | Crecimiento de C4 en TSB en presencia y ausencia de FOS en anaerobiosis.  | 57 |
| Figura 5.4.  | Crecimiento de C4 en caldo LPSM y en caldo mínimo con y sin FOS, en aerobiosis.   | 58 |
| Figura 5.5.  | Efecto de la suplementación con FOS, glucosa y FOS + glucosa sobre el crecimiento de C4 en medio mínimo en aerobiosis.  | 59 |
| Figura 5.6.  | Efecto de la suplementación con FOS, glucosa y FOS + glucosa sobre el crecimiento de C4 en medio mínimo en anaerobiosis.  | 60 |
| Figura 5.7.  | Supervivencia de C4 en un ensayo de simulación de digestión gastrointestinal, en ausencia y presencia de FOS (5 g/l).   | 61 |
| Figura 5.8.  | Influencia de FOS en las interacciones entre C4 y una cepa virulenta de <i>Y. enterocolitica</i> durante el proceso de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> . | 63 |
| Figura 5.9.  | Antibiosis de C4 sobre <i>Y. enterocolitica</i> durante el proceso de digestión gastrointestinal <i>in vitro</i> en presencia de FOS.                               | 64 |
| Figura 5.10. | Antibiosis de C4 sobre <i>E. coli</i> en presencia de FOS.  | 66 |
| Figura 5.11. | Antibiosis de C4 sobre <i>S. typhimurium</i> en presencia de FOS.   | 67 |
| Figura 5.12. | Antibiosis de C4 sobre <i>E. faecalis</i> en presencia de FOS.  | 67 |
| Figura 6.1.  | Genes implicados en la producción de toxinas por <i>C. difficile</i> .  | 74 |
| Figura 6.2.  | Algoritmo diagnóstico para la detección de <i>C. difficile</i> del Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves.                                     | 83 |

|              |   |     |
|--------------|---|-----|
| Figura 6.3.  | Esquema de un cuadrante en la cámara de Neubauer.   | 86  |
| Figura 6.4.  | Monocapas de células Vero incubadas con sobrenadantes de <i>C. difficile</i> y sobrenadantes de C4 teñidas con azul de metileno             | 88  |
| Figura 7.1.  | Efecto de <i>L. plantarum</i> C4 en la aparición de mutantes revertientes de TA98 en presencia de 2-nitrofluoreno (2NF).                    | 107 |
| Figura 7.2.  | Efecto de <i>L. plantarum</i> C4 en la aparición de mutantes revertientes de TA100 en presencia de azida de sodio.                          | 108 |
| Figura 8.1.  | Esquema de la organización histológica en el intestino delgado.   | 114 |
| Figura 8.2.  | Recirculación de linfocitos tras la activación en placas de Peyer.  | 118 |
| Figura 8.3.  | Esquema de la inoculación de las células Raw 264.7 con C4.  | 129 |
| Figura 8.4.  | Esquema de la inoculación de las células Raw 264.7 con C4 e IP383.  | 131 |
| Figura 8.5.  | Esquema general de los ensayos de ELISA.  | 132 |
| Figura 8.6.  | Producción de TNF- $\alpha$ por células Raw 264.7 inoculadas con <i>L. plantarum</i> C4 muerto por calor.                                   | 138 |
| Figura 8.7.  | Producción de IFN- $\alpha$ por células Raw 264.7 inoculadas con <i>L. plantarum</i> C4 muerto por calor.                                   | 139 |
| Figura 8.8.  | Influencia de <i>L. plantarum</i> C4 en la producción de TNF- $\alpha$ por células Raw 264.7 infectadas con <i>Y. enterocolitica</i> IP383. | 140 |
| Figura 8.9.  | Influencia de <i>L. plantarum</i> C4 en la producción de IFN- $\alpha$ por células Raw 264.7 infectadas con <i>Y. enterocolitica</i> IP383. | 142 |
| Figura 8.10. | Influencia de la ingestión de C4 en la respuesta de los esplenocitos a mitógenos.   | 145 |
| Figura 8.11. | Medición del curso temporal de la colonización de las PP por <i>Y. enterocolitica</i> .   | 147 |
| Figura 8.12. | Niveles de TNF- $\alpha$ en el contenido cecal de ratones no infectados e infectados con <i>Y. enterocolitica</i> .                         | 148 |
| Figura 8.13. | Niveles de IL-10 en el contenido cecal de ratones no infectados e infectados con <i>Y. enterocolitica</i> .                                 | 149 |
| Figura 8.14. | IgA total secretada en el contenido cecal de ratones no infectados e infectados con <i>Y. enterocolitica</i> .                              | 149 |
| Figura 8.15. | Niveles de TNF- $\alpha$ en plasma de ratones no infectados e infectados con <i>Y. enterocolitica</i> .                                     | 150 |
| Figura 8.16. | Niveles de citocinas (IL-10 e IFN- $\gamma$ ) en plasma de ratones no infectados e infectados con <i>Y. enterocolitica</i>                  | 151 |

## ABREVIATURAS

|               |   |
|---------------|---|
| DAA           | Diarrea Asociada a Antibióticos   |
| 2NF           | 2-nitrofluoreno   |
| AICR/WCRF     | Informe del Fondo Mundial para la Investigación del Cáncer/Instituto Americano para la Investigación del Cáncer |
| BAL           | Bacterias Ácido Lácticas  |
| C4            | <i>Lactobacillus plantarum</i> C4   |
| CD            | Células dendríticas   |
| CDIFF         | Medio cromogénico para <i>Clostridium difficile</i>   |
| CDT           | Toxina binaria o transferasa de <i>Clostridium difficile</i>  |
| ConA          | Concanavalina A   |
| CU            | Colitis Ulcerativa  |
| DACD          | Diarrea Asociada a <i>Clostridium difficile</i>   |
| DC            | Células dendríticas   |
| EC            | Enfermedad de Crohn   |
| EFSA          | Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria  |
| EHEC          | <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica   |
| EII           | Enfermedad Inflamatoria Intestinal  |
| FAO           | Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.                                      |
| FOS           | Fructooligosacárido   |
| GALT          | Tejido Linfoide Asociado al Intestino   |
| GRAS          | Microorganismos “Generalmente Considerados Seguros”   |
| HCA           | Aminas heterocíclicas   |
| ICD           | Infecciones por <i>Clostridium difficile</i>  |
| ICH           | Comisión Internacional de Armonización  |
| IEC           | Células epiteliales intestinales  |
| IEL           | Linfocitos intraepiteliales   |
| IFN- $\gamma$ | Interferón- $\gamma$  |
| IFN- $\alpha$ | Interferón- $\alpha$  |
| IgA           | Inmunoglobulina A   |
| IgAs          | Inmunoglobulina A secretora   |
| IL            | Interleukina  |
| IP383         | <i>Yersinia enterocolitica</i> serotipo O9 del Instituto Pasteur, Francia.                                      |
| ISAPP         | Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos  |
| LcS           | <i>Lactobacillus casei</i> Shirota  |
| LGG           | <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG   |
| LPS           | Lipopolisacárido  |
| LPSM          | Medio Selectivo para <i>Lactobacillus plantarum</i>   |

|                  |  |
|------------------|--|
| MALT             | Tejido linfoide Asociado a la Mucosa   |
| MHC-I/ MHC-II    | Complejo principal de Histocompatibilidad I y II   |
| MRS              | Agar De Man, Rogosa and Sharpe para el enriquecimiento y aislamiento de especies de <i>Lactobacillus</i> . |
| NaN <sub>3</sub> | Azida de sodio   |
| NK               | Células <i>Natural killer</i>  |
| NOC              | Compuestos N-nitrosos  |
| OCDE             | Organización Internacional para la Cooperación y el Desarrollo Económico                                   |
| OMGE             | Organización Mundial de Gastroenterología  |
| OMS              | Organización Mundial de la Salud   |
| PAH              | Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos  |
| PAMPs            | Patrones moleculares compartidos entre grupos de patógenos   |
| PBS              | Búfer fosfato salino   |
| PP               | Placas de Peyer  |
| PTS              | Sistema Fosfotransferasa fructuosa/manosa  |
| QPS              | Presunción Cualificada de Seguridad  |
| REDECAN          | Red Española de Registros de Cáncer  |
| SBF              | Suero Bovino Fetal   |
| SCFA             | Ácidos grasos de cadena corta  |
| SEOM             | Sociedad Española de Oncología Médica  |
| SII              | Síndrome del Intestino Irritable   |
| T CD4            | Linfocito T CD4 <sup>+</sup>   |
| T CD8            | Linfocito T CD8 <sup>+</sup>   |
| TcdA y TcdB      | Citotoxinas A y B de <i>Clostridium difficile</i>  |
| TGF-β            | Factor de crecimiento transformante-β  |
| T <sub>H</sub>   | Linfocito T helper   |
| TLR              | Receptor <i>Toll like</i>  |
| TNF-α y TNF-β    | Factor de Necrosis Tumoral α y β   |
| TSB              | Caldo Tripticasa Soja  |
| TSA              | Agar Tripticasa Soja   |
| UFC              | Unidades Formadoras de Colonias  |

## **1. RESUMEN**



Los probióticos se definen como microorganismos vivos que, cuando son administrados en adecuadas cantidades, confieren beneficios para la salud del huésped. Entre estos efectos beneficiosos figuran la reducción de los síntomas de mala digestión de la lactosa, reducción de hipercolesterolemia, disminución de la duración y gravedad de procesos diarreicos, mejora de la barrera de permeabilidad intestinal, prevención de algunos tipos de cáncer por adsorción o inactivación de agentes genotóxicos, incremento de la resistencia a infecciones intestinales y extraintestinales, atenuación de la enfermedad inflamatoria intestinal, y prevención de alergias (especialmente alimentarias). La cepa C4 de *Lactobacillus plantarum* ha sido aislada de kéfir y largamente estudiada en nuestro laboratorio por su potencial probiótico. En la presente memoria de tesis doctoral se describen nuevas actividades y propiedades que configuran el potencial probiótico de esta cepa. *L. plantarum* C4 resistió las condiciones de la digestión gastrointestinal simulada *in vitro*; en presencia del fructooligosacárido prebiótico FOS se prolongó la viabilidad de la bacteria que adquirió la capacidad de inhibir cepas de las bacterias patógenas intestinales *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Enterococcus faecalis*. *L. plantarum* C4 ejerció antibiosis sobre *Clostridium difficile* y demostró capacidad para inactivar sus citotoxinas, efectos mediados por la producción de ácidos. Además, *L. plantarum* C4 inhibió de forma significativa la mutagenicidad del 2-nitrofluoreno sobre la cepa auxotrofa *S. typhimurium* TA98 en el ensayo de Ames, en condiciones en las que la viabilidad de C4 se vió abolida, lo que sugiere un mecanismo de adsorción que retira el mutágeno. Ensayos de inmunomodulación *in vitro*, sobre líneas celulares, e *in vivo*, en animales de experimentación, demostraron un excelente comportamiento de la cepa probiótica, que potenció mecanismos defensivos sin una contrapartida proinflamatoria en las condiciones basales, lo que se reflejó finalmente en un incremento de la resistencia en el modelo de infección experimental del ratón por *Y. enterocolitica*. La discusión general de estos resultados pone de manifiesto que *L. plantarum* utiliza mecanismos directos (antibiosis, inactivación o adsorción de toxinas y de mutágenos) e indirectos (a través de la modulación de mecanismos inmunitarios) para producir los diversos efectos beneficiosos que se describen por primera vez en esta memoria.

## **2. INTRODUCCIÓN**

## 2.1. EMERGENCIA Y EVOLUCIÓN DEL CONCEPTO DE PROBIOTICO

### 2.1.1. Raíces del concepto de probiótico

El concepto actual de probiótico procede de diversos postulados desde hace más de un siglo. La primera descripción del concepto de probiótico surgió de las observaciones realizadas por el científico ruso Elie Metchnikoff, premio Nobel y profesor del Instituto Pasteur de París, quien postuló la existencia de dos grandes grupos de bacterias intestinales: las bacterias de la putrefacción, nocivas; y las fermentadoras, beneficiosas para la salud. Según Metchnikoff, el balance entre bacterias de la putrefacción y bacterias fermentadoras debía tener gran importancia para la salud, y la ingesta habitual de una cantidad suficiente de las “bacterias fermentadoras” como los lactobacilos presentes en el yogur y otros derivados lácteos fermentados, debería inclinar el balance hacia el lado positivo. Postuló que las bacterias ácido lácticas (BAL) conferirían beneficios a la salud capaces de promover la longevidad de campesinos búlgaros que consumían productos de leche fermentada con *Lactobacillus* y *Streptococcus*. Sugería que la autointoxicación intestinal y el envejecimiento resultante podría suprimirse modificando la microbiota intestinal y reemplazando los microbios proteolíticos por microbios útiles (De Vrese y Schrezenmeir, 2008; OMGE, 2011).

### 2.1.2. Los primeros microorganismos probióticos

El pediatra francés Henry Tissier del Instituto Pasteur fue el primero en aislar una bifidobacteria a partir de un lactante alimentado con leche materna a la que dio el nombre de *Bacillus bifidus communis*. Había encontrado que las heces de niños pequeños con diarrea contenían inusuales bacterias con forma de Y (“bifid”) al compararlas con la de niños sanos de la misma edad. Ello le llevó a sugerir que los pacientes con diarrea podrían ser tratados con estas bacterias para desplazar las bacterias proteolíticas y ayudar a restaurar la microbiota intestinal saludable (OMGE, 2011; Binns, 2013).

En 1917, el profesor alemán Alfred Nissle aisló una cepa no patógena de *Escherichia coli* a partir de heces de un soldado de la Primera Guerra Mundial que no había desarrollado enterocolitis durante un brote severo de shigelosis. Los trastornos del tracto intestinal eran tratados frecuentemente con bacterias no patógenas viables, con el fin de modificar o reemplazar la microbiota intestinal. La cepa Nissle 1917 de *E. coli* es uno de los pocos ejemplos de un probiótico no BAL (OMGE, 2011).

Posteriormente, el Dr. Minoru Shirota investigando en el laboratorio del Dr. Kenji Kiyono en la Universidad Imperial de Kioto, Japón, comprobó que los lactobacilos eran capaces de suprimir bacterias dañinas dentro del organismo. Para el año 1930, logró aislar y cultivar una cepa del género *Lactobacillus* del tracto intestinal humano que hoy día se le conoce con el nombre de *Lactobacillus casei* Shirota (LcS). Las investigaciones sobre este microorganismo han demostrado su resistencia a las secreciones gástricas y biliares así como diversos beneficios a la salud: alivia la severidad de los síntomas de la rinitis alérgica, mejora el estreñimiento y reduce el riesgo de infección. De igual manera ha mostrado tener efectos antitumorales y antimetastásicos en roedores, particularmente inhibe el crecimiento de tumores en la cavidad torácica tanto en ratones como en humanos a través de la producción de diversas citocinas involucradas en la regulación de la respuesta inmune celular del hospedero tales como IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Actualmente es ingrediente activo de productos lácteos probióticos comercializados en Japón y Europa (Matsuzaki, 1998; Dong *et al.*, 2013).

### 2.1.3. Formulaciones del concepto de probiótico

La palabra probiótico proviene del latín *pro* que significa “para” y del griego *bios* que significa “vida” y fue utilizada por primera vez en 1965 por Lilly y Stillewell para describir sustancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otro diferenciándose del término antibiótico (Schrezenmeir y De Vrese, 2001; Binns, 2013).

Aunque el término “probiótico” ha sido usado con distintas acepciones, su significación actual fue establecida por Fuller en 1989, que describe a los probióticos como microorganismos vivos que, dados como suplemento dietético, afectan beneficiosamente al hospedador porque mejoran el balance microbiano en el intestino (Schrezenmeir y de Vrese, 2001). Posteriores definiciones asumen el concepto de Fuller, añadiendo algunos aspectos más precisos, como la importancia de la dosis, o resaltando características obvias como la de que no deben ser microorganismos patógenos. Cabe destacar las definiciones propuestas por Schaafsma y Salminen en 1996. Según Salminen, un probiótico es "un cultivo microbiano vivo o producto lácteo cultivado que influye de manera beneficiosa en la salud y la nutrición del hospedador" y según Schaafsma, "los probióticos orales son microorganismos vivos que, una vez ingeridos en cierto número, ejercen efectos saludables más allá de los inherentes a la nutrición básica".

Sin embargo, la definición más usada y ampliamente aceptada es la propuesta por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación y la Organización Mundial de la Salud (FAO/WHO) para el año 2001, quienes describen los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando son administrados en adecuadas cantidades, confieren beneficios para la salud del huésped” (Binns, 2013).

Por su parte, la Organización Mundial de Gastroenterología (OMGE) recoge esencialmente el mismo concepto, aunque subraya la conveniencia de que solo se consideren probióticos aquellos microorganismos cuyos efectos beneficiosos hayan sido demostrados en estudios controlados con seres humanos (OMGE, 2011). Consideraciones adicionales sobre efectos clínicos, mecanismos de acción, seguridad y otros aspectos han sido incluidos en sucesivos documentos de consenso elaborados por expertos, como el publicado por Rowland *et al.* (2010).

Numerosos autores han propuesto diversos criterios generales para la selección de un microorganismo probiótico, entre los que se mencionan:

- Tolerancia al tracto gastrointestinal: Los probióticos deben resistir las enzimas salivales, el ácido del estómago, la secreción de sales biliares y enzimas pancreáticas, así como cambios de pH e ingredientes de alimentos y bebidas que se encuentren a su paso a lo largo del tracto gastrointestinal.
- Capacidad para adherirse a las células epiteliales y a las superficies mucosas lo que prolonga su tiempo de permanencia en el tracto gastrointestinal y reduce la adhesión de microorganismos patógenos.
- Ser seguros: No deben tener antecedentes de ser patógenos ni estar asociados con otras enfermedades tales como endocarditis infectiva o desordenes gastrointestinales.
- Modulación del sistema inmune asociado al tracto gastrointestinal del hospedador, sin producir inflamación.
- Ausencia de resistencia transferible frente a antibióticos de interés clínico: No deben actuar como fuente de genes de resistencia a antibióticos para miembros microbianos menos inocuos del ecosistema intestinal y se debe verificar la ausencia de genes transferibles.
- Finalmente, una cepa probiótica debe cumplir una serie de requisitos tecnológicos como el cultivo a gran escala, la estabilidad genética y el mantenimiento de su viabilidad dentro del producto alimenticio o suplemento, además de poseer buenas cualidades sensoriales (Saarela *et al.*, 2000; Salminen *et al.*, 2005; Mejía *et al.*, 2006; Sanders *et al.*, 2010; Binns, 2013).

La capacidad para fermentar determinados tipos de fibra es una importante característica de las bacterias probióticas. Los “prebióticos” son un tipo de fibra no digerible, pero fermentable, que estimulan selectivamente el crecimiento y la actividad de algunas especies bacterianas que residen en el tracto gastrointestinal, especialmente lactobacilos y bifidobacterias, pero no exclusivamente (Quigley, 2011b; Arenahalli y Siddalingaiya, 2012; Binns, 2013; Slavin, 2013).

La definición más reciente de un prebiótico dietético fue establecida en la Reunión de la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP) como “un ingrediente de la dieta que es fermentado selectivamente produciendo cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal, lo que confiere beneficios a la salud del huésped” (Gibson *et al.*, 2010). Aunque todos los prebióticos actuales son fibras, no todas las fibras son prebióticos. La clasificación de un ingrediente alimenticio como prebiótico incluye las siguientes características:

- Resistencia a la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas digestivas de mamíferos, y a la absorción en el tracto gastrointestinal superior.
- Ser fermentado por la microbiota intestinal.
- Estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de las bacterias intestinales potencialmente asociadas con la salud y el bienestar (Slavin, 2013).

Algunos ingredientes prebióticos se encuentran naturalmente en alimentos tales como puerros, espárragos, achicoria, alcachofas de Jerusalén, ajo, cebollas, trigo, avena y soja. Una alternativa para lograr una ingesta que promueva la salud, es añadir dichos ingredientes funcionales a determinados alimentos como yogures, cereales, panes, galletas, postres de leche, helados, pastas para untar, bebidas, alimentos y suplementos para animales (Gibson *et al.*, 2010).

Aunque no se estipula como requisito en la definición de un prebiótico, la mayor parte de la investigación se ha llevado a cabo sobre fructanos (inulina y fructooligosacáridos: FOS), galactanos (galacto-oligosacáridos: GOS) y lactulosa (disacárido sintético también utilizado como laxante). Los polisacáridos se obtienen usualmente a partir de cultivos agrícolas como es el caso de la inulina que se obtiene a partir de achicoria o agave mientras que los oligosacáridos pueden producirse comercialmente mediante la hidrólisis de polisacáridos (por ejemplo oligofruktosa (OF) a partir de inulina), o a través de reacciones enzimáticas catabólicas de azúcares de menor peso molecular como por ejemplo fructooligosacáridos de cadena corta (scFOS) de sacarosa, o trans-galactooligosacáridos (TOS) de lactosa (Gibson *et al.*, 2010; Binns,

2013). La Tabla 2.1 muestra las características de los oligosacáridos no digeribles más comunes (Macfarlane *et al.*, 2006).

Tabla 2.1. Propiedades de los oligosacáridos no digeribles más comunes.

| Nombre                  | Composición   | Obtención   | GP          |
|-------------------------|---|---|-------------|
| Inulina                 | $\beta(2-1)$ fructanos.   | Extracción de raíces de achicoria.  | 11-65       |
| Fructo-oligosacáridos   | $\beta(2-1)$ fructanos.   | Transfructosilación de sacarosa.<br>ó hidrólisis de inulina de achicoria. | 2-10<br>3-5 |
| Galacto-oligosacáridos  | Oligo-galactosa (85%) con trazas de glucosa y lactosa.            | Producido por la $\beta$ -galactosidasa a partir de lactosa.              | 2-5         |
| Soja-oligosacáridos     | Mezcla de raffinosa (F-GAL-G) y estaquiosa (F-Gal-Gal-G).         | Se extrae de la harina de soja.   | 3-4         |
| Xilo-oligosacáridos     | Xilosas unidas por enlaces $\beta(1-4)$ .                         | Hidrólisis enzimática del xilano.   | 2-4         |
| Pirodextrinas           | Mezcla de glucosa y oligosacáridos.                               | Pirólisis del almidón de patata o maíz.                                   | varios      |
| Isomalto-oligosacáridos | $\alpha(1-4)$ glucosas y ramificaciones $\alpha(1-6)$ de glucosa. | Transgalactosilación de maltosa.  | 2-8         |

GP: grado de polimerización; F: fructuosa; Gal: galactosa; G: glucosa.

El principal sitio de acción para los prebióticos es el colon. Por lo tanto, un prebiótico debe resistir los efectos de la acidez gástrica y las enzimas digestivas con el fin de alcanzar el colon intacto. Una vez allí, confieren beneficios mediante la estimulación del crecimiento y/o las actividades metabólicas de las bacterias que los fermentan. Los principales géneros bacterianos que fermentan los prebióticos son las bifidobacterias y los lactobacilos, aunque esto puede cambiar a medida que se amplía el conocimiento de la diversidad microbiana y la funcionalidad. Los prebióticos y los probióticos pueden administrarse juntos en forma de "simbióticos". En este caso, los efectos de los dos componentes deben ser sinérgicos. El crecimiento del probiótico puede ser estimulado por su capacidad para fermentar el prebiótico, el cual crea así un ambiente más favorable para que el probiótico pueda competir con otras bacterias intestinales. El probiótico puede estimularse a crecer en el intestino fermentando el prebiótico y/o el prebiótico puede soportar un ambiente intestinal más favorable en el que el probiótico puede competir mejor (Binns, 2013).

#### 2.1.4. Ubicación taxonómica de los probióticos

El concepto de probiótico incluye una amplia diversidad microbiana, tanto microorganismos procariotas como eucariotas pueden poseer propiedades probióticas (Ramos-Cormenzana *et al.*, 2005). Sin embargo, la mayoría de los microorganismos más comúnmente usados como probióticos son bacterias del ácido láctico pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Otras especies de los géneros *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Enterococcus*, así como cepas no patogénas de *E. coli* y ciertas cepas de bacilos y levaduras (Tabla 2.2) pueden actuar también como probióticos (Álvarez-Olmos y Oberhelman, 2001; Howarth y Wang, 2013).

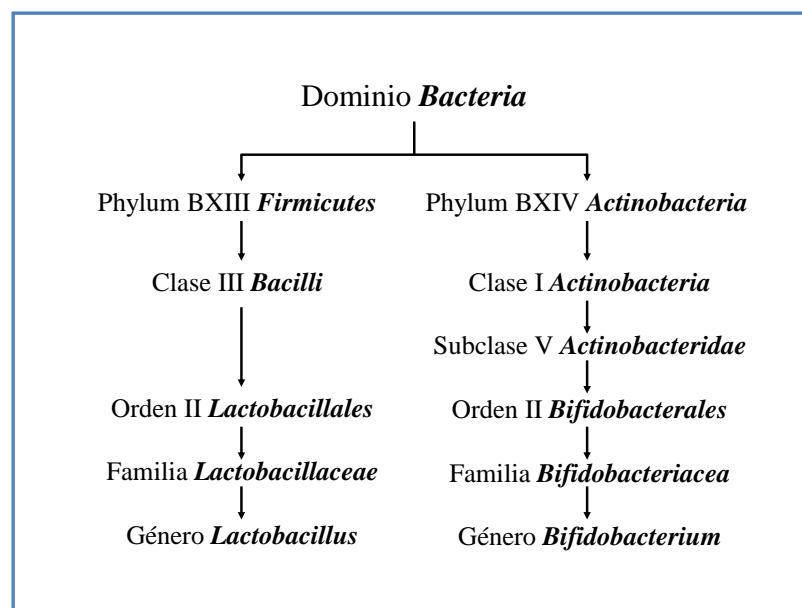
Tabla 2.2. Principales microorganismos usados como agentes probióticos

|  |
|--|
| <b>Especies <i>Lactobacillus</i></b>   |
| <i>L. acidophilus</i>                  |
| <i>L. casei</i>                        |
| <i>L. reuteri</i>                      |
| <i>L. bulgaricus</i>                   |
| <i>L. plantarum</i>                    |
| <i>L. johnsonii</i>                    |
| <i>L. lactis</i>                       |
| <b>Especies <i>Bifidobacterium</i></b> |
| <i>B. bifidum</i>                      |
| <i>B. longum</i>                       |
| <i>B. breve</i>                        |
| <i>B. infantis</i>                     |
| <i>B. lactis</i>                       |
| <i>B. adolescentis</i>                 |
| <b>Otras especies</b>                  |
| <i>Bacillus cereus</i>                 |
| <i>Escherichia coli</i>                |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i>        |
| <i>Enterococcus faecalis</i>           |
| <i>Streptococcus thermophilus</i>      |

La ubicación actual de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* dentro de los grandes taxones procariotas se presenta en la Figura 2.1. Los lactobacilos son bacilos o cocobacilos Gram-positivos no esporulados que, como miembros del *Phylum* Firmicutes, tienen un contenido en G+C inferior al 50%; son aerotolerantes o anaerobios, su metabolismo es estrictamente fermentativo, distinguiéndose especies homofermentadoras (el ácido láctico supera el 85% de los productos de fermentación de la glucosa) y heterofermentadoras



(producen láctico, CO<sub>2</sub>, etanol y/o acético en proporciones equimoleculares). Los complejos requerimientos nutritivos reflejan sus nichos ecológicos ricos en carbohidratos: plantas y residuos vegetales, alimentos fermentados y como componentes de la microbiota de compartimentos del cuerpo de animales, especialmente el intestino (Tannock, 2004). Por su parte, las bifidobacterias son bacilos Gram-positivos con alto contenido G+C, con una peculiar morfología bacilar que suele ramificarse en los extremos, son anaerobios, no esporulados e inmóviles, que habitan en el tracto intestinal de animales y en aguas residuales (Prescott *et al.*, 2005). Las bifidobacterias fueron inicialmente reconocidas en 1900 como miembros dominantes en la microbiota fecal de niños sanos por Tissier, con la denominación de *Bacillus bifidus*. Forman parte de las bacterias anaerobias que se instalan en primer lugar en el intestino de los recién nacidos, llegando a alcanzar niveles superiores al 90% de la población bacteriana total en bebés amamantados (Hidalgo-Cantabrana *et al.*, 2017). Su persistencia en el intestino del lactante se asocia con su actividad sacarolítica hacia glicanos que son abundantes en el intestino del lactante (Turroni *et al.*, 2017).



**Figura 2.1. Ubicación de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en los taxones superiores del dominio *Bacteria*.**

Entre los microorganismos eucariotas con potencial probiótico, figuran cepas de levaduras, siendo *Saccharomyces boulardii* la especie más referenciada al respecto (Ouweland *et al.*, 2002). Si bien, su situación taxonómica ha sido discutida, actualmente se acepta que las cepas de *S. boulardii* forman un subtipo dentro de la especie *Saccharomyces cerevisiae* (Posteraro *et al.*, 2005). Otras levaduras a las que se ha atribuido potencial probiótico son

*Candida pintolopesli*, *Kluyveromyces lactis*, *Yarrowia lipolytica* y *Debaryomyces occidentalis* (Amores *et al.*, 2004; Kumura *et al.*, 2004).

Un aspecto importante del concepto de probiótico, es que se circunscribe a nivel de cepa: dentro de una misma especie, las diferentes cepas pueden distinguirse por propiedades genéticas y fisiológicas únicas, por lo tanto, los efectos saludables demostrados para una cepa microbiana específica no son extrapolables o atribuibles a otras cepas de la misma especie (Schrezenmeir y de Vrese, 2001; Reid *et al.*, 2003).

La taxonomía y nomenclatura actual de las bacterias ácido lácticas probióticas no sólo está basada en sus características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, sino también en sus características fenotípicas y genotípicas. El uso de las técnicas de biología molecular no solo han sido útiles en la identificación a nivel de especie, sino que han permitido evaluar la dinámica de los probióticos a través del tracto gastrointestinal y la calidad de los productos que contienen probióticos (Alvarez-Olmos y Oberhelman, 2001).

### **2.1.5. Situación actual de los probióticos**

Los efectos beneficiosos para la salud atribuidos a los microorganismos probióticos los identifican claramente como posibles componentes de los llamados “alimentos funcionales” y “nutracéuticos” (Aronson, 2017). El adjetivo “funcional” implica que un alimento posee algún valor añadido a los meramente nutricionales: para el “National Academy of Sciences’ Food and Nutrition Board” un alimento funcional es “cualquier alimento modificado o ingrediente de alimento que aporta un beneficio para la salud adicional a su contenido tradicional en nutrientes”; y el “International Life Sciences Institute” propone como definición la de “alimentos que, como consecuencia de la presencia de componentes fisiológicamente activos, aportan un beneficio a la salud, más allá de la nutrición básica” (Hasler, 2002). Una definición más detallada, adoptada por el “International Food Information Council” (IFIC), los describe como “todo aquel alimento semejante en apariencia física al alimento convencional, consumido como parte de la dieta diaria, pero capaz de producir demostrados efectos metabólicos o fisiológicos, útiles en el mantenimiento de una buena salud física y mental, en la reducción del riesgo de enfermedades crónico-degenerativas, además de sus funciones nutricionales básicas” (Ferreira y Luengo, 2007).

La legislación europea no considera que los alimentos funcionales constituyan una categoría específica, sino un concepto al que se aplican las numerosas normativas concernientes a los alimentos (Siró *et al.*, 2008), y entre ellas el Reglamento EC No. 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de la

Unión Europea, que establece “disposiciones específicas relativas al uso de las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en alimentos que vayan a suministrarse como tales a los consumidores”, guiadas por el fin general de evitar que el etiquetado contenga “información que pueda inducir a error al comprador o que atribuya virtudes medicinales a los alimentos” (Ferreira y Luengo, 2007; Siró *et al.*, 2008). Syngai *et al.* (2016) reconocen tres tipos de alimentos funcionales: (1) alimentos habituales que contienen sustancias bioactivas naturales (por ejemplo, fibra dietética); (2) alimentos suplementados con sustancias bioactivas (por ejemplo, antioxidantes); y (3) ingredientes derivados de alimentos introducidos en otros alimentos convencionales (por ejemplo, oligosacáridos prebióticos).

Según Aronson (2017), los conceptos “alimento funcional” y “nutracéutico” son indistinguibles. El término “nutracéutico” fue introducido en 1989 por Stephen L. DeFelice, definiéndolo como “un alimento (o parte de un alimento) que proporciona beneficios médicos o de salud, incluyendo la prevención y/o el tratamiento de una enfermedad”, lo que en efecto coincide con el concepto de “alimento funcional” (Kalra, 2003). Sin embargo, puede establecerse una diferencia basada en la forma de administración. Se considera que los alimentos funcionales se ingieren, en forma y cantidad, como componentes usuales de la dieta, y por tanto no deben administrarse en otras formas (como píldoras, cápsulas, etc.) que no sean las normales para un alimento (Siró *et al.*, 2008). En cambio, la denominación de “nutracéutico” se destina para “aquellos suplementos de la dieta que suministran una forma concentrada de un agente presumiblemente bioactivo, procedente de un alimento, que se presenta en una matriz no alimentaria, y que se usa para potenciar la salud en dosis que exceden de las contenidas en el alimento normal” (Zeisel, 1999).

La tendencia de los consumidores, receptores de una información sobre salud cada vez mayor, a desarrollar el autocuidado; la preocupación de la medicina por prevenir enfermedades crónicas frecuentes en las poblaciones envejecidas y por ocuparse, no solo del tratamiento de las patologías, sino también de incrementar el bienestar (que es una forma de prevención); los avances tecnológicos; el crecimiento del mercado de productos de salud, son algunos de los principales factores a los que se atribuye el hecho de que la investigación sobre nutracéuticos y alimentos funcionales se haya convertido en un área en expansión, una de las más activas en las ciencias de la nutrición (Hasler, 2002). La mayoría de las presentaciones comerciales de probióticos corresponden a alimentos funcionales (leche, quesos, yogures y otros derivados lácteos fermentados, zumos...), pero el hecho de que las formas farmacéuticas se consideren más eficaces para la liberación efectiva de probióticos en el intestino ha promovido su formulación como nutracéuticos (perlas, cápsulas) y está impulsando la investigación sobre nuevos sistemas de

liberación y formulaciones que añadan fuentes de energía para las bacterias vivas, prebióticos, vitaminas, etc. (Govender *et al.*, 2014).

Sin embargo, la comercialización de productos o suplementos alimenticios con microorganismos probióticos en la Unión Europea tiene hasta ahora serias limitaciones legales en cuanto al etiquetado. En primer lugar, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo prohíbe de forma general el uso de información que atribuya propiedades medicinales a los alimentos (Katan, 2012). El ya citado Reglamento EC No. 1924/2006 del Parlamento Europeo matiza algo esta prohibición, ya que, junto a las alegaciones o declaraciones (“claims”) nutricionales (que exponen las propiedades nutricionales benéficas específicas de un alimento), admite, como se ha indicado anteriormente, declaraciones de propiedades saludables (que informan de relaciones entre un alimento y la salud) y de reducción del riesgo de enfermedad (basadas en la propuesta del consumo de una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente un factor de riesgo de aparición de una enfermedad humana). Sin embargo, la aplicación del Reglamento por la EFSA (“European Food Safety Authority”) ha sido muy restrictiva en lo referente a las alegaciones de productos conteniendo probióticos, basándose en el Artículo 6, “Fundamentos científicos de las alegaciones” que en su punto 1 dice textualmente: “Las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables deberán basarse y fundamentarse en datos científicos generalmente aceptados”. Se entiende que, además de su fundamento científico, estas reclamaciones deben ser bien comprendidas por el consumidor medio. Hasta el momento, la EFSA ha publicado opiniones sobre muchas reclamaciones, pero aún no ha aceptado ninguna de ellas para un producto probiótico. El 14 de diciembre de 2012, el uso del término probiótico quedó prohibido en virtud del Reglamento de HC, al no haberse aceptado una sola reclamación relativa a su uso por parte de la EFSA, lo cual significa que no pueden venderse en la UE productos con la alegación de ser probióticos. En una reedición de su documento de orientación sobre los requisitos científicos para las declaraciones de propiedades saludables relacionadas con el sistema inmunológico, el tracto gastrointestinal y la defensa contra microorganismos patógenos, EFSA abre posibilidades para la consideración de futuras alegaciones, pero también explica la razón de muchos de sus rechazos: los estudios científicos tendentes a demostrar efectos beneficiosos deben realizarse en humanos y deben evidenciar un efecto fisiológico beneficioso o el resultado de ensayos clínicos; variables como cambios en marcadores inmunológicos (tamaño de subpoblaciones linfocitarias, capacidad de linfoproliferación en respuesta a mitógenos, actividad de fagocitos, citotoxicidad por células T o células “natural killer”, niveles séricos de inmunoglobulinas, producción de citokinas), en mediadores de inflamación (interleukinas proinflamatorias, quimiokinas, proteínas de fase aguda), modificaciones en la composición de la microbiota intestinal, en la producción de ácidos grasos de cadena corta..., “no pueden

constituir la única base para la justificación científica de una alegación de salud” si no evidencian un beneficio sobre funciones específicas del organismo, aunque si pueden utilizarse para entender los mecanismos de acción de un efecto concreto (EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies, 2016). Desde un punto de vista científico, estas reticencias están justificadas, ya que las comparaciones estadísticas de cambios a niveles celulares o moleculares pueden producir significaciones espúreas, por lo que resultan menos fidedignas que la incidencia, evolución o curación de una enfermedad (Katan, 2012). En Estados Unidos, la U.S. Food and Drug Administration (FDA) mantiene unos criterios similares (DePrisco *et al.*, 2016). Sin embargo, muchos científicos han reprochado con acritud la postura excesivamente rigurosa de estas agencias, en su rechazo total a las alegaciones sobre los efectos beneficiosos de probióticos en la salud (Katan, 2012).

Entre los efectos beneficiosos de los probióticos se encuentran los siguientes:

- Mejora de la digestión de la lactosa y reducción de la flatulencia y el malestar: La intolerancia a la lactosa es una condición, en la cual la fermentación colónica de la lactosa no digerida produce efectos gastrointestinales tales como dolor abdominal, hinchazón, borborismos y diarrea. Muchas poblaciones de todo el mundo tienen una gran proporción de adultos que no pueden digerir la lactosa. En los humanos, y de hecho en todos los mamíferos, la expresión de la enzima lactasa se regula negativamente en la edad adulta. Algunas cepas probióticas son capaces de compensar la falta de lactasa endógena en el intestino humano. Esta mejoría es evidenciada por una disminución en los niveles de hidrógeno en la respiración, puesto que éste se eleva cuando los carbohidratos no digeridos alcanzan el colon y se fermentan. Esta digestibilidad mejorada reduce los síntomas relacionados con la intolerancia a la lactosa en las personas intolerantes a ella (Levri *et al.*, 2005; Binns, 2013; Corgneau *et al.*, 2017).
- Disminución de la duración y la gravedad de la diarrea de origen viral, al limitar la superficie de mucosa en la que se desarrolla la infección y sus efectos inmunológicos. La Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica extendió esta observación a la prevención de la evolución de la diarrea por rotavirus confirmando el beneficio clínico de los probióticos en el tratamiento de la diarrea por rotavirus en lactantes (Isolauri, 2001).
- Prevención de la diarrea del viajero: La diarrea del viajero ocurre en aproximadamente la mitad de los viajeros que visitan áreas de alto riesgo. Aunque la mayoría de los casos son leves y autolimitados, existe una

morbilidad considerable. Se ha evaluado el efecto de algunas preparaciones probióticas en la profilaxis para la diarrea del viajero. Los estudios más recientes a doble ciego, controlados con placebo, indican que algunas cepas de bacterias del ácido láctico pueden proteger contra esta afección. En un estudio aleatorio controlado con placebo realizado por Black *et al.* (1989) se trataron 94 turistas daneses que participaron en un viaje de 2 semanas a Egipto con una mezcla de *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*. Sus resultados demostraron una reducción en la frecuencia de la diarrea del 71% al 43% ( $P < 0.001$ ).

- Prevención de la diarrea aguda nosocomial: En un estudio realizado por Saavedra *et al.* (1994), se demostró que el uso de fórmulas con probióticos (*S. thermophilus* y *Bifidobacterium* Bb 12) en niños entre 5 y 24 meses de edad, hospitalizados de larga duración, reduce la incidencia de la diarrea aguda nosocomial en un 7% en el grupo tratado, en comparación con el 31% del grupo control.
- De manera similar, la evidencia de estudios recientes indica que los probióticos pueden ser valiosos en la prevención de la diarrea asociada a antibióticos (DAA). Esta diarrea es el resultado de un desequilibrio microbiano que conduce a una disminución en la microbiota endógena que generalmente es responsable de la resistencia a la colonización y una disminución en la capacidad de fermentación del colon. Los microorganismos que frecuentemente se encuentran involucrados son *Clostridium difficile* y *Klebsiella oxytoca* quienes juegan un papel importante en la patogenia de las lesiones colónicas. Algunas cepas probióticas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* así como *S. boulardii*, han mostrado efectos beneficiosos en el tratamiento y la prevención de la diarrea asociada a antibióticos. Un pequeño estudio, con 16 adultos jóvenes, diseñado para evaluar la eficacia de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) para prevenir la diarrea asociada a eritromicina, mostró un efecto positivo entre los que recibieron yogurt enriquecido con LGG, en comparación con aquellos que recibieron yogurt placebo. La duración de la diarrea fue solo de 2 días en los pacientes del grupo de estudio mientras que en el grupo placebo fue de 8 días (Siitonen *et al.*, 1990). En otros estudios en humanos, aleatorios, a doble ciego y controlados con placebo, han demostrado que la administración oral de *S. boulardii* (Ultralevure, Biocodex, Francia) puede disminuir el riesgo de DAA (Adam *et al.*, 1977) o acortar significativamente su duración (Surawicz *et al.*, 1989).
- Protección de la mucosa intestinal frente a agentes carcinógenos: En la fisiopatología del cáncer de colon la microbiota intestinal interviene de forma preponderante, con una clara relación entre dieta y cáncer de colon.

Muchas bacterias probióticas son capaces de contrarrestar los efectos de las sustancias genotóxicas y mutagénicas en el colon producto de la dieta o del metabolismo microbiano. Esto es atribuido a su capacidad para influir en las funciones metabólicas, inmunológicas y protectoras del cuerpo. Varios autores han demostrado que algunos probióticos pueden disminuir las concentraciones fecales de enzimas, mutágenos y sales biliares que pueden estar involucradas en la carcinogénesis del colon (Wollowski *et al.*, 2001). Matsumoto y Benno (2004) realizaron un estudio con voluntarios humanos, demostrando que el consumo de yogur conteniendo *B. lactis* LKM512 incrementa el contenido fecal en espermidina y disminuye la mutagenicidad de las heces; los autores especulan que la espermidina producida por estas bacterias podría jugar un papel como estabilizador del DNA celular, al que protegerían de los efectos genotóxicos de los carcinógenos. Los ácidos grasos de cadena corta son también candidatos, en especial el butírico, por sus efectos protectores sobre los enterocitos (Wong *et al.*, 2006). Según de Moreno de LeBlanc y Perdigon (2004), la administración de yogur tradicional a ratones inhibe, no la carcinogénesis, sino la promoción y progresión de tumores de colon, a través de la potenciación de la inmunidad; en concreto, atribuyen un papel al incremento de apoptosis en enterocitos por acción, no de ácidos grasos de cadena corta, sino de citocinas como TNF- $\alpha$ ; en el mismo sentido, Yamazaki *et al.* (2000) han sugerido que la inhibición de la carcinogénesis en colon de ratas por *L. casei* Shirota se debe a la estimulación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>.

- Disminución de la hipercolesterolemia: Algunos microorganismos probióticos poseen la capacidad de reducir la colesterolemia. La capacidad de la cepa probiótica *L. reuteri* CRL 1098 para ejercer este efecto se evaluó en dos ensayos usando ratones. En un primer ensayo se administró de forma terapéutica: inmediatamente después de establecida la dieta grasa (Taranto *et al.*, 1998) y en un segundo ensayo, de forma preventiva: previo a la administración de la dieta grasa (Taranto *et al.*, 2000). En ambos casos, se encontró una disminución en los niveles de colesterol y triglicéridos; en el tratamiento preventivo de 20 y 22% y en el tratamiento terapéutico de 38 y 40%, en los niveles de colesterol y triglicéridos, respectivamente. Otras experiencias demuestran efectos beneficiosos en la regulación de los niveles de colesterol en ratas hipercolesterolémicas cuando se las alimentó con leche fermentada adicionada de *Bifidobacterium longum* BL1 (Xiao *et al.*, 2003). Además, los mismos autores en el mismo estudio, pero con humanos, encontraron reducción significativa de los niveles de colesterol en individuos con valores de colesterolemia comprendidos entre 220 y 280 mg/dl después del consumo del producto fermentado durante cuatro semanas. Nguyen *et al.* (2007) demostraron la disminución de los niveles de colesterol y triglicéridos en un 7 y 10%, respectivamente, tras la

administración de una cepa de *L. plantarum* durante 14 días a ratas hipercolesterolémicas.

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

- Efectos beneficiosos en las infecciones vaginales: Algunas cepas probióticas pueden ser útiles en el tratamiento de las infecciones vaginales ocasionadas por *Candida*. Hilton *et al.* (1992) mostraron una reducción significativa en la colonización vaginal de especies de *Candida* después de la administración oral de *L. acidophilus*, y mejoría clínica tras la aplicación de supositorios vaginales de LGG durante 7 días en mujeres con vaginitis recurrente (Hilton *et al.*, 1995). Aunque muchos lactobacilos productores de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se encuentran en la mucosa vaginal de la mayoría de las mujeres sanas, también se encuentran presentes en el 23% de las mujeres con vaginosis bacteriana. Estos lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno son tóxicos para *Gardenella vaginalis* en altas concentraciones, y se ha demostrado que la ausencia de estos lactobacilos puede permitir un



crecimiento excesivo de organismos catalasa negativos involucrados en la patogenia de la vaginosis bacteriana. Además, muchos lactobacilos pueden inhibir el crecimiento de *Neisseria gonorrhoeae* por varios mecanismos, incluido la acidificación del medio ambiente, la secreción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la producción de inhibidores de proteínas (Alvarez-Olmos y Oberhelman, 2001).

- Otra de las acciones beneficiosas de los probióticos es la prevención de la inflamación intestinal. La alteración de la tolerancia a las bacterias intestinales es la causa primaria de las enfermedades inflamatorias intestinales: enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa. Una teoría recientemente acreditada es que la reducción en el consumo de alimentos fermentados tiene como resultado una maduración defectuosa en las células reguladoras T y un desbalance de éstas con las T-helper, que provocan una respuesta característica de las enfermedades inflamatorias intestinales. Algunas cepas probióticas tienen la capacidad para contrarrestar estos procesos inflamatorios al estabilizar el entorno microbiano intestinal y la barrera de permeabilidad del intestino. Los efectos de los probióticos preventivos o que alivian síntomas en estas enfermedades en humanos se han realizado con *L. rhamnosus*, en pacientes con enfermedad de Crohn (Braat *et al.*, 2004) y la mezcla VSL n°3 se ha utilizado para aliviar ulceritis crónica (Isolauri *et al.*, 2001; Bibiloni *et al.*, 2005; Monteoliva-Sánchez *et al.*, 2012).
- Actividad preventiva de afecciones alérgicas, especialmente en la urticaria que aparece como manifestación cutánea de alergias alimentarias y en la alergia atópica: Entre los estudios realizados con probióticos en la prevención y tratamiento de alergias se encuentra el realizado por Isolauri *et al.* (2000) quienes administraron *B. lactis* bb-12 y LGG a 27 niños alimentados con leche materna y que presentaban eczema atópico. Los autores fueron capaces de demostrar, a los dos meses de tratamiento, una mejoría significativa de la extensión y severidad del eczema junto con una reducción de algunos marcadores de inflamación alérgica. En otro estudio del mismo grupo de investigación, se administró LGG en 159 madres que fueron seleccionadas por tener al menos un pariente próximo, o el marido, con historial alérgico (dermatitis atópica, rinitis y asma alérgica). La dosis del probiótico o el placebo la recibieron desde el primer mes del embarazo hasta el parto y también sus bebés durante seis meses. El primer seguimiento, realizado a los dos años reveló que la prevalencia de eczema atópico había sido significativamente menor en el grupo que recibió el probiótico (Kalliomaki *et al.*, 2001). A los cuatro años, un segundo seguimiento sobre los 132 de los niños del estudio general puso de manifiesto que persistía la diferencia significativa a favor del grupo tratado (Kalliomaki *et al.*, 2001).

## 2.2. Mecanismos de acción de los probióticos

### 2.2.1. La microbiota intestinal y sus alteraciones: papel de los probióticos

El tracto gastrointestinal humano alberga una comunidad microbiana compleja y dinámica la cual es específica para cada persona dependiendo del ambiente y los factores genéticos. Cada individuo alberga alrededor de 1,5 kg de bacterias que pueden superar el 60% de la masa fecal. Esta comunidad microbiana contiene cientos de diferentes especies que varían a lo largo del tracto gastrointestinal encontrándose la menor concentración en el estómago ( $10^3$ - $10^4$  ufc/g) y la mayor en el colon ( $10^{11}$ - $10^{12}$  ufc/g). Esta microbiota intestinal juega un papel importante en la salud humana, no solo debido a su participación en el proceso de digestión, sino por su función crítica en el desarrollo de la mucosa intestinal y del sistema inmune (Gueimonde y Collado, 2012).

Debido a la motilidad del intestino y a los efectos antimicrobianos del ácido gástrico, el estómago y el intestino delgado proximal contienen un número relativamente pequeño de bacterias en sujetos sanos. La microbiología del íleon terminal representa una zona de transición entre el yeyuno que contiene predominantemente especies aeróbicas y la población densa de anaerobios encontrada en el colon. El recuento de colonias bacterianas puede llegar a ser de  $10^9$  ufc/g en la proximidad de la válvula ileocecal con predominio de bacterias gram negativas y anaerobios. En el colon, la concentración y variedad bacteriana cambia drásticamente, encontrando concentraciones superiores a  $10^{12}$  ufc/g compuesta principalmente de anaerobios tales como: *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* y *Clostridium*, superando en número las bacterias anaerobias a las bacterias aerobias en más de una unidad logarítmica (Quigley, 2011a). A nivel de phyla la microbiota intestinal de adultos sanos está compuesta mayoritariamente por Gram negativos-*Bacteroidetes* y Gram positivos-*Firmicutes* y en menor proporción encontramos los phyla *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia*, *Tenericutes*, *Deferribacteres* y *Fusobacteria* (Liévin-Le y Servin, 2014).

La microbiota bacteriana entérica influye en una variedad de funciones intestinales y juega un papel clave en la nutrición, en el mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial, en el desarrollo de la inmunidad de la mucosa y en el metabolismo del hospedador (Quigley, 2011a). Mazmanian *et al.* (2005) demuestran la influencia de la microbiota comensal en la maduración del sistema inmune del hospedador al comprobar la capacidad de un polisacárido (PSA) producido por *Bacteroides fragilis* para corregir deficiencias de células T, desbalances  $T_H1/T_H2$  y dirigir el desarrollo de los órganos linfoides en animales libres de gérmenes.

Hasta la última década, el conocimiento de la composición y desarrollo de la microbiota se había basado en el uso de métodos tradicionales de cultivo, lo que ha proporcionado datos interesantes pero desafortunadamente con una visión muy sesgada de la composición total de la microbiota intestinal. El desarrollo de técnicas moleculares independientes de cultivo ha demostrado que solo una minoría de los miembros de la microbiota es cultivable. Las técnicas modernas de secuenciación de ADN aplicadas al estudio de comunidades microbianas directamente en su ambiente sin la necesidad del cultivo y el aislamiento (también llamada metagenómica) se han aplicado también para caracterizar la microbiota intestinal humana. Estas técnicas de secuenciación extensiva del ADN han incrementado enormemente el conocimiento de la composición y actividad de la microbiota contribuyendo enormemente en las investigaciones de los probióticos. Más de tres millones de genes se han secuenciado del microbioma intestinal y se ha identificado la existencia de diferentes enterotipos humanos. Además se ha caracterizado en detalle el proceso del establecimiento de la microbiota en el recién nacido así como el efecto de la dieta en la composición de la microbiota. Estas técnicas también han permitido realizar estudios comparativos de la microbiota de individuos sanos con la de pacientes con determinadas enfermedades y establecer algunas correlaciones entre las proporciones en que están representados ciertos taxones bacterianos y patologías como la enfermedad inflamatoria intestinal y la obesidad. De igual forma, la secuenciación del genoma de cepas probióticas específicas ha proporcionado datos interesantes en relación a los mecanismos de adhesión a la mucosa intestinal o la interacción con el sistema inmune, entre otros (Gueimonde y Collado, 2012).

A pesar de la amplia información sobre la composición general de la microbiota intestinal, hay poco conocimiento cierto sobre lo que constituye la composición microbiana normal del intestino o "Eubiosis". En parte, esto se debe a que es difícil estudiar qué está sucediendo dentro del tracto gastrointestinal de un individuo sano. Por lo tanto, no existe una definición de la microbiota "normal" o "saludable", aunque este es un objetivo clave de la investigación actual. Los individuos pueden tener una microbiota razonablemente estable, pero existe una considerable variación interindividual. Se han observado desviaciones en la composición o función de la microbiota habitual, conocida como "Disbiosis" en ciertos estados de enfermedad tales como: atopía (alergia), asma, enfermedad celíaca, cáncer de colon, diabetes tipo I, diabetes tipo II, infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH), Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), Síndrome del Intestino Irritable (SII), infecciones gastrointestinales, Diarrea Asociada a Antibióticos (DAA), enterocolitis necrosante, obesidad y artritis reumatoide. Sin embargo, no está claro si las alteraciones en la microbiota son causa o consecuencia de dichos procesos patológicos (Binns, 2013).

Las alteraciones en la microbiota, designadas como disbiosis, pueden aparecer como resultado de infecciones intestinales o de la administración de antibióticos de amplio espectro que eliminan poblaciones de microorganismos indígenas sensibles. El ejemplo clásico de disbiosis es la entidad clínica conocida como “diarrea asociada a antibiótico” cuya forma más grave es la colitis pseudomembranosa causada por cepas toxigénicas de *C. difficile*. Tradicionalmente, se ha creído que, una vez cesada la causa de la disbiosis (es decir, una vez interrumpido el tratamiento con antibióticos), la microbiota recupera rápidamente su composición inicial, pero diversos estudios sugieren que los cambios inducidos por antibióticos, aunque sutiles, pueden no ser tan transitorios y recuperables como se había imaginado previamente (Engelbrekton *et al.*, 2006; Dethlefsen y Relman, 2011).

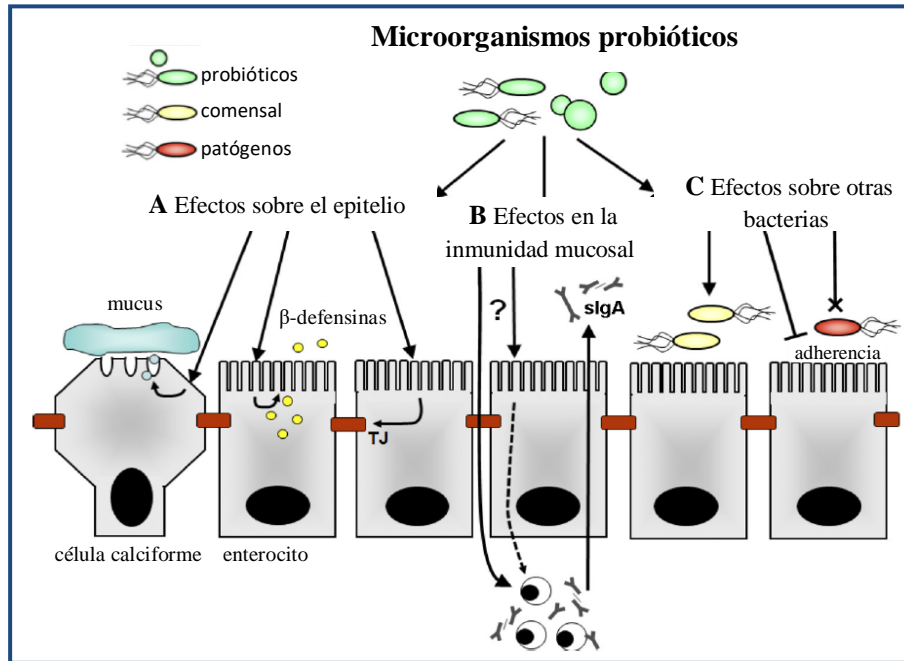
La EII abarca una serie de enfermedades crónicas que afectan al tracto gastrointestinal siendo las formas más comunes la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerativa (CU). Se caracteriza por una inflamación intestinal recurrente crónica que resulta de una respuesta inmune aberrante y continua a los microorganismos en el intestino, catalizada por la susceptibilidad genética del individuo. Aunque la etiología de la EII sigue siendo en gran parte desconocida, implica una interacción compleja entre los factores genéticos, ambientales o microbianos y las respuestas inmunes (Zhang y Li, 2014). La CU y la EC se diferencian por la localización intestinal y las características de la inflamación. La CU por definición es una inflamación continua que comienza en el recto y se restringe al colon, mientras que la inflamación del EC puede ocurrir en cualquier parte del tracto gastrointestinal, a menudo con lesiones salteadas. Las lesiones microscópicas están restringidas a la capa de mucosa para CU mientras que en la EC afecta el espesor completo de la pared intestinal (Mack, 2011).

La mayoría de las cepas utilizadas actualmente como probióticos han sido aisladas de la microbiota intestinal de humanos sanos, cuyos efectos en la salud son mediados a través de la modulación de la composición y actividad de la microbiota intestinal (Gueimonde y Collado, 2012). Las funciones beneficiosas de los probióticos para aliviar los síntomas de la EII involucran: la capacidad de restaurar la biodiversidad en la microbiota, el antagonismo contra los patógenos, la mejora de la producción de mucus, la estimulación de la estimulación del epitelio, la modulación de la permeabilidad intestinal y la mediación de los efectos proinflamatorios (Scaldaferrietal, 2013). Admitiendo el papel de componentes de la microbiota intestinal en la inducción de una respuesta inmune agresiva, como mecanismo patogénico de la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa, se ha sugerido que las bacterias probióticas podrían ser beneficiosas y restaurar el equilibrio inmunitario (Sartor, 2004). Se han realizado ensayos clínicos prometedores, como el publicado por Kruis *et al.* (2004), que muestra que la administración de la cepa probiótica *E. coli* Nissle

1917, componente del producto comercial Mutaflor, puede ser tan efectiva como el tratamiento convencional con mesalazina en la duración de la ausencia sintomatológica en enfermos con colitis ulcerativa en remisión. Investigaciones posteriores tratan de dilucidar los posibles mecanismos de acción y de sentar unas bases racionales para la aplicación de algunos probióticos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales. Pathmakanthan *et al.* (2004), trabajando con modelos *in vitro*, han comunicado que cepas comensales y enteropatógenas de *E. coli* incrementan la producción de citokinas proinflamatorias por leucocitos mononucleares de mucosa colónica, ya sea de intestino normal o con colitis ulcerativa, mientras que *L. plantarum* 299v no tuvo este efecto proinflamatorio, sino que, al contrario, indujo producción de la citokina anti-inflamatoria IL-10 por células T y macrófagos de la mucosa de colon con colitis ulcerativa. Un preparado probiótico denominado VSL-3 que contiene *B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* y *S. salivarius subsp. thermophilus*, mejoró la colitis experimental en ratones, efecto que se asoció a la inducción de IL-10 y de células T reguladoras, productoras de TGF- $\beta$  (Di Giacinto *et al.*, 2005). Se ha demostrado que la interacción de algunas especies de lactobacilos, como *L. reuteri* y *L. casei*, con células dendríticas, es capaz de inducir *in vitro* la generación de células T reguladoras productoras de IL-10; curiosamente, *L. plantarum* no es efectivo en esta interacción (Smits *et al.*, 2005), lo que no concuerda con los resultados mencionados de Pathmakanthan *et al.* (2004). Además de la inducción de citokinas supresoras y anti-inflamatorias, otros mecanismos pueden participar en los efectos beneficiosos de los probióticos frente a patologías intestinales, como la enfermedad de Crohn. Así, Carol *et al.* (2006) han descrito que *L. casei* DN114001 disminuye el número de células T activadas en la lámina propia de la mucosa intestinal de enfermos con esta dolencia, al parecer a través de la reducción de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2, lo que facilita la eliminación por apoptosis de los linfocitos anormalmente activados.

### 2.2.2. Barrera de permeabilidad intestinal

La integridad de la barrera intestinal se ve influenciada por cambios en la permeabilidad intestinal, en la composición de la mucina y en la homeostasis entre la producción de nuevos enterocitos y la tasa de apoptosis de los enterocitos dañados (Howarth y Wang, 2013). Los probióticos afectan la barrera epitelial de diversas formas (Figura 2.2).



**Figura 2.2. Efectos de las bacterias probióticas sobre la función de la barrera epitelial intestinal.** Figura tomada de Howart y Wang (2013) con modificaciones.

**1.2.2.1. Efectos directos sobre el epitelio:** Diversas especies de *Lactobacillus* ejercen efectos sobre la expresión y secreción de mucinas. Las mucinas intestinales son el principal componente proteico del mucus que cubre el epitelio del tracto gastrointestinal. Estas macromoléculas altamente glicosiladas (hasta 80% p/p) son sintetizadas por las células calciformes o células de goblet y se localizan en la membrana celular o se secretan en la luz intestinal para formar la capa mucosa. De las 18 glicoproteínas de tipo mucina expresadas por humanos, la mucina MUC2 es la glicoproteína predominante que se encuentra en el moco del intestino delgado y grueso. Los extremos  $\text{NH}_2$  y  $\text{COOH}$  no están glicosilados en la misma medida, pero son ricos en residuos de cisteína que forman enlaces disulfuro intra e intermoleculares. Estos grupos de glucano confieren resistencia proteolítica a las mucinas, mientras que los enlaces disulfuro forman una matriz de glicoproteínas que es la columna vertebral de la mucosa. Esta capa proporciona protección al epitelio frente a antígenos y moléculas potencialmente dañinas, a la vez que actúa como un lubricante para la motilidad intestinal. El mucus es la primera barrera que las bacterias intestinales se encuentran, y los patógenos deben penetrarla para llegar a las células epiteliales durante la infección. Los microorganismos han desarrollado diversos mecanismos para degradar el moco, como la reducción de enlaces disulfuro de la mucina, la actividad proteolítica y la actividad glucosidasa útiles para la invasión y/o la absorción de nutrientes derivados de la mucosidad. Por otra parte, la capa mucosa del colon es más delgada en áreas de inflamación, lo que permite una mayor adherencia e infiltración bacteriana. Diversos

estudios *in vitro* demuestran que diversas especies de *Lactobacillus* tales como *L. plantarum* 299v, *L. rhamnosus* GG, *L. acidophilus* DDS-1, pueden aumentar la expresión y secreción de mucina por las células caliciformes como un mecanismo para mejorar la función de barrera y la exclusión de patógenos al limitar el movimiento bacteriano a través de la capa mucosa (Mack *et al.*, 2003; Ohland y MacNaughton, 2010; Howarth y Wang, 2013).

Otro efecto positivo de algunos microorganismos probióticos sobre el epitelio es el aumento de la expresión y secreción de defensinas. Las  $\alpha$ -defensinas (HD-5 y HD-6) expresadas principalmente por las células de Paneth del intestino delgado y las  $\beta$ -defensinas (hBD1 a hBD-4) expresadas por células epiteliales en todo el intestino, poseen actividad antimicrobiana contra una amplia variedad de bacterias, hongos y algunos virus y se expresan constitutivamente para evitar que los patógenos lleguen al epitelio. Por su parte, la disminución de la producción de defensinas se ha asociado con el desarrollo de enfermedad inflamatoria intestinal y con una mayor susceptibilidad a las infecciones bacterianas (Ohland y MacNaughton, 2010). Diversas especies del género *Lactobacillus* y preparados comerciales probióticos han demostrado en estudios *in vitro* con células Caco-2 y en estudios *in vivo* con humanos, que pueden regular la expresión y secreción de la  $\beta$ -defensina hBD-2. Los pacientes que recibieron dos veces al día durante tres semanas los preparados comerciales mostraron un aumento significativo en los niveles fecales de la proteína hBD-2, mientras que los individuos tratados con placebo no presentaron cambios. Dichos niveles se mantuvieron durante 9 semanas después del cese del tratamiento probiótico, aunque en menor grado. El aumento de la expresión de  $\beta$ -defensina y la secreción al moco por las células epiteliales puede prevenir la proliferación de comensales y patógenos, contribuyendo así también a la integridad de la barrera (Möndel *et al.*, 2008; Schlee *et al.*, 2008).

Los probióticos también pueden mejorar la estabilidad de barrera intestinal al modificar la expresión de las proteínas TJ (Tight Junction) lo que disminuye la permeabilidad epitelial a los patógenos y sus productos. Estas proteínas TJ tales como: ocludina, zonula ocludens-1, claudina-1, claudina-2, claudina-4, la molécula de adhesión A y la actina F, se encuentran en la zona subapical de las membranas laterales y construyen las conexiones físicas entre las células responsables de la integridad de la barrera intestinal. Sin embargo, la disfunción de la barrera mucosa intestinal, en condiciones tales como la enfermedad inflamatoria intestinal puede conducir a un aumento de la permeabilidad intestinal, que en parte se debe a la expresión irregular de ciertas proteínas TJ en el epitelio intestinal (Howarth y Wang, 2013). Algunos microorganismos probióticos han mostrado capacidad para mantener la función de barrera intestinal al modificar la expresión de proteínas TJ. Corridoni *et al.* (2012) encontró que una combinación de microorganismos probióticos (VSL#3)

regula la proteína epitelial ocludina y disminuye la expresión de claudina-2, atenuando posteriormente el aumento de la permeabilidad intestinal en ratones con enfermedad de Crohn inducida experimentalmente (Figura 1.2A).

**2.2.2.2. Efectos sobre la inmunidad de la mucosa:** Los probióticos pueden aumentar los niveles de células productoras de Inmunoglobulina A (IgA) en la lámina propia y promover la secreción de IgA secretora (IgAs) en la capa luminal de la mucosa. Estos anticuerpos limitan la colonización epitelial al unirse a las bacterias y sus antígenos, lo que contribuye a la homeostasis intestinal. Algunos estudios demuestran que tras una infección, ciertos microorganismos pueden aumentar los niveles de IgAs totales y patógeno-específica, sin aumentar los niveles de IgAs probiótico-específica. Galdeano y Perdigón (2006) demostraron que la administración de *L. casei* a ratones aumentó significativamente el número de células productoras de IgA e IL-6, la cual puede estimular el cambio de clase a IgA en las células B dentro de la lámina propia del intestino delgado. Además no encontraron anticuerpos específicos contra *L. casei*, lo que indica la falta de respuesta del sistema inmune intestinal a esta bacteria beneficiosa (Figura 1.2.B).

**2.2.2.3. Efectos sobre otras bacterias comensales o patógenos:** Los probióticos pueden alterar la composición de la microbiota y/o su expresión génica, lo que lleva a una mejora indirecta de la barrera a través de las bacterias comensales. Además, algunos probióticos pueden matar directamente o inhibir el crecimiento de bacterias patógenas a través de la expresión de factores antimicrobianos tales como bacteriocinas (descritos en el siguiente apartado). Los probióticos también pueden competir con patógenos o comensales por sitios de unión en mucinas o células epiteliales, evitando así la colonización perjudicial y contribuyendo a la función de barrera (Ohland y MacNaughton, 2010) (Figura 1.2.C.).

### **2.2.3. Inhibición de microorganismos patógenos**

Dada la relación íntima entre la microbiota comensal y la homeostasis de la mucosa del huésped, los factores bacterianos secretados por estas bacterias pueden considerarse una parte integral de la barrera intestinal, particularmente cuando estos factores están involucrados en la supresión o eliminación de organismos patógenos. De hecho, los microorganismos comensales son esenciales para la fisiología normal del intestino (Ohland y MacNaughton, 2010).

Muchos microorganismos probióticos pueden ejercer actividades bacteriostáticas o bactericidas a través de la producción de moléculas



antimicrobianas entre ellas los ácidos grasos de cadena corta (SCFA) y las bacteriocinas o microcinas. Estas últimas, son péptidos similares producidos de una manera “cepa-específica” por una gran variedad de bacterias probióticas y comensales. Típicamente, el término bacteriocinas se refiere a péptidos producidos por bacterias Gram-positivas mientras que las microcinas (<10 kDa) son producidas por bacterias Gram-negativas. Las bacteriocinas pueden permeabilizar la membrana interna de bacterias Gram negativas lo que conduce a su ruptura y desorganización o bien, pueden interferir con la síntesis de la pared celular originando la formación de poros al unirse al lípido precursor del peptidoglicano II. Las microcinas, por otro lado, actúan en la membrana interna, sobre las enzimas que están involucradas en la estructura y síntesis del ADN o el ARN, o las enzimas de síntesis de proteínas. Todos estos mecanismos inducen una muerte bacteriana rápida y, por lo tanto, contribuyen a mantener una barrera intestinal libre de patógenos. Diversas bacteriocinas se usan como biopreservativos en alimentos para inhibir o controlar el crecimiento de patógenos bacterianos transmitidos por los alimentos. Varias bacteriocinas y moléculas de tipo-bacteriocina producidas por cepas de *Lactobacillus* probióticas han mostrado actividad antimicrobiana contra el crecimiento de varios patógenos Gram-negativos gástricos o enterovirulentos, incluyendo *Helicobacter pylori*, *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *Shigella*, *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria*, *Bacillus*, *Enterococcus* y *Staphylococcus*, así como, bacterias Gram positivas incluyendo aislados clínicos de *C. difficile*. Por su parte, los SCFA también pueden desorganizar y romper la membrana externa de bacterias Gram negativas tales como EHEC, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Esta permeabilización potencia la actividad de otras moléculas antimicrobianas al permitirles penetrar más fácilmente a la pared celular (Ohland y MacNaughton, 2010; Liévin-Le y Servin, 2014).

Además de la producción de bacteriocinas y SCFA, los lactobacilos durante el metabolismo fermentativo producen ácidos orgánicos como productos terminales, entre ellos el ácido acético y el ácido láctico cuyas actividades antagónicas contra diversos patógenos bacterianos son llevadas a cabo a través de la acidificación intracelular y la permeabilización de la membrana. Esta última, potencia la actividad de otras moléculas, Pridmore *et al.* (2008) comprobaron que la actividad bactericida del peróxido de hidrógeno producido por *L. johnsonii* NCC 533 aumenta en presencia de ácido láctico (Alakomi *et al.*, 2000).

#### 2.2.4. Inmunomodulación

Sin duda alguna, uno de los principales mecanismos responsables de los efectos probióticos es la actividad inmunomoduladora o capacidad para

modificar la respuesta biológica (Lebeer, *et al.*, 2008; Forsythe y Bienenstock, 2010). La interacción entre estructuras y/o metabolitos de bacterias probióticas y receptores de la inmunidad innata como los TLRs (de *toll like receptor*), presentes en macrófagos y células dendríticas, puede ser el acontecimiento inicial de la inmunomodulación por estas bacterias (Lebeer *et al.*, 2008; Adams, 2010). Por ello, y aunque según la definición aceptada de probióticos, se trata de bacterias que se ingieren vivas, es necesario investigar también las actividades biológicas de sus fracciones y metabolitos. Los microorganismos probióticos muertos retienen generalmente algunas actividades, así como sus lisados (Zakostelska, 2011), macromoléculas secretadas por ellos (Lebeer, *et al.*, 2008; Sánchez, *et al.*, 2010) y péptidos procedentes de su acción proteolítica sobre proteínas del vehículo en que se administran, mayoritariamente derivados lácteos (LeBlanc, *et al.*, 2004). Pero otros tipos celulares deben tener también un papel crucial en las interacciones probióticos – respuesta biológica; es el caso de las células de la mucosa intestinal, que expresan receptores de inmunidad innata y son capaces de producir citokinas (Wells *et al.*, 2011). La tecnología de cultivos en *transwell* permite estudiar los efectos de bacterias sobre células de mucosa intestinal y células inmunitarias en sistemas de cocultivos separados por una membrana (Vossenkömper *et al.*, 2010), y ha sido aplicada a la investigación del efecto de bifidobacterias con células Caco-2 cocultivadas con leucocitos mononucleares periféricos (Riedel *et al.*, 2006). Además, esta misma tecnología puede aprovecharse para investigar los efectos de los probióticos en la barrera de permeabilidad intestinal (Eun *et al.*, 2010). Los efectos de los microorganismos probióticos sobre el sistema inmune se describen en el apartado 8 de esta tesis, Actividad inmunomoduladora de *Lactobacillus plantarum* C4.

### 2.2.5. Modulación de la apoptosis y efectos antitumorales

La apoptosis es un mecanismo de suicidio celular para controlar el número de células en los tejidos y eliminar células individuales. Sin embargo, la apoptosis fisiológica de ciertas células puede ser perjudicial. Diversos microorganismos probióticos han mostrado capacidad para prevenir la apoptosis celular inducida por la inflamación. Yan y Polk (2012) encontraron que *Lactobacillus rhamnosus* GG es capaz de prevenir la producción de citokinas tales como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  o IFN- $\gamma$  reduciendo la apoptosis tanto en células epiteliales colónicas humanas como de ratón. Además, la cepa probiótica de *S. boulardii* evitó la apoptosis inducida por TNF- $\alpha$  en células T84 colónicas humanas infectadas con *E. coli* enterohemorrágica. En presencia de *S. boulardii*, las células infectadas con *E. coli* no iniciaron la activación de algunas características apoptóticas tales como procaspasa-3, poli-ADP-ribosa-polimerasa (PAPR) y la escisión internucleosómica del ADN. Además, en el mismo estudio, *S. boulardii* evitó la

activación de las caspasas 8 y 9, que juntas condujeron a las actividades antiapoptóticas de *S. boulardii* contra los patógenos (Dalmasso *et al.*, 2006).

Diversos autores han fijado su atención en las posibilidades de modificar el equilibrio entre apoptosis y mitosis y sus repercusiones sobre la tumorigénesis. Rachid *et al.* (2002) comunicaron que el yogur tradicional (sin otras cepas que *S. salivarius* subsp. *thermophilus* y *L. bulgaricus*) ejerce un efecto pro-apoptótico que se asocia a la inhibición en el desarrollo de cáncer de colon en ratones. Según de Moreno de LeBlanc y Perdigon (2004), la administración de yogur tradicional a ratones inhibe, no la carcinogénesis, sino la promoción y progresión de tumores de colon, a través de la potenciación de la inmunidad; en concreto, atribuyen un papel al incremento de apoptosis en enterocitos por acción, no de ácidos grasos de cadena corta, sino de citokinas como TNF- $\alpha$ , a través de la estimulación de mecanismos inmunitarios, lo cual caería fuera de los mecanismos incluidos en el denominado interfaz metabólico; en el mismo sentido, Yamazaki *et al.* (2000) han sugerido que la inhibición de la carcinogénesis en colon de ratas por *L. casei* Shirota se debe a la estimulación de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. En una revisión realizada por Parvez *et al.* (2006) hacen una recapitulación de los posibles mecanismos implicados en la inhibición de la carcinogénesis por agentes químicos en el colon entre los que se mencionan: (a) detoxificación de carcinógenos ingeridos; (b) modificación de la microbiota intestinal, disminuyendo aquellas poblaciones cuyas actividades metabólicas puede generar compuestos carcinógenos; (c) producción de metabolitos como el ácido butírico, que promueven la apoptosis (en lugar de la proliferación) en aquellas células que han sufrido daños génicos; (d) producción de compuestos que inhiben la proliferación de células tumorales; y (e) estimulación de los mecanismos inmunitarios.

### 2.3. Bioseguridad

Muchas cepas y preparaciones de probióticos se han usado durante décadas por millones de individuos sanos y enfermos, sin embargo, los datos definitivos en materia de seguridad son escasos (Quigley, 2011b). La mayoría de los productos contienen microorganismos de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*, incluidos en la categoría GRAS (“Generalmente Considerados Seguros”, del inglés “Generally Regarded as Safe”) (Mattia y Merker, 2008). En una revisión realizada por Boyle *et al.* (2006) concluyen que, aunque los probióticos tienen un excelente historial de seguridad, deben ser usados con precaución en ciertos grupos de pacientes, particularmente en neonatos prematuros y en personas con deficiencias inmunes. Así mismo hacen referencia de diversos casos de abscesos y endocarditis relacionados con el uso de probióticos y en la mayoría de los casos, el probiótico cultivado a partir del tejido infectado fue muy

probablemente un contaminante más que el patógeno responsable (Quigley, 2011b). Sanders *et al.* (2010) establecen aspectos microbiológicos y metabólicos relacionados con la seguridad de los probióticos:

**2.3.1. Identificación taxonómica del microorganismo:** En primer lugar, se debe identificar al microorganismo taxonómicamente a nivel de especie para el establecimiento de la seguridad y su vinculación con otras especies relacionadas, además de proporcionar información respecto a sus condiciones de crecimiento, sus características metabólicas y genómicas. Posteriormente, el microorganismo debe ser identificado a nivel de cepa para definir aspectos de su selección y caracterización, estabilidad en el proceso industrial, correcta descripción del material usado en los estudios de intervención humana, seguimiento eficiente del probiótico a través del hospedador y para la vigilancia post-comercial, incluyendo estudios de cepas aisladas de cualquier infección sospechosa.

**2.3.2. Estudios de colonización en el tracto gastrointestinal:** Los estudios de colonización a largo plazo o permanente son considerados criterios de seguridad de los probióticos, sin embargo, no debería generalizarse a todos los hospedadores, a todas las cepas de probióticos, ni a todos los sitios de colonización posible. La evidencia documentada de la colonización a largo plazo en el tracto gastrointestinal de adultos es escasa. La capacidad de un probiótico para colonizar a largo plazo depende de su capacidad para sobrevivir y multiplicarse en dicho tracto. Para evaluar esta capacidad de colonización y de supervivencia gastrointestinal, se hacen estudios *in vivo* como, por ejemplo, técnicas de intubación intestinal y biopsias de colon.

**2.3.3. La expresión de resistencia a antibióticos y/o su transferencia:** Es necesario conocer si los microorganismos probióticos expresan resistencia a antibióticos y si es transferida a la microbiota comensal *in vivo*. Aceptando que los probióticos en cuestión no presentan riesgo de infección, el principal asunto con la presencia de genes de resistencia a antibióticos es que las cepas probióticas no deben actuar como fuente de genes de resistencia a antibióticos para miembros microbianos del ecosistema intestinal. Hay varios proyectos de organizaciones que abarcan la seguridad de los probióticos, algunos de estos proyectos fundados por la Unión Europea son: Evaluación de la Bioseguridad de probióticos utilizados para el consumo humano (PROSAFE), Evaluación y Valoración Crítica de Transferencia de Resistencia a los Antibióticos en la cadena alimentaria (ACE-ART) y el equipo de acción sobre probióticos de la Organización Internacional de Normalización en conjunto con la Federación Internacional de Lácteos (IDF-ISO). Uno de los aspectos cruciales en la resistencia a antibióticos en probióticos es distinguir la resistencia intrínseca de la resistencia adquirida. Dentro de esta última, es importante distinguir entre

resistencia causada por cambios genéticos al azar en genes cromosómicos de aquellos otros, que probablemente se transmiten más fácilmente (elementos móviles, plásmidos o vectores). Muchas cepas de *Lactobacillus* son naturalmente resistentes a vancomicina generando controversias con respecto a la posible transferencia de tales resistencias a bacterias patógenas, particularmente: Enterococos y *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, los genes de resistencia a vancomicina de lactobacilos son cromosomales y por lo tanto, no son capaces de transferirse fácilmente a otras especies (Morrow *et al.*, 2012).

**2.3.4. Translocación del probiótico:** Otro riesgo en el uso de probióticos es la translocación del probiótico a través de la mucosa intestinal al medio interno, esto comportaría un riesgo de bacteriemia con sus posibles complicaciones, como un cuadro de inflamación sistémica o sepsis. Sin embargo, no se han encontrado reportes de bacteriemia debido a probióticos en pacientes. Los casos encontrados son limitados y han ocurrido uniformemente en individuos con factores de riesgo selectivo como diabetes no controlada, prótesis endovasculares, entre otros (Quigley, 2011b).

**2.3.5. Estabilidad y transferencia genética:** Al igual que los parámetros anteriores, la estabilidad y transferencia genética también tienen que ser evaluadas. La estabilidad genética de una cepa probiótica refleja la susceptibilidad a una reorganización en el curso de su evolución natural. Esta reorganización podría reflejar pequeñas variaciones introducidas en posiciones específicas o al azar del genoma a través de mutaciones, eliminaciones o inserciones pero podría estar también vinculada a las variaciones estructurales que resultan de recombinaciones homólogas y transferencia horizontal de genes. Idealmente, una evaluación rigurosa de la estabilidad genética de una cepa requiere la disponibilidad de la secuencia de su genoma. Las cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* usadas en aplicaciones probióticas tienden a mostrar una alta estabilidad genotípica. Esta hipótesis necesita ser ampliada con estudios a largo plazo empleado método de tipificación molecular o genómicos comparativos.

**2.3.6. Viabilidad de la cepa probiótica:** La viabilidad está relacionada con las características fisiológicas de la cepa. Los microorganismos probióticos vivos han mostrado mayor eficacia que los microorganismos inactivados por calor tanto en estudios *in vitro* como *in vivo*. Sin embargo, se sabe que la presencia de microorganismos muertos o dañados en productos comerciales es inevitable. Algunos estudios han revelado efectos adversos que resultan de la ingestión de probióticos inactivados (Kirjavainen *et al.*, 2003). Por tanto, la ingestión de microorganismos probióticos viables es importante no sólo desde el punto de vista de la eficacia sino posiblemente también, desde la asociación con efectos adversos.

**2.3.7. Patogenicidad y toxicidad:** Para los grupos bacterianos para los que no se conocen miembros conocidos patógenos, es difícil evaluar qué factores de virulencia potenciales puedan existir. No se han identificado genes asociados con patogenicidad en *Lactobacillus* o *Bifidobacterium* utilizadas como probióticos.

**2.3.8. Aminas biógenas:** Las aminas como histamina o tiramina, son moléculas de bajo peso molecular presentes en muchos alimentos pero también producidas por gran cantidad de microorganismos por la actividad aminoácido-descarboxilasa. La ingestión de grandes cantidades de aminas biógenas originan afecciones que pueden ser confundidas con reacciones alérgicas por la similitud de los signos y síntomas. Aunque algunas especies de lactobacilos son capaces de producir aminas biógenas, hay una gran variabilidad en esta capacidad y no se han descrito casos de tales compuestos perjudiciales en preparados lácteos fermentados con lactobacilos (Bernardeau *et al.*, 2008).

A fin de considerar la mayor cantidad posible de aspectos relacionados con la seguridad de los probióticos, el comité científico de la Unión Europea en Nutrición Animal publicó en el año 2002, un artículo sobre la evaluación de la seguridad y aspectos regulatorios de microorganismos en alimentación y productos alimenticios. Se propuso una aproximación a lo que sería “seguro” con el término: QPS “Qualified Presumption of Safety” (Presunción Cualificada de Seguridad), un sistema adecuado para aproximarse a la seguridad de suplementos alimenticios con bacterias. El establecimiento del estatus QPS involucra cuatro pasos: (1) definición de la taxonomía del microorganismo; (2) recolección de información suficiente que proporcione la base para el estatus QPS, incluida toda la literatura científica, la historia de uso, aplicaciones industriales, los datos ecológicos y los datos de la intervención humana; (3) la exclusión de patogenicidad, y (4) la definición del uso final. Posteriormente, una cepa microbiana categóricamente asignada a un grupo QPS estará exenta de la evaluación de la seguridad, aparte de satisfacer las eventuales salvedades especificadas. Los microorganismos que no se consideran adecuados para el estatus QPS quedarían sujetos a una evaluación de seguridad completa. Los miembros de las bacterias del ácido láctico, que incluyen algunas especies de bacterias probióticas, serán uno de los primeros grupos en ser evaluados (Sanders *et al.*, 2010; Binns, 2013).

#### 2.4. Antecedentes de la cepa probiótica objeto del presente trabajo

La investigación sobre lactobacilos probióticos es una de las líneas de investigación más recientes del Grupo de Inmunología Microbiana (BIO 201) de la Universidad de Granada, cuyo investigador principal es el Prof. Alfonso Ruiz-Bravo. Tras un muestreo de nuevas cepas probióticas, la atención del Grupo se centró en la cepa C4 de *L. plantarum*. Este microorganismo fue aislado de un kéfir comercial. Recientes investigaciones han demostrado que esta cepa cumple los criterios de bacterias potencialmente probióticas, ya que resiste el pH ácido y la bilis y posee propiedades antimicrobianas e inmunomoduladoras. Además, se ha observado que la leche desnatada tiene capacidad como tampón y es un vehículo apropiado para la administración intragástrica de *L. plantarum* C4 en ratones (Bujalance *et al.*, 2007).

Fuentes *et al.* (2008a) analizaron muestras de ratones alimentados con *L. plantarum* C4 bajo diferentes condiciones inmunológicas; sus resultados mostraron la presencia del probiótico en el intestino y una expansión de bacterias filamentosas en el íleon de los ratones inmunodeficientes, que no se observó tras la administración de *L. plantarum* C4. Además, el mismo grupo de investigación observó un incremento de lactobacilos en heces y muestras de intestino de ratones tras recibir una mezcla de *L. plantarum* C4 y *L. casei* (Fuentes *et al.*, 2008b). Puertollano *et al.* (2008) observaron que la administración oral de *L. plantarum* C4 redujo la producción de interleukinas proinflamatorias en ratones infectados con *Listeria monocytogenes*, especulando que esta cepa podría ejercer efectos antiinflamatorios; más tarde, se llevó a cabo el primer estudio *in vitro* sobre actividad antimicrobiana y biológica de sobrenadantes concentrados de *L. plantarum*, observando que *L. plantarum* C4 libera un compuesto responsable de la ruptura de la membrana plasmática de *E. coli* y de una actividad citotóxica en células promielocíticas de leucemia humana (Puertollano *et al.*, 2009). Posteriormente se comprobó que los sobrenadantes de *L. plantarum* C4 son capaces de inducir necrosis en lugar de apoptosis a dosis altas en la línea celular promielocítica, demostrando las propiedades citotóxicas de los mismos en esta línea celular tumoral y abriendo la posibilidad de analizar la composición química para elucidar las moléculas bioactivas (Puertollano *et al.*, 2013).

### **3. OBJETIVOS**



Esta memoria de tesis doctoral se presenta estructurada en capítulos, en cada uno de los cuales se exponen los correspondientes objetivos concretos. Globalmente, la tesis se ha diseñado para responder a los siguientes objetivos generales, dentro de la línea de extender nuestros conocimientos sobre la actividad probiótica de la cepa C4 de *Lactobacillus plantarum*:

- 1°. Evaluar la resistencia de la cepa C4 a las condiciones gastrointestinales *in vitro* y sus interacciones con bacterias patógenas, en un vehículo lácteo suplementado o no con el prebiótico FOS.
- 2°. Examinar la capacidad de la cepa C4 para inhibir a la bacteria toxigénica *Clostridium difficile* y para neutralizar sus citotoxinas.
- 3°. Evaluar la capacidad de la cepa C4 para reducir la actividad mutagénica de agentes mutagénicos.
- 4°. Investigar la capacidad inmunomoduladora de la cepa C4 *in vitro*, sobre cultivos celulares, incluyendo cultivos primarios de esplenocitos de ratones sanos y cultivos de la línea celular continua Raw 264.7 de macrófagos murinos.
- 5°. Evaluar el efecto de la cepa C4 en la infección intestinal con *Y. enterocolitica* O9 en ratones a través de su actividad inmunomoduladora.

## **4. MATERIAL Y MÉTODOS**

En cada uno de los capítulos de la presente memoria se detalla la metodología específica que se ha utilizado. A continuación se describen los aspectos metodológicos comunes a todos ellos.

#### **4.1. CEPA C4 DE *Lactobacillus plantarum***

La cepa C4 se aisló a partir de una muestra de Kefir, como componente de los microorganismos que crecieron en Agar-MRS (Difco Laboratories, Francisco Soria Melguizo, Madrid, España) y que eran bacilos Gram-positivos, catalasa-positivos. La identificación fenotípica se realizó mediante el patrón de fermentación de azúcares en el sistema API 50 CH (BioMérieux, Lyon, France), cuyo software Apilab Plus calificó la cepa como perteneciente a la especie *L. plantarum* con un perfil de identificación excelente (Bujalance, 2006).

Para confirmar la identificación fenotípica, la cepa fue enviada al Laboratorio de Técnicas Instrumentales de la Universidad de León, donde se aisló el DNA y se amplificó un fragmento de alrededor de 1,100 bp del gen que codifica el rRNA 16S, para proceder a su secuenciación bidireccional. Una vez obtenidas las secuencias se realizó el contig de ambas secuencias. Para la identificación de las bacterias, se introdujeron las secuencias en bases de datos como la del GenBank NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) con el programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), obteniéndose una identificación como *Lactobacillus plantarum* con un porcentaje de similitud > 99.

#### **4.2. CULTIVO Y CONSERVACIÓN DE *L. plantarum* C4**

La cepa C4 se conservó en tubos con agar MRS inclinado. Durante el curso del estudio se realizaron pases con incubaciones a 37 °C durante 24 horas en aerobiosis.

Para garantizar la conservación de la cepa, algunos cultivos se sometieron a liofilización en un liofilizador Telstar CRYODOS-45, y los liófilos se conservaron en viales de vidrio estériles a 4 °C.

### **4.3. BACTERIAS PATÓGENAS**

Las cepas de bacterias patógenas utilizadas en los ensayos descritos en los capítulos 5, 6 y 8 son aislados de muestras clínicas que fueron caracterizadas en el Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, de Granada. Todas ellas se mantuvieron en medios ordinarios o específicos, se propagaron por subcultivos y se conservaron en tubos inclinados en refrigeración.

### **4.4. CULTIVOS DE CÉLULAS DE MAMÍFERO**

Se utilizaron cultivos primarios de esplenocitos murinos (capítulo 8) y cultivos de líneas celulares (capítulos 6 y 8), que se describen en sus respectivos capítulos. En los ensayos con citotoxinas de *Clostridium difficile* se utilizaron cultivos cerrados tamponados con HEPES (capítulo 6); en los ensayos de inmunomodulación se recurrió a la tecnología de cultivos abiertos en atmósfera con tensión de 5 % de CO<sub>2</sub>. En ambos casos se trabajó en las unidades de cultivos celulares del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario Virgen de las Nieves, y del Laboratorio del Grupo de Investigación de Inmunología Microbiana BIO201 en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia, dotados de las instalaciones necesarias.

### **4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

La significación estadística de las comparaciones de grupos de resultados con distribución normal se realizó mediante el test de la *t* de Student. En el caso de grupos de resultados cuya distribución no es normal se aplicó el test no paramétrico de Wilcoxon. En el caso concreto del análisis de mutantes obtenidos mediante el test de Ames la significación se estableció de acuerdo con las tablas publicadas por Gilbert (1980) para el análisis estadístico del test de fluctuaciones, que son las adoptadas por el fabricante del ensayo comercial utilizado en el presente trabajo.

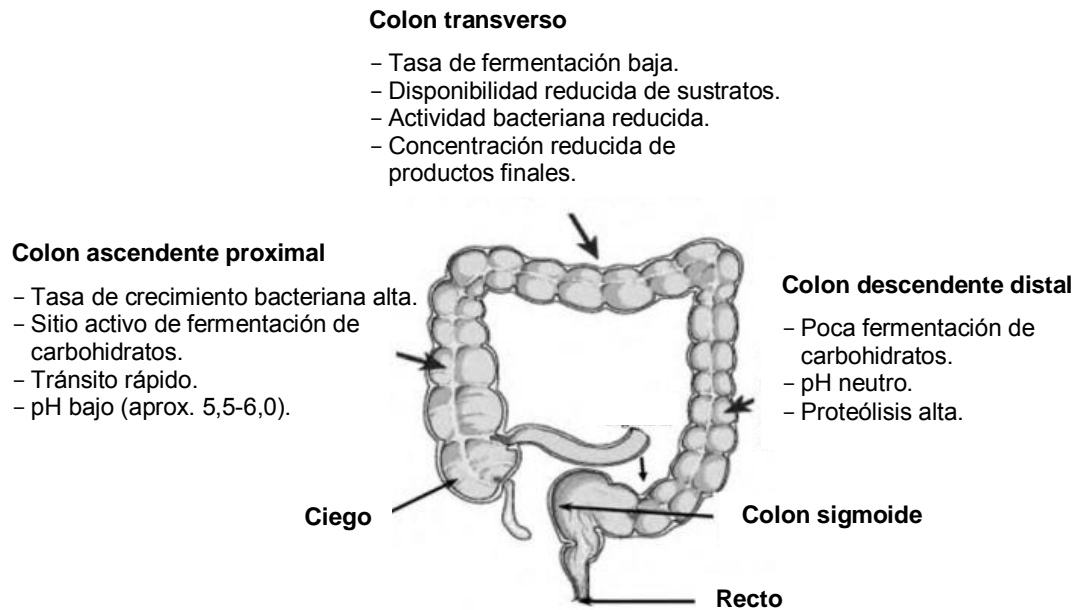
**5. VIABILIDAD DE *Lactobacillus plantarum* C4 EN  
CONDICIONES DE DIGESTIÓN GASTROINTESTINAL:  
INFLUENCIA DEL FRUCTOOLIGOSACÁRIDO PREBIÓTICO FOS  
E INTERACCIONES CON BACTERIAS PATÓGENAS  
INTESTINALES.**

## 5.1. INTRODUCCIÓN

El número y diversidad de microorganismos que habitan el tracto digestivo humano es característico en cada región anatómica del mismo (Macfarlane *et al.*, 1997). El tránsito de alimentos a través del estómago y el intestino delgado es, probablemente demasiado rápido (aproximadamente 4-6 horas), para que la microbiota intestinal ejerza un impacto significativo. Sin embargo, en el colon este tránsito se ralentiza marcadamente (aproximadamente 48-70 horas), lo que permite establecer una comunidad microbiana compleja y relativamente estable (Macfarlane y Gibson, 1994).

El intestino grueso humano está formado por el ciego, el colon ascendente, el colon transversal, el colon descendente, el colon sigmoide y el recto (Figura 5.1). El colon a través de su microbiota es capaz de llevar a cabo complejas funciones hidrolíticas digestivas. Esto implica la descomposición de los sustratos disponibles derivados de la dieta o de secreciones endógenas que han escapado a la digestión y la absorción en el tracto gastrointestinal superior (Roberfroid *et al.*, 2010). Los sustratos principales son endógenos (entre ellos, moco), carbohidratos de la dieta como: almidones resistentes, polisacáridos no amiláceos (celulosas, hemicelulosas, pectinas y gomas), alcoholes de azúcar y oligosacáridos no digeribles (Slavin, 2013) y, también algunas proteínas, que no se hidrolizan ni se absorben en el tracto digestivo superior. La disponibilidad de carbohidratos disminuye a medida que los residuos de la dieta pasan del colon proximal al intestino distal y transversal (Gibson y Rastall, 2006).

Debido al prolongado tiempo de residencia de los contenidos en el colon, la diversa microbiota que en él reside juega un papel importante en la salud y el bienestar del huésped. Los efectos beneficiosos están relacionados con su metabolismo (perfiles de fermentación y productos finales), capacidad de producir vitaminas, antioxidantes, moléculas antimicrobianas (ácidos orgánicos, antibióticos, bacteriocinas) capaces de actuar contra competidores potencialmente dañinos, intercambio de señales moleculares entre los diferentes géneros y especies y también con el epitelio celular eucariótico (Roberfroid *et al.*, 2010). La vía principal de fermentación que utilizan las bacterias del colon genera piruvato a partir de las hexosas del carbohidrato no digerido. Además, utilizan una amplia gama de enzimas hidrolasas para producir hidrógeno, metano, dióxido de carbono, ácidos grasos de cadena corta (SCFA: principalmente acetato, propionato y butirato) y lactato (Slavin, 2013).



**Figura 5.1. Regiones del intestino grueso humano con las actividades bacterianas correspondientes y diferencias fisiológicas (Gibson y Rastall, 2006).**

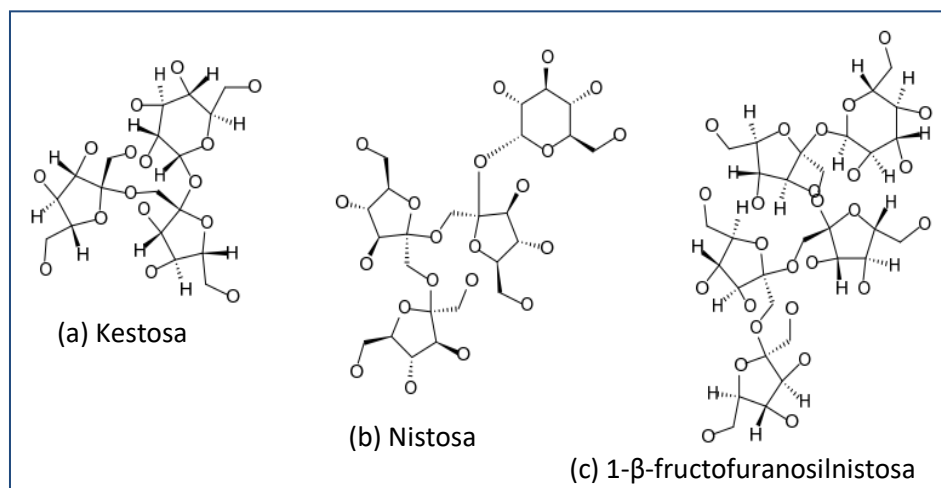
Uno de los criterios para la selección de microorganismos probióticos ha sido la tolerancia a las condiciones del tracto digestivo, pues para poder ejercer efectos beneficiosos en el intestino grueso deben ser capaces de sobrevivir a duras condiciones como pH ácido, altas concentraciones de enzimas digestivas y sales biliares (Arroyo-López *et al.*, 2014). Estas últimas, principales componentes de la bilis, son sustancias biológicas de tipo detergente sintetizadas en el hígado a partir del colesterol. Las enzimas del huésped conjugan los ácidos biliares sintetizados en el hígado con los aminoácidos glicina o taurina, generando sales biliares conjugadas. Estos compuestos se almacenan en la vesícula biliar y se liberan en el duodeno durante la digestión para realizar su función fisiológica, que es la solubilización de la grasa que proviene de la dieta. Estas sales biliares poseen una fuerte actividad antimicrobiana, ya que son capaces de desorganizar la estructura de la membrana celular, así como provocar daño al ADN (Ruiz *et al.*, 2013). Por ello, las bacterias probióticas deben poder sobrevivir en “número suficiente” al tránsito gastrointestinal y así colonizar transitoriamente nuestro intestino. La disminución de viabilidad puede ocurrir a lo largo de todo el tracto gastrointestinal, pero es evidente que el ambiente ácido del estómago y la presencia de bilis en el duodeno son factores importantes que afectan la viabilidad de las bacterias probióticas (Mainville *et al.*, 2005).

Otra característica probiótica importante es la capacidad para fermentar selectivamente oligosacáridos. Los prebióticos más conocidos son oligosacáridos (Kaplan y Hutkins 2000), los cuales son fermentados por cepas específicas de bifidobacterias y lactobacilos de la microbiota intestinal, por lo que el uso de una dieta enriquecida con prebióticos puede conducir a un aumento selectivo de microorganismos beneficiosos en el colon (Kleessen *et al.*, 2001). Además del efecto deseable del aumento de bifidobacterias y lactobacilos, se producen ácidos grasos de cadena corta (SCFA) como productos finales de la fermentación de oligosacáridos. Los SCFAs son absorbidos por el colon humano de una manera dependiente de la concentración y son los principales combustibles respiratorios para los colonocitos, suministrando hasta 60-70% de sus necesidades energéticas. Los SCFAs también estimulan el crecimiento de las células de la mucosa colorrectal, retardan la atrofia de la mucosa y disminuyen el riesgo de transformación maligna en el colon. Entre los diversos SCFAs, el butirato ha demostrado ser particularmente eficaz para disminuir el riesgo de transformación maligna en el colon (Mentschel y Claus 2003). Por otra parte, los oligosacáridos prebióticos estimulan la adsorción intestinal de minerales tales como calcio, hierro y magnesio (Quiang, *et al.*, 2009).

Un grupo específico de oligosacáridos que ha atraído mucho interés comercial como prebiótico son los fructooligosacáridos conocidos con el acrónimo FOS. Los fructooligosacáridos pueden obtenerse por hidrólisis de inulina o por transfructosilación de sacarosa. Se encuentran de forma natural en una gran variedad de alimentos, como el plátano, cebolla, ajo, puerro, la hortaliza mejicana denominada pataca o alcachofa de Jerusalén, y también en la miel. La raíz de achicoria contiene una gran cantidad de inulina que por hidrólisis parcial genera FOS (Sangeetha *et al.*, 2005; Gänzle y Follador, 2012). El trigo, el centeno y la cebada contienen entre 0,15 y 0,4% de FOS con un grado de polimerización de 3 a 5 (Campbell *et al.*, 1997).

Los fructooligosacáridos están compuestos de glucosa-(fructosa)<sub>n</sub> con enlace  $\beta$ -2  $\rightarrow$  1 entre las unidades de monómeros de fructosa. Su estructura general puede ser representada por GF<sub>n</sub> o F<sub>n</sub>, en la que G y F son, respectivamente, una unidad de glucosa o fructosa y n es el número de unidades de fructosilo. La longitud de la cadena de fructosa varía de 2 a 60 con un grado medio de polimerización superior a 10. Entre los principales FOS se encuentran la 1-kestosa (GF<sub>2</sub>), la nistosa (GF<sub>3</sub>) y la 1- $\beta$ -fructofuranosilnistosa (GF<sub>4</sub>), los cuales difieren en el número de unidades de fructosa presentes en el polímero (Figura 5.2).





**Figura 5.2. Estructura química de fructooligosacáridos.** (a) 1-kestosa, (b) nistosa, (c) 1-β-fructofuranosilnistosa (Guio *et al.*, 2009).

De acuerdo al método de obtención, están disponibles comercialmente dos tipos de FOS que son ampliamente utilizados en la industria alimentaria. Un primer tipo, denominado FOS tipo GF<sub>n</sub>, se obtiene a partir de la hidrólisis enzimática de la sacarosa y consiste en un monómero de glucosa (G) unido por enlaces α-1,2 a dos o más unidades de β-2,1-fructosa (F), formando una mezcla de GF<sub>2</sub>, GF<sub>3</sub> y GF<sub>4</sub>. El otro tipo de FOS comercial se obtiene a través de la hidrólisis enzimática parcial de la inulina. El producto resultante consiste en una mezcla de oligómeros de fructosa lineales, en la forma FF<sub>n</sub>, también unidos por enlaces β-2,1 y con un grado de polimerización que varía de 2 a 10. Debido a la presencia de una glucosa terminal en la molécula de inulina, estos últimos productos también contienen especies de oligosacáridos en la forma GF<sub>n</sub> (Goh *et al.*, 2007).

Por causa de su estructura química, el FOS no se digiere en el tracto gastrointestinal. Sin embargo, se ha demostrado *in vivo* que puede modular de forma beneficiosa la composición de la microbiota intestinal aumentando de forma preferencial las cantidades de bifidobacterias y lactobacilos (Takemura *et al.*, 2010). La utilización de FOS puede llevarse a cabo a través de dos rutas metabólicas. En una de ellas, el FOS se transporta intacto y se hidroliza en el citoplasma bacteriano; en la otra, se hidroliza mediante enzimas extracelulares, seguido de la acumulación posterior de los productos de la hidrólisis. En *Lactobacillus acidophilus* NCFM, por ejemplo, Barrangouet *et al.* (2003) identificaron un operón de metabolismo de azúcar múltiples (*msm*) que se asemeja al operón *msm* de *Streptococcus mutans* y el operón de rafinosa (*raf*) de *Streptococcus pneumoniae*. Este operón *msm* codifica un sistema de transporte de tipo “cassette” de unión, dependiente de ATP y una fructosidasa citoplasmática que median la captación de FOS y la hidrólisis intracelular,

respectivamente. La expresión de este operón puede ser inducida por sacarosa y FOS, pero no por glucosa o fructuosa. Sin embargo, en el caso de *Lactobacillus paracasei* 1195, un análisis de micromatrices (*microarrays*) del lactobacilo cultivado en FOS permitió la identificación de un operón putativo involucrado en el metabolismo de FOS. Este operón putativo denominado *fosABCDXE* codifica un sistema fosfotransferasa fructuosa/manosa (PTS) y un precursor de la enzima  $\beta$ -fructosidasa (FosE), los cuales tienen alta homología con el operón putativo levanasa (*lev*) de *Lactobacillus casei* ATCC334 y BL23. La inactivación del gen FosE inhabilita la cepa para crecer en FOS y en otros azúcares ligados a fructuosa. La deducción de la secuencia aminoacídica de FosE ha permitido conocer que contiene una secuencia aminoacídica de un péptido señal en la región N-terminal y un motivo de anclaje a la pared celular en la región C-terminal, lo que sugiere que FOS puede ser hidrolizado extracelularmente por FosE y posteriormente sus productos de hidrólisis pueden ser captados dentro de la célula por el sistema PTS. Los análisis de micromatrices también indicaron que la expresión de los genes inducidos por FOS está sujeta a una regulación de catabolitos por glucosa. Del mismo modo, se han descrito  $\alpha$ -fructofuranosidasas citoplasmáticas capaces de hidrolizar FOS en *Bifidobacterium adolescentes*, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium lactis* (Goh et al., 2007).

Los prebióticos y los probióticos pueden combinarse en un mismo producto destinado al consumo; a estas combinaciones se les ha asignado el nombre de "simbióticos", que no parece demasiado afortunado ya que el término "simbiosis" tiene en Biología un significado concreto y muy diferente. En este caso, la denominación alude a que los efectos de los dos componentes deben ser sinérgicos. El crecimiento del microorganismo probiótico en el intestino debe verse estimulado por su capacidad para fermentar el prebiótico, que por tanto promueve un ambiente intestinal más favorable en el que el probiótico puede competir mejor con otras bacterias; además, algunos productos de esta fermentación, como los ácidos grasos de cadena corta, actúan beneficiosamente sobre la mucosa intestinal (Binns, 2013).

Por lo anteriormente expuesto, en este capítulo se evalúa la resistencia de la cepa C4 a las condiciones gastrointestinales *in vitro* y se investigan sus interacciones con bacterias patógenas, examinando el papel de FOS en todo ello.

## 5.2. OBJETIVOS

En este capítulo se plantearon los siguientes objetivos:

1°. Evaluar la influencia del fructooligosacárido prebiótico FOS en el crecimiento y viabilidad de *Lactobacillus plantarum* C4.

2°. Examinar el comportamiento de la cepa C4 en condiciones similares a las gastrointestinales, incluyendo las posibles interacciones de antagonismo frente a las bacterias patógenas entéricas *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis* y la posible influencia de la presencia de FOS sobre el comportamiento de C4 en dichas condiciones.

## 5.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.3.1. Instrumentación y equipos

- Tubos estériles de 50 ml
- Jarra para incubación en anaerobiosis (Thermo Scientific Oxoid, Estados Unidos).
- Vortex, YellowLine TTS 2 IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Alemania).
- Incubador Memmert (Alemania).
- Medidor de pH y temperatura (Crison Instruments, S.A., España).
- Micropipetas de 10-50 µl, 50-200 µl y 100-1000 µl, Boeco (Alemania).
- Sobres de anaerobiosis, OXOID (Estados Unidos).
- Filtros de esterilización de 0,22 µm, Millex® - GS, Merck Millipore Ltd., Irlanda).

### 5.3.2. Reactivos y disoluciones

- Fructooligosacáridos de achicoria FOS (>90% como FOS e inulina), obtenido de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA).
- Leche desnatada estéril.

- Solución enzimática gástrica: Se preparó una solución al doble de la concentración de uso, como se describe en la Tabla 5.1, y se esterilizó por filtración a través de membrana de 0,22 µm de diámetro de poro.

**Tabla 5.1. Componentes de la solución gástrica.**

|   | 2X       |
|---|----------|
| NaCl Panreac  | 5,5 g/l  |
| KCl Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania)      | 1,64 g/l |
| Pepsina, Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania) | 2 g/l    |

- Solución enzimática intestinal: Se preparó también al doble de su concentración de uso (Tabla 5.2)

**Tabla 5.2. Componentes de la solución intestinal.**

|   | 2X   |
|---|------|
| Pancreatina de páncreas porcino, Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania) | 2g/l |
| Bilis   | 4g/l |

Para su preparación, los polvos fueron pulverizados en mortero con adición gradual de agua estéril. La suspensión fue centrifugada a 800 rpm durante 10 minutos. El pH final fue de 6,20.

- Tabletas para preparar Búfer Fosfato Salino (PBS), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).

### 5.3.3. Medios de cultivo

- Agar Lactobacilli (MRS), Difco™, Becton, Dickinson and Company, Estados Unidos).
- Agar MacConkey (Difco™, Becton, Dickinson and Company, Estados Unidos).
- Caldo Trypticasa Soja (Difco™, Becton, Dickinson and Company, Estados Unidos).
- Caldo y agar LPSM (*Lactobacillus plantarum* Selective Medium): Es un medio selectivo y diferencial (Tabla 5.3) diseñado por nuestro grupo de investigación que permite cuantificar las bacterias viables de la cepa C4

sin interferencia de otros lactobacilos y bacterias intestinales (Bujalance, *et al.*, 2006).

**Tabla 5.3. Composición del medio LPSM.**

|                        | Agar LPSM g/l | Caldo LPSM g/l |
|------------------------|---------------|----------------|
| Sorbitol               | 20            | 20             |
| Citrato amónico        | 2             | 2              |
| Acetato sódico         | 5             | 5              |
| Sulfato de magnesio    | 0,1           | 0,1            |
| Sulfato de manganeso   | 0,05          | 0,05           |
| Fosfato de potasio     | 2             | 2              |
| Peptona                | 10            | 10             |
| Extracto de carne      | 10            | 10             |
| Extracto de levadura   | 5             | 5              |
| Púrpura de bromocresol | 0,02          | -              |
| Ciprofloxacino         | 0,004         | -              |
| Bacto-Agar             | 15            | -              |

- Caldo mínimo: Con el nombre de “caldo mínimo” designamos un medio líquido diseñado a partir del medio base utilizado por Altieri *et al.* (2011) con suplementos de glucosa o prebióticos para examinar el efecto del prebióticos en la viabilidad de *L. plantarum*, basado a su vez en la formulación propuesta por Bevilacqua *et al.* (2008); en el medio usado por nosotros (Tabla 5.4) se ha prescindido de la solución de vitaminas (el extracto de levadura aporta vitaminas del complejo B) y del Tween-80.

**Tabla 5.4. Composición del caldo mínimo.**

|                      | g/l  |
|----------------------|------|
| Sulfato de magnesio  | 0,1  |
| Sulfato de manganeso | 0,05 |
| Fosfato de potasio   | 2    |
| Extracto de levadura | 5    |

#### 5.3.4. Cepas indicadoras

Se utilizaron aislados clínicos pertenecientes a la colección de microorganismos del Hospital Virgen de las Nieves de Granada: *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, *Escherichia coli* y *Enterococcus faecalis*. Además, se utilizó *Yersinia enterocolitica* IP383, un aislado clínico de serotipo O9, biotipo 2 que porta el plásmido de virulencia pYV (Mazigh *et al.*, 1983).

Este último microorganismo durante los pases de mantenimiento fue incubado a 25°C para evitar la pérdida del plásmido de virulencia.

### **5.3.5. Crecimiento de *L. plantarum* C4 en presencia y ausencia de FOS**

Se evaluó la cinética de crecimiento de *L. plantarum* C4 en TSB, caldo LPSM y caldo mínimo suplementados con FOS 5 g/l y 10 g/l y, sin suplementar. El inóculo inicial fue realizado a partir de una suspensión en PBS estéril ajustada por turbidez equivalente al patrón 0,5 de MacFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  bacterias/ml) a la que posteriormente se le realizó un recuento en agar MRS según la metodología descrita en el siguiente apartado. Los medios con y sin FOS se incubaron durante 72 horas tanto en aerobiosis como en anaerobiosis tomando alícuotas a las 2, 6, 12, 24, 36, 48 y 72 horas para los recuentos.

### **5.3.6. Recuento de suspensiones bacterianas y cultivos**

Para realizar los recuentos, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l y se prepararon diluciones ( $10^{-1}$  hasta  $10^{-7}$ ) en 900  $\mu$ l de PBS estéril. Seguidamente se sembró 10  $\mu$ l de cada una de estas diluciones en placas de agar MRS y agar LPSM y se incubaron a 37°C en aerobiosis durante 24 horas. Se contaron las diluciones que tuvieran entre 10 y 100 colonias y se multiplicó por su factor de dilución para obtener las unidades formadoras de colonias por mililitro (ufc/ml).

### **5.3.7. Digestión gastrointestinal *in vitro***

La digestión *in vitro* fue llevada a cabo en dos etapas: etapa gástrica y etapa intestinal, utilizando leche desnatada estéril en presencia y ausencia de FOS 5g/l. Simultáneamente se sometieron a la digestión *in vitro*, cocultivos de *L. plantarum* y patógenos gastrointestinales para evaluar la posible actividad antimicrobiana de los sobrenadantes durante la digestión.

Para la etapa gástrica, se cogieron 10 ml de leche desnatada estéril con y sin FOS a los cuales se les añadió 10 ml de solución enzimática gástrica (NaCl 2,75 g/l, KCl 0,82 g/l y pepsina 1 g/l) en tubos de 50 ml de capacidad. Seguidamente, se inoculó con *L. plantarum* C4 y las bacterias indicadoras y el pH fue ajustado entre 3 y 3,5 con HCL 1N. Estas mezclas fueron incubadas a 37°C durante 2 horas en aerobiosis, se registró el pH y se tomaron alícuotas para realizar los recuentos post-digestión en agar MRS y agar MacConkey.

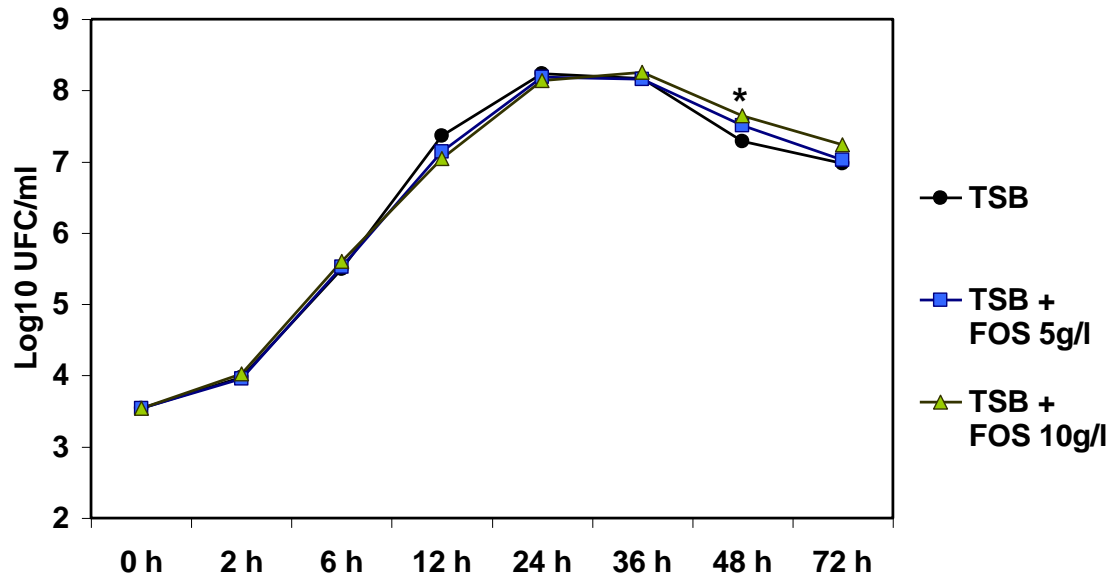
Finalizada la etapa gástrica, se continuó con la etapa intestinal, para la cual se adicionó 10 ml de solución enzimática intestinal (pancreatina 1g/l y bilis 2g/l, pH 6,20). La mezcla resultante fue ajustada a un pH de entre 7 y 7,5 con NaHCO<sub>3</sub> 1N y se incubó en condiciones de anaerobiosis durante 20 horas. Se tomaron alícuotas para realizar recuentos a las 4, 16 y 20 horas en agar MRS y agar MacConkey.

## 5.4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 5.4.1. Influencia de FOS en el crecimiento de *L. plantarum* C4

Inicialmente se examinó el crecimiento de C4 en TSB en ausencia y presencia de FOS, incorporado a concentraciones de 5 y 10 g/l. Los cultivos se incubaron en anaerobiosis. Los resultados se presentan en la Figura 5.3, y muestran que la suplementación de un medio relativamente rico en nutrientes con FOS tuvo escaso efecto sobre el crecimiento: los recuentos de bacterias viables fueron similares en los tres medios durante la fase de crecimiento exponencial (establecida aproximadamente entre las 2 y las 24 h) y solo a las 48 h se observó una diferencia significativa a favor del medio suplementado con la mayor cantidad de FOS. El hecho de que esta diferencia se manifestase en la fase de muerte de los cultivos concuerda con la observación de que FOS tiene un efecto prolongador de la viabilidad en etapas tardías de cultivos de una cepa de *L. plantarum* (Altieri *et al.*, 2011).

La relativa riqueza del TSB y en especial su contenido en dextrosa pueden minimizar el efecto de la suplementación con una fuente de energía compleja como es FOS. De hecho, Goh *et al.* (2007) han descrito un crecimiento diaúxico de *L. paracasei* cuando crece en un medio con dextrosa y FOS: la dextrosa se consume en primer lugar, y el operón responsable de la metabolización de FOS solo se expresó cuando se hubo consumido la glucosa.

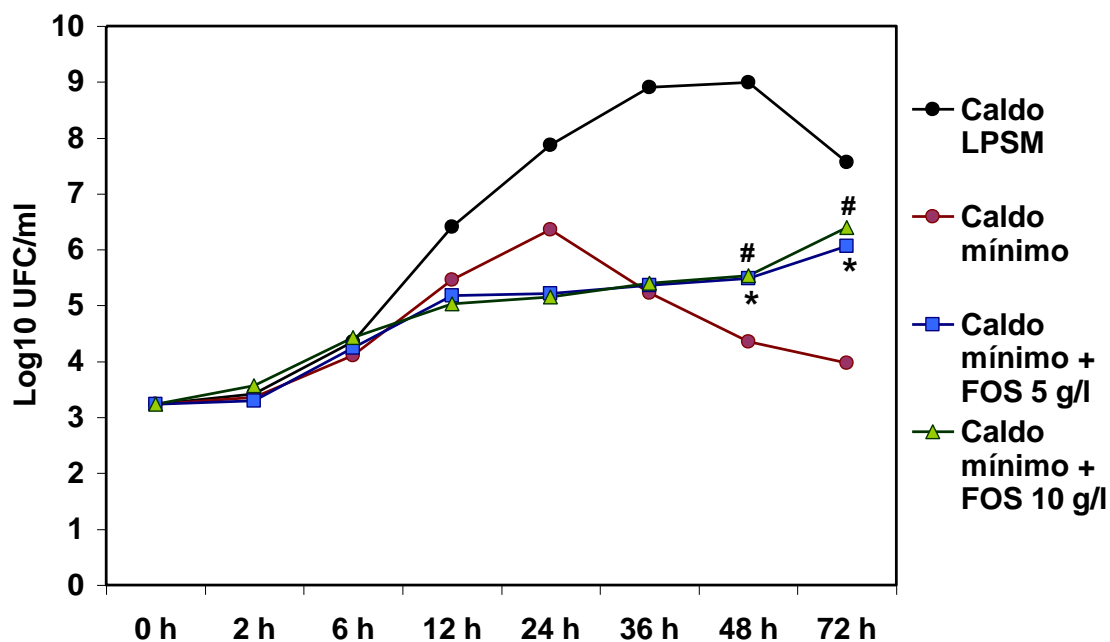


**Figura 5.3. Crecimiento de C4 en TSB en presencia y ausencia de FOS en anaerobiosis.** Cada punto representa el promedio de tres ensayos; \*, diferencia significativa entre el número de bacterias viables en TSB y en TSB suplementado con 10 g/ml de FOS ( $P < 0,02$ )

En un intento para poner de manifiesto con mayor claridad la influencia del prebiótico, se repitieron los ensayos utilizando un medio mínimo, cuya única fuente orgánica fue el extracto de levadura. Como término de comparación se eligió el caldo LPSM sin ciprofloxacino ni indicador, ya que es un medio apto para sustentar un desarrollo de *L. plantarum* igual o superior al conseguido en TSB. Si se comparan las Figuras 5.3 y 5.4, se observa que el crecimiento en LPSM fue incluso superior al conseguido en TSB, y la fase exponencial se prolongó unas 12 h más. Los resultados de la Figura 5.4 evidencian en primer lugar que el medio mínimo, sin fuente de carbono glucídica, permitió el crecimiento de C4, aunque a niveles muy inferiores a los obtenidos en el caldo LPSM, que posee un alto contenido en sorbitol. Kaplan y Hutkins (2000), para explicar el crecimiento de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en medio MRS desprovisto de hidratos de carbono, aducen la posible presencia de azúcares contaminantes en el propio medio o en el suplemento de FOS. Además, hay que tener presente al respecto que tanto en MRS basal como en el medio mínimo usado en el presente trabajo hay otras fuentes de carbono orgánico, entre ellas aminoácidos, y que los lactobacilos son capaces de utilizar aminoácidos como histidina o arginina para obtener energía por fosforilación a nivel de sustrato (Christensen *et al.*, 1999).



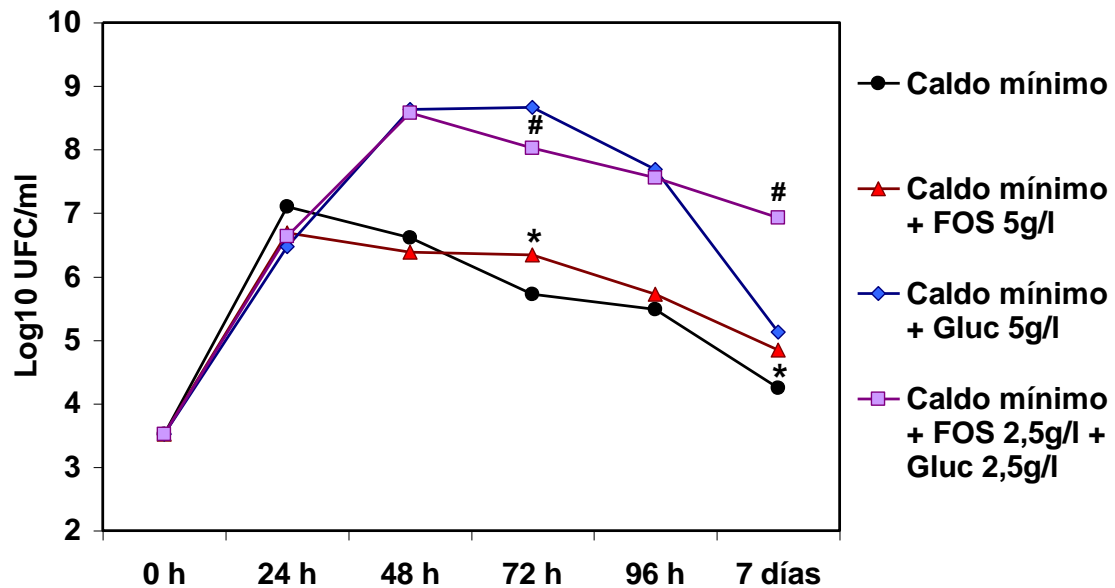
La suplementación con FOS prolongó muy significativamente la viabilidad de los cultivos en relación con los valores del medio mínimo (Figura 5.4). Sin embargo, no se observaron diferencias apreciables entre los medios suplementados con 5 g/l y con 10 g/l de FOS. Por ello, y dado que la disolución de 10 g de FOS en un litro de agua plantea problemas técnicos, se eligió en adelante la suplementación con 5 g/l.



**Figura 5.4. Crecimiento de C4 en caldo LPSM y en caldo mínimo con y sin FOS, en aerobiosis.** Cada punto representa el promedio de tres ensayos; \*, diferencias significativas entre los recuentos en caldo mínimo y en el mismo medio suplementado con 5 g/l de FOS ( $P < 0,005$  a 48 h y  $P < 0,003$  a 72 h); #, diferencias significativas entre los recuentos en caldo mínimo y en el mismo medio con 10 g/l de FOS ( $P < 0,005$  a 48 h y  $P < 0,004$  a 72 h).

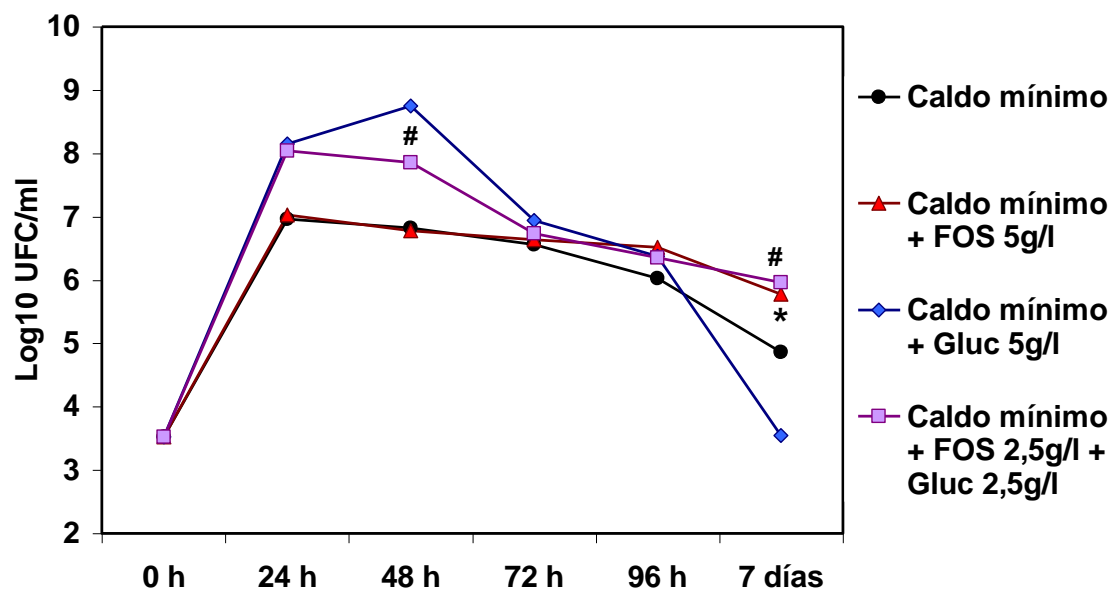
Se han descrito cepas de lactobacilos capaces de utilizar FOS como única fuente de carbono y energía (Altieri *et al.*, 2011), mostrando en algunos casos una eficiencia similar a la de la misma cantidad de glucosa (Kaplan y Hutkins, 2000; Chen *et al.*, 2015). Para entender mejor si el papel de FOS es simplemente prolongar la viabilidad de C4 o si puede ser usado de forma eficiente para soportar el crecimiento, diseñamos experimentos comparando el crecimiento en cultivos en caldo mínimo sin y con suplementación de glucosa, FOS, y mezcla de glucosa y FOS, en las cantidades utilizadas por Altieri *et al.* (2011).

Según los resultados mostrados en la Figura 5.5, la adición de FOS al caldo mínimo no modificó apreciablemente viabilidad de los cultivos en los dos primeros días, pero a las 72 h produjo recuentos de viables significativamente mayores y retrasó la fase de muerte con diferencias de nuevo significativas en los recuentos realizados a los 7 días.



**Figura 5.5. Efecto de la suplementación con FOS, glucosa y FOS + glucosa sobre el crecimiento de C4 en medio mínimo en aerobiosis.** Cada punto representa el promedio de tres ensayos; \*, diferencias significativas entre los recuentos en caldo mínimo y en el mismo medio suplementado con FOS ( $P < 0,05$  a 72 h y a 7 días); #, diferencias significativas entre los recuentos en caldo mínimo con glucosa y caldo mínimo con glucosa + FOS ( $P < 0,05$  a 72 h y  $P < 0,001$  a 7 días).

La repetición de estos experimentos con cultivos en anaerobiosis confirmó el papel de FOS en la prolongación de la viabilidad de C4 (Figura 5.6): tras siete días de cultivo, los medios con FOS contenían significativamente más bacterias viables que sus contrapartidas sin el prebiótico.



**Figura 5.6. Efecto de la suplementación con FOS, glucosa y FOS + glucosa sobre el crecimiento de C4 en medio mínimo en anaerobiosis.** Cada punto representa el promedio de tres ensayos; \*, diferencias significativas entre los recuentos en caldo mínimo y en el mismo medio suplementado con FOS ( $P < 0,05$  a 7 días); #, diferencias significativas entre los recuentos en caldo mínimo con glucosa y caldo mínimo con glucosa + FOS ( $P < 0,05$  a 72 h y  $P < 0,001$  a 7 días).

Se han identificado diversos genes implicados en el metabolismo de fructooligosacáridos en varias especies de *Lactobacillus*, incluyendo *L. plantarum* (Saulnier *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2015). Sin embargo, Saulnier *et al.* (2007) han demostrado que *L. plantarum* no es capaz de crecer eficientemente en FOS comercial obtenido de raíz de achicoria, aunque si lo hace en fructooligosacáridos de cadena corta (scFOS), producidos de la sacarosa por acción de fructosil-transferasas de *Aspergillus niger*. Esto concuerda con los resultados de nuestros ensayos, en los que se utilizó FOS procedente de achicoria.

En todos los ensayos realizados, se observó que los recuentos de viables en el medio mínimo con glucosa y FOS mostraron un descenso respecto de los recuentos en el medio con glucosa sola, a las 72 h en los cultivos en aerobiosis y a las 48 h en los cultivos en anaerobiosis. Aunque no puede excluirse algún papel desconocido de FOS en este efecto, parece razonable asumir que es el menor contenido en glucosa (la mitad) en el medio con glucosa y FOS el responsable de este descenso de viabilidad, habida cuenta de las limitaciones señaladas anteriormente para el crecimiento de *L. plantarum* sobre FOS.

#### 5.4.2. Resistencia de C4 al proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*: influencia de FOS.

En los estudios preliminares que se realizaron para evaluar el potencial probiótico de la cepa C4, se estableció su capacidad para resistir el pH ácido y la acción de las sales biliares (Bujalance *et al.*, 2007). En el presente trabajo se extendió este estudio, examinando el comportamiento de C4 en condiciones experimentales de aproximación *in vitro* a una situación real de ingestión del probiótico: inóculo no inferior a  $10^8$  bacterias viables por ml, suspensión en leche descremada y simulación de la digestión, con una etapa gástrica de 3 h y otra intestinal de 20 h, realizando recuentos de bacterias viables al final de cada etapa y a las 4 h de iniciada la etapa intestinal. Los resultados se presentan en la Figura 5.7, y muestran que la bacteria soportó perfectamente las condiciones gastrointestinales (de un recuento inicial de  $10^{8.2}$  se pasó a un recuento final de  $10^{8.5}$  bacterias viables por ml), sin que la presencia de FOS (5 g/l) influyese de forma significativa. En los estudios preliminares citados, la incubación durante 30 min a pH 2,6 en solución salina redujo en tres unidades logarítmicas el recuento de viables (Bujalance *et al.*, 2007). Por el contrario, en nuestros ensayos actuales, usando inóculos del mismo orden de magnitud, no se observó reducción significativa tras 3 h de digestión gástrica. Dos factores pueden explicar esta resistencia de C4: la diferencia de pH, que en los ensayos actuales nunca fue inferior a 3, lo que sugiere que entre los valores 3 y 2,6 puede localizarse un límite de resistencia; y la presencia de proteínas de la leche, que ya se puso de manifiesto en los experimentos preliminares aludidos, en los que el poder amortiguador de la leche descremada preservó la viabilidad de C4 en presencia de HCl, aunque a valores de pH superiores a 3.

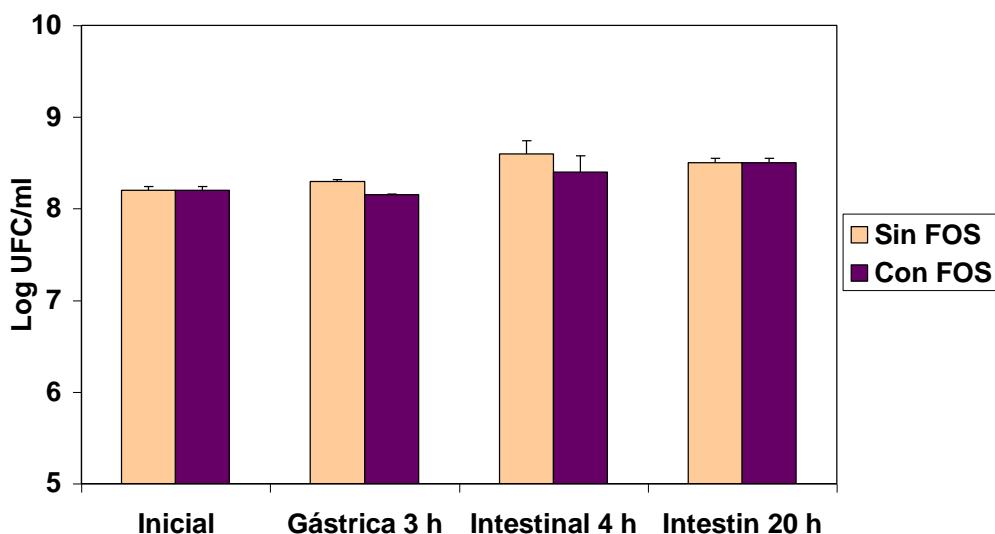


Figura 5.7. Supervivencia de C4 en un ensayo de simulación de digestión gastrointestinal, en ausencia y presencia de FOS (5 g/l). Los resultados son promedios de tres determinaciones.

### **5.4.3. Comportamiento de C4 bajo condiciones gastrointestinales *in vitro*: interacciones con patógenos intestinales.**

Una vez establecida la capacidad de C4 para sobrevivir en condiciones de digestión gastrointestinal, se abordó el estudio de las interacciones con bacterias patógenas intestinales sometidas a las mismas condiciones. Las investigaciones preliminares mencionadas en el apartado anterior incluyeron ensayos de antibiosis en los que C4 inhibió el crecimiento de aislados patógenos de *E. coli*, *S. enterica* serovar *Typhimurium*, *Y. enterocolitica* y *Listeria monocytogenes* (Bujalance *et al.*, 2007). Al estar realizadas estas pruebas con C4 crecida en agar MRS, con un alto contenido en dextrosa, es razonable atribuir los halos de inhibición observados a la producción de ácidos como consecuencia de la fermentación, lo que ha sido confirmado posteriormente (datos no publicados); pero las condiciones del hábitat intestinal son muy distintas, lo que limita la validez de aquellos ensayos de antibiosis y justifica el interés del estudio actual.

La Figura 5.8 presenta los resultados de un ensayo preliminar de digestión con inóculos de C4 y la cepa IP383 de *Y. enterocolitica*, perteneciente al serotipo O9 y portadora del plásmido de virulencia pYV, en ausencia (A) y presencia de FOS (B).

El comportamiento de C4 fue el esperado. La cepa de *Y. enterocolitica* mostró una buena adaptación a las condiciones gastrointestinales, ya que, partiendo de un nivel inicial de  $10^{7,48}$  bacterias por ml, remontó al menos una unidad de logaritmo al finalizar el proceso, sin que la presencia de FOS influyera en los recuentos. Cuando las dos cepas se sometieron al proceso digestivo juntas, en ausencia de FOS, no se pudo evidenciar ninguna interacción, ya que los recuentos de viables fueron similares a los obtenidos con cada una de ellas por separado. Sin embargo, en presencia de FOS el crecimiento de *Y. enterocolitica* se vio frenado por C4 a las 4 h de digestión intestinal, y a las 20 h su viabilidad descendió por debajo del nivel inicial. Por el contrario, C4 mantuvo su cinética de supervivencia usual.

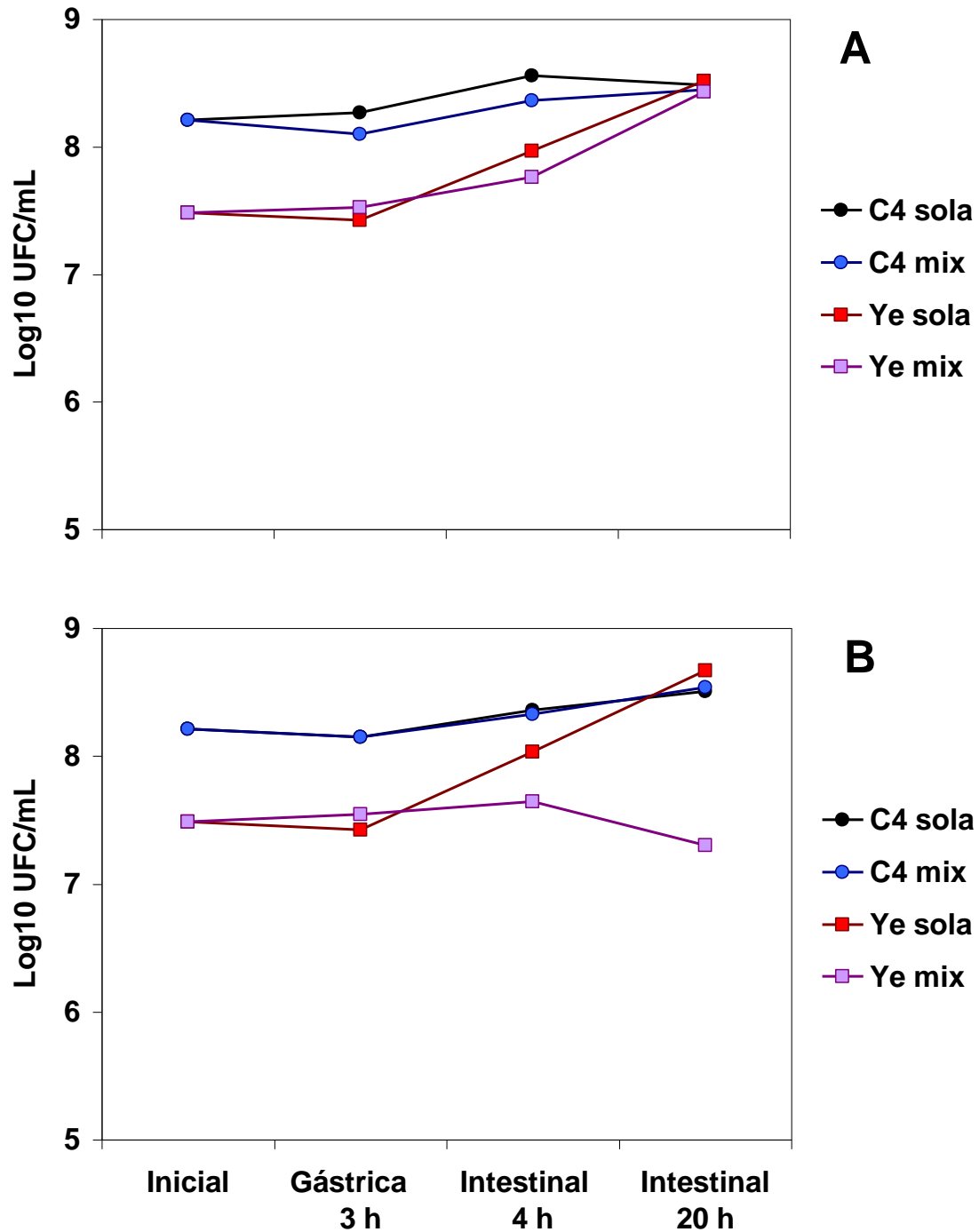
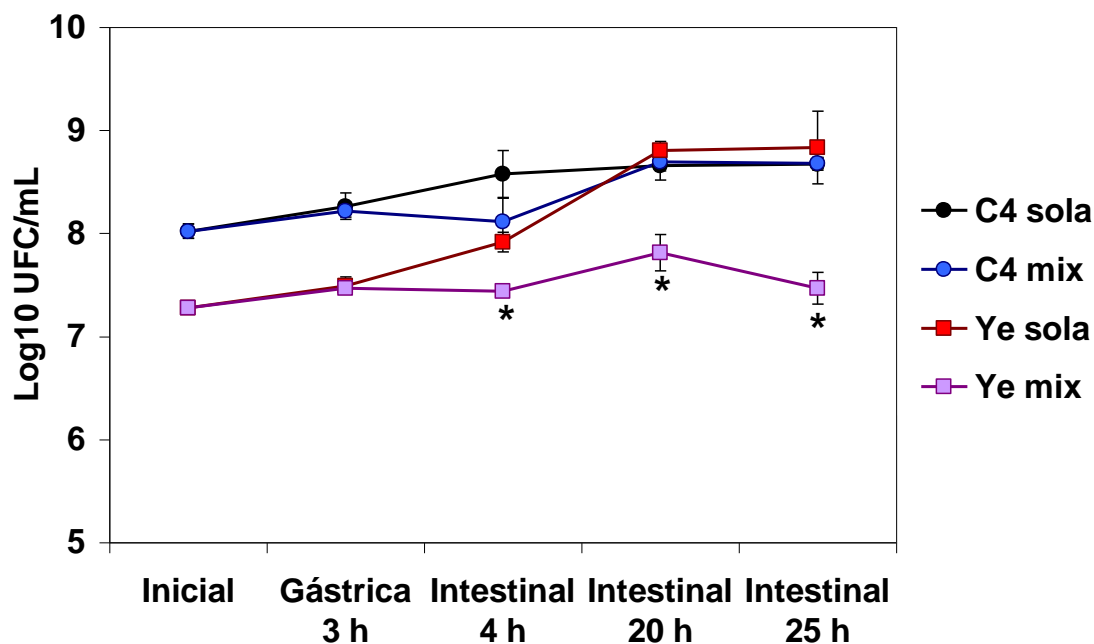


Figura 5.8. Influencia de FOS en las interacciones entre C4 y una cepa virulenta de *Y. enterocolitica* durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro*. (A), digestión en ausencia de FOS; (B), digestión en presencia de FOS (5 g/l). Se presentan los recuentos de las dos bacterias inoculadas por separado (solas) y juntas (mix). Ye, *Y. enterocolitica*.

Dado el gran interés de estos resultados, se repitió el ensayo en presencia de FOS, y por triplicado para permitir el análisis estadístico. Los datos de la Figura 5.9 confirmaron que, en presencia de FOS, C4 ejerce un efecto de antibiosis sobre *Y. enterocolitica*.



**Figura 5.9. Antibiosis de C4 sobre *Y. enterocolitica* durante el proceso de digestión gastrointestinal *in vitro* en presencia de FOS.** Los resultados son promedios de tres ensayos y representan los recuentos de las dos bacterias inoculadas por separado (solas) y juntas (mix), siempre en presencia de FOS (5 g/l); \*, diferencias significativas entre los recuentos de *Y. enterocolitica* sola y en codigestión con C4 ( $P < 0,005$  tras 4 h y 20 h, y  $P < 0,01$  tras 25 h de digestión intestinal). Ye, *Y. enterocolitica*.

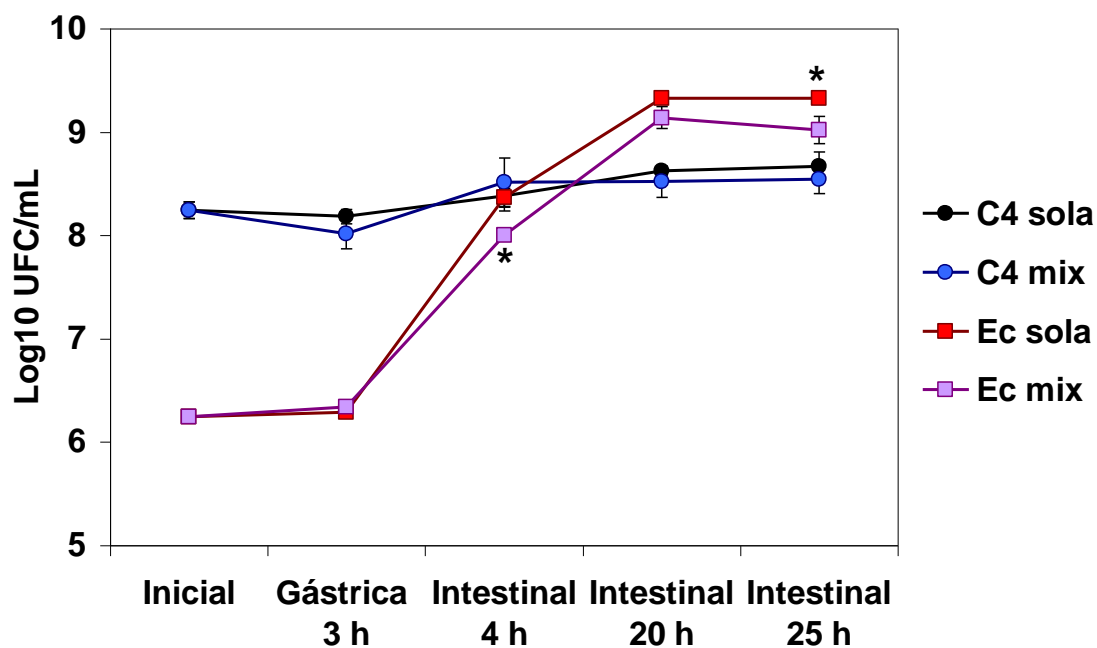
Los recuentos de *Y. enterocolitica* fueron similares tras la digestión gástrica, pero comenzaron a divergir en la etapa intestinal, siendo significativamente menores los obtenidos tras 4, 20 y 25 h de digestión en presencia de C4. Por tanto, en nuestras condiciones experimentales FOS no ha mostrado ser una fuente de carbono y energía que soporte eficientemente el crecimiento de C4, pero es capaz de inducir en esta cepa probiótica un efecto de antibiosis sobre *Y. enterocolitica* en las condiciones de digestión intestinal. El mecanismo de esta antibiosis es desconocido; la inhibición por acidificación, que fue el mecanismo de la antibiosis en los ensayos reportados por Bujalance *et al.*

(2007) con cultivos de C4 en agar MRS, se excluye porque el pH final de los procesos de digestión fue medido en todos los experimentos y se mantuvo siempre por encima de 7 (datos no mostrados). Chen *et al.* (2007) han descrito que especies de bacterias del ácido láctico (incluyendo *Lactobacillus animalis* y dos especies de *Lactococcus*) productoras de bacteriocinas incrementaban significativamente la producción de estas moléculas antibacterianas cuando crecían en un medio base sencillo, carente de carbohidratos, adicionado de FOS; pero en nuestros ensayos de digestión *in vitro* FOS no sustenta el crecimiento de C4 (solo prolonga su viabilidad), y, por otra parte, la acción inhibidora sobre una bacteria Gram-negativa, filogenéticamente muy lejana, no parece que pueda atribuirse a una bacteriocina.

En los siguientes ensayos se investigó si la capacidad de C4 para ejercer antibiosis durante el proceso digestivo en presencia de FOS se extiende a otras bacterias patógenas, dos Gram-negativas (*E. coli* y *S. enterica* serovar *Typhimurium*) y una Gram-positiva (*E. faecalis*). La Figura 5.10 muestra que la cepa de *E. coli* ensayada tiene una notable adaptación al hábitat intestinal, ya que, tras mantener el nivel de viabilidad durante la digestión gástrica, el número de bacterias viables remontó en alrededor de tres unidades logarítmicas al final de la digestión intestinal. En presencia de C4 y FOS el crecimiento de *E. coli* se vio moderadamente disminuido, pero la reducción alcanzó significación estadística en las medidas realizadas a las 4 y a las 25 h de iniciada la fase intestinal. Como en los ensayos anteriores, la viabilidad de C4 se incrementó moderadamente a lo largo del ensayo, sin verse afectada por la presencia del patógeno.

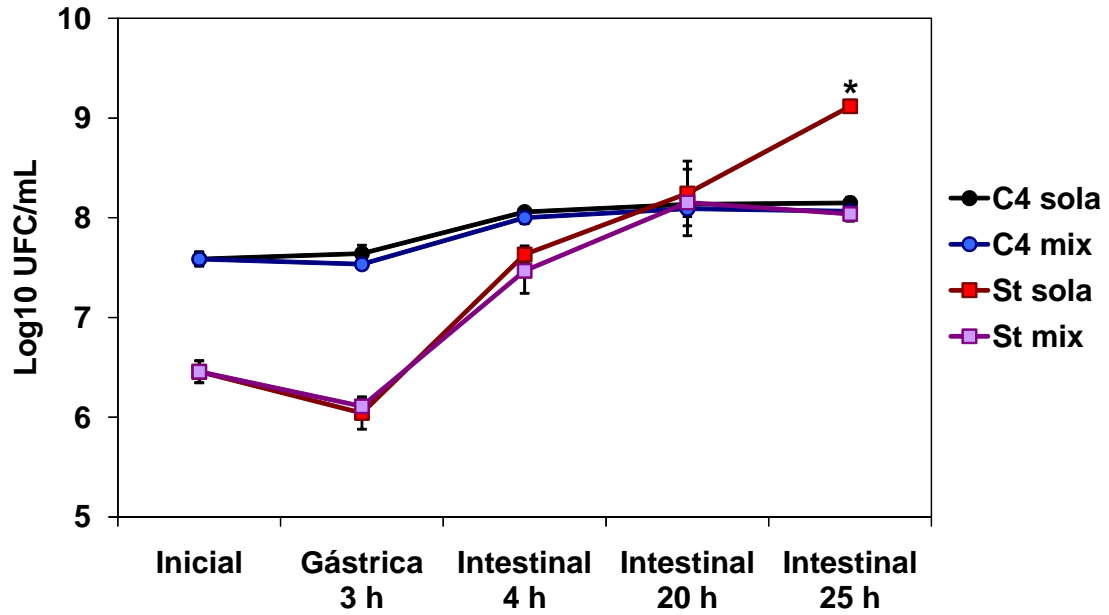
En la Figura 5.11 se observa que la cepa de *S. enterica* serovar *Typhimurium* fue más sensible que la de *E. coli* a las condiciones gástricas, ya que el número de salmonelas viables descendió a menos de la mitad tanto en los monocultivos como en los cultivos mixtos. Sin embargo, durante la digestión intestinal remontó más de dos unidades logarítmicas respecto del recuento inicial. Nuevamente C4 mostró una moderada proliferación, sin modificarse por la presencia de la enterobacteria. Pero en presencia de C4 y FOS, el crecimiento de *S. enterica* serovar *Typhimurium* se vio detenido a partir de las 20 h de digestión intestinal, con diferencias muy significativas entre el monocultivo y el cultivo mixto en los recuentos realizados a la 25 h.



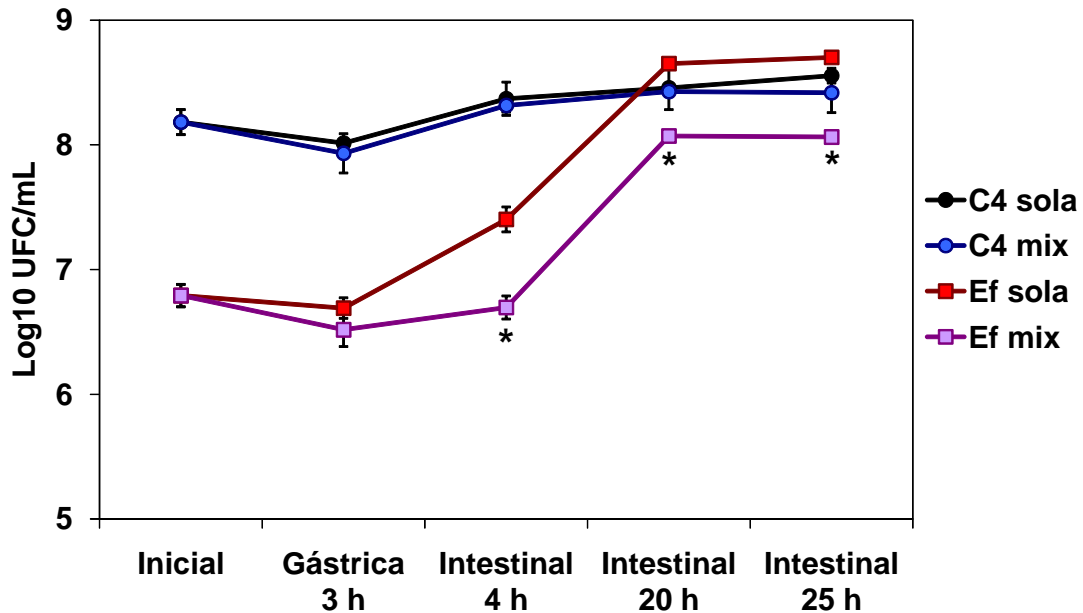


**Figura 5.10. Antibiosis de C4 sobre *E. coli* en presencia de FOS.** Los resultados son promedios de tres ensayos y representan los recuentos de las dos bacterias inoculadas por separado (solas) y juntas (mix), siempre en presencia de FOS (5 g/l); \*, diferencias significativas entre los recuentos de *E.coli* sola y en codigestión con C4 ( $P < 0,02$  tras 4 h y  $P < 0,05$  tras 25 h de digestión intestinal). Ec, *E. coli*.

Por último, se examinaron las interacciones entre C4 y *E. faecalis* durante la digestión en presencia de FOS. Los resultados se presentan en la Figura 5.12 y revelan que, también en este caso, el patógeno, tras superar con leves pérdidas la digestión gástrica, incrementó los recuentos de viables durante la etapa intestinal; pero cuando se cocultivó con *L. plantarum* C4, los recuentos de enterococos viables evidenciaron reducciones estadísticamente significativas en los tres intervalos medidos (4, 20 y 25 h de digestión intestinal).



**Figura 5.11. Antibiosis de C4 sobre *S. typhimurium* en presencia de FOS.** Los resultados son promedios de tres ensayos y representan los recuentos de las dos bacterias inoculadas por separado (solas) y juntas (mix), siempre en presencia de FOS (5 g/l); \*, diferencias significativas entre los recuentos de *S. enterica* serovar *Typhimurium* sola y en codigestión con C4 ( $P < 0,001$  tras 25 h de digestión intestinal). St, *S. enterica* serovar *Typhimurium*.



**Figura 5.12. Antibiosis de C4 sobre *E. faecalis* en presencia de FOS.** Los resultados son promedios de tres ensayos y representan los recuentos de las dos bacterias inoculadas por separado (solas) y juntas (mix), siempre en presencia de FOS (5 g/l); \*, diferencias significativas entre los recuentos de *E. faecalis* sola y en codigestión con C4 ( $P < 0,001$  tras 4 h y  $P < 0,0001$  tras 20 y 25 h de digestión intestinal). Ef, *E. faecalis*.

Los resultados obtenidos demuestran que, en condiciones que simulan el proceso de digestión gastrointestinal de un vehículo lácteo suplementado con FOS, y en un lapso de tiempo total de 28 h, la cepa *L. plantarum* C4, que exhibió un crecimiento moderado, ejerció significativos efectos inhibidores sobre el crecimiento y la viabilidad de bacterias patógenas intestinales.

Los principales mecanismos por los que las bacterias probióticas inhiben a otros microorganismos son la producción de ácidos grasos de cadena corta, de bacteriocinas y de agua oxigenada (Cruz-Guerrero *et al.*, 2014). Estos mecanismos pueden verse estimulados por la presencia de prebióticos y, en concreto, prebióticos con inulina promueven la formación de ácidos grasos de cadena corta por ciertas cepas de lactobacilos (Cruz-Guerrero *et al.*, 2014). La cepa C4 destaca por su capacidad para producir isobutírico cuando se incuba en papillas fecales adicionadas de FOS (Bergillos-Meca *et al.*, 2015), y se ha descrito que las salmonelas son sensibles a este ácido (Salsali *et al.*, 2006). Otros ácidos, producto de la fermentación láctica, como el acético, son aún más activos que el butírico, pero el hecho de que al menos la inhibición de *Y. enterocolitica* no ocurra en el curso de la digestión del vehículo lácteo en ausencia de FOS, sugiere que los productos de la fermentación láctica no deben estar implicados y apoya la hipótesis del papel inhibidor del isobutirato, aunque se requieren estudios posteriores para dilucidar el mecanismo del efecto inhibidor.

## 5.5. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten extraer las siguientes conclusiones:

1ª. *Lactobacillus plantarum* C4 resiste las condiciones de una simulación in vitro de la digestión gastrointestinal, mostrando al final del proceso un crecimiento moderado.

2ª. La adición de fructooligosacárido prebiótico (FOS) al medio en distintas condiciones experimentales, incluyendo medios de cultivo ricos y mínimos y un proceso de digestión gastrointestinal de leche descremada, no puede sustituir a la dextrosa como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* C4, pero prolonga su viabilidad.

3ª. En el curso de un proceso de digestión gastrointestinal de vehículo lácteo adicionado de FOS, *Lactobacillus plantarum* ejerce un efecto inhibitor sobre cepas de las bacterias patógenas intestinales *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Enterococcus faecalis*, siendo la presencia de FOS un requisito necesario para esta inhibición al menos en el caso de *Y. enterocolitica*.

## **6. INHIBICIÓN DE *Clostridium difficile* Y SUS TOXINAS**

**POR *Lactobacillus plantarum* C4**

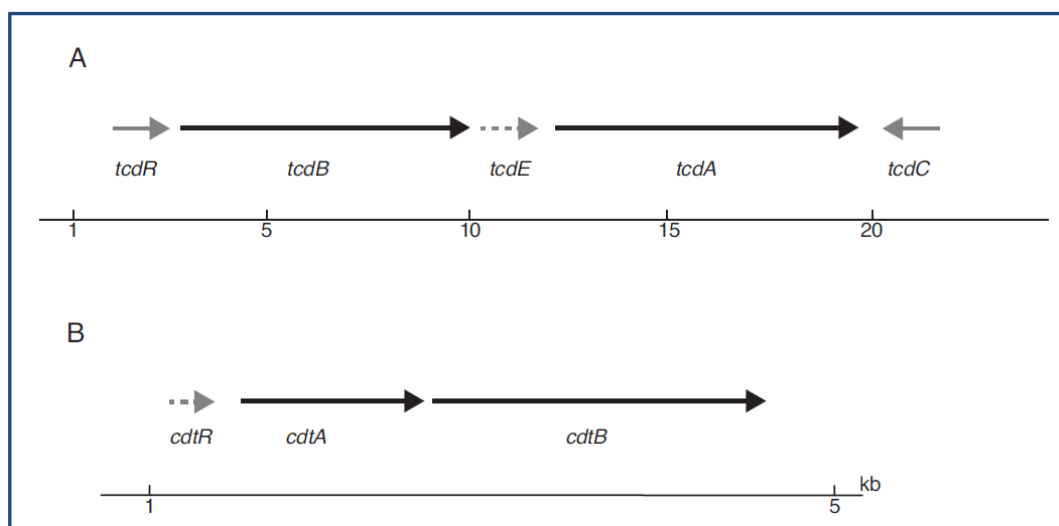
## 6.1. INTRODUCCIÓN

### 6.1.1. Generalidades de *Clostridium difficile*

*Clostridium difficile* es un bacilo Gram-positivo esporulado, anaerobio estricto, causante de un espectro de enfermedades incluidas en la denominación conjunta “Infecciones por *Clostridium difficile*” (ICD), que van desde un cuadro de diarrea no complicada y evolución benigna hasta cuadros de progresiva gravedad que incluyen la colitis pseudomembranosa y el megacolon tóxico y, en ocasiones, sepsis e incluso muerte, y que en la mayoría de los casos aparecen como consecuencia de la disbiosis intestinal inducida por algunos tratamientos antimicrobianos (Asensio y Monge, 2012; Theriot y Young, 2015). Actualmente, la ICD es la primera causa de diarrea nosocomial en los países desarrollados y uno de los principales agentes etiológicos de la diarrea de adquisición comunitaria (Alcalá *et al.*, 2015; Shin *et al.*, 2016).

Estudios realizados en Estados Unidos, en Canadá y en Europa han mostrado un importante aumento de la incidencia de los casos de diarrea asociada a *C. difficile* (DACD) desde finales de los años noventa, convirtiéndose en una importante causa de morbilidad y mortalidad (Rodríguez-Pardo *et al.*, 2013). En España, la incidencia anual de la DACD se estima en 17,1 casos por cada 10.000 pacientes hospitalizados oscilando entre 12,2 y 24,0 casos por cada 10.000 altas e ingresos hospitalarios, respectivamente (Asensio *et al.*, 2013).

Las cepas toxigénicas de *C. difficile*, a diferencia de las no toxigénicas, expresan dos proteínas de alto peso molecular: la toxina A, una potente enterotoxina; y la toxina B, una potente citotoxina codificadas por los genes *tcdA* y *tcdB*, respectivamente (Voth y Ballard, 2005). Estos dos genes junto con sus genes reguladores se encuentran localizados en el cromosoma bacteriano en un locus de patogenicidad de 19,6 kb (PaLoc). Este locus (Figura 6.1.A) está formado por 5 genes (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdE* y *tcdR*). Los genes *tcdA* y *tcdB* codifican las dos toxinas TcdA y TcdB, responsables de la patogenicidad de *C. difficile*. El gen *tcdR* actúa como regulador positivo de la expresión de *tcdA* y *tcdB*, mientras que *tcdC* actúa como regulador negativo, evitando la expresión de todo el PaLoc. Finalmente, *tcdE* codifica una holina que se encargara de hacer poros en la membrana citoplasmática que permite la liberación de las toxinas. En cepas no toxigénicas esta región es reemplazada por una secuencia corta de 115 pb (Rupnik *et al.*, 2009).



**Figura 6.1. Genes implicados en la producción de toxinas por *C. difficile*.** (A) Esquema del locus de patogenicidad (PaLoc) que contiene los genes de las toxinas *tcdA* y *tcdB* (flechas negras), los genes reguladores *tcdR* y *tcdC* (flechas grises) y la holina *tcdE* (flecha punteada). (B) Región que codifica la transferasa, a la que se denomina toxina binaria. Tomado de Rodríguez-Pardo *et al.* (2013).

Tanto TcdA como TcdB tienen una similitud de secuencia de aminoácidos del 63% siendo la toxina B, esencial para la virulencia (Lyras *et al.*, 2009; Carter *et al.*, 2010; Di Bella *et al.*, 2016). Ambas son citotoxinas que poseen actividad glucosiltransferasa que causan la interrupción de las fibras de actina del citoesqueleto lo que se traduce en una disminución de la resistencia transepitelial, la acumulación de líquido y la destrucción del epitelio intestinal. Su mecanismo de acción aún no está del todo dilucidado. Las toxinas, tras unirse a sus receptores, son introducidas en las células diana mediante endocitosis. Dentro de los endosomas, en un ambiente ácido, ocurre la digestión proteolítica por la que la región N-terminal (con el dominio catalítico) se separa del resto de la toxina y glucosila determinadas guanosin trifosfasas (GTPasas) como las proteínas Rho y Rac bloqueando su ruta de señalización. Estas GTPasas se encargan, entre otras cosas, de la regulación de determinados procesos de señalización que están implicados en funciones relacionadas con el mantenimiento de la barrera epitelial y las interacciones intercelulares, como la formación del citoesqueleto, además de intervenir en la fagocitosis y la producción de citocinas, etc. Como consecuencia de todo este proceso, las células epiteliales se desestructuran separándose entre ellas e incluso muriendo y, por lo tanto, facilitando la migración de neutrófilos hacia el intestino y contribuyendo a la respuesta inflamatoria típica de la colitis (Voth y Ballard, 2005; Rodríguez-Pardo *et al.*, 2013).

Adicionalmente, algunas cepas toxigénicas de *C. difficile* poseen la capacidad de producir una tercera toxina, conocida como toxina binaria o *Clostridium difficile* transferasa (CDT) codificada por dos genes separados *cdtA* y *cdtB* que no se encuentran en el PaLoc (Figura 6.1.B). CdtB tiene una función de unión y CdtA es un componente enzimático (Rupnik *et al.*, 2009). Se trata de una ADP-ribosiltransferasa cuyo rol en la enfermedad no está claro, sin embargo se asocia con cuadros más severos en humanos y más frecuentemente en animales (Stubbs *et al.*, 2000). Otros factores de virulencia importantes que contribuyen a la patogénesis de *C. difficile* incluyen adhesinas, fimbrias, flagelos, cápsula y proteínas de la capa superficial.

La diarrea es la manifestación clínica más frecuente en la ICD y está mediada por las toxinas A y B. El tipo de enfermedad y la gravedad de las ICD (Tabla 6.1) dependerán tanto de factores del microorganismo como del paciente, principalmente de la virulencia de la cepa infectiva y de la respuesta inmune del hospedador (Alcalá *et al.*, 2015).

Los brotes de ICD con mayor gravedad, alta tasa de recaída y mortalidad significativa, se han relacionado con la aparición de una nueva cepa de *C. difficile* en América del Norte y Europa. Esta cepa emergente se denomina BI/NAP1/027. Se cree que el aumento de virulencia de *C. difficile* tipo 027 está asociado con una delección de un par de bases en la posición 117 del gen *tcdC* que conduce a una producción aumentada o prolongada de toxinas A y B y posiblemente la producción de la toxina binaria. Sin embargo, estos factores de virulencia no son únicos para el tipo 027 y también están presentes en otras cepas de *Clostridium* toxigénicos (Kuijper *et al.*, 2008).

Dado que *C. difficile* es capaz de producir esporas que persisten en el ambiente durante largos periodos de tiempo y son resistentes a un gran número de desinfectantes, este patógeno es altamente transmisible, especialmente a partir de las manos del personal sanitario (Alcalá *et al.*, 2015). Una vez ingerida, la estructura de la spora la protege del pH ácido del estómago y de las enzimas digestivas, y al llegar al intestino se produce la germinación, principalmente en el ciego y el colon. La patogénesis involucra la germinación de las esporas en células vegetativas, la colonización dentro del hábitat intestinal (favorecida por la disbiosis producida por tratamientos antimicrobianos) y la producción de toxinas que conducen al daño intestinal y la inflamación (Schenck *et al.*, 2015).



**Tabla 6.1. Clasificación de las ICD según la gravedad de la enfermedad**

| <b>Categoría de ICD</b> | <b>Signos clínicos y laboratorio</b>  | <b>Factores de riesgo asociados</b>  |
|-------------------------|---|--|
| Leve a moderada         | Diarrea sin signos sistémicos de infección, recuentos leucocitarios de <15.000/ $\mu$ l, creatinina sérica <1,5 veces el nivel basal.     | Uso de antibióticos, hospitalización previa, prolongada estancia hospitalaria, uso de inhibidores de la bomba de protones, quimioterapia, enfermedad renal crónica, sonda alimentación.  |
| Grave                   | Signos sistémicos de infección y/o recuentos leucocitarios de $\geq$ 15.000/ $\mu$ l o creatinina sérica $\geq$ 1,5 veces el nivel basal. | Edad avanzada, infección por la cepa BI/NAP1/027 de <i>C. difficile</i> , del toxinotipo III, tipo de campo pulsado de Norteamérica 1 (NAP1), grupo de análisis de endonucleasa de restricción tipo BI y ribotipo de PCR 027 (Tipo 027).                     |
| Grave complicada        | Signos sistémicos de infección incluyendo hipotensión, íleo o megacolon.  | Todos los anteriores más cirugía reciente, historia de enfermedad inflamatoria intestinal y tratamiento intravenoso con inmunoglobulinas.  |
| Recurrente              | Recurrencia en las 8 semanas siguientes tras haber completado el tratamiento para ICD correctamente.                                      | Paciente $\geq$ 65 años, uso concomitante de antibióticos, presencia de comorbilidades significativas, uso concomitante de inhibidores de la bomba de protones, mayor gravedad del episodio inicial, alta carga de <i>C. difficile</i> en muestras de heces. |

Los principales factores de riesgo que se han asociado con las ICD son la exposición antibiótica (especialmente a clindamicina, cefalosporinas, betalactámicos y fluoroquinolonas), la hospitalización prolongada, el ingreso en una unidad de cuidados intensivos, la proximidad física de un individuo infectado, la edad avanzada (mayores de 65 años), la gravedad de otra enfermedad subyacente, la inmunosupresión, una escasa respuesta inmune a las toxinas de *C. difficile*, la realización de procedimientos gastrointestinales no quirúrgicos y, posiblemente, el uso de antiácidos. Aunque los pacientes mayores hospitalizados y en tratamiento antibiótico son el principal grupo de riesgo de esta infección, se ha observado un aumento de casos en poblaciones especiales como pueden ser niños, pacientes inmunodeprimidos o pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal. Por otro lado, cada vez se observan más casos de infecciones asociadas o adquiridas en la comunidad, de hecho,

constituyen en torno a un 25% del total de casos de ICD y se dan en pacientes que no presentan los factores de riesgo tradicionales sino que muchas veces se trata de pacientes jóvenes que no han tenido relación con instituciones sanitarias o tratamiento antibiótico. Debe tenerse en consideración que el 1-3% de la población son portadores sanos así como alrededor de un 20% de los pacientes hospitalizados (posiblemente con inmunidad natural) y que, en consecuencia, no debe solicitarse el estudio de *C. difficile* en pacientes que no presentan sintomatología. Además, alrededor del 80% de los niños menores de un año suelen ser portadores asintomáticos de este patógeno, probablemente por la falta de receptores para las toxinas en su intestino. En este sentido, debe actuarse con precaución a la hora de realizar el diagnóstico de ICD en niños, realizándose únicamente en aquellos que presenten diarrea clínicamente significativa y descartando siempre otros posibles enteropatógenos (Alcalá *et al.*, 2015).

### **6.1.2. Diagnóstico de la DACD**

El diagnóstico de la DACD se basa en una combinación de criterios clínicos y datos de laboratorio. Los datos clínicos incluyen: a) diarrea: 3 evacuaciones o más diarias durante más de 24 h sin otra causa identificable; y b) la identificación de pseudomembranas en el colon mediante visión directa por colonoscopia. Entre los métodos de diagnóstico en el laboratorio se mencionan: cultivo microbiológico, detección de la enzima glutamato deshidrogenasa, detección de las toxinas A y B, ensayo de citotoxicidad, cultivo citotóxico y diagnóstico del gen de la toxina B.

#### **6.1.2.1. Determinación de la citotoxicidad**

El método de referencia para el diagnóstico de DACD en el laboratorio son los estudios de la citotoxicidad de las heces en cultivo celular. Esta prueba consiste en inocular un filtrado de las heces en diferentes líneas celulares. Si en las heces y por lo tanto en el filtrado hay toxinas (principalmente TcdB), a las 48 o 72 h se observará un efecto citopático en las células. Esta es una técnica sensible aunque poco específica, dado que la toxicidad también se puede observar por otros factores no relacionados con las toxinas de *C. difficile*. La especificidad del efecto citopático se incrementa realizando una neutralización con antitoxinas específicas. La prueba se considera positiva si se observa efecto citopático en el 50% o más de las células a las 48 horas y además, si el efecto es inhibido en los controles con antitoxina. Este método, si bien es considerado como el de referencia, tiene menor sensibilidad que el

aislamiento de *C. difficile* por cultivo, que sin embargo supone un retraso considerable a la hora de obtener resultados (Rodríguez-Pardo *et al.*, 2013; Antonara y Leber, 2016).

Por ello, se emplean métodos alternativos como los métodos inmunoenzimáticos (EIA) que evidencian la presencia de enzimas metabólicas y/o las toxinas A/B de *C. difficile*, así como, métodos que detectan secuencias nucleotídicas específicas de *C. difficile* y/o los genes que codifican sus toxinas (Rodríguez-Pardo *et al.*, 2013). La utilidad de las técnicas comúnmente empleadas para la detección de *C. difficile* se muestra en la Tabla 6.2.

**Tabla 6.2. Métodos de detección y diagnóstico de laboratorio de *C. difficile*.**

| <b>Método diagnóstico de laboratorio</b>                   | <b>Utilidad</b>                                     |
|--|---|
| Cultivo microbiológico<br>Detección de GDH                 | Presencia de <i>C. difficile</i>                    |
| Ensayo de citotoxicidad<br>Detección de toxinas            | Presencia de <i>C. difficile</i> toxigénico         |
| Cultivo citotoxigénico<br>Detección del gen de la toxina B | Capacidad de <i>C. difficile</i> de producir toxina |

#### **6.1.2.2. Detección de las toxinas A y/o B**

Las principales técnicas diagnósticas rápidas suelen incluir la detección de la toxina B o la de su gen. Existen diversos ensayos comerciales para la detección inmunológica rápida de las toxinas A y B: éstas van desde técnicas inmunocromatográficas basadas en flujo lateral, que no requieren ninguna tecnología específica, hasta técnicas de inmunoensayo basadas en una lectura final mediante espectrofotometría o quimioluminiscencia. La diversidad genética entre diferentes aislados de *C. difficile* en los genes codificantes de las toxinas puede afectar a la afinidad de los anticuerpos utilizados en los equipos comerciales por las toxinas y por tanto a su sensibilidad. Aunque la especificidad de esta técnica suele ser superior al 90% y en algunos caso se acerca al 100%, su sensibilidad suele ser del 40-60% cuando se comparan con el cultivo toxigénico, por lo que este método no puede ser utilizado de forma aislada para el diagnóstico de la ICD (Alcalá *et al.*, 2015).

### **6.1.2.3. Detección de la enzima glutamato deshidrogenasa (GDH)**

La GDH es una enzima de la pared celular de *C. difficile* que se produce en mucha cantidad y posee mayor estabilidad que las toxinas A y B. Es por ello que su sensibilidad alcanza valores cercanos al 90% cuando se compara con el cultivo toxigénico y su valor predictivo negativo o VPN es del 95-100%. Es una técnica poco específica, dado que la GDH se encuentra tanto en cepas toxigénicas como en cepas no toxigénicas, lo que hace que el valor predictivo positivo sea relativamente bajo y que un resultado positivo deba confirmarse por detección de las toxinas (Rodríguez-Pardo *et al.*, 2013; Alcalá *et al.*, 2015).

### **6.1.2.4. Detección de los genes de las toxinas A y/o B**

Estos métodos se basan en la amplificación de los genes *tcdA* y *tcdB* mediante PCR con posterior detección del producto amplificado o mediante PCR a tiempo real mientras que otros se basan en amplificaciones isotérmicas. Son pruebas muy sensibles y rápidas (entre 45 minutos y 3 horas) con lo que se puede obtener el resultado en el mismo día de la toma de la muestra. Un inconveniente de estas técnicas es el coste económico y la detección de portadores asintomáticos (Alcalá *et al.*, 2015).

### **6.1.2.5. Cultivo toxigénico**

El cultivo toxigénico consiste en el cultivo de las muestras de heces en medios selectivos, seguido de la detección de toxinas *in vitro*, con el fin de determinar la toxigenicidad de las cepas aisladas preferiblemente por técnicas rápidas inmunoenzimáticas o técnicas de amplificación comerciales. El cultivo toxigénico es una técnica muy sensible y con una alta especificidad, sin embargo es lenta (1-3 días), laboriosa y requiere personal preparado. Por otro lado, permite la detección de cepas toxigénicas en aquellos casos en los que éstas no se detectan mediante las técnicas rápidas realizadas directamente sobre la muestra y que resultan menos sensibles.

### **6.1.7. Tratamiento**

Los antibióticos de elección para el tratamiento de la DACD, dependiendo de la gravedad del proceso, son metronidazol (diarrea leve a moderada) o vancomicina por vía oral (cuadros severos). Dos de los desafíos más difíciles para el tratamiento de la ICD son los planteados por la recurrencia múltiple y

por la ICD complicada o severa. Los pacientes con recurrencias múltiples responden al tratamiento típico con vancomicina o metronidazol, sin embargo, los síntomas de diarrea se reanudan días o semanas después de que el tratamiento haya culminado. Entre el 20% y el 50% de estas recidivas son causadas por nuevos microorganismos de *C. difficile* que indican una reinfección en lugar de una recaída de la infección original (Rupnik *et al.*, 2009). Un análisis en España publicado en el año 2012, señala que el tratamiento con metronidazol y vancomicina fracasa en el 22,4% y el 14,2% de los casos, respectivamente, y que se produce recurrencia de la infección después del tratamiento en el 27,1% y el 24,0%, respectivamente (Asensio *et al.*, 2013). No se han ideado medios altamente eficaces para tratar estas recurrencias múltiples, y la mayoría se tratan con una disminución progresiva y una dosificación de pulso de vancomicina administrada cada dos o tres días mientras se recupera la microbiota normal (Rupnik *et al.*, 2009).

Actualmente junto a la terapia antibiótica convencional, se emplea la bioterapia en dos modalidades: reposición de la microbiota normal con el trasplante de microbiota fecal, en el caso de pacientes con recurrencias múltiples y, la terapia con microorganismos probióticos (Schenck *et al.*, 2015).

El trasplante fecal consiste en la administración, por sonda nasogástrica o por enema, de microorganismos intestinales de las heces de un individuo sano en el tracto gastrointestinal de una persona con infección recurrente por *C. difficile* (Rupnik *et al.*, 2009).

Por su parte, el tratamiento con microorganismos probióticos busca estabilizar la microbiota intestinal alterada por los efectos de los antibióticos y mantener la resistencia a la colonización mediante la prevención del asentamiento de *C. difficile* o la unión de sus toxinas. La mayoría de los estos microorganismos pertenecen a los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Saccharomyces* y *Streptococcus* y han demostrado ser útiles en la prevención y el tratamiento de la diarrea asociada a antibióticos y ocasionada por *C. difficile* (Plummer *et al.*, 2004).

## 6.2. OBJETIVOS

En este capítulo se plantearon los siguientes objetivos:

1°. Evaluar la capacidad de *Lactobacillus plantarum* C4 para inactivar las toxinas de un aislado clínico de *Clostridium difficile*.

2°. Determinar la actividad antimicrobiana de la cepa C4 en cocultivos con *C. difficile* toxigénico.

## 6.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.3.1. Instrumentación y equipos

- Frascos Falcon de 75 cm<sup>3</sup> para cultivo celular.
- Frascos *shell vial*
- Microscopio óptico invertido (Olympus, Japón).
- Sobres y jarra para incubación en anaerobiosis (Anaerogen, Oxoid)
- Membranas filtrantes de 0,22 µm (Millex® - GS, Merck Millipore Ltd., Irlanda)
- Vortex, YellowLine TTS 2 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Alemania).
- Incubador a 37°C y a 4°C (Mettler, Alemania).
- Campana de flujo laminar (Telstar S.A., España).
- Micropipetas de 10-50 µl, 50-200 µl y 100-1000 µl (Boeco, Alemania).
- Centrífuga para tubos de 15 mL (Mettler, Alemania).
- Microscopio óptico invertido (Casa Álvarez S.A., España).
- Espectrómetro de masas Maldi tof (Maldi Biotyper, Bruker).

### 6.3.2. Medios de cultivo, reactivos y soluciones

- Agar y caldo Lactobacilli (Difco™, Becton, Dickinson and Company, Estados Unidos).
- Agar cromogénico *Clostridium difficile* CDIFF (Biomérieux, Francia).
- Agar LPSM: *L. plantarum* Selective Medium (Bujalance *et al.*, 2006).

- Placas de agar sangre (Difco™, Becton, Dickinson and Company, Estados Unidos).
- Caldo Tioglicolato con vitamina K y hemina (Becton, Dickinson and Company, Estados Unidos)
- Medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos).
- Suero bovino fetal (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos).
- L-glutamina (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos).
- Solución tripsina-EDTA 0,25% (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos).
- Solución de antibiótico y antimicótico (vancomicina 50 mg/l, gentamicina 40 mg/l y anfotericina B 0,25 mg/l) (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos).
- Toxina B de *Clostridium difficile* (Sigma S.M.L., Estados Unidos).
- Soluciones de NaOH 1N y HCL 1N estériles.
- Colorante azul de metileno (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos).
- Azul Tripán (Sigma-Aldrich Co., Estados Unidos).

### 6.3.3. Aislado clínico de *C. difficile* toxigénico

Se seleccionó un aislado clínico de *C. difficile* productor de toxinas y otro aislado no productor de toxinas, como control negativo, ambos procedentes del Hospital Universitario Virgen de las Nieves de Granada. El aislamiento se hizo a partir de muestras fecales (heces diarreicas) con petición de toxina de *C. difficile*. Cada aislado fue recuperado sembrándolo en medio cromogénico *Clostridium difficile* (CDIFF) (Biomerieux) e incubándolo a 37°C durante 48 horas en atmósfera anaeróbica (Anaerogen, Oxoid). Tras la incubación, se seleccionó una colonia negra característica de cada muestra y se subcultivó en agar sangre en las mismas condiciones. Los aislados obtenidos en cultivo puro fueron identificados mediante espectroscopia de masa Maldi-tof.

El algoritmo diagnóstico (Figura 6.2) utilizado actualmente en el Servicio de Microbiología para la detección de toxina de *C. difficile* emplea dos pasos en su realización, siguiendo las recomendaciones de la Sociedad Española de Microbiología Clínica (SEIMC) en su Procedimiento en Microbiología Clínica Nº 53 (Alcalá *et al.*, 2015). Inicialmente se emplea un inmunoensayo cualitativo que detecta la presencia de *C. difficile* en heces basado en una inmunocromatografía capaz de detectar el antígeno glutamato deshidrogenasa GDH (H&R® *C. difficile* GDH, Vegal Farmacéutica, España). Posteriormente, las heces positivas para GDH se someten a otra inmunocromatografía que

detecta la presencia de las toxinas A y B en heces frescas (Uni-Gold™ *C. difficile* Toxin A/B, Trinity Biotech, Irlanda), que permite la diferenciación de muestras que contienen *C. difficile* toxigénico y no toxigénico. Las muestras fecales negativas para toxina se confirman a través de una amplificación isotérmica de ácidos nucleicos que detecta la presencia de *C. difficile* toxigénico a través de la amplificación del gen de la toxina B (tcdB) (Orion GenRead® *C. difficile*, Orion Diagnostica Oly, Finlandia). Este método (SIBA® Strand Invasion Based Amplification) se basa en la inserción, dependiente de la recombinasa, de un oligonucleótido de invasión monocatenario en una región complementaria del ADN diana dúplex, que produce como resultado su disociación. Este evento de disociación genera ADN de cadena sencilla, que a su vez permite que los cebadores específicos se unan y extiendan la secuencia diana mediante la acción de una ADN polimerasa (Hoser *et al.*, 2014). Adicionalmente, la presencia de toxinas en las heces se confirma a través de un ensayo de citotoxicidad *in vitro* con células MRC-5, una línea celular diploide no continua procedente de fibroblastos de pulmón de embrión humano, según el procedimiento establecido por el Servicio de Microbiología del Hospital y que se describe en el apartado 6.3.7.

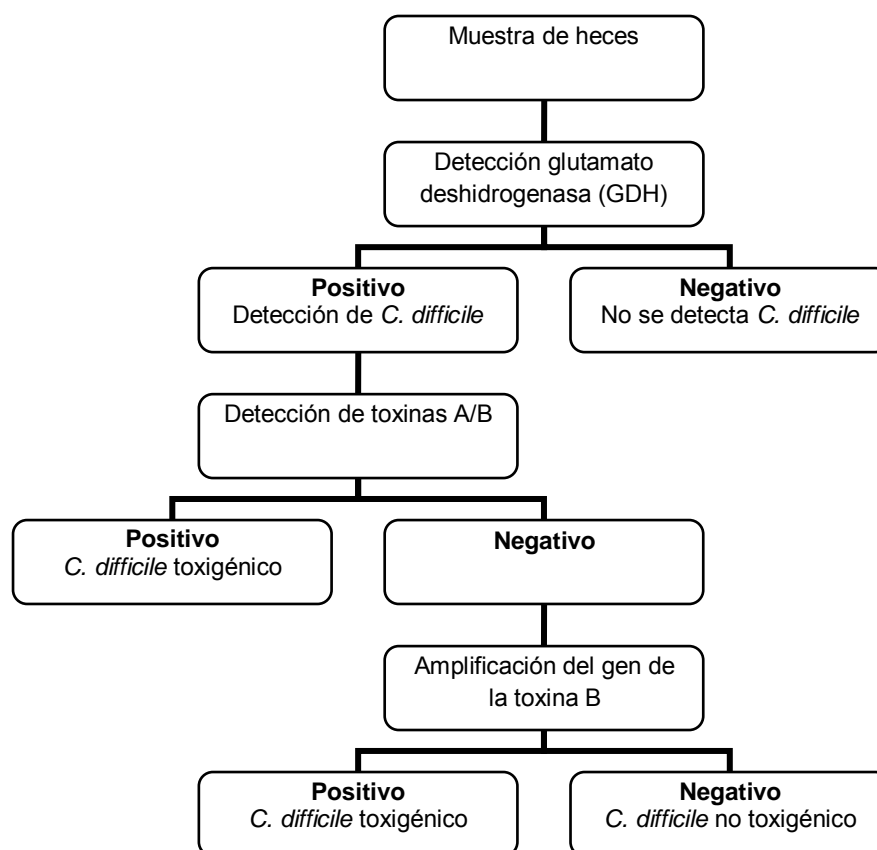


Figura 6.2. Algoritmo diagnóstico para la detección de toxina B de *C. difficile* del Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves de Granada.



#### **6.3.4. Obtención de sobrenadantes de *C. difficile***

Los aislados de *C. difficile* (toxigénico y no toxigénico) se cultivaron en caldo tioglicolato a 37°C durante 48 horas. Tras la incubación, se centrifugaron a 4000 g durante 15 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se filtraron por membrana de 0,22 µm y se conservaron a 4°C hasta su uso.

#### **6.3.5. Obtención de sobrenadantes de C4**

Los sobrenadantes de C4 fueron obtenidos a partir de un cultivo de 48 horas de incubación a 37°C en caldo MRS en condiciones anaeróbicas. Tras la incubación, se realizaron recuentos en agar MRS según la metodología descrita en el apartado 5.3.6 y seguidamente se centrifugó a 4000 X g durante 10 minutos. El sobrenadante obtenido fue filtrado y dividido en dos partes iguales, una parte fue ajustada a pH 7,50 con NaOH 1N y la otra mitad se dejó sin ajustar (pH 3,75). Ambos sobrenadantes se filtraron nuevamente por membrana 0,22 µm y se conservaron a 4°C hasta su uso.

#### **6.3.6. Tratamiento del sobrenadante toxigénico de *C. difficile* con C4**

Inicialmente, se incubó el sobrenadante toxigénico de *C. difficile* con los sobrenadantes de C4 (pH 3,75 y pH 7,50). Para ello, se mezclaron volúmenes iguales y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. De igual forma, se incubó el sobrenadante no toxigénico con los sobrenadantes de C4. Tras la incubación, las mezclas se ajustaron a pH 7,5 con NaOH 1N, se filtraron con membrana de 0,22 µm y se evaluó el efecto citopático sobre monocapas de células Vero siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 6.3.7. Como control, se examinó el efecto citopático de los sobrenadantes de *C. difficile* (toxigénico y no toxigénico) sin incubar con los sobrenadantes de C4; de los sobrenadantes de C4 (pH 3,75 y pH 7,50); del caldo tioglicolato y del caldo MRS. En estos controles, tanto los sobrenadantes de *C. difficile* como de C4 fueron diluidos a la mitad con medio de cultivo para reproducir las mismas condiciones de los sobrenadantes tratados. El sobrenadante de C4 a pH 3,75 fue ajustado previamente a pH 7,50 antes de inocular las células.

### 6.3.7. Determinación de la citotoxicidad

La citotoxicidad de los sobrenadantes tratados y sin tratar de *C. difficile* fue evaluada de acuerdo con el protocolo de determinación de citotoxicidad del Servicio de Microbiología del Hospital Virgen de las Nieves, si bien en lugar de utilizar células MRC-5 se emplearon células Vero, una línea celular heteroploide continua proveniente de células de riñón de mono verde Africano. Esta línea celular también es sensible a la toxina B de *C. difficile* (Carter *et al.*, 2010) y a la toxina binaria (Perelle *et al.*, 1997).

#### 6.3.7.1. Mantenimiento del cultivo celular

Para su mantenimiento, crecimiento y proliferación, las células se cultivaron en frascos Falcon de poliestireno de 75 cm<sup>3</sup> de superficie conteniendo medio de cultivo MEM (*Minimum Essential Medium Eagle*) con tampón HEPES y suplementado según la Tabla 6.3.

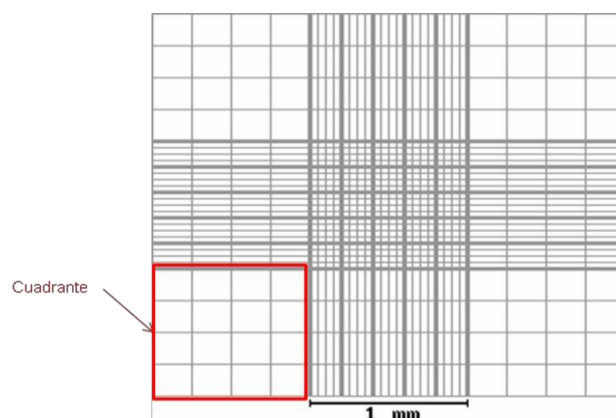
**Tabla 6.3. Suplemento del medio MEM**

| Componentes                     | Concentración |
|---------------------------------|---------------|
| Mezcla antibiótica-antimicótica | 1%            |
| Suero bovino fetal              | 10%           |
| L-glutamina                     | 0,3 g/l       |

Las células fueron incubadas en este medio a 37°C. El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días hasta que las células alcanzaron una confluencia aproximada del 70%. A partir de este momento, se procedió al proceso de tripsinización con la finalidad de despegar y separar las células del frasco para su recuento y/o siembra en frascos con medio de cultivo nuevo. Para ello, se desechó el medio de cultivo y las células fueron lavadas tres veces con 5 ml de solución de Tripsina-EDTA en cada lavado. Se descartó toda la tripsina y se incubó, tras añadir 5 ml de la solución de tripsina, a 37°C durante 5 minutos o hasta observar el desprendimiento de la monocapa. Seguidamente se adicionó 10 ml de medio de cultivo para detener la tripsinización y con la ayuda de una pipeta se homogenizó completamente la suspensión. Se adicionaron 20 ml de medio de cultivo y se repartieron las células en tres nuevos frascos a razón de 10 ml/frasco los cuales se completaron posteriormente hasta 30 ml con medio de cultivo nuevo, tras ello los frascos fueron incubados en las condiciones descritas arriba para su crecimiento y proliferación.

### 6.3.7.2. Recuento celular

Para conocer el número de células presentes en las suspensiones homogenizadas, se utilizó el método de tinción con colorante azul de tripán y recuento en cámara de Neubauer. Se prepararon diluciones 1:2 y 1:10 en solución de azul de tripán (1:10) y se depositaron en cámaras de Neubauer (Figura 6.3) para realizar el recuento en los cuatro cuadrantes de la cámara.



**Figura 6.3. Esquema de un cuadrante en la cámara de Neubauer.**

El área de un cuadrante es  $1 \text{ mm}^2$  y la altura entre la cámara y el cubreobjetos es  $0,1 \text{ mm}$ , de manera que se contó el número de células en un volumen de  $0,1 \text{ mm}^3$ . Para determinar la densidad celular ( $n^\circ$  de células/ml) se contaron las células en los cuadrantes y se calculó el contenido medio de células por cuadrante, éste se multiplicó por 10.000 y por el factor de dilución (2 ó 10) y se calculó el volumen de medio de cultivo a adicionar al frasco para obtener una suspensión de 150.000 células/ml. Las células no viables son capaces de captar el colorante azul tripán, mientras que las células vivas no se tiñen, debido a que mantienen la integridad de su membrana. Este método nos permitió preparar y ajustar suspensiones celulares a la densidad requerida para cada ensayo y nos mostró que la viabilidad de las suspensiones celulares utilizadas nunca fue inferior al 85%.

### 6.3.8. Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Para los ensayos de citotoxicidad *in vitro*, la suspensión celular fue ajustada utilizando medio MEM (SBF 1%) que permitiera el mantenimiento pero no la proliferación en exceso de las células y se distribuyó 1 ml en viales (shell vial).

Un “shell vial” es un frasco cilíndrico de poliestireno que lleva en el fondo un cubreobjeto de vidrio estéril que cubre toda la base y es donde se adhieren las células en monocapa. Los viales se incubaron a 37°C durante 24 horas. Transcurrida la incubación, se comprobó la integridad de las monocapas sobre el cubreobjeto de vidrio, se renovó el medio de cultivo y se inoculó con 200 µl de los sobrenadantes de *C. difficile* tratados y sin tratar con sobrenadantes de C4.

Las células se incubaron nuevamente a 37°C durante 24 horas y se tiñeron con azul de metileno durante 2 minutos para lo cual se fijaron previamente con metanol durante 2 minutos. Se examinaron las monocapas en microscopio invertido (4X y 10X) para determinar el efecto citopático, caracterizado por la presencia de células redondas y refringentes en más del 50% de la monocapa así como pérdida de la integridad de la misma.

Como control negativo, se emplearon monocapas con medio nuevo sin inocular. Todos los ensayos y sus controles se realizaron por triplicado.

#### **6.3.9. Cocultivo de *L. plantarum* C4 y *C. difficile***

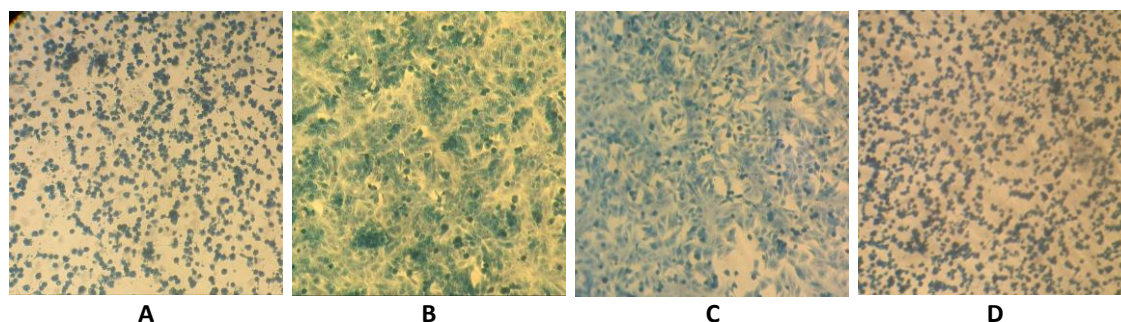
Con la finalidad de conocer si C4 ejerce un efecto antagónico sobre el crecimiento de *C. difficile*, se prepararon cocultivos en caldo tioglicolato a partir de suspensiones estandarizadas de ambos microorganismos. Para ello, se añadió 100 µl de cada suspensión sobre 10 ml de caldo y se incubó a 37°C durante 48 horas. Posteriormente se realizaron recuentos en agar LPSM en aerobiosis y agar CDIFF en anaerobiosis para C4 y *C. difficile*, respectivamente. Es importante resaltar que previamente, se comprobó que en estos medios y bajo dichas condiciones se podía recuperar C4 en LPSM sin interferencia de *C. difficile* y viceversa, recuperar *C. difficile* en CDIFF sin interferencia de C4. Como control, se evaluó el crecimiento de los cultivos puros y se compararon con los recuentos obtenidos en los cocultivos.

## 6.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.4.1. Neutralización del sobrenadante toxigénico de *C. difficile*

La Figura 6.4 muestra los resultados obtenidos tras la incubación del sobrenadante toxigénico de *C. difficile* con los sobrenadantes de C4 y sus controles. Se comprobó el efecto citotóxico del sobrenadante toxigénico de *C. difficile* sobre las células (A) y la ausencia de efecto del sobrenadante no toxigénico (B); además se puso de manifiesto que ni los sobrenadantes de C4 ni los medios de cultivos producen efecto citotóxico sobre las células *per se* (imágenes no mostradas).

Por su parte, el sobrenadante toxigénico de *C. difficile* incubado con el sobrenadante de C4 a pH 3,75 no mostró efecto citotóxico sobre las células (C). Sin embargo, observamos efecto citotóxico cuando se incubó con el sobrenadante de C4 ajustado a pH 7,5 (D).



**Figura 6.4. Monocapas de células Vero incubadas con sobrenadantes de *C. difficile* y sobrenadantes de C4 teñidas con azul de metileno** (Ver el texto para los tratamientos correspondientes a las letras).

Esta actividad anticitotóxica coincide con la encontrada por Auclair *et al.* (2015), en un diseño experimental muy parecido al nuestro. Los sobrenadantes de varias especie de lactobacilos, entre ellas *L. acidophilus* CL1285, *L. casei* LBC80R y *L. rhamnosus* CLR2, protegieron a los enterocitos (células Caco) de los efectos citotóxicos de los sobrenadantes de *C. difficile* cuando fueron previamente tratados con sobrenadantes de las cepas de lactobacilos. Sin embargo no todas las cepas de lactobacilos evaluadas mostraron este efecto protector, confirmando que este efecto es específico de cepas.

Para conocer si el pH está relacionado con la neutralización de las toxinas de *C. difficile*, se realizaron varios experimentos. Se incubaron 2 ml de sobrenadante toxigénico de *C. difficile* con: a) 2 ml de caldo MRS cuyo pH había sido ajustado entre 3,6 y 3,7 con 200 µl de ácido láctico concentrado (98%); b) con 2 ml de caldo tioglicolato ajustado a pH entre los mismos márgenes citados, con 1000 µl de HCl 1N; y c) con 2 ml de caldo tioglicolato ajustado a pH 7,1 con 100 µl de NaOH 1N. Las incubaciones se realizaron durante 2 horas a 37°C y finalmente se ajustó nuevamente el pH a  $7,1 \pm 0,05$  para inocularlo sobre monocapas de células Vero y evaluar su citotoxicidad. Se detectó efecto citopático solo en el sobrenadante de *C. difficile* incubado con caldo MRS a pH 7,5. Por tanto, el pH ácido es el responsable de la inactivación de la toxicidad de los sobrenadantes, y la naturaleza del ácido no es un factor determinante. Otros autores han descrito la producción, por ciertas cepas de lactobacilos, de componentes bioactivos capaces de neutralizar la toxicidad de sobrenadantes de *C. difficile* (Banerjee *et al.*, 2009); y Auclair *et al.* (2015) encontraron que ciertas cepas de lactobacilos son capaces de inhibir la toxicidad de los sobrenadantes de cultivos de *C. difficile* mediante la producción de ácidos orgánicos, y que en concreto el ácido láctico a  $\text{pH} < 4,2$  elimina la actividad citotóxica. Aunque en el citado trabajo no se establece con claridad si la naturaleza del ácido juega algún papel, lo cierto es que la neutralización de los sobrenadantes ácidos de los cultivos de lactobacilos abolió la actividad antitóxica de los mismos (Auclair *et al.*, 2015), lo que resalta el papel del pH, pero no concuerda con nuestros resultados, ya que una vez incubados los sobrenadantes de *C. difficile* a pH ácido, la posterior neutralización no restauró la toxicidad. Cabe resaltar que en nuestro estudio la inactivación por pH ácido, además de ser irreversible, afectó a todas las posibles toxinas presentes en los sobrenadantes de *C. difficile* (las toxinas A, B y binaria son todas ellas capaces de causar citotoxicidad en células Vero).

#### **6.4.2. Inhibición del crecimiento de *C. difficile* en cocultivo con *L. plantarum* C4**

Se evaluó el efecto antagónico de la cepa C4 frente a *C. difficile* en caldo tioglicolato y en condiciones anaeróbicas. Tras 48 horas de incubación se realizaron los recuentos de bacterias viables y las medidas de pH, que se muestran en la Tabla 6.4.

**Tabla 6.4. Antibiosis de *L. plantarum* C4 sobre *C. difficile* en medio líquido**

| Bacteria                          | Recuentos (y pH) en el tiempo que se indica |                          |                        |
|-----------------------------------|---|--------------------------|------------------------|
|                                   | 0 h   | 48 h                     |                        |
|                                   |   | Cultivo individual       | Cocultivo              |
| Ensayo 1                          |   |                          |                        |
| <i>C. difficile</i> toxigénico    | $1,3 \times 10^2$                           | $1,3 \times 10^7$ (5,33) | $< 10^2$ (4,08)        |
| <i>C. difficile</i> no toxigénico | $9 \times 10^2$                             | $2,8 \times 10^6$ (5,30) | $< 10^2$ (4,09)        |
| Ensayo 2                          |   |                          |                        |
| <i>C. difficile</i> toxigénico    | $2,1 \times 10^3$                           | $1,3 \times 10^7$ (5,31) | $5 \times 10^3$ (4,13) |
| <i>C. difficile</i> no toxigénico | $3,5 \times 10^3$                           | $1,5 \times 10^6$ (5,35) | $3 \times 10^3$ (4,35) |

Los recuentos se expresan como UFC por ml; los valores de C4 en el ensayo 1 fueron  $3,6 \times 10^4$  (inicial),  $4,9 \times 10^7$  (48 h individual),  $6,6 \times 10^7$  (48 h cocultivo con la cepa toxigénica) y  $4,8 \times 10^7$  (48 h cocultivo con la cepa no toxigénica); y en el ensayo 2 fueron  $6,5 \times 10^4$  (inicial),  $1,0 \times 10^8$  (48 h individual),  $1,5 \times 10^8$  (48 h cocultivo con la cepa toxigénica) y  $1,4 \times 10^8$  (48 h cocultivo con la cepa no toxigénica).

Se observa que C4 ejerció un marcado efecto inhibitor del crecimiento de *C. difficile*, tanto sobre la cepa toxigénica como sobre la no toxigénica. La inhibición fue más efectiva cuando las concentraciones iniciales de los clostridios fueron bajas ( $< 10^3$ ), en cuyo caso la recuperación de viables tras 48 h de incubación fue menor incluso que el nivel inicial. Naaber *et al.* (2004) han encontrado que cepas de diversas especies de lactobacilos (incluyendo *L. plantarum*) ejercen antibiosis sobre *C. difficile*, y que este efecto está mediado por la producción de  $H_2O_2$  y de ácido láctico. Nuestras medidas de pH sugieren que la antibiosis por C4 pueda estar mediada por la acidificación del medio, que en tal caso tendría un doble efecto: neutralizar la toxicidad e impedir la proliferación de *C. difficile*; pero se precisan investigaciones adicionales para contrastar esta hipótesis.

Los probióticos pueden ejercer protección frente a las patologías causadas por *C. difficile* a través de tres mecanismos: neutralización o inactivación de la toxina, represión de la formación de la toxina e inhibición del crecimiento de la bacteria toxigénica (Valdés-Varela *et al.*, 2016). El presente estudio demuestra

que la cepa C4 es capaz de promover la inactivación de la actividad tóxica presente en sobrenadantes de *C. difficile* y de inhibir el crecimiento de esta bacteria, sin que se haya examinado el mecanismo restante (represión de los genes responsables de la producción de toxinas); y sienta las bases para futuros estudios encaminados a investigar si estos efectos inhibidores son efectivos en las condiciones del hábitat intestinal.

## 6.5. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este capítulo sugieren las siguientes conclusiones:

- 1<sup>a</sup>. La producción de ácidos por *Lactobacillus plantarum* C4 inactiva la toxicidad de los sobrenadantes de *Clostridium difficile* toxigénico, siendo el factor determinante de esta inactivación el pH y no la naturaleza de los ácidos.
- 2<sup>a</sup>. La cepa C4 de *Lactobacillus plantarum* ejerce antibiosis in vitro sobre *Clostridium difficile*, sin que la presencia o ausencia de los genes responsables de la toxigenicidad influya en este efecto.



**7. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMUTAGÉNICA**  
**DE *Lactobacillus plantarum* C4**

## 7.1. INTRODUCCIÓN

El cáncer de colon es la segunda causa de muerte por cáncer en los países desarrollados. Representa casi el 10% de todos los cánceres. Su frecuencia relativa se ha ido incrementando en los últimos años. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), para el año 2015 el cáncer colorrectal se ubicó en la posición 18 entre las 20 principales causas de muerte a nivel mundial. Sin embargo, en el año 2000 no aparecía en dicha lista. En Europa y para ambos sexos en su conjunto, ocupa la tercera posición después de la próstata y el de mama, mientras que en España se ubica en primera posición (Galceran *et al.*, 2017).

Según los datos publicados por la Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN) en el informe anual del año 2017 de la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), el número total de nuevos casos de cáncer en España en 2015 fue de 247.771 (148.827 en varones y 98.944 en mujeres) siendo el cáncer colorrectal el tipo de cáncer más frecuentemente diagnosticado (41.441 casos). Comparando con otros países en Europa, la incidencia de éste cáncer en España ocupa una posición intermedia y es ligeramente más frecuente en hombres tanto en el mundo, como en Europa y en España (Ferlay *et al.*, 2013).

El desarrollo del cáncer de colon es un proceso de múltiples etapas que se produce por la acumulación de mutaciones en ciertos protooncogenes y genes supresores de tumores (Wollowski *et al.*, 2001). El daño en el ADN es un componente esencial para su génesis. Se sabe que los productos microbianos del intestino y los componentes de los alimentos son los principales responsables del daño que inicia la progresión de la enfermedad (Gratz *et al.*, 2011).

Las microbiota intestinal puede producir, a partir de componentes de la dieta, sustancias con actividad genotóxica, carcinogénica y promotora de tumores (Burns y Rowland, 2004). Esto lo hacen produciendo directamente metabolitos genotóxicos o indirectamente, por activación metabólica de precarcinógenos ingeridos e inducción de reacciones inflamatorias en las que se producen radicales oxidantes genotóxicos. Entre las especies de las que se sospecha que pueden jugar un papel en la carcinogénesis colorrectal figuran *Streptococcus bovis*, *Helicobacter pylori*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *Clostridium septicum*, *Fusobacterium spp.* y *Escherichia coli* (Gagnière *et al.*, 2016). A modo de ejemplo, se encontró que *B. fragilis* alcanzó niveles mayores en el colon de pacientes con cáncer colorrectal al compararlos con

sujetos sanos. Existen varios mecanismos posibles por los cuales *B. fragilis* puede contribuir a la carcinogénesis del colon, entre ellos la acción combinada de la enterotoxina producida por la bacteria y la reacción inflamatoria a través de la vía dependiente de células T “*helper*” 17 (T<sub>H</sub> 17) desencadenada por dicha toxina (Thiele *et al.*, 2017). Además, *B. fragilis* está implicado con la generación de aminas heterocíclicas, mutágenos generados durante la cocción de la carne a altas temperaturas (Culpepper y Mai 2013). Por ello, durante los últimos años ha habido un gran interés en los agentes dietéticos que pueden modificar la microbiota intestinal y que por lo tanto podrían modular el riesgo de cáncer.

Por su parte, los factores nutricionales exógenos modulan el contenido fecal, lo que conduce a una mayor o menor carga de factores tóxicos y cancerígenos (Oßwald *et al.*, 2000). Se ha relacionado con el cáncer de colon, el consumo de carnes rojas entre ellas los embutidos, así como alimentos ricos en proteínas quemadas (Nader *et al.*, 1981; Gill y Rowland, 2002) mientras que las dietas ricas en vegetales, frutas y fibra dietética confieren un efecto protector reduciendo su riesgo (AICR/WCRF Informe del Fondo Mundial para la Investigación del Cáncer/Instituto Americano para la Investigación del Cáncer, 2007; Huxley *et al.*, 2013).

Se han identificado 5 grandes grupos de carcinógenos en la dieta y en las heces entre los que se incluyen: hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAH), aminas heterocíclicas (HCA), compuestos N-nitrosos (NOC), fecapentaenos y esteroides fecales: ácidos biliares, esteroides neutros y ácidos grasos de cadena larga (Gratz *et al.*, 2011). Tanto las HCA como los PAH y los nitritos y los nitratos, son mutágenos conocidos relacionados con la carne roja (Miller *et al.*, 2013).

El agua fecal o papilla fecal es la fracción soluble en agua obtenida como sobrenadante tras la centrifugación a alta velocidad de las heces totales y refleja el contenido luminal tanto de factores de riesgo como de factores protectores de enfermedades gastrointestinales y cáncer de colon (DeKoky van Maanen, 2000). La citotoxicidad y/o genotoxicidad de las papillas fecales es un biomarcador útil en el estudio del impacto de los factores ambientales sobre la exposición del intestino a los carcinógenos y la modificación de esta exposición por los hábitos alimentarios (Mai *et al.*, 2009). Se ha demostrado que la genotoxicidad de las papillas fecales está relacionada con la carcinogénesis del colon en animales (Klinder *et al.*, 2004). En estudios con humanos, se ha encontrado mayor genotoxicidad en las papillas fecales tras una dieta rica en carne en comparación con una dieta enriquecida en fibra (Rieger *et al.*, 1999). Además, se ha encontrado relación entre los hábitos alimenticios donde se incluye el aumento en la ingesta de HCA con el cáncer de colon debido a las modificaciones en la composición de la microbiota intestinal (Mai *et al.*, 2009).

Diversas especies de bacterias ácido-lácticas pueden inhibir la genotoxicidad de carcinógenos alimentarios. La suplementación con bacterias probióticas ejerce efectos protectores contra un amplio rango de eventos tales como: inducción del daño al ADN en la mucosa del colon de ratas, incidencia de tumores en modelos animales y alteración de las actividades enzimáticas bacterianas reduciendo así los niveles de enzimas involucradas en la formación de carcinógenos (Burns y Rowland, 2004). La ingesta oral de yogures suplementados con bacterias probióticas disminuyó significativamente la genotoxicidad de aguas fecales en comparación con la ingesta de yogur sin suplementación (Oberreuther-Moschner *et al.*, 2004).

La genotoxicidad de las papillas fecales puede ser evaluada por diversas técnicas. Los ensayos de mutación bacteriana se usan ampliamente para detectar agentes que dañan el ADN (genotoxinas) y entre ellos se encuentra la prueba de Ames o prueba de mutación reversa (Ames *et al.*, 1975). Esta prueba emplea una o varias cepas de *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* (en adelante, *S. typhimurium*) construidas por ingeniería genética, capaces de detectar compuestos que causan mutaciones génicas por dislocamiento del cuadro de lectura (*frame shift*) o por sustitución de pares de bases del ADN. Estas cepas poseen mutaciones en el operón que codifica para la biosíntesis del aminoácido histidina, que las hacen incapaces para sintetizar dicho aminoácido (His<sup>-</sup>). Esas mutaciones actúan como puntos calientes para mutágenos que causan daño al ADN por diferentes mecanismos. Cuando estas bacterias auxotróficas se siembran en un medio mínimo con trazas del aminoácido histidina, sólo crecerán aquellas bacterias que reviertan a la prototrofia (His<sup>+</sup>) o revertantes espontáneas. La pequeña cantidad de histidina permite que las bacterias sufran algunas divisiones celulares; en muchos casos, este crecimiento es esencial para que ocurra la mutagénesis. Sin embargo, en presencia de una sustancia capaz de inducir mutaciones, el número de revertantes se incrementa, por lo general, en relación con la dosis. Las nuevas mutaciones en el sitio de las mutaciones preexistentes, o cercanas en los genes, pueden restaurar la función del gen y permitir que las células sinteticen histidina y por lo tanto, serán capaces de crecer en ausencia de este aminoácido (Mortelmans y Zeiger, 2000; Gatehouse, 2012).

Ames *et al.* (1975) observaron que muchos carcinógenos o sus metabolitos son grandes moléculas frecuentemente incapaces de atravesar la pared celular de la bacteria. El lipopolisacárido de la pared de las cepas salvajes actuaba como barrera frente a moléculas hidrofóbicas voluminosas. Por consiguiente, introdujeron la mutación *rfa* dentro de las cepas lo que llevó a la formación de un polisacárido defectuoso con incremento en su permeabilidad. Esto hizo a las bacterias más sensibles a la mutación por agentes químicos (Gatehouse, 2012). Además de la mutación *rfa*, las cepas poseen el plásmido pKM101 que

aumenta la mutagénesis química y la inducida por luz ultravioleta (UV) a través de un incremento en el sistema de reparación de ADN propenso a errores. El plásmido confiere, además, resistencia a ampicilina, un marcador conveniente para detectar la presencia del plásmido (Mortelmans y Zeiger, 2000). Entre las cepas más comúnmente utilizadas se encuentran las cepas TA98 y TA100. Sus características genotípicas se describen en la Tabla 7.1.

**Tabla 7.1. Características genotípicas de las cepas TA98 y TA100.**

| <i>S. typhimurium</i> | Mutación histidina | Genotipo completo                                | Reversión  |
|-----------------------|--------------------|--|--|
| TA98                  | hisD3052           | <i>rfa</i> Dgal chlD bio <i>uvrB</i><br>(pKM101) | Sustitución de pares de bases.                             |
| TA100                 | hisG46             | <i>rfa</i> Dgal chlD bio <i>uvrB</i><br>(pKM101) | Dislocamiento del cuadro de lectura ( <i>frameshift</i> ). |

El test de mutagenicidad de Ames fue diseñado específicamente para detectar mutagénesis inducida químicamente. A lo largo de los años, su valor como tal ha sido reconocido por la comunidad científica y por agencias gubernamentales y corporaciones. La prueba se utiliza en todo el mundo como un ensayo inicial para determinar el potencial mutagénico de nuevos productos químicos y fármacos. También se han desarrollado directrices internacionales, por ejemplo, la Organización Internacional para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE) y la Comisión Internacional de Armonización (ICH), para que las empresas y los laboratorios de pruebas puedan garantizar la uniformidad de los procedimientos de prueba antes de la presentación de datos a las agencias reguladoras. La guía de la OCDE establece las pruebas para la evaluación de productos químicos y es uno de los ensayos *in vitro* recomendados para la evaluación reguladora de genotoxinas en productos farmacéuticos, químicos, pesticidas y cosméticos.

La prueba de Ames puede llevarse a cabo a través del método tradicional de incorporación en placa o a través de un método modificado que utiliza placas de 96 pocillos denominado "Método de Fluctuación". En el método tradicional, las bacterias auxotrofas son tratadas con el material de ensayo (muestra a evaluar) en un intervalo de dosis inmediatamente por debajo de la concentración que muestra una toxicidad significativa a las bacterias y luego se siembran en una placa con agar deficiente en histidina. Las cepas de *Salmonella* original/mutada (dependiente de la histidina) no pueden formar

colonias visibles bajo tales condiciones de crecimiento, a menos que experimenten una segunda mutación y vuelvan a ser independientes de la histidina. Después del tratamiento del material de ensayo, el número de colonias reversibles por placa de agar podría utilizarse como un indicador de la potencia mutagénica del material de ensayo. Por otra parte, en el método de fluctuación, cada pocillo de la placa es considerado una colonia. Si la colonia revierte a la prototrofia significa que se ha producido una mutación inversa, por lo tanto, las bacterias de la colonia tendrán la capacidad de sintetizar histidina y seguirán creciendo. Este fenómeno es evidenciado por un cambio de color al cambiar el pH del medio en presencia del indicador. Al igual que el método tradicional, esta técnica compara los resultados con la tasa de reversión espontánea o *background* dentro del ensayo (Mortelmans y Zeiger, 2000).

El interés de mantener poblaciones intestinales de bacterias capaces de limitar la presencia de carcinógenos en la luz intestinal nos ha llevado a estudiar esta actividad en la cepa de *L. plantarum* objeto de nuestro trabajo.

## 7.2. OBJETIVOS

Evaluar la capacidad de *L. plantarum* C4 para reducir la actividad mutagénica de papillas fecales y agentes mutagénicos.

## 7.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.3.1. Instrumentación y equipos

- Placas estériles de 96 pocillos, tubos de 50 ml y bolsas de plástico zip-lock (incluidos en el kit Muta-ChromoPlate™)
- Sobres y jarra para incubación en anaerobiosis (Anaerogen, Oxoid)
- Membranas filtrantes 0,45 µm y 0,22 µm (Millex® - GS, Merck Millipore Ltd., Irlanda)
- Vortex, YellowLine TTS 2 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Alemania).
- Incubador 37°C (Mettler, Alemania)
- Campana de flujo laminar (Telstar S.A., España).
- Micropipeta multicanal de 8 canales *Multimate* (High TechLab, Polonia).
- Micropipetas de 10-50 µl, 50-200 µl y 100-1000 µl (Boeco, Alemania).
- Microcentrifuga Mikro 120 (Hettich, Alemania).
- Centrifuga para placa de 96 pocillos (Mettler, Alemania).

### 7.3.2. Reactivos, disoluciones y medios de cultivo

- Agar Lactobacilli (MRS), Difco™, Becton, Dickinson and Company (Sparks, Estados Unidos).
- Tabletas para preparar Buffer Fosfato Salino (PBS), Sigma Chemical Co. (St. Louis, Estados Unidos), Sigma-Aldrich Chemie (Steinheim, Alemania).
- Kit de detección de Mutagenicidad Muta-ChromoPlate™. Environmental Bio-Detection Products Inc (EBPI). Ontario-Canadá. El kit se compone de los siguientes reactivos, cepas y sustancias mutagénicas (Tabla 7.2).

**Tabla 7.2. Componentes del kit Muta-ChromoPlate™.**

|  |   |
|--|---|
| Reactivos                                    | A: Sales de Davis-Mingiolis                     |
|  | B: D-glucosa                                    |
|  | C: Púrpura de bromocresol                       |
|  | D: D-biotina                                    |
|  | E: L-Histidina                                  |
|  | F: Agua destilada                               |
|  | G: Medio de crecimiento                         |
| Cepas bacterianas liofilizadas               | <i>Salmonella typhimurium</i> TA 100            |
|  | <i>Salmonella typhimurium</i> TA 98             |
| Sustancias mutagénicas (controles positivos) | Azida de sodio (NaN <sub>3</sub> ) 0,5 µg/100ml |
|  | 2-Nitrofluoreno (2NF) 30 µg/100ml               |

Las cepas de *Salmonella* utilizadas responden a un agente mutágeno determinado (control positivo). En el caso de la cepa TA98 frente a 2-nitrofluoreno (2NF) y en el caso de la cepa TA100 frente a azida de sodio (NaN<sub>3</sub>).

### 7.3.3. Muestras

Se emplearon muestras fecales provenientes de 3 voluntarios sanos, con edades comprendidas entre 20 y 25 años, sin antecedentes de enfermedad gastrointestinal y que no habían recibido terapia antibiótica ni ingerido productos conteniendo microorganismos probióticos durante los tres últimos meses.

### 7.3.4. Preparación del filtrado fecal

Se preparó por homogenización completa de las muestras fecales en PBS estéril (1:4) durante 10 minutos y se centrifugó a 10.000 g durante 20 minutos. El sobrenadante obtenido se filtró a través de membranas 0,45 µm y 0,22 µm y se conservó a 4°C hasta su uso.



### 7.3.5. Tratamiento del filtrado fecal

El filtrado fecal fue dividido en dos partes iguales, una de las partes fue tratada con *L. plantarum* C4 y la otra mitad se dejó sin tratar. Para este tratamiento, se preparó una suspensión de la cepa C4 en PBS estéril ajustada por turbidez equivalente al 0,5 de la escala de MacFarland a la que posteriormente se le realizó un recuento en agar MRS. El recuento fue realizado según la metodología descrita en el apartado 5.3.6. El número de bacterias viables de *L. plantarum* C4 en la papilla fecal fue de  $1,3 \times 10^8$  bacterias/ml.

Simultáneamente se trataron con C4 dos soluciones mutagénicas: Azida de sodio ( $1,25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) y 2-Nitrofluoreno ( $75 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) en agua estéril. La concentración de las sustancias mutagénicas fue la misma que la establecida en los controles de mutagenicidad del kit. El filtrado fecal tratado, el filtrado fecal sin tratar así como las soluciones mutagénicas tratadas, se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  en condiciones de anaerobiosis durante 48 horas.

Tras la incubación, se realizaron recuentos en agar MRS y seguidamente los tubos se centrifugaron a  $4000 \text{ g}$  durante 10 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se filtraron por membrana  $0,22 \mu\text{m}$  para asegurar la completa eliminación de C4.

### 7.3.6. Ensayo de mutagénesis o reversión de las bacterias auxotrofas

Previo al ensayo, se rehidrataron las bacterias auxotrofas liofilizadas (TA98 y TA100) en medio de crecimiento (G) y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas y, se preparó la “mezcla de reacción” según las instrucciones del kit (Tabla 7.3.)

**Tabla 7.3. Componentes de la mezcla de reacción.**

| <b>Componentes</b>       | <b>Volumen</b> |
|--------------------------|----------------|
| Sales de Davis-Mingioli, | 43,24 ml       |
| D-glucosa                | 9,5 ml         |
| Púrpura de bromocresol   | 4,76 ml        |
| D-biotina                | 2,38 ml        |
| L-histidina              | 0,12 ml        |

Para el ensayo, se dispensó asépticamente 2,5 ml de “mezcla de reacción” sobre 17,5 ml de las papillas fecales tratadas y no tratadas con C4 y los controles (Tabla 7.4.). Los controles fueron los siguientes: controles positivos

de mutagenicidad para TA98 y TA100 (soluciones mutagénicas y mezcla de reacción), controles negativos o controles de mutación espontánea para TA98 y TA100 (agua estéril y mezcla de reacción) y el control de esterilidad del ensayo (agua estéril y mezcla de reacción, sin auxotrofas). Finalmente se adicionó 5  $\mu$ l de las bacterias auxotrofas según la siguiente tabla:

**Tabla 7.4. Filtrados fecales tratados y no tratados con C4 y controles.**

|  | <i>S. typhimurium</i> |
|--|-----------------------|
| Filtrado fecal tratado con C4  | TA98                  |
| Filtrado fecal no tratado  | TA98                  |
| Filtrado fecal tratada con C4  | TA100                 |
| Filtrado fecal no tratado  | TA100                 |
| Solución de 2NF tratada con C4   | TA98                  |
| Solución de NaN <sub>3</sub> tratada con C4                                | TA100                 |
| Control positivo de mutagenicidad de TA98                                  | TA98                  |
| Solución acuosa de 2NF (2-nitrofluoreno) 75 $\mu$ g/ $\mu$ l               |                       |
| Control positivo de mutagenicidad de TA100                                 | TA100                 |
| Solución acuosa de NaN <sub>3</sub> (Azida de sodio) 1,25 $\mu$ g/ $\mu$ l |                       |
| Control de mutagenicidad espontanea de TA98                                | TA98                  |
| Control de mutagenicidad espontanea de TA100                               | TA100                 |
| Control negativo de esterilidad  | Sin auxotrofas        |

Cada una de estas mezclas se distribuyó en placas estériles de 96 pocillos dispensando 200  $\mu$ l por pocillo y se incubaron a 37°C durante 5 días en bolsas ziploc.

### 7.3.7. Ensayo de detección de bacterias prototrofas

La metodología descrita hasta aquí se corresponde con la propuesta por el fabricante del kit Muta-ChromoPlate™ de EBPI. Las interferencias de los filtrados de papillas fecales con la lectura de las placas (ver apartado 7.4.1) obligó a modificar la técnica, introduciendo una centrifugación para eliminar los filtrados. Por ello, tras 5 días de incubación, las placas se centrifugaron a 4000 rpm durante 15 minutos, se descartó el sobrenadante y se hicieron tres lavados con agua estéril (suministrada en el kit) centrifugando bajo las mismas condiciones. Seguidamente se adicionó 200  $\mu$ l a cada pocillo de una nueva

mezcla de reacción y se incubó a 37°C durante 5 días más; en estas condiciones, solo crecerán los mutantes prototrofos. Culminada la incubación, se valoraron como positivos los pocillos que viraron a amarillo y como negativos los pocillos que no viraron (púrpura). Se registró el número de pocillos positivos en cada placa. Se compararon los resultados de las papillas y los controles.

## 7.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.4.1. Primeros ensayos con filtrados fecales y modificación del diseño experimental

Los primeros ensayos se realizaron siguiendo el diseño sugerido por la casa comercial. Sin embargo, los filtrados de papillas fecales, diluidos a 1:4, dificultaron por su color la detección temprana de los virajes. Los virajes aparecieron tardíamente, y en proporciones muy bajas, inferiores incluso a las registradas en los controles de revertientes espontáneos, independientemente de que los filtrados fecales se hubiesen incubado o no con la cepa C4.

Este efecto inhibitorio de la aparición de mutantes es inesperado si se tiene en cuenta que, como se ha indicado en la Introducción de este capítulo, las heces contienen agentes carcinógenos con actividad genotóxica (Gratz *et al.*, 2011), procedentes de la ingesta (Oßwald *et al.*, 2000); y algunas bacterias indígenas de la microbiota intestinal contribuyen a la carcinogénesis, ya sea directamente por producir metabolitos genotóxicos, o por mecanismos indirectos como la activación de precarcinógenos ingeridos o la inducción de inflamación con generación de radicales oxidantes que contribuyen crear un ambiente genotóxico (Gagnière *et al.*, 2016). En consecuencia, los sobrenadantes y filtrados de las papillas fecales exhiben genotoxicidad, que puede evaluarse mediante ensayos de mutagenicidad en bacterias como el test de Ames, o alternativamente usando pruebas en células de mamífero, como el ensayo Comet (de Kok y van Maanen, 2000). Solo se ha mencionado, como complicación técnica de la aplicación del test de Ames a los estudios de mutagenicidad en preparaciones de papillas fecales, la interferencia por la presencia de histidina en las muestras, que podría causar el crecimiento de las cepas auxotrofas de *Salmonella* (Gratz *et al.*, 2011), aunque se ha comunicado que en muestras diluidas 1:10, el contenido en histidina es irrelevante en relación con la posibilidad de falsos positivos (Silverman *et al.*, 1986). Pero, en nuestro caso, la situación es la inversa: los filtrados de heces ralentizaron y disminuyeron la aparición de mutantes espontáneos.

En un intento de explicar la disminución de mutaciones espontáneas en presencia de los filtrados, se evaluó la posibilidad de que en las muestras fecales existiese algún agente inhibidor de las cepas auxotrofas de *Salmonella* (por ejemplo, bacteriófagos). Para ello, se dispusieron tres fracciones de filtrado fecal; de ellas, la primera se incubó con la cepa C4 ( $2,4 \times 10^8$  bacterias/ml) a  $37^\circ\text{C}$  durante 48 horas en anaerobiosis, tras lo cual se esterilizó por filtración; la segunda fracción se filtró y la tercera se esterilizó al autoclave. Seguidamente, las tres fracciones fueron inoculadas con 50  $\mu\text{l}$  de una suspensión densa de la cepa auxotrofa *S. typhimurium* TA98 y se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 horas en aerobiosis. Como control, se inoculó la misma cantidad de la cepa auxotrofa en un volumen similar de agua estéril. Se comprobó mediante recuento en placas de TSA que el crecimiento de las bacterias auxotrofas no se vio afectado en presencia de los filtrados fecales tratados o sin tratar; las técnicas de filtración y autoclavado tampoco influyeron en el crecimiento (Tabla 7.5). Por tanto, la inhibición de mutaciones por los filtrados fecales no parece atribuible a un efecto inhibidor del crecimiento de la cepa de *Salmonella*.

**Tabla 7.5. Crecimiento de *S. typhimurium* en TSA post-incubación en filtrados fecales.**

| <b>Fracciones de filtrados fecales</b>           | <b>Recuento de <i>S. typhimurium</i></b> |
|--|--|
| Filtrado fecal incubado con C4 y luego filtrado. | $1,1 \times 10^8$ ufc/ml.                |
| Filtrado fecal, no incubado con C4.              | $1,6 \times 10^8$ ufc/ml.                |
| Filtrado fecal autoclavado, no incubado con C4.  | $1,0 \times 10^8$ ufc/ml.                |
| Agua estéril.                                    | $2,1 \times 10^8$ ufc/ml.                |

Con el fin de evitar la aparente interferencia de los filtrados fecales en el crecimiento de los mutantes revertientes, se modificó el diseño experimental, adaptando a nuestro diseño la sugerencia de Gratz *et al.* (2011) para evitar la interferencia de la histidina. Tras la incubación de los filtrados con las cepas auxotrofas durante cinco días, los pocillos se lavaron por centrifugación de las placas; las bacterias se resuspendieron en mezcla de reacción nueva y se prosiguió la incubación durante cinco días. La incubación de las bacterias en ausencia de filtrados fecales eliminó la interferencia del color, pero siguieron obteniéndose recuentos de mutantes muy inferiores a los de los controles de reversión espontánea.

No tenemos actualmente una explicación satisfactoria de esta interferencia que nos ha impedido aplicar el test de Ames a la investigación de la posible

actividad antimutagénica de la cepa C4 sobre filtrados fecales. Se ha descrito que varios aminoácidos poseen actividad antimutagénica (Roy *et al.*, 2002), pero no hemos encontrado referencias que adjudiquen efecto antimutagénico significativo a los aminoácidos presentes en las heces. Algunas bacterias intestinales producen catabolitos con actividad antimutagénica, como es el caso de *Bifidobacterium lactis* que reduce la mutagenicidad del contenido intestinal al incrementar los niveles de poliaminas (Matsumoto y Benno, 2004), pero no tenemos evidencias de que en nuestro caso incida un mecanismo semejante.

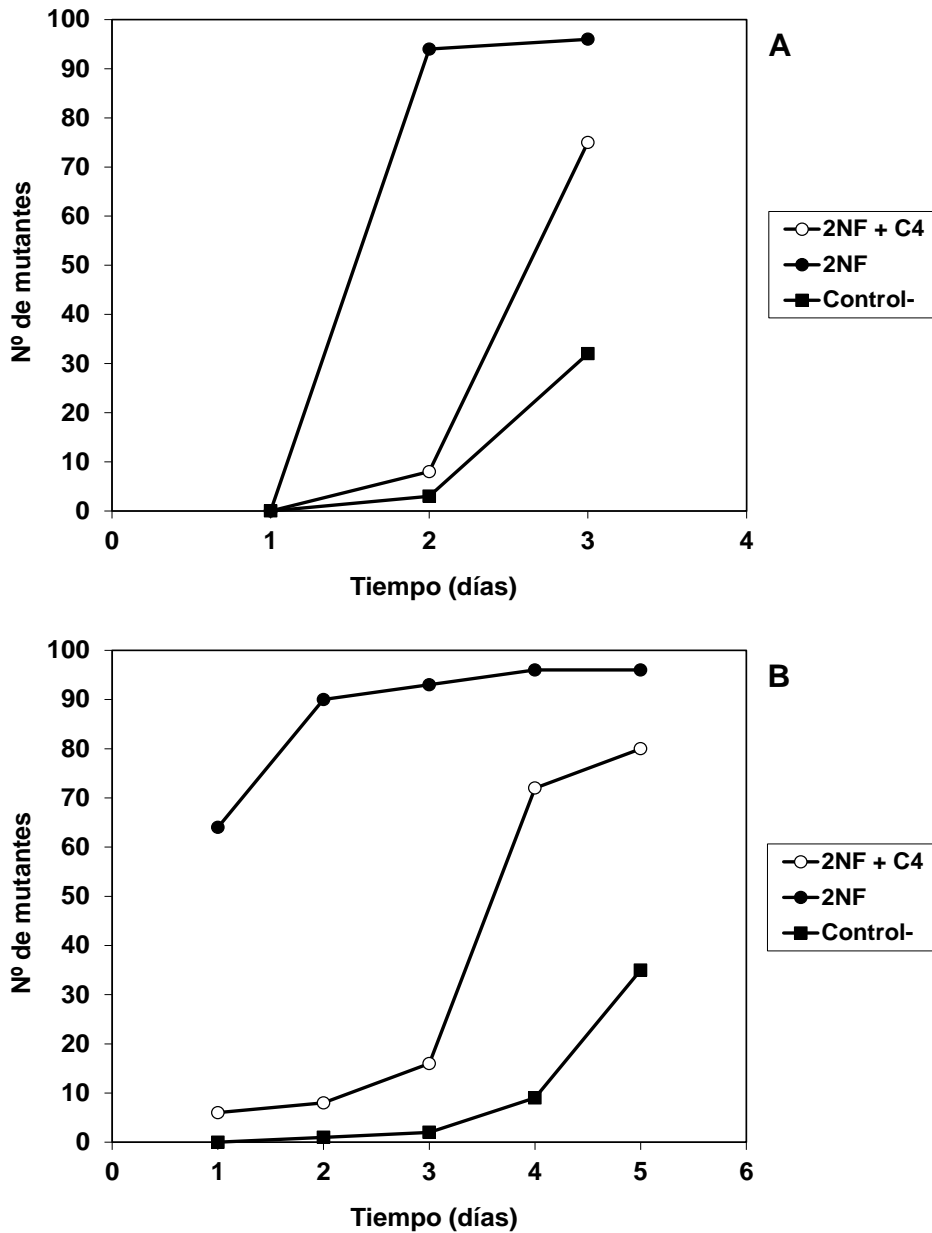
#### **7.4.2. Actividad antimutágena de *L. plantarum* C4 frente a los mutágenos azida de sodio y 2-Nitrofluoreno**

Los virajes en los pocillos correspondientes a los controles negativo (mutaciones espontáneas) y positivos (mutaciones inducidas por 2-nitrofluoreno en la cepa TA98 y por azida de sodio en la cepa TA100, respectivamente), libres de las interferencias causadas por los filtrados fecales, permitieron examinar la actividad antimutágena de la *L. plantarum* C4.

La Figura 7.1 muestra los resultados de dos ensayos realizados con 2-nitrofluoreno y la cepa TA98. En el ensayo de la Figura 7.1.A, la evolución temporal del control negativo fue satisfactoria en los tres primeros días, pero dificultades técnicas invalidaron las lecturas de los días posteriores; sin embargo, los resultados del día 3 mostraron diferencias significativas ( $\alpha < 0,001$ ) entre el control positivo (mutantes inducidos por 2-nitrofluoreno) y el negativo, y también entre el control positivo y el mutágeno incubado con C4, cuyo número de mutantes revertientes representó solo el 78 % del control positivo; la significación de las diferencias se estableció de acuerdo con las tablas publicadas por Gilbert (1980) para el análisis estadístico del test de fluctuaciones y adoptadas por el fabricante del ensayo comercial utilizado en el presente trabajo.

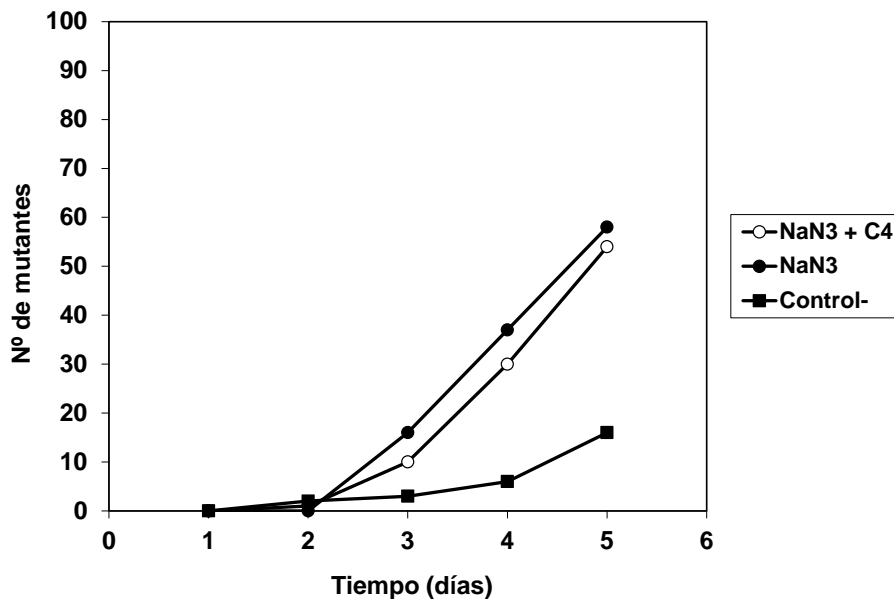
La Figura 7.1.B presenta los resultados de un ensayo conducido de forma satisfactoria hasta el final. El número de mutantes espontáneos se mantuvo por debajo de 10 en los cuatro primeros días, elevándose hasta 35 en el 5º día. Los valores del control positivo fueron elevados desde el primer día (hay que tener presente que la modificación de la técnica incluye una incubación de cinco días antes de retirar los sobrenadantes por centrifugación, con lo que los mutantes obtenidos en el día 1º se han generado en un intervalo de tiempo entre seis días y 24 h) y se mantuvieron durante los cinco días por encima del control negativo con valores de  $\alpha < 0,001$ . Pero la incubación del mutágeno con la cepa C4 redujo drásticamente los recuentos de mutantes revertientes, que

representaron el 9,4 % respecto del control positivo en el día 1, el 8,9 % en el día 2, y el 17,2 % en el día 3, para elevarse al 75 % en el día 4 y al 83,3 %, pero manteniendo los cinco días el mismo alto nivel de significación ( $\alpha < 0,001$ ).



**Figura 7.1. Efecto de *L. plantarum* C4 en la aparición de mutantes revertientes de TA98 en presencia de 2-nitrofluoreno (2NF).** El mutágeno (75  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) se incubó con C4 durante 48 horas y luego se evaluó la actividad mutagénica; cada punto representa el número mutantes revertientes para cada caso.

En cambio, C4 no mostró una actividad antimutágena significativa en los ensayos con azida sódica sobre la cepa TA100, como se desprende del análisis de los datos en la Figura 7.2. El número de mutantes detectados los dos primeros días fue irrelevante. En los días 3, 4 y 5 los recuentos en el control positivo fueron significativamente superiores a los del control negativo ( $\alpha = 0,001$  el día 3 y  $< 0,001$  los días 4 y 5). Durante estos tres últimos días, la placa procedente de la incubación de la azida sódica con C4 presentó valores inferiores a los del control positivo (62,5 %, 81,1 % y 93,1 %, respectivamente), pero en todos los casos los valores de  $\alpha$  fueron superiores a 0,05.



**Figura 7.2. Efecto de *L. plantarum* C4 en la aparición de mutantes revertientes de TA100 en presencia de azida de sodio.** El mutágeno (1,25  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) se incubó con C4 durante 48 horas y luego se evaluó la actividad mutagénica; cada punto representa el número mutantes revertientes para cada caso.

La actividad antimutagénica de algunas bacterias intestinales, como los lactobacilos, se conoce desde hace años (Morotomi y Mutai, 1986). A partir de estudios sobre actividades de enzimas fecales en animales y humanos, inhibición de la genotoxicidad de carcinógenos conocidos *in vitro* e *in vivo*, y supresión de lesiones preneoplásicas y de tumores inducidos por carcinógenos en animales de laboratorio, se han acumulado evidencias sobre la capacidad de algunas bacterias probióticas para prevenir la carcinogenicidad (Burns y Rowland, 2000). Matsumoto y Benno (2004) agrupan los posibles mecanismos de antimutagenicidad de las bacterias probióticas en dos categorías: la bioantimutagenicidad opera sobre los mecanismos de reparación de los daños causados al ADN, mientras que la desmutagenicidad implica la inactivación o

eliminación de los mutágenos; y señalan que la antimutagenicidad de los probióticos parece depender de desmutagenicidad. Esta desmutagenicidad puede conseguirse por degradación o modificación química del carcinógeno (biotransformación), o por adsorción del carcinógeno sin modificar sobre la superficie de la bacteria, impidiendo su contacto con las células de la mucosa y promoviendo su eliminación junto con las bacterias fecales (Oberreuther-Moschner *et al.*, 2004; Ambalam *et al.*, 2011; Klewicka *et al.*, 2012). Ambalam *et al.* (2011), estudiando la actividad antimutagénica de una cepa de *Lactobacillus rhamnosus*, mostraron que era capaz de retirar el anaranjado de la acridina por adsorción, y de inactivar por biotransformación N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina y 2-amino-3,8-dimetilimidazo-[4,5-f]-quinoxalina; en todos los casos, las bacterias mantuvieron altas tasas de viabilidad después de la incubación con los mutágenos. Con el fin de obtener información preliminar sobre el posible mecanismos de la acción antimutágena de *L. plantarum* C4, examinamos el efecto de los mutágenos ensayados, 2-nitrofluoreno y azida sódica, en la viabilidad de la bacteria, encontrando un marcado efecto letal para ambos agentes (datos no mostrados). Esto sugiere un mecanismo de acción pasivo, compatible con la adsorción por estructuras superficiales de la bacteria, ya que no parece probable (aunque no se puede excluir) que durante las incubaciones con los mutágenos, tóxicos para ella, C4 haya podido producir niveles significativos de hipotéticos metabolitos antimutagénicos, como poliaminas (Matsumoto y Benno, 2004) o péptidos (Sah *et al.*, 2016).

Usando la variante del test de Ames en placas Petri, Mobarez *et al.* (2007) han demostrado actividad antimutagénica frente al 2-nitrofluoreno (el mismo agente frente a cuya genotoxicidad protege C4), sobre la cepa TA100, en cepas comerciales de *Lactobacillus acidophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* aisladas de yogur, pero no establecen ningún mecanismo de acción, excepto que la actividad encontrada parece requerir lactobacilos metabólicamente activos.

En cuanto a antecedentes de actividad antimutagénica de cepas de *L. plantarum*, es interesante considerar que Tsuda *et al.* (2008) han obtenido una cepa mutante, productora de exopolisacárido, capaz de unir (e inactivar) aminas policíclicas mutagénicas, capacidad de la que carece la cepa silvestre original, no productora de exopolisacárido. Obviamente, en el caso de mutágenos que no sean tóxicos para la bacteria, pueden operar otros mecanismos, ya que *L. plantarum* ha mostrado capacidad para modificar algunos mutágenos en condiciones que aseguraban su viabilidad (Caldini *et al.*, 2005).



### **7.4.3. Perspectivas para futuros ensayos**

Los resultados obtenidos avalan el interés de avanzar en la investigación de las propiedades antimutagénicas de *L. plantarum* C4. Los estudios futuros deben, por una parte, indagar los mecanismos de la actividad antimutagénica: comparar la actividad de bacterias vivas y muertas, examinar la producción de polímeros extracelulares por C4 y, en su caso, evaluar su capacidad de adsorción. Por otra parte, es imperativo, de cara a las aplicaciones probióticas de la cepa, investigar la protección frente a la genotoxicidad en filtrados fecales, para lo que sería apropiado utilizar ensayos como el Comet o similares.

## **7.5. CONCLUSIONES**

Los resultados presentados en este capítulo sustentan la siguiente conclusión:

1<sup>a</sup>. *Lactobacillus plantarum* C4 inhibe de forma significativa la mutagenicidad del 2-nitrofluoreno sobre la cepa auxotrofa *S. typhimurium* TA98 en el ensayo de Ames, en condiciones en las que la viabilidad de C4 se ve abolida, lo que sugiere un mecanismo de adsorción que faculta a esta bacteria para retirar el mutágeno.

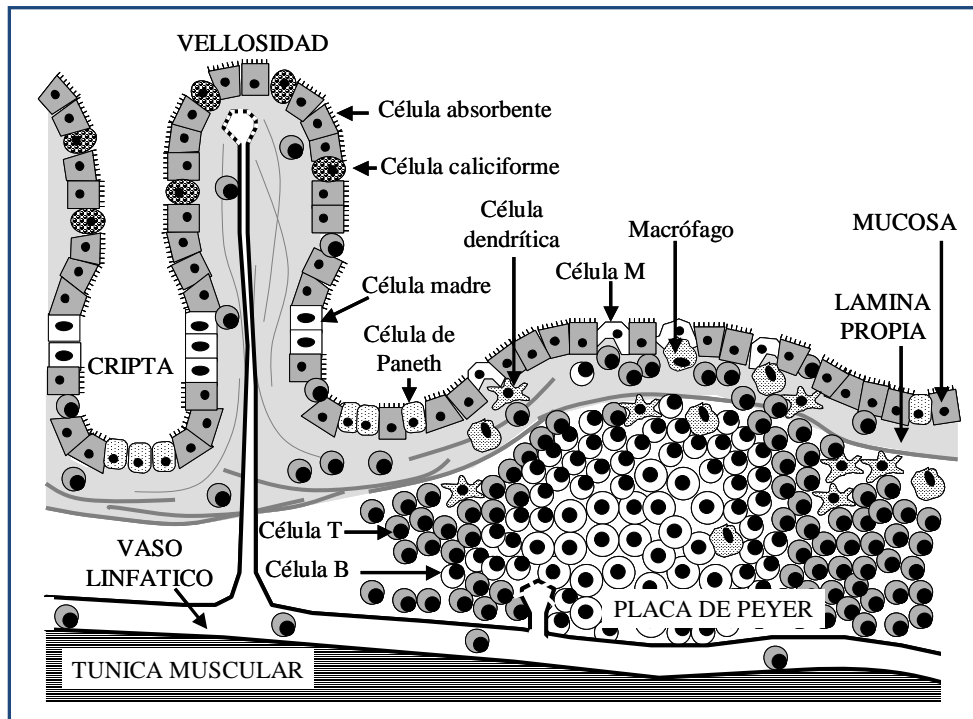
## **8. ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA**

**DE *Lactobacillus plantarum* C4**

## 8.1. INTRODUCCIÓN

Un rasgo característico del sistema inmune gastrointestinal es su capacidad para discriminar entre antígenos inocuos de la dieta y de la microbiota comensal, de aquellos otros pertenecientes a microorganismos potencialmente patógenos. Para ello, debe reconocer todos los antígenos del lumen del intestino, diferenciar los antígenos dañinos de los inofensivos y regular estrictamente las respuestas efectoras consiguientes. De esta forma se evitan respuestas inflamatorias frente a agentes generalmente inocuos. El fracaso en la regulación de la respuesta inmune de la mucosa, ocasiona una variedad de desórdenes clínicos tales como alergia, inflamación y enfermedades autoinmunes. Para realizar estas funciones, el tracto gastrointestinal alberga la mayor porción del sistema inmune de todo el cuerpo, que representa más del 70% del total del sistema inmune. Consta de dos componentes principales: el tejido linfoide asociado a la mucosa (MALT, de *mucosa-associated lymphoid tissue*), que incluye las placas de Peyer del intestino delgado y los folículos linfoides del intestino grueso (órganos linfoides sin vasos aferentes); y los ganglios linfáticos mesentéricos, así como de un gran número de células inmunocompetentes difusamente distribuidas por la lámina propia y el epitelio mucoso. Los tejidos organizados sirven como un sitio potencial para la inducción de respuestas inmunes a nuevos antígenos, mientras que la mucosa intestinal sirve como el sitio efector (Gill, 2003). Todas estas células y tejidos inmunitarios forman una línea defensiva que ofrece, a la vez, nichos ecológicos óptimos para numerosos microorganismos y eficaces mecanismos antimicrobianos: el resultado es un ecosistema complejo y dinámico (Liévin-Le Moal y Servin, 2006).

La Figura 8.1 esquematiza un corte histológico del intestino delgado. Son características, las vellosidades intestinales y las criptas de Lieberkühn, ambas recubiertas de un epitelio de células con microvellosidades en la superficie apical. Estas células, en continua renovación, proceden de células madre pluripotenciales, localizadas en el cuello de las criptas; las células madre se diferencian en 4 tipos celulares: células absorbentes, células caliciformes (secretoras de mucus), células enteroendocrinas y células de Paneth (secretoras de sustancias antimicrobianas). Bajo este epitelio se encuentra la lámina propia, que rellena el interior de las vellosidades, por donde discurren los conductos quilíferos que drenan en plexos linfáticos.



**Figura 8.1. Esquema de la organización histológica en el intestino delgado.** Se muestran vellosidades, criptas de Lieberkühn y una placa de Peyer con un centro germinal. Se observa la distribución de los linfocitos en áreas T y B dentro de la placa de Peyer, la presencia de linfocitos en la lámina propia y de linfocitos intraepiteliales, y el drenaje linfático de las vellosidades y de la placa de Peyer. Figura tomada de Bujalance (2006).

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

La mucosa intestinal está protegida por dos capas de glicoconjugados: unidas a la superficie celular, las glicoproteínas y glicolípidos del glicocálix; y, por encima de éstas, la secreción mucosa de las células caliciformes (Freitas y Cayuela, 2000). Esta secreción es un gel formado por mucinas, proteínas que poseen cadenas de oligosacáridos unidos a serinas, prolinas y treoninas, pudiendo representar la parte glucídica hasta el 80% de la masa molecular. Además de proteger y lubricar la superficie de la mucosa, el gel constituye una barrera para ciertos enteropatógenos como *Yersinia enterocolitica* o *Shigella flexneri*, así como para los rotavirus (Liévin-Le Moal y Servin, 2006). Las mucinas son degradadas por glicosidasas y estererasas de bacterias de la microbiota, lo que suministra nutrientes para el crecimiento bacteriano, de lo que se pueden aprovechar también algunos microorganismos patógenos que se adhieren al mucus (Macfarlane *et al.*, 2000).

El MALT del intestino se denomina GALT (*gut-associated lymphoid tissue*). En el ser humano adulto, el GALT llega a ser el principal órgano linfopoyético, donde se producen tanto células B como T (Sell, 2001). La mayoría de los linfocitos intraepiteliales son células T CD8<sup>+</sup>, con el receptor específico (TCR, de *T-cell receptor*)  $\alpha/\beta$  o  $\gamma/\delta$  encontrándose también fenotipos que son infrecuentes en las células T circulantes, como el “doble negativo” CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> TCR  $\gamma/\delta$ . Los linfocitos de la lámina propia constituyen una población heterogénea, con proporciones de células B y T, y, dentro de estas, T CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> y T CD4<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup>, similares a las encontradas en otros órganos linfoides (Dotan y Mayer, 2003).

Las placas de Peyer son agregados foliculares que pueden contener más de 100 folículos. Cada folículo está constituido por una zona clara llamada centro germinal, rica en linfocitos B IgA<sup>+</sup>, en la cual se observan muy pocas células plasmáticas productoras de IgA, debido a que estas células dejan el folículo antes de diferenciarse totalmente, y una zona oscura periférica donde predomina linfocitos B IgM<sup>+</sup> e IgD<sup>+</sup>. También existen en las placas de Peyer linfocitos T CD4, T CD8 (en menor proporción) macrófagos y células dendríticas (CD) (Mora y Corado, 2003). Las placas de Peyer funcionan como un “sitio inductivo”, donde se inician las respuestas a muchos antígenos (Simpson y Wetzler, 2004), pero también el principal sitio donde se establece la tolerancia o ausencia de respuesta a antígenos administrados por vía oral, a dosis altas o bajas (en relación a las dosis óptimas para inducir respuesta) (Dotan y Mayer, 2003).

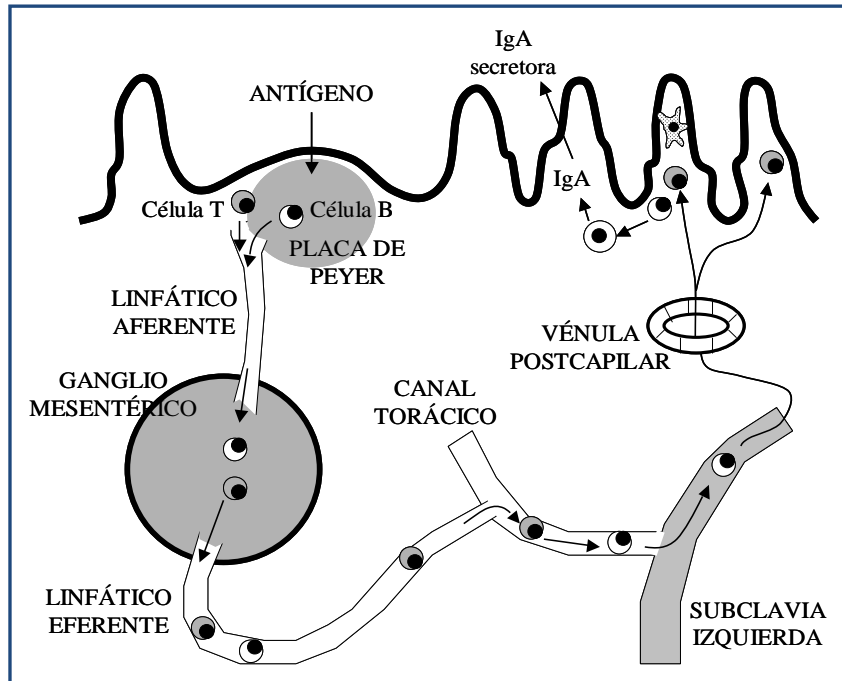
La llegada de antígenos desde la luz intestinal se realiza preferentemente a través de las células M, localizadas en el epitelio que recubre la parte luminal de las placas de Peyer. Estas células no poseen microvellosidades y están especializadas en la endocitosis de macromoléculas y partículas desde la luz intestinal y su posterior exocitosis, a través de su membrana basal, hacia la lámina propia: por tanto, es una vía para la translocación de antígenos a través de la mucosa. Su superficie apical tiene amplias prolongaciones que facilitan el proceso de endocitosis y su membrana basolateral es profundamente invaginada formando estructuras con forma de bolsillos donde se sitúan macrófagos y CD que endocitan los antígenos translocados, los procesan y presentan los correspondientes oligopéptidos con valor de epítomos a las células T (Mora y Corado, 2003; Simpson y Wetzler, 2004).

Además de las células M, los propios enterocitos pueden capturar antígenos lumbinales, procesarlos y presentarlos a linfocitos T. Para ello, tanto los enterocitos, como otras muchas células del cuerpo, expresan constitutivamente moléculas codificadas por genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, de *major histocompatibility complex*) de clase I, lo que les capacita para la presentación de antígenos procesados por vía endógena a células T CD8<sup>+</sup> (CTL, de *cytotoxic T lymphocytes*), pero también, en respuesta a estímulos, expresan moléculas del MHC de clase II, por lo que pueden procesar antígenos por la vía exógena y presentar los correspondientes oligopéptidos a células T CD4<sup>+</sup> (T<sub>H</sub> o *T helper*) (Dotan y Mayer, 2003).

La respuesta inmunológica en respuesta a estímulos puede ser celular, humoral, o ambas. En la respuesta humoral, los linfocitos T CD4 reconocen los antígenos asociados a proteínas del MHC-II en la superficie de la célula presentadora de antígeno y producen citocinas que activan las células B. Éstas células experimentan proliferación clonal y se diferencian en células plasmáticas que luego producirán anticuerpos (IgA). En la respuesta mediada por células, el complejo antígeno-MHC-II es reconocido por los linfocitos T CD4, mientras que el complejo antígeno-MHC de clase I es reconocido por los linfocitos T CD8. El número de células CD4 y CD8 activas es crítico para el mantenimiento de la respuesta inmune celular. Cuando existe un desequilibrio en la proporción de células CD4 y CD8, existe mayor susceptibilidad al desarrollo de infecciones oportunistas, enfermedades autoinmunes y ciertos tumores. Cada clase de células T produce citocinas, se activa y se expande por proliferación clonal. Las citocinas liberadas son los mediadores solubles de las respuestas de defensa del huésped, tanto específicas como inespecíficas, y tienen un papel críticamente importante en los mecanismos efectores de la eliminación de agentes extraños (Ashraf y Shah, 2014).

La población de células T CD4 se puede dividir en varios subconjuntos basados en la secreción específica de citocinas y funciones efectoras: células T helper 1 (T<sub>H</sub>1) que secretan las citocinas proinflamatorias interleukina-2 (IL-2), interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) y TNF- $\beta$  (de *tumor necrosis factor*- $\beta$ ); células T helper 2 (T<sub>H</sub>2) que producen IL-4, IL-5, IL-10, IL-13, que suministran señales para la activación de células B y la generación de respuestas de varias clases y subclases de inmunoglobulinas; células T<sub>H</sub>17 que secretan TGF- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-23 para las respuestas contra patógenos extracelulares a través de la IL-17A e IL-22; y finalmente, las células Treg para la supresión de la respuesta inmune a través de la producción de IL-10, TGF- $\beta$  e IL-35 (Schulze-Koops y Kalden, 2001; Hardy *et al.*, 2013).

Después de la presentación antigénica, las células T y B activadas abandonan los sitios de inducción y viajan a los órganos linfoides secundarios (Figura 8.2) a través del conducto torácico y la circulación para poblar los sitios efectores de la mucosa (la lámina propia y el epitelio). Esta orientación específica está dirigida por la expresión de las integrinas  $\alpha 4\beta 7$  en los linfocitos que reconocen las adreínas, moléculas de superficie celular de la mucosa (MAdCAM-1), expresadas en las células endoteliales de la mucosa. Ya en la lámina propia, las células B se diferencian en células plasmáticas secretoras de IgA dimérica. La IgA dimérica se transporta a través de las células epiteliales por el receptor de inmunoglobulina polimérico expresado en el lado basolateral de las células epiteliales del intestino y se libera como IgA secretora. En la luz intestinal, la IgA secretora contribuye a la protección del huésped uniéndose a antígenos, neutralizando toxinas y virus, y evitando la adherencia microbiana a las células epiteliales (exclusión inmune). Además, se ha demostrado que la IgA dimérica neutraliza los virus intracelulares y los antígenos que han penetrado con éxito en la lámina propia desde el lumen. Varios factores, como la naturaleza del antígeno (soluble o particulado), la vía (naturaleza de las células presentadoras de antígeno) mediante la cual los antígenos se presentan al sistema inmune, influyen en la naturaleza de la respuesta inmune generada: “tolerancia o inmunidad” (Gill, 2003).



**Figura 8.2. Recirculación de linfocitos tras la activación en placas de Peyer.** Los linfocitos activados son llevados por el drenaje linfático a los ganglios mesentéricos, de donde salen por los vasos eferentes, que finalmente desembocan en el gran canal torácico y pasan a la circulación sanguínea. Los linfocitos activados abandonan el compartimento vascular a nivel de organizaciones endoteliales especiales en las vénulas postcapilares, tanto en las mucosas como en otras localizaciones. Sin embargo, los linfocitos activados en el GALT tienden a ubicarse en la lámina propia intestinal, donde las células B se transforman en células plasmáticas que producen anticuerpos, especialmente IgA, la cual finalmente es transportada por los enterocitos, en forma de dímero secretor, hasta la luz intestinal. Figura tomada de Simpson y Wetzler (2004), con modificaciones.

La presentación a través de una célula “no profesional”, como el enterocito, podría formar parte de las vías de inducción de tolerancia oral inducida por dosis altas de antígeno, ya que una presentación inadecuada (por ejemplo, en ausencia de señales coestimuladoras) puede provocar anergia en las células T. En la tolerancia oral inducida por dosis bajas de antígeno, juega un papel crucial la producción de citocinas supresoras como interleukina 10 (IL-10), producida por células  $T_H2$ , y TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ), producido por células  $T_H3$ ; por tanto, esta tolerancia afecta a la inmunidad celular proinflamatoria (inhibición de las células  $T_H1$ ), pero no a la cooperación de células  $T_H2$  con los linfocitos B, con lo que se acompaña de una respuesta de anticuerpos secretores IgA (Dotan y Mayer, 2003).



El efecto de los probióticos en el sistema inmune ha sido objeto de numerosos estudios en los últimos 20 años. Determinadas cepas probióticas pueden estimular, o bien, regular diversos aspectos de la respuesta inmune innata o de la inmunidad adquirida. La interacción de microorganismos probióticos con las células epiteliales del intestino y las células inmunes, provoca cambios en el fenotipo celular, secreción de citocinas, y la activación o supresión de las vías de señalización intracelular, modulando así, la resistencia del huésped (Ashraf y Shah, 2014).

### 8.1.1. Efectos de los probióticos en la producción de citocinas

Las citocinas comprenden el grupo más grande y más pleotrópico de mediadores de respuesta inmune. La iniciación, el mantenimiento y la resolución de las respuestas inmunes innatas y adquiridas están reguladas por la comunicación “célula a célula” a través de las citocinas. Diversos estudios *in vitro* han demostrado que las bacterias ácido lácticas (BAL) o sus productos, pueden estimular la función inmune al actuar directamente sobre las células epiteliales intestinales (IEC) y los linfocitos intraepiteliales (IEL) con efectos en la expresión de citocinas y se ha observado una gran variación en la capacidad de diferentes cepas de *Lactobacillus* para inducir citocinas pro y antiinflamatorias (Gill, 2003). Algunas cepas LAB como *L. sakei* son capaces de inducir la expresión de ARNm de IL-1 $\beta$ , IL-8, la proteína quimioattractiva de monocitos-1 y TNF- $\alpha$  en células Caco-2 en presencia de leucocitos (Haller *et al.*, 2000). También se ha observado la inducción preferencial de la expresión de ARNm de TGF- $\beta$  en células Caco-2 sensibilizadas con leucocitos tras el cocultivo con *L. johnsonii*. Por otra parte, se ha demostrado que el TNF- $\alpha$  podría ser el mediador clave responsable de sensibilizar las células epiteliales a los lactobacilos; Así, *L. plantarum* 299v aumentó la expresión del ARNm de IL-8 en células HT29 estimuladas con TNF- $\alpha$  (McCracken *et al.*, 2002). En modelos animales, se ha demostrado la capacidad de las LAB, administradas por vía oral, para influir en la producción de citocinas en las superficies de las mucosas *in vivo*. Maassen *et al.* (2000) demostraron que la administración de *L. reuteri* y *L. brevis* aumentó la expresión de citocinas proinflamatorias producidas por T<sub>H</sub>1, TNF- $\alpha$ , IL-2 y/o IL-1 $\beta$  en las vellosidades intestinales de ratones. Por su parte, Perdigon *et al.* (2002) evidenciaron un aumento del número de células productoras de TNF- $\alpha$  y de IFN- $\beta$  en las placas de Peyer y en los niveles de Bc1, una proteína responsable de la activación celular, en la lámina propia de ratones a los que se les administró diferentes cepas de *Lactobacillus*.

En lo que respecta a los estudios en seres humanos, se ha demostrado que la ingesta de probióticos es capaz de inducir y/o aumentar la producción de citokinas *in vivo* y, en *ex vivo* en estudios con células mononucleares de sangre periférica después de la estimulación apropiada. De Simone *et al.* (1989) detectaron niveles significativamente más altos de IFN- $\gamma$  en el suero de individuos que recibieron lactobacilos liofilizados y yogurt en comparación con el grupo control. Efectos similares en la producción de IFN- $\gamma$  y/o IL-2 se han observado en otros estudios. Entre ellos, el realizado por Wheeler *et al.* (1989) en linfocitos estimulados con concavalina A de pacientes a los cuales se les administró yogurt con *L. acidophilus*. Sus resultados mostraron un aumento de los niveles de IFN- $\gamma$  (P= 0,054). También se ha demostrado que *L. brevis* subsp. *coagulans* y *Bifidobacterium lactis* administrados por vía oral, mejoran la capacidad de producción de IFN- $\gamma$  en individuos sanos en un mecanismo dependiente de la dosis en el caso de *L. brevis*. En el mismo estudio observaron que los lactobacilos muertos por calor eran menos efectivos para inducir la producción de IFN- $\alpha$  (Kishi *et al.*, 1996; Arunachalam *et al.*, 2000)

La secreción de IFN- $\gamma$  potencia la eliminación de microorganismos mediada por fagocitos (aumentando la producción de óxido nítrico y la expresión de receptores de Fc en las células fagocíticas), induce la expresión de MHC-I y MHC-II en diversas células, estimula la función de las células T<sub>H</sub> y aumenta la inmunogenicidad de las vacunas. El TNF- $\alpha$  coopera con el IFN- $\gamma$  para aumentar la capacidad microbicida de los macrófagos y, ejerce un efecto citotóxico contra los tumores. El IFN- $\alpha$  juega un papel importante en las primeras etapas de la defensa del huésped contra las infecciones virales, las infecciones microbianas y el cáncer. La IL-1 estimula la proliferación de las células T y B, mientras que la IL-6 induce la diferenciación de células plasmáticas para la secreción de anticuerpos. La IL-2 estimula la proliferación y diferenciación de las células NK (de *natural killer*) y las células B, y desempeña un papel importante en la inducción y regulación de las respuestas inmunitarias mediadas por las células T. Mientras que la IL-10 y el TGF- $\beta$  tienen potentes propiedades antiinflamatorias y juegan un papel importante en la homeostasis del sistema inmune (Gill, 2003).

### **8.1.2. Efectos beneficiosos de los probióticos sobre la inmunidad innata**

La respuesta inmune innata actúa no solo como primera línea de defensa para la protección contra los patógenos invasores, sino que también juega un papel crucial en el desarrollo posterior de la respuesta inmune adaptativa. Los principales componentes celulares de la inmunidad no específica incluyen las

células fagocíticas (monocitos, macrófagos y células polimorfonucleares) y las células NK. Estas células poseen la capacidad de reconocer patrones moleculares compartidos entre grupos de patógenos (PAMPs: lipopolisacáridos, ácido lipotecoico, peptidoglicanos, etc.) a través de sus receptores de reconocimiento de patrones (por ejemplo, receptores TLR de *toll-like-receptor* y CD14) (Gill, 2003). Los TLR se expresan principalmente en macrófagos y CD, y en otros tipos de células, como las células B y las células epiteliales. La activación de los TLR da como resultado el inicio de la respuesta de las CD, lo que conduce a la producción de citocinas y a una regulación positiva o negativa de las moléculas de la superficie celular (Granucci y Ricciardi-Castagnoli, 2003). Las células fagocíticas desempeñan un papel central en la lucha contra las infecciones microbianas, mientras que, las células NK son fundamentales para la defensa del huésped contra las infecciones virales y el cáncer (Gill, 2003).

Diversas cepas probióticas pueden modular varias rutas de señalización dentro de los macrófagos que repercuten sobre las funciones inmunorreguladoras de la inmunidad mucosal. Además de las citocinas proinflamatorias innatas como  $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$  e  $IL-8$ , se ha prestado especial atención a la  $IL-10$  y la  $IL-12$ , ya que la producción de estas citocinas por parte de los macrófagos y otras células inmunes en respuesta a microorganismos, pueden determinar el tipo de respuesta inmune adaptativa (Llewellyn y Foey, 2017).

La  $IL-10$  e  $IL-12$  son producidas naturalmente por macrófagos, células B y CD. La  $IL-12$  estimula la inmunidad celular al estimular potentemente las células T citotóxicas y las células NK, así como, induce la proliferación de células  $T_H1$  y la producción de citocinas ( $IL-2$  e  $IFN-\gamma$ ). Por el contrario, la  $IL-10$  regula negativamente la inmunidad mediada por células directamente o mediante la supresión de funciones celulares que presentan antígenos, incluida la producción de  $IL-12$ . Debido a su actividad antitumoral, antimetastásica y antiangiogénica de  $IL-12$ , ha existido un interés en evaluar la  $IL-12$  como un posible fármaco anticanceroso (Ashraf y Shah, 2014).

Algunas cepas probióticas pueden restaurar la disminución de la función fagocítica relacionada con la edad. La ingesta de leche suplementada con *L. rhamnosus* (HN001) o *B. lactis* (HN019) durante 3-6 semanas en humanos, aumentó la capacidad fagocítica de neutrófilos y monocitos en comparación con el grupo control que recibió solo leche sin probiótico. Los resultados mostraron que los individuos con sistema inmunitario deprimido antes de la intervención probiótica, presentaron mayor incremento en la función celular fagocítica al final del tratamiento, que los individuos que presentaban una función inmune adecuada antes de la ingesta del probiótico. Además el

aumento de la actividad fagocítica se correlacionó con la edad, los individuos mayores de 70 años presentaron una mejora significativamente mayor en la función inmune que aquellos menores de 70 años (Gill *et al.*, 2001a). En otro estudio, los mismos autores, determinaron el impacto de una dieta suplementada con *L. rhamnosus* (HN001) o *B. lactis* (HN019) sobre la actividad de las células NK en sangre periférica de individuos sanos con edad avanzada. Tras tres semanas de tratamiento, sólo los individuos que recibieron cualquiera de las dos cepas presentaron un aumento en la proporción de linfocitos T CD56<sup>+</sup> en la circulación periférica, así como, un aumento de la actividad tumoricida *ex vivo* de células mononucleares de sangre periférica contra las células tumorales K562. Al igual que el estudio anterior, estos aumentos se correlacionaron significativamente con la edad, y los sujetos mayores de 70 años experimentaron mejoras significativamente mayores que los menores de 70 años (Gil *et al.*, 2011b).

Otro estudio realizado por Schiffrin *et al.* (1995) en el cual se administró durante 3 semanas leche fermentada suplementada con *L. johnsonii* La1 o *B. lactis* Bb12, mejoró la actividad fagocítica de los leucocitos de sangre periférica (células polimorfonucleares y monocitos) en voluntarios humanos sanos. Los granulocitos mostraron mayor actividad fagocítica que los monocitos. Este aumento en la actividad fagocítica se mantuvo durante varias semanas después del cese del consumo de leche fermentada suplementada con los probióticos.

La respuesta a citocinas por los macrófagos puede variar entre diferentes cepas con potencial probiótico. Además, algunas cepas del género *Lactobacillus* pueden activar los macrófagos para secretar tanto citocinas inflamatorias como antiinflamatorias. Así, en un estudio llevado a cabo por Morita *et al.* (2002) con 11 cepas de *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. rhamnosus* para evaluar la secreción de citocinas en la línea celular de macrófagos murinos J774.1, encontraron que algunas de las cepas indujeron la producción de IL-6, IL-12 y TNF- $\alpha$  y siete de ellas también indujeron la producción de IL-10.

A pesar de que el consumo de muchas cepas probióticas ejerce diversos efectos sobre la función inmune innata, varios estudios no han encontrado ningún efecto. No se sabe si esto se debe a la escasa capacidad inmunoestimuladora de las cepas probióticas evaluadas o a diferencias relacionadas con la dosis. Por lo tanto, es importante demostrar para cada cepa, la eficacia y la dosis relacionada con la respuesta o efecto, en ensayos rigurosamente diseñados (aleatorios, a doble ciego y controlados con placebo).

### 8.1.3. Efectos beneficiosos de los probióticos sobre la inmunidad adaptativa

La ingesta de cepas específicas de LAB también ha demostrado mejorar la respuesta inmune humoral a las infecciones naturales y a las inmunizaciones sistémicas u orales en estudios con tanto ratones como en humanos.

La administración de *L. acidophilus*, *B. infantis*, *B. bifidum* en combinación con los microorganismos tradicionales del yogurt *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* a ratones con 8 semanas de edad durante 3 semanas y desafiados dos veces con 10 µg de la toxina del cólera, aumentó significativamente los niveles de IgA anti-cólera intestinal y sérica. Este aumento fue significativamente mayor en aquellos ratones que recibieron los microorganismos probióticos en el yogurt elaborado con los *starter* tradicionales, al comparar con los que los recibieron solo en leche (Tejada-Simon *et al.*, 1999; Sanders y Klaenhammer, 2001).

Algunas LAB poseen propiedades adyuvantes capaces de mejorar la eficacia de las vacunas orales y pueden actuar como inmunoestimulantes para promover la recuperación de enfermedades infecciosas. Así, en un estudio aleatorio, controlado con placebo, llevado a cabo por Kaila *et al.* (1992) observaron un número significativamente mayor de células secretoras de IgG, IgA e IgM en niños a quienes se les administró leche fermentada con *L. rhamnosus* GG durante la fase aguda de la infección por rotavirus (diarrea) en comparación con los niños que recibieron el placebo. Durante la convalecencia, una proporción significativamente mayor de niños en el grupo que recibió el probiótico (90%) en comparación con el grupo que recibió el placebo (46%) desarrolló una respuesta celular con secreción de anticuerpos IgA específicos para rotavirus. En otro estudio realizado por De Vrese *et al.* (2005) con 66 voluntarios sanos quienes consumieron durante 5 semanas leche suplementada con *L. rhamnosus* GG y *L. paracasei* subsp. *paracasei* (CRL431) o el placebo (leche acidificada) fueron desafiados oralmente después de la semana 2 con una vacuna con el virus de poliomyelitis vivo atenuado. Sus resultados muestran que los individuos que recibieron el desafío presentaron un aumento significativo de IgG e IgA séricos específicos para el virus comparado con el grupo que recibió el placebo.

Se ha demostrado que la ingesta de probióticos fortalece la función de barrera de la mucosa al promover la producción de anticuerpos y al reducir la transferencia transmucosal de antígenos. En un estudio realizado por Gill *et al.* (2001) con la bacteria probiótica *L. rhamnosus* HN001 a fin de conocer su capacidad para conferir protección frente a una o varias dosis de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 1772) en ratones, a través de su

actividad inmunomoduladora. Los ratones que recibieron el probiótico mostraron mejor estado de bienestar (mayor ingesta de alimentos y agua con el consiguiente aumento de peso) que el grupo control, produjeron títulos altos de anticuerpos anti-*Salmonella* en el tracto gastrointestinal y mostraron una mayor supervivencia a la infección (27 de 30 ratones sobrevivieron 21 días después de la exposición, en comparación con 2 de 29 en el grupo de control). Después de la administración de varias dosis de *Salmonella*, los ratones que recibieron el probiótico, tenían significativamente menor carga promedio de patógenos en el bazo e hígado, que los controles, y adicionalmente, los leucocitos peritoneales obtenidos de ratones alimentados con HN001 mostraron una capacidad fagocítica *ex vivo* significativamente mayor comparada con la de los ratones control.

Paineau *et al.* (2008) administraron dos cápsulas diarias que contenían uno de los siguientes microorganismos probióticos: *B. lactis* Bi-07, *B. lactis* BI-04, *L. acidophilus* La-14, *L. acidophilus* NCFM, *L. plantarum* Lp-115, *L. paracasei* Lpc-37, *L. salivarius* Ls-33 durante 21 días a voluntarios sanos. Sus resultados mostraron un aumento significativo en anticuerpos séricos totales. Durante la respuesta temprana (día 0-21), la IgG sérica aumentó significativamente en los sujetos que consumieron *Bifidobacterium lactis* BI-04 y *L. acidophilus* La-14 ( $P = 0.01$ ) en comparación con los controles, mientras que durante la respuesta tardía (día 21-28), las IgA e IgM en suero aumentaron en los sujetos que recibieron *L. acidophilus* NCFM.

No se conocen los mecanismos por los que los microorganismos probióticos aumentan la respuesta inmune humoral, pero podrían ser el resultado de un mayor transporte de materiales antigénicos en el intestino y una regulación positiva de moléculas presentadoras de antígenos y moléculas coestimuladoras de las células inmunes inducidas por citocinas proinflamatorias y/o un mayor número de células B.

La potenciación de la inmunidad por probióticos tiene como resultado el incremento de la resistencia frente a patógenos. Se sugiere que los probióticos confieran protección contra patógenos entéricos mediante la producción de citocinas, la potenciación de la capacidad fagocítica de las células polimorfonucleares y los macrófagos, el aumento de la actividad citotóxica de las células NK y mejora de las respuestas de anticuerpos específicos a organismos patógenos (Gill, 2003).

## 8.2. OBJETIVOS

En el presente capítulo se abordaron los siguientes objetivos:

1°. Investigar la capacidad inmunomoduladora de *Lactobacillus plantarum* C4 *in vitro*, sobre cultivos celulares, incluyendo cultivos primarios de esplenocitos de ratones sanos y cultivos de la línea celular continua Raw 264.7 de macrófagos murinos.

2°. Evaluar el efecto de C4 en la infección intestinal con *Y. enterocolitica* O9 en ratones a través de su actividad inmunomoduladora.

## 8.3. MATERIALES Y MÉTODOS

### 8.3.1. Instrumentación y equipos

- Frascos de 75 cm<sup>3</sup> para cultivo celular.
- Frascos *shell vial*
- Placas microtiter de 24 y 96 pocillos
- Microscopio óptico invertido (Olympus, Japón).
- Sobres y jarra para incubación en anaerobiosis (Thermo Scientific Oxoid)
- Membranas filtrantes de 0,22 µm.
- Vortex, YellowLine TTS 2 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Alemania).
- Incubador a 37°C (Mettler, Alemania).
- Incubador de CO<sub>2</sub> a 37°C (Mettler, Alemania).
- Micropipetas de 10-50 µl, 50-200 µl y 100-1000 µl, Boeco (Alemania).
- Centrífuga para tubos de 15 ml (Mettler, Alemania).
- Lector microELISA (Behring EL 311).
- Aguja de alimentación (Harvard Apparatus, Edenbridge, Reino Unido)
- Instrumental quirúrgico estéril.

### 8.3.2. Medios de cultivo, reactivos y soluciones

- Agar Lactobacilli (MRS), Difco™, Becton, Dickinson and Company (Sparks, Estados Unidos).

- Agar LPSM: *L. plantarum* Selective Medium (Bujalance *et al.*, 2006).
- Agar TSA (Tryptic Soy Agar, Difco laboratorios, Le Pont de Claix, Francia).
- Agar Cefsulodin-Irgasan-Novobiocina (CIN): agar selectivo para *Yersinia*, (Difco, Le Pont de Claix, Francia).
- Medio RPMI 1640, Sigma R7388.
- Suero bovino fetal (SBF), Sigma F2442
- Mezcla de antibiótico y antimicótico (vancomicina 50 mg/l, gentamicina 40 mg/l y anfotericina B 0,25 mg/l), Sigma A5955.
- Piruvato de sodio, Sigma P2256
- L-glutamina, Sigma G7513.
- Estuches de ELISA comerciales para la medición de las citokinas: TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12 e IFN- $\alpha$ , Pierce Biotechnology, Thermo Scientific, Rockford, EEUU).
- Estuche de ELISA comercial para la determinación de IgA, Affymetrix eBioscience (San Diego CA, EE. UU.).

### 8.3.3. Bacterias y condiciones de cultivo

*L. plantarum* C4 se cultivó en agar MRS, medio en el que se consigue un buen crecimiento tras 24 h a 37°C. Tras el crecimiento se conservó en frío (4°C). Se realizaron resiembras periódicas de los cultivos para su mantenimiento y uso.

*Y. enterocolitica* cepa IP383 de la colección del Instituto Pasteur. La cepa fue aislada de heces humanas, e identificada como serotipo O9 y biotipo 2, poseyendo el plásmido de virulencia pYV. Por lo tanto, esta cepa expresa a 37°C el fenotipo de virulencia que se caracteriza por aglutinación en medios líquidos y crecimiento dependiente de calcio (Mazigh *et al.*, 1983). Se cultivó en agar inclinado de TSA a 37°C. Tras el crecimiento, fueron conservadas a 4°C. Para el mantenimiento, se hicieron siembras periódicas.



### 8.3.4. Ensayos de inmunomodulación *in vitro*

#### 8.3.4.1. Células

Se utilizó la línea celular Raw 264.7 (ATCC TIB-71), una línea continua de macrófagos de origen murino del linaje BALB/c, obtenidos del líquido ascítico y establecida desde un tumor inducido por el virus de la leucemia murina de Abselon. Tienen capacidad fagocítica y citolítica dependiente de anticuerpo, son adherentes y crecen formando monocapa. La línea fue amablemente cedida por el Dr. F. Gamarro (Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Granada). Para su cultivo se empleó el medio RPMI 1640 suplementado (Tabla 8.1) y fueron incubadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> en frascos Falcon. En los ensayos con bacterias, el medio RPMI no fue suplementado con la mezcla antibiótico-antimicótico.

**Tabla 8.1. Suplementos del medio RPMI.**

| <b>Componentes</b>              | <b>Concentración por litro</b> | <b>Volumen p/100 ml</b> |
|---------------------------------|--------------------------------|-------------------------|
| Mezcla antibiótica-antimicótica | 1%                             | 1 ml                    |
| Piruvato de sodio               | 1mM                            | 1 ml                    |
| L-glutamina                     | 2 mM                           | 1 ml                    |
| Suero bovino fetal              | 10%                            | 10 ml                   |

El medio de cultivo se cambió cada 2-3 días hasta que las células alcanzaron un crecimiento confluyente formado una monocapa. A partir de este momento, se procedió al proceso de tripsinización con la finalidad de despegar y separar las células del frasco para su recuento y/o subcultivo en frascos con medio de cultivo nuevo. Para ello, se desechó el medio de cultivo y las células fueron lavadas tres veces con 1 ml de solución de Tripsina-EDTA en cada lavado y después se incubaron a 37°C durante 3-5 minutos con dicha solución o hasta observar el desprendimiento de la monocapa. A continuación, se sacudieron los frascos para despegar las células, obteniendo una suspensión celular turbia. Para minimizar la acción proteolítica de la tripsina, se añadió medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal y con la ayuda de una pipeta se homogenizó completamente. La suspensión celular homogénea se recogió y se centrifugó a 100 x G, descartando el sobrenadante con tripsina, y

resuspendiendo las células en medio de cultivo nuevo. El recuento de células Raw 264.7 viables se hizo por exclusión con azul de Tripán de acuerdo al procedimiento descrito previamente en el apartado 6.3.7.2. A partir de la suspensión celular ajustada a una concentración de  $5 \times 10^5$  células/ml, se llenaron 24 pocillos de una placa de cultivo para células con 1 ml cada uno, siendo cultivadas las células durante 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub> para la formación de las monocapas.

#### **8.3.4.2. Preparación de las suspensiones de *L. plantarum* C4**

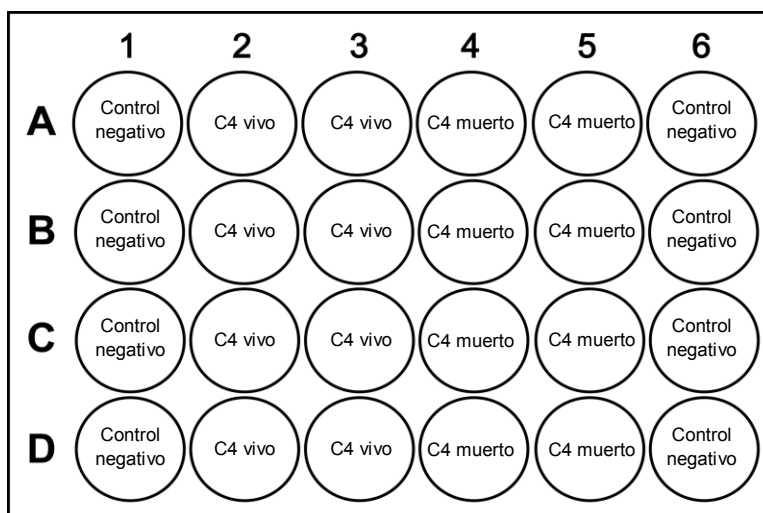
Las suspensiones estandarizadas de C4 fueron obtenidas a partir de un cultivo de 24 horas de incubación a 37°C en agar MRS en condiciones aeróbicas. A partir de este cultivo se preparó una suspensión de bacterias en búfer fosfato a pH 7,2 (PBS) estéril. La concentración se ajustó por turbidimetría usando como término de comparación el patrón 0,5 de la escala McFarland. 1 ml de esta suspensión fue adicionado a 9 ml de medio RPMI 1640 sin antibiótico para obtener una suspensión de  $10^7$  bacterias/ml lo que constituyó la suspensión de trabajo con microorganismos vivos (C4 vivo). El resto de la suspensión se utilizó para preparar la suspensión con microorganismos muertos (C4 muerto). Para ello, se inactivó por ebullición durante 10 minutos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. Al igual que la suspensión con microorganismos vivos, se tomó 1 ml de la suspensión inactivada que fue adicionada a 9 ml de RPMI 1640 sin antibiótico para obtener una suspensión de  $10^7$  bacterias/ml. La concentración real de todas las suspensiones, así como la inactivación de C4, fueron comprobadas de acuerdo al procedimiento descrito en el apartado 5.3.6.

#### **8.3.4.3. Inoculación de las células con *L. plantarum* C4 vivo y muerto**

A las 24 h del cultivo de las células Raw 264.7 en placas de 24 pocillos se retiró el medio de cultivo de éstos, y se lavó dos veces con medio RPMI sin antibiótico. Se realizó un control basal de la producción de citokinas por las células Raw, en ausencia de bacterias, tanto a las 28 como a las 48 h, a fin de determinar posteriormente el efecto de la cepa C4 en la producción de citokinas por estas células.

Para la inoculación de las bacterias se siguió el esquema expuesto en la Figura 8.3. Se incubaron las columnas de la placa de cultivo en diferentes condiciones (cada condición por cuadruplicado): en la primera y en la sexta columna se añadió 1 ml de RPMI 1640 sin antibiótico en cada pocillo, como

control basal. En la segunda y en la tercera, se añadió 1 ml de *L. plantarum* C4 vivo a una concentración de  $10^7$  bacterias/ml en cada pocillo. En la cuarta y quinta columna, se añadió 1 ml de *L. plantarum* C4 muerto a  $10^7$  bacterias/ml en cada pocillo. En las columnas primera, segunda, tercera y cuarta, la incubación se realizó durante 4 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Para las columnas quinta y sexta, la incubación fue 24 h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>.



**Figura 8.3. Esquema de la inoculación de las células Raw 264.7 con *L. plantarum* C4.** Columnas: 1 y 6: controles negativos, sin C4; columnas 2 y 3: suspensión de C4 vivo; columnas 4 y 5: suspensión de C4 muerto. A las 4 h de incubación se recogió el sobrenadante de columnas 1, 3 y 4, y a las 24 h de las columnas 5 y 6. La columna 2 se utilizó como control de viabilidad de C4.

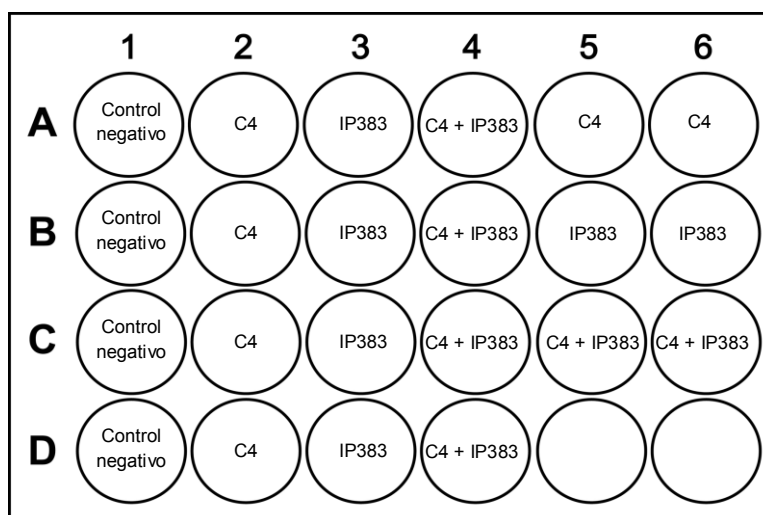
A las 4 y 24 horas (28 y 48 horas totales respectivamente), se recogieron los sobrenadantes de las columnas primera, tercera y cuarta, y las columnas quinta y sexta respectivamente. Todos los sobrenadantes se filtraron con un filtro de 0,22  $\mu$ m, y se congelaron a -20°C hasta la posterior medida de citokinas. La columna segunda se usó como control de la concentración real de *L. plantarum* C4. Los pocillos de esta columna se trataron con solución de bilis durante 15 minutos a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, para recuperar también aquellas bacterias que las células Raw 264.7 hubieran fagocitado. Se obtuvieron los sobrenadantes, y se realizaron diluciones decimales seriadas en PBS estéril, sembrando gotas de 10  $\mu$ l en placa con agar MRS y contando las colonias crecidas a las 24 h.

#### 8.3.4.4. Inoculación con *L. plantarum* C4 y *Y. enterocolitica* IP383

A otra placa con monocapas de células Raw 264.7 de 24 horas (placa 2), se le retiró el medio de cultivo de los pocillos de las columnas, lavando cada pocillo dos veces con 1 ml de medio RPMI sin antibiótico. En este experimento también se realizó un control basal con células Raw. Se prepararon suspensiones de las cepas C4 e IP383 en solución de búfer fosfato como se ha descrito en el apartado 8.3.4.2 de este capítulo.

Para la inoculación de los pocillos de la placa de cultivo con las cepas C4 e IP383 se siguió el esquema representado en la Figura 8.4. Se incubaron las columnas en diferentes condiciones (cada condición por cuadruplicado): en la primera columna se añadió 1ml de RPMI, sin antibiótico, en cada pocillo durante 4 h. En la segunda columna se añadió 1ml de una suspensión con concentración  $10^7$  bacterias/ml de *L. plantarum* C4 en cada pocillo durante 4 h. En la tercera columna, se añadió 100  $\mu$ l de una suspensión que contenía  $10^7$  bacterias/ml de *Y. enterocolitica* IP383 (una hora más tarde, tras haber incubado las células 25 h), durante 3 h. En la cuarta columna se añadió 1ml de *L. plantarum* C4 de una suspensión que contenía  $10^7$  bacterias/ml, y a la hora, se le añadió 100  $\mu$ l *Y. enterocolitica* IP383 de una suspensión  $10^7$  bacterias/ml durante 3 h. En los primeros pocillos de las columnas quinta y sexta (5A y 6A) se realizó el mismo procedimiento que para la segunda columna, en los segundos pocillos (5B y 6B) el mismo procedimiento que para la tercera columna, y en los terceros pocillos (5C y 6C) el mismo procedimiento que para la cuarta columna.

A las 28 horas totales, se recogieron los sobrenadantes de los pocillos de las columnas primera, segunda, tercera y cuarta, se filtraron con un filtro de 0,22  $\mu$ m, y se congelaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la posterior medida de citokinas. Los pocillos de las columnas quinta y sexta se usaron como control de la concentración real de *L. plantarum* C4 (la primera fila), de *Y. enterocolitica* (la segunda fila), y de ambas en la tercera fila. Para ello, cada pocillo se trató con 100  $\mu$ l de solución de bilis durante 15 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$ . Se obtuvieron los sobrenadantes, y se realizaron diluciones decimales seriadas en PBS estéril, sembrando gotas de 10  $\mu$ l en placa con agar MRS y LPSM para los pocillos que contenían *L. plantarum* C4; y en agar TSA y agar *Yersinia* para aquellos que contenían *Y. enterocolitica*; y en agar MRS, agar TSA, agar *Yersinia* y agar LPSM para los pocillos que contenían ambas bacterias, recontando el número de colonias crecidas en las placas a las 24 h.



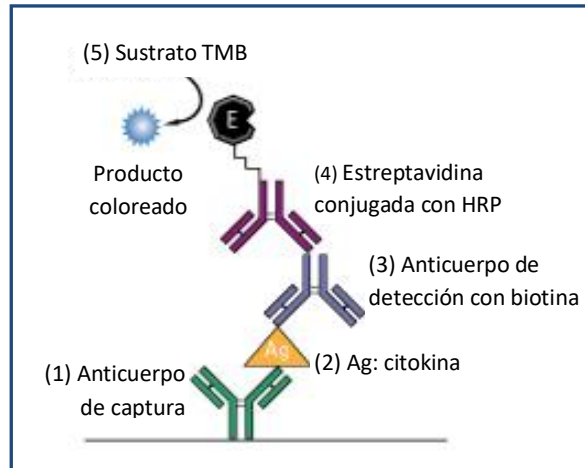
**Figura 8.4. Esquema de la inoculación de las células Raw 264.7 con las cepas C4 e IP383.** Columna 1: control negativo, sin bacterias; columna 2: suspensión de C4; columna 3: suspensión de IP383; columna 4: suspensión de C4 y una hora después, adición de IP383; pocillos 5A y 6A, igual que columna 2; pocillos 5B y 6B, igual que columna 3; pocillos 5C y 6C, igual que columna 4. A las 24 h se inoculó con C4, a las 25 h con IP383 y a las 28 h se recogieron todos los sobrenadantes.

#### 8.3.4.5. Cuantificación de citokinas

Los niveles de citokinas en los sobrenadantes de cultivo se cuantificaron mediante estuches comerciales por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Las concentraciones problema se determinaron por interpolación en la recta de calibrado obtenida a partir de las densidades ópticas correspondientes a estándares de concentraciones conocidas, suministrados por la casa comercial y de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El procedimiento general se ilustra en la Figura 8.5.

Las citokinas ensayadas fueron TNF- $\alpha$ , IL-10, IL-12 e IFN- $\alpha$ . Las lecturas de las absorbancias se realizaron en un lector MicroELISA, a 450 nm y 550 nm para las citokinas IL-10, IL-12 y TNF- $\alpha$ , y solo a 450 para IFN- $\alpha$ .

Para el análisis estadístico, se determinaron las medias y desviaciones estándar de los valores obtenidos. Las diferencias entre los grupos de medidas se determinaron mediante la prueba *t* de Student. Los valores de  $P \leq 0,05$  se consideraron significativos.



**Figura 8.5. Esquema general de los ensayos de ELISA.** (1) La superficie de los pocillos está sensibilizada con el anticuerpo de captura específico para la citokina a medir. (2) Adición de las muestras y patrón para la reacción Ag (antígeno) - Ac (anticuerpo). (3) Adición del anticuerpo de detección conjugado con biotina. (4) Adición de estreptavidina conjugada con la enzima peroxidasa de rábano (HRP). (5) Adición de sustrato TMB y generación de un producto coloreado. Lectura en espectrofotómetro.

### 8.3.5. Actividad inmunomoduladora de *L. plantarum* C4 sobre la capacidad de los esplenocitos de ratón para responder a mitógenos de células B y T.

#### 8.3.5.1. Animales

Se emplearon ratones BALB/c, hembras, de 8 a 12 semanas de edad y de 18 a 22 g de peso, procedentes de Janvier Labs (Saint Berthevin, Francia). Los animales se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos con libre acceso a pienso estándar (dieta AO4, Panlab, Barcelona) y agua estéril, y se distribuyeron en dos grupos de 5 ratones cada uno.

#### 8.3.5.2. Inoculación de los ratones con *L. plantarum* C4

El grupo de animales tratados fueron inoculados cada día con una dosis de  $10^9$  bacterias/ml de *L. plantarum* C4 en un volumen de 100  $\mu$ l de vehículo por ratón durante 18 días. Como vehículo se utilizó leche comercial descremada estéril. La administración se realizó por vía intragástrica empleando una cánula de alimentación de acero inoxidable conectada a una jeringa estéril de 1 ml. El

grupo control fue tratado con el mismo volumen de leche descremada estéril durante el mismo tiempo.

Para la estandarización del inóculo, se partió de un cultivo de 24 horas de la cepa C4 en placa de agar MRS a 37°C. A partir de este cultivo, se preparó una suspensión bacteriana en búfer fosfato pH 7,2 estéril a una concentración de  $10^{10}$  bacterias/ml por comparación visual con una suspensión conocida. 1 ml de esta suspensión fue adicionado a 9 ml de leche descremada estéril para obtener la suspensión de  $10^9$  bacterias/ml. Para comprobar la concentración real de las suspensiones se realizaron diluciones decimales en búfer fosfato salino (PBS) pH 7,2 estéril y sembrando gotas de 10  $\mu$ l en las placas con agar MRS y agar TSA. Una vez culminado el programa de inoculación de los ratones se procedió a la obtención de heces (en su defecto, contenido cecal) y a su posterior sacrificio para obtener la suspensión de esplenocitos.

### 8.3.5.3. Cultivo de esplenocitos y respuesta a mitógenos

Una vez obtenida las heces de cada ratón, éstos fueron sacrificados. Tras aseptizar la superficie corporal con etanol al 96%, se dispusieron sobre soportes previamente aseptizados en el interior de una cabina de flujo laminar. Utilizando material quirúrgico estéril, se practicaron sucesivas incisiones en la piel y en el peritoneo para extraer el bazo que se dispuso sobre una rejilla metálica estéril depositada en el interior de una placa de Petri también estéril, conteniendo ésta 10 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Tabla 8.2).

**Tabla 8.2. Suplementación del medio RPMI 1640 para esplenocitos.**

| Componente                    | Concentración por litro | Volumen p/100 ml         |
|-------------------------------|-------------------------|--------------------------|
| L-glutamina                   | 2 mM                    | 1 ml                     |
| Piruvato sódico               | 1 mM                    | 1 ml                     |
| 2-mercaptoetanol <sup>a</sup> | 50 $\mu$ M              | 350 $\mu$ l <sup>b</sup> |
| Suero fetal bovino            | 90,9 ml                 | 10 ml                    |

<sup>a</sup>Se añade 2-mercaptoetanol al medio para favorecer la proliferación de los esplenocitos. <sup>b</sup>Volumen a tomar de una dilución 1:1000 en PBS del producto comercial.

Se procedió a homogenizar el bazo presionando sobre la rejilla con el extremo ancho de una jeringa de 5 ml estéril. Se dejaron decantar los restos tisulares macroscópicos y se llevó la suspensión celular a un tubo de centrifuga de 15 ml. Las células se sedimentaron por centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos y a 5°C en centrifuga Kokusan H-103N, desechando posteriormente el sobrenadante. El sedimento celular obtenido fue resuspendido en 5 ml de tampón de lisis de hematíes (sigma) estéril. La suspensión fue incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos, tras lo cual se añadieron 5 ml de medio de cultivo para proteger las células nucleadas de daño hipotónico. A continuación se realizó un lavado por centrifugación en las condiciones ya descritas y se resuspendieron en 10 ml de medio fresco.

De la suspensión de esplenocitos se tomaron 100 µl que se llevaron a un tubo eppendorf sobre 500 µl de Azul tripán (Sigma) y 400 µl de medio de cultivo celular RPMI 1640. Con esta dilución a 1:10 se llenó una cámara hemocitométrica de Neubauer para proceder al recuento de células viables y además comprobar que la viabilidad estuviese por encima del 95%. Las suspensiones con viabilidad inferior fueron eliminadas. La suspensión original se centrifugó en las condiciones descritas anteriormente y el sedimento celular se resuspendió en un volumen apropiado de medio de cultivo, para conseguir una concentración de  $5 \times 10^6$  células viables por ml.

Las células se cultivaron en placas microtiter de poliestireno de 96 pocillos de fondo plano. Se distribuyeron 100 µl de suspensión por pocillo de modo que cada pocillo recibió  $5 \times 10^5$  células. La suspensión (procedente del pool de esplenocitos de varios ratones) se distribuyó en 3 columnas de 8 pocillos. Se añadió 10 µl de LPS (mitógeno estándar de células B) a cada uno de los 8 pocillos de una columna y 10 µl de Concanavalina A (ConA, mitógeno estándar de células T) a la siguiente columna. La columna restante se correspondió con los controles que no recibieron estímulo mitogénico. Las concentraciones finales fueron 2,5 µg/ml para LPS y 1 µg/ml para Con A. Las placas se incubaron a 37°C, 5% de tensión de CO<sub>2</sub> y humedad a saturación durante 72 horas, tras lo cual se procedió a la lectura de la proliferación celular.

La proliferación celular se determinó por el método colorimétrico descrito por Mosmann (1983). Tras los tres días de incubación, se añadieron a cada pocillo 10 µl de solución de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio) MTT (sigma) al 0,5% en PBS y se incubaron durante 4 horas. En este tiempo las células metabólicamente activas reducen el MTT a un derivado tetrazólico coloreado. Transcurrida esta incubación, cada pocillo recibió 100 µl de isopropanol ácido (0,42 ml de HCL al 35% por cada 100 ml de isopropanol), con el fin de extraer de las células el colorante reducido. Se aspiró y expelió



varias veces el contenido de cada pocillo, para solubilizar completamente los cristales del colorante reducido. La densidad óptica de los cultivos se determinó en un lector de microELISA, a una absorbancia de 550 nm (test) y 650 nm (referencia). Los resultados se expresaron como la media aritmética de las densidades ópticas obtenidas para cada mitógeno (Leiva, 2008).

### **8.3.6. Efecto de C4 sobre la infección intestinal con *Y. enterocolitica* O9 *in vivo***

#### **8.3.6.1. Animales**

Se emplearon 36 ratones BALB/c hembras libres de patógenos, de 6 semanas de edad, procedentes de Janvier Labs (Saint Berthevin, Francia). Se hicieron seis grupos de seis animales cada uno y se colocaron en condiciones de barrera estándar en jaulas con pisos de rejilla de acero en la Unidad de Experimentación Animal de la Universidad de Granada. Todos los experimentos con animales se llevaron a cabo de conformidad con las directrices del Convenio Europeo para la protección de los animales vertebrados utilizados con fines experimentales y otros fines científicos (Directiva 86/609/CEE) y supervisados por el Comité de Bioética de la Universidad de Granada.

#### **8.3.6.2. Preparación de la leche fermentada adicionada con *L. plantarum* C4**

La leche fermentada adicionada de *L. plantarum* C4 fue suministrada por el Departamento de Nutrición de la Universidad de Granada y se fabricó de acuerdo al procedimiento descrito por Bergillos-Meca *et al.* (2015). De forma resumida, el proceso de preparación fue el siguiente: la leche cruda de cabra se desnató, se concentró y se calentó a 80°C durante 30 min. Una vez enfriada, se inoculó con los iniciadores tradicionales utilizados en la fabricación de yogur (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*), así como con *L. plantarum* C4. El inóculo de C4 fue preparado a partir de una suspensión en búfer fosfato salino a concentración conocida, que fue posteriormente centrifugada para ser agregada a la leche. La leche y los inóculos se incubaron a 37°C durante 6 h.

### **8.3.6.3. Inoculación de los animales**

Dos grupos (1 y 2) de animales recibieron una dosis de  $10^9$  bacterias viables de la cepa C4 en 100  $\mu$ l de leche fermentada, una vez al día por vía intragástrica, durante 19 días. La administración se realizó con una aguja de alimentación de acero inoxidable y una jeringa de 1 ml. Otros dos grupos (3 y 4) recibieron 100  $\mu$ l de leche fermentada sin C4 y los grupos (5 y 6) recibieron 100  $\mu$ l de agua en las mismas condiciones. Para la evaluación del número real de bacterias C4 viables, se sembraron diluciones del inóculo en placas con agar LPSM y se registró el número de UFC después de 24 h de incubación a 37°C.

### **8.3.6.4. Infección experimental con *Y. enterocolitica* O9 IP383**

La cepa de *Y. enterocolitica* IP383 fue cultivada en TSA a 25°C durante 24 h, se recogió, se lavó y se resuspendió en agua estéril. El número real de bacterias IP383 fue evaluado por siembra de las diluciones decimales preparadas en agar CIN e incubadas a 37°C durante 24 h. Los ratones fueron desafiados con una dosis única de  $10^8$  bacterias viables en 100  $\mu$ l de agua por la vía intragástrica.

### **8.3.6.5. Detección de *Y. enterocolitica* O9 en heces y placas de Peyer**

Para la evaluación de la excreción fecal de IP383, las heces recién recogidas se pesaron y se homogeneizaron en PBS estéril y las diluciones apropiadas de los homogeneizados se sembraron en placas de agar CIN para su recuento. Para la detección de *Yersinia* en las placas de Peyer (PP), los ratones se sacrificaron por asfixia con CO<sub>2</sub> en diversos puntos temporales después de la infección, las PP se extrajeron asépticamente, se homogeneizaron en PBS estéril y se procesaron como se ha descrito anteriormente para las heces. Se registró el crecimiento bacteriano en las placas de agar CIN después de las 48 h de incubación a 25°C.

### **8.3.6.6. Medición de citocinas e IgA**

Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de ketamina y xilazina antes de la obtención de sangre a través de una punción cardíaca. La sangre completa se recogió en tubos con EDTA a fin de separar el plasma para los ensayos de citocinas. A continuación, los ratones se sacrificaron y el contenido

cecal se retiró, pesó y homogeneizó en PBS. Las citokinas y la IgA total se determinaron en homogeneizados cecales usando estuches comerciales de ELISA.

#### **8.3.6.7. Análisis estadístico**

Se analizó la significación estadística de las diferencias en la persistencia de *Yersinia* en heces o en las PP de los ratones tratados con el probiótico y los no tratados, usando la prueba no paramétrica de Wilcoxon. Los resultados de las determinaciones de citokinas e IgA se expresaron como medias y desviaciones estándar y, para las comparaciones de los valores medios de los ratones tratados con probióticos y los no tratados se usó la prueba *t* de Student. Los valores de  $P \leq 0,05$  se consideraron significativos.

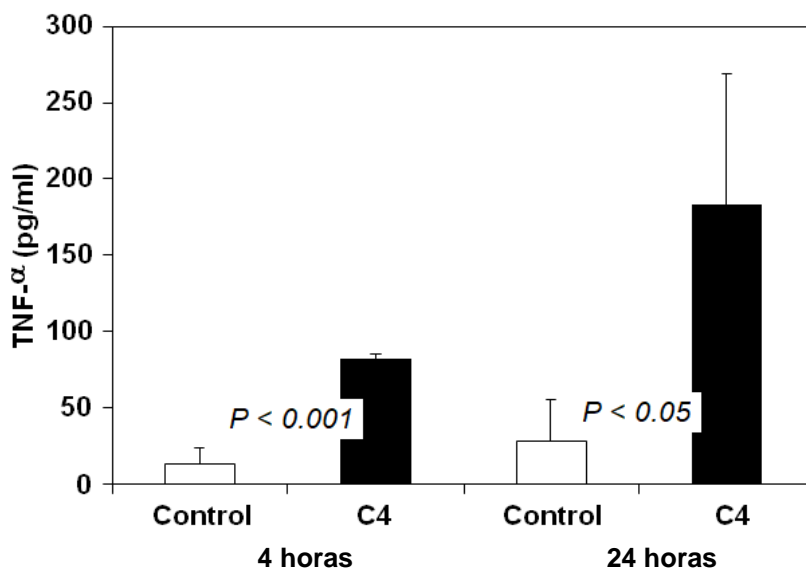
### **8.4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

#### **8.4.1. Actividad inmunomoduladora de *L. plantarum* C4 sobre células Raw 264.7**

En primer lugar, se examinó la respuesta de las monocapas de células Raw 264.7 al estímulo de la cepa C4, inactivada por calor. Los ensayos con bacterias inactivadas por calor ofrecen algunas ventajas: al excluir la actividad metabólica de las bacterias, se facilita el estudio de los efectos de sus componentes estructurales potencialmente bioactivos; en el caso de bacterias Gram-positivas como los lactobacilos, existen varios candidatos, principalmente componentes de la pared como los ácidos lipoteicoicos o la mureína (Lee *et al.*, 2013; Noh *et al.*, 2015) y otras moléculas superficiales como polisacáridos y glicoproteínas (Lebeer *et al.*, 2008; Donkor *et al.*, 2012; Ghadimi *et al.*, 2014). Adicionalmente, los tiempos de incubación de células de mamífero con bacterias muertas pueden prolongarse durante 24 h o más, sin que se incremente la relación entre el número de bacterias y el de células y sin que la actividad metabólica de las bacterias consuma los nutrientes del medio y acumule metabolitos tóxicos o modifique el pH. Sin embargo, estos ensayos tienen la limitación de que no reproducen las interacciones protagonizadas por bacterias vivas, funcionalmente activas, capaces de secretar moléculas con

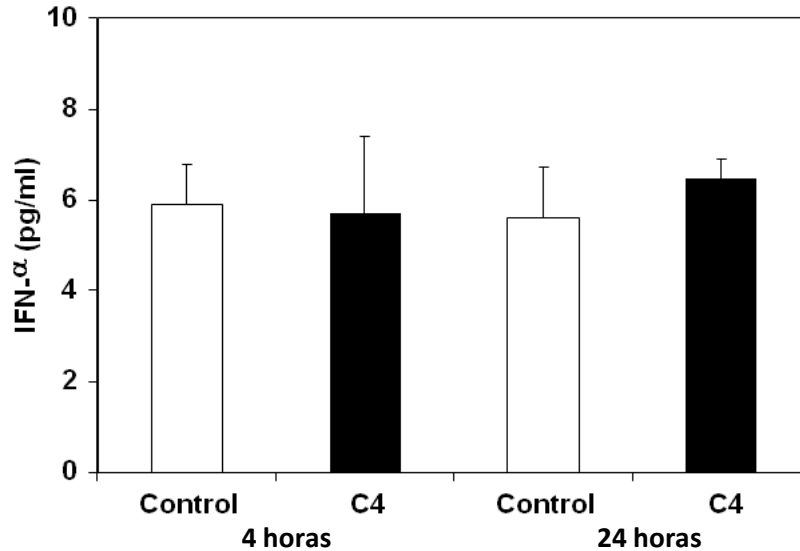
actividad biológica y de establecer un diálogo molecular con las células del hospedador o con otros microorganismos presentes en la microbiota intestinal (Adams, 2010).

La Figura 8.6 presenta las determinaciones de TNF- $\alpha$  en sobrenadantes de cultivos de células Raw 264.7 incubadas con la cepa C4, muerta por calor, durante periodos de 4 y 24 h. En ambos casos, C4 estimuló la producción de TNF- $\alpha$  hasta seis veces en comparación con los cultivos control de células Raw 264.7 sin estimular. Estos resultados sugieren que algún o algunos componentes de C4 promueven la producción de esta citokina proinflamatoria por macrófagos.



**Figura 8.6. Producción de TNF- $\alpha$  por células Raw 264.7 inoculadas con *L. plantarum* C4 muerto por calor.** Las monocapas de Raw 264.7 se inocularon con suspensiones de C4 inactivadas por tratamiento térmico y se incubaron durante 4 y 24 horas. Los resultados representan las medias de cuatro determinaciones (más la desviación estándar). Los valores de P indican diferencias significativas de los cultivos inoculados con C4 en relación con sus correspondientes controles.

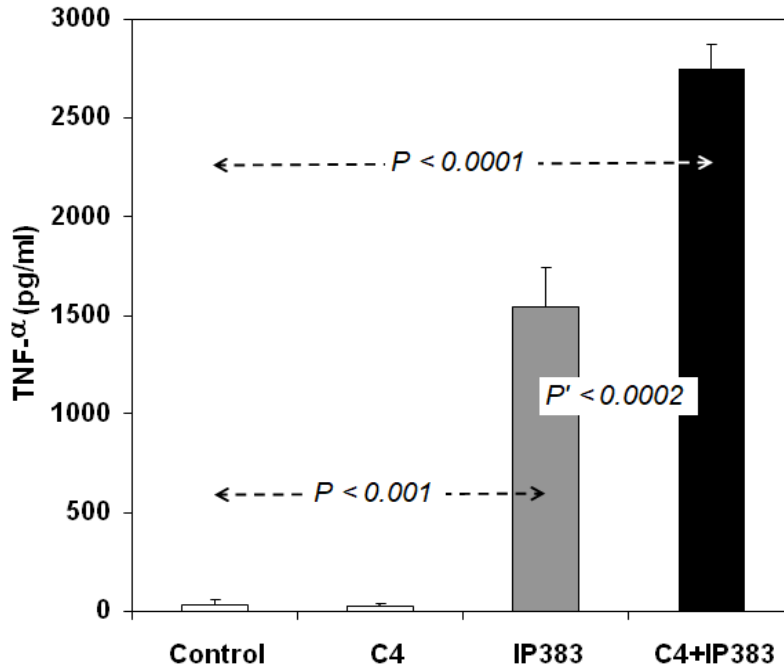
En lo que se refiere a la producción de IFN- $\alpha$ , como se muestra en la Figura 8.7, la incubación con C4 inactivada por calor no modificó significativamente su producción respecto de los niveles basales medidos en los respectivos cultivos control.



**Figura 8.7. Producción de IFN- $\alpha$  por células Raw 264.7 inoculadas con *L. plantarum* C4 muerto por calor.** Las condiciones del ensayo fueron las mismas descritas en el pie de la Figura 8.6. Los resultados representan las medias de cuatro determinaciones (mas la desviación estándar). No se observaron diferencias significativas entre los cultivos inoculados con C4 y sus correspondientes controles.

En el siguiente grupo de experimentos las monocapas de Raw 264.7 se incubaron en presencia de bacterias vivas. Esto permitió estudiar la acción de C4 viva para compararla con los efectos observados con C4 inactivada en los ensayos anteriores. Adicionalmente, se examinó la influencia de C4 viva en la respuesta de citocinas inducida por la bacteria enteropatógena *Y. enterocolitica* O9. Las monocapas de Raw 264.7 se incubaron durante 4 h en presencia de C4; transcurrida la primera hora, se adicionó la cepa IP383 de *Y. enterocolitica*, que se mantuvo por tanto 3 h en cocultivo con la monocapa. Los ensayos incluyeron monocapas control (sin bacterias), monocapas incubadas 4 h con C4 sola y monocapas incubadas 3 h con IP383 sola. En la Figura 8.8 se presentan las determinaciones de TNF- $\alpha$ . En primer lugar, se observa que la incubación durante 4 h con C4 viva no modificó la producción basal de esta citokina. Sin embargo, los ensayos anteriores mostraron que la incubación con C4 inactivada, durante el mismo periodo de tiempo, incrementó en más de seis veces el nivel de TNF- $\alpha$  en los sobrenadantes. Aparentemente, el hecho de que una bacteria probiótica inactivada por calor es capaz de inducir una potente respuesta proinflamatoria, mientras que la misma bacteria viva carece de dicha capacidad, es inusual y llama la atención. Aunque se reconoce que muchas bacterias probióticas pueden ejercer sus efectos beneficiosos tanto vivas como muertas (Adams, 2010), en la mayoría de los estudios

comparativos se encuentra que la actividad probiótica es claramente superior en las bacterias vivas, tanto *in vitro* (Donkor *et al.*, 2012; Karlsson *et al.*, 2012; Fang *et al.*, 2014) como *in vivo* (Kim *et al.*, 2013).



**Figura 8.8. Influencia de *L. plantarum* C4 en la producción de TNF- $\alpha$  por células Raw 264.7 infectadas con *Y. enterocolitica* IP383.** Las monocapas de Raw 264.7 se inocularon con cultivos vivos de C4 y de IP383. Los sobrenadantes se recogieron 4 horas después de la inoculación con C4 y 3 h después de la infección con IP383. Los resultados representan las medias de cuatro determinaciones (más la desviación estándar). Los valores P indican diferencias significativas de los cultivos inoculados con IP383 y con la combinación de C4 e IP383 en relación con el cultivo control. El valor de P' indica que la diferencia entre los cultivos infectados con IP383 sin y con pretratamiento con C4 fue significativa.

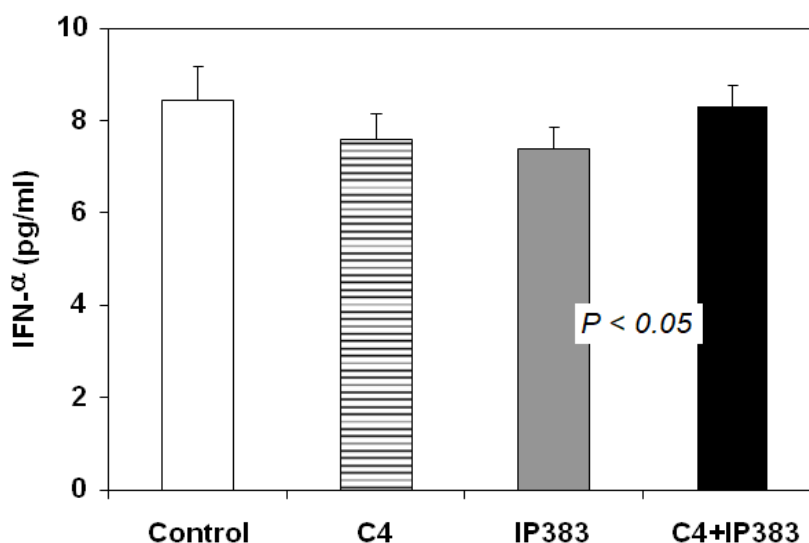
Sin embargo, Wang *et al.* (2013), trabajando con células Raw 264.7 estimuladas con una cepa probiótica de *Lactobacillus casei*, han observado una transcripción diferencial de los genes que codifican diversos TLRs en función de que las bacterias estuviesen vivas o muertas por calor, en consecuencia, las bacterias vivas mostraron capacidad para suprimir significativamente la respuesta de mediadores de inflamación, incluyendo TNF- $\alpha$ . Esta observación podría explicar nuestros resultados. Adicionalmente, hay que considerar que algunos lactobacilos producen proteasas capaces de degradar citokinas proinflamatorias (von Schillde *et al.*, 2012). Si este fuese el caso de la cepa C4,

está claro que la promoción de la actividad proinflamatoria no se detectaría con bacterias vivas, con actividad proteolítica; sin embargo, actualmente no poseemos evidencias de que C4 produzca proteasas capaces de degradar TNF- $\alpha$ .

La Figura 8.8 muestra también que la cepa IP383 indujo una notable producción de TNF- $\alpha$  por las células Raw 264.7. Esta citokina proinflamatoria es una molécula crucial en la inmunidad innata frente a infecciones bacterianas (Pfeffer, 2003) y desempeña un papel prominente en la defensa frente a *Y. enterocolitica* (Autenrieth *et al.*, 1992; Autenrieth *et al.*, 1996). En nuestros ensayos, el pretratamiento de las células Raw 264.7 con C4 incrementó significativamente la respuesta de TNF- $\alpha$  frente a IP383 en comparación con la respuesta inducidos por IP383 sola, lo que sugiere un claro efecto inmunoestimulador de C4 que se puede traducir en términos de un incremento de la resistencia a la infección por la enterobacteria. Dado que la reacción inflamatoria causa un daño tisular, la producción excesiva de citokinas proinflamatorias puede resultar perjudicial para el hospedador y, de hecho, se admite que algunos probióticos con actividad antiinflamatoria son capaces de limitar los daños causados en el curso de infecciones por bacterias como *Salmonella enterica* (Eom *et al.*, 2015) o *Helicobacter pylori* (Myllyluoma *et al.*, 2008). Por tanto, la actividad antiinflamatoria de algunos probióticos puede reportar beneficios al hospedador, pero también puede disminuir la resistencia frente a la infección (Steinberg *et al.*, 2014). En nuestro caso, es de destacar que C4 viva no induce de por sí producción de TNF- $\alpha$ , pero es capaz de potenciar notablemente su producción en respuesta a *Y. enterocolitica*, es decir, solo promueve la respuesta defensiva en presencia del agente patógeno.

En los ensayos con bacterias vivas también se midieron los niveles de IFN- $\alpha$  en los sobrenadantes de los cultivos de células Raw 264.7. Los resultados se presentan en la Figura 8.9. Ninguna de las bacterias ensayadas, ni su combinación, modificó significativamente la producción de IFN- $\alpha$  en relación con los cultivos control no infectados. Sin embargo, en los sobrenadantes de las monocapas incubadas con IP383 sola, los niveles de esta citokina antiviral fueron menores que en los controles y esta disminución rozó la significación estadística ( $P = 0.0606$ ); pero el pretratamiento con C4 abolió esta inhibición: los niveles de IFN- $\alpha$  en sobrenadantes de monocapas inoculadas con la combinación de C4 e IP383 fueron moderada pero significativamente mayores que los niveles en sobrenadantes de monocapas inoculadas con IP383 solo. Estos datos podrían interpretarse en el sentido de que la infección con *Y. enterocolitica* se asocia a una ligera depresión de la capacidad de respuesta frente a infecciones virales, pero la cepa C4 es capaz de revertir esta situación

y llevarla a la normalidad. Se precisan nuevos estudios para documentar este posible efecto de la cepa probiótica.



**Figura 8.9. Influencia de *L. plantarum* C4 en la producción de IFN- $\alpha$  por células Raw 264.7 infectadas con *Y. enterocolitica* IP383.** Las condiciones del ensayo fueron las mismas descritas en el pie de la Figura 8.8. Los resultados representan las medias de cuatro determinaciones (más la desviación estándar). La diferencia entre los cultivos infectados con IP383 sin y con pretratamiento con C4 fue significativa.

Finalmente, hay que reseñar que las determinaciones de IL-10 y de IL-12 no ofrecieron niveles detectables de ninguna de estas citocinas en la mayoría de los sobrenadantes examinados, motivo por el cual no se incluyen resultados de las mismas. Las razones de esta ausencia de valores detectables no están claras. La línea Raw 264.7 ha sido utilizada por otros autores para medir la producción de IL-10, aunque en algunas condiciones experimentales sus niveles son indetectables (Yamamoto *et al.*, 2007), como ocurre en nuestro caso. Hay que tener presente que IL-10 es una citocina antiinflamatoria, que suele presentar una correlación negativa con las citocinas proinflamatorias como TNF- $\alpha$  (Mege *et al.*, 2006). En estudios previos, nuestro equipo ha encontrado que *L. plantarum* C4 inhibe la producción de IL-10 y que algunos efectos antiinflamatorios de esta cepa están mediados por un mecanismo independiente de IL-10 (Jiménez-Valera *et al.*, 2013). En cuanto a IL-12, su producción por células Raw 264.7 sometidas a diversos estímulos es frecuentemente muy escasa (Yamamoto *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2008), lo que supone una limitación experimental dado el interés de esta citocina inmunorreguladora.



#### 8.4.2. Influencia de C4 en la capacidad de los esplenocitos para proliferar en respuesta a mitógenos.

Para investigar los posibles efectos inmunomoduladores de la administración de *L. plantarum* C4 por vía intragástrica, durante 18 días consecutivos, se obtuvieron los bazo y se realizaron recuentos de células nucleadas viables. Los resultados, que se muestran en la Tabla 8.3, revelan que no hubo ninguna diferencia significativa en el tamaño de la población de esplenocitos.

**Tabla 8.3. Número de esplenocitos en ratones testigos y tratados con C4.**

| Ratón                 | Grupo         | Esplenocitos por bazo (x10 <sup>6</sup> ) |
|-----------------------|---------------|---|
| 1                     | Control       | 88  |
| 2                     |               | 84  |
| 3                     |               | 105                                       |
| 4                     |               | 79  |
| 5                     |               | 71  |
| <b>Media</b>          |               | <b>85,4</b>                               |
| <b>DE<sup>a</sup></b> |               | <b>12,66</b>                              |
| 6                     | Tratado       | 45  |
| 7                     |               | 100                                       |
| 8                     |               | 61  |
| 9                     |               | 163                                       |
| 10                    |               | 60  |
| Media                 |               | 85,8                                      |
| <b>DE<sup>a</sup></b> | <b>47,71</b>  |   |
| <b>P<sup>b</sup></b>  | <b>0,9831</b> |   |

<sup>a</sup>Desviación estándar.

<sup>b</sup>Calculada mediante la prueba t de Student (significación < 0,05).

Estos resultados son consistentes con la ausencia de esplenomegalia observable en los animales tratados con C4. La esplenomegalia es un síntoma característico de diversas infecciones causadas por protozoos, bacterias y virus, y es la consecuencia de una reacción inflamatoria que acumula células fagocíticas en el bazo colonizado por microorganismos patógenos (Stevens *et al.*, 1994). El bazo es un órgano muy irrigado y rico en fagocitos fijos, por lo que (junto con el hígado) juega un papel crucial en la depuración de partículas extrañas y microorganismos que hayan alcanzado la circulación sanguínea. La inducción de esplenomegalia se considera por tanto un efecto indeseable para un probiótico (Kuo *et al.*, 2013). Se ha comprobado que la administración oral de otros lactobacilos probióticos vivos no induce modificaciones significativas en el peso del bazo ni en su contenido en linfocitos (Kirjavainen *et al.*, 1999; Bernardeau *et al.*, 2002).

La Tabla 8.4. muestra las determinaciones y el cálculo de la proliferación de esplenocitos correspondiente a un ratón del grupo testigo. Las suspensiones de esplenocitos se cultivaron en ausencia de estímulo (blancos) y en presencia de los mitógenos LPS y ConA, para examinar la capacidad de respuesta de los linfocitos B y T, respectivamente. Como se ha descrito anteriormente, la proliferación celular se midió por un método no radiactivo, basado en la reducción del MTT.

**Tabla 8.4. Ejemplo del cálculo de la proliferación de esplenocitos.**

| Fila <sup>a</sup>     | Filtro | Densidades ópticas en las columnas indicadas <sup>a,b</sup> |         |          |
|-----------------------|--------|---|---------|----------|
|                       |        | 1 (Blanco)  | 2 (LPS) | 3 (ConA) |
| A                     | 550 nm | 0,255   | 0,655   | 1,117    |
| B                     |        | 0,282   | 0,660   | 1,037    |
| C                     |        | 0,261   | 0,686   | 1,130    |
| D                     |        | 0,281   | 0,684   | 1,123    |
| E                     |        | 0,254   | 0,693   | 1,153    |
| F                     |        | 0,250   | 0,712   | 1,107    |
| G                     |        | 0,264   | 0,696   | 1,095    |
| H                     |        | 0,241   | 0,742   | 1,128    |
| A                     | 650 nm | 0,073   | 0,126   | 0,194    |
| B                     |        | 0,080   | 0,129   | 0,182    |
| C                     |        | 0,083   | 0,134   | 0,205    |
| D                     |        | 0,084   | 0,135   | 0,208    |
| E                     |        | 0,087   | 0,142   | 0,222    |
| F                     |        | 0,089   | 0,141   | 0,214    |
| G                     |        | 0,083   | 0,133   | 0,207    |
| H                     |        | 0,078   | 0,139   | 0,205    |
| Diferencia 550-650 nm |        | 0,182   | 0,529   | 0,923    |
|                       |        | 0,202   | 0,531   | 0,855    |
|                       |        | 0,178   | 0,552   | 0,925    |
|                       |        | 0,197   | 0,549   | 0,915    |
|                       |        | 0,167   | 0,551   | 0,931    |
|                       |        | 0,161   | 0,571   | 0,893    |
|                       |        | 0,181   | 0,563   | 0,888    |
|                       |        | 0,163   | 0,603   | 0,923    |

<sup>a</sup>Filas y columnas de una placa de microtiter de 96 pocillos; cada valor corresponde a la media de la densidad óptica (DO) de un pocillo.

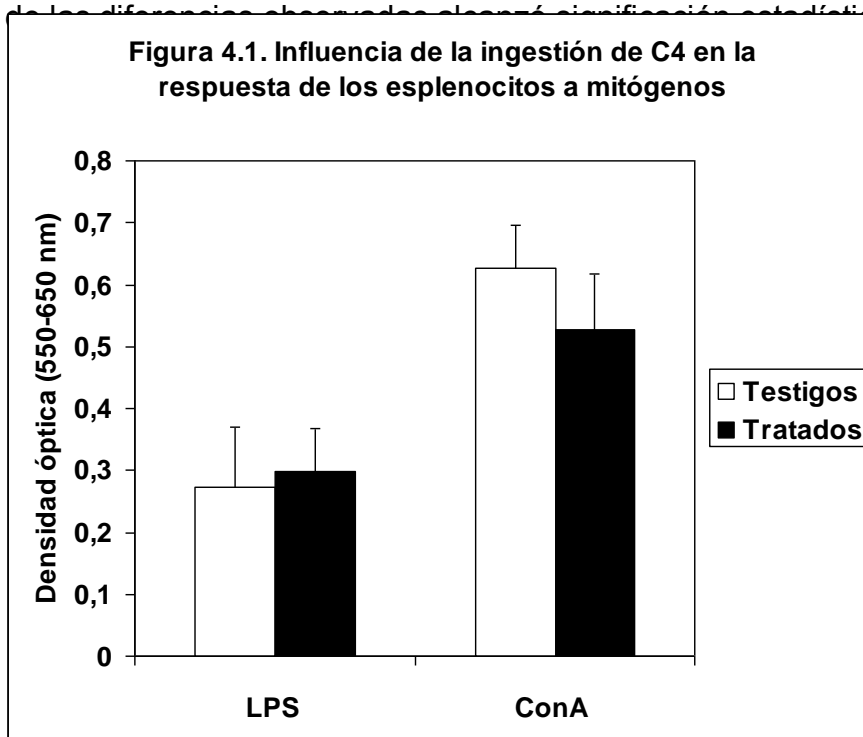
<sup>b</sup>Los cultivos en las columnas 2 y 3 se hicieron en presencia de LPS y ConA.

<sup>c</sup>La proliferación se mide por la diferencia entre la media de densidad óptica de los cultivos estimulados con un mitógeno y la media de DO de los cultivos sin estimular.

Los esplenocitos de cada bazo se habían cultivado en 24 pocillos distribuidos en tres columnas: los ocho pocillos de la primera columna eran blancos, los

ocho de la segunda se estimularon con LPS y los ocho de la tercera con ConA. Para cada pocillo, se determinó la absorbancia en los lisados de esplenocitos, a 550 y a 650 nm, y a la primera se restó a segunda. Se calculó el promedio de los ocho valores obtenidos para los ocho pocillos de cada columna. Finalmente, al promedio de cada columna de cultivos estimulados con mitógenos se le restó el promedio de la columna de cultivos blancos, sin estimular.

Una vez obtenidos los resultados de proliferación correspondientes a los esplenocitos de cada ratón, se calcularon los promedios para el grupo testigo y para el grupo tratado con C4, y se analizó la significación estadística de las diferencias observadas. Los resultados se presentan en la Figura 8.10. Ninguna de las diferencias observadas alcanzó significación estadística.



**Figura 8.10. Influencia de la ingestión de C4 en la respuesta de los esplenocitos a mitógenos.** Valores de P: para la comparación de respuestas a LPS,  $P = 0,6692$ ; para la comparación de respuestas a ConA,  $P = 0,0889$ .

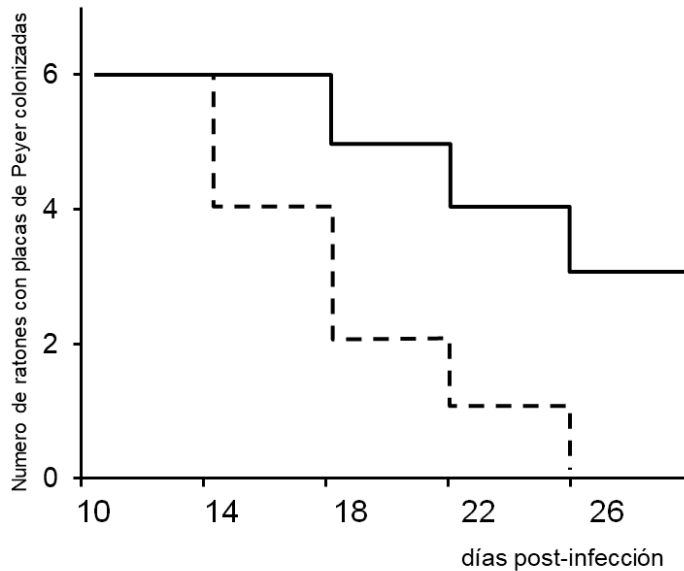
Por tanto, el tratamiento con C4 no tuvo repercusión en la capacidad de respuesta de los linfocitos a nivel sistémico. Un enfoque ya clásico en el estudio de las interacciones entre probióticos e inmunidad pasa por examinar los efectos de la incubación de leucocitos periféricos, esplenocitos o líneas leucocitarias estables (linfocitos y macrófagos) con bacterias probióticas vivas, muertas o con fracciones o metabolitos suyos. Partiendo de este enfoque, numerosas publicaciones han demostrado que las células inmunitarias son

fácilmente estimuladas *in vitro*, con diversos efectos, reflejados generalmente en la producción de citokinas pro- o anti-inflamatorias, inmunorreguladoras, antivirales, quimiokinas, etc. (Leber *et al.*, 2008; Adams, 2010; Donkor *et al.*, 2012). Sin embargo, esta información no es apenas relevante para conocer los efectos de la ingestión de probióticos sobre la inmunidad, dadas las distintas condiciones y factores que se dan en los experimentos *in vitro* respecto de los ensayos *in* o *ex vivo*. En nuestro caso, es muy interesante notar que en el presente estudio no se han detectado modificaciones adversas de la capacidad de respuesta sistémica en ratones inmunológicamente intactos, pero tenemos evidencias previas de que C4 puede ejercer una significativa acción inmunorrestauradora en ratones inmunosuprimidos por tratamiento con ciclofosfamida (Bujalance *et al.*, 2007). Si este perfil de inmunomodulación se confirma, estaríamos ante una bacteria que no modifica la inmunidad intacta pero sí ayuda a la recuperación de funciones inmunitarias deterioradas. En posteriores investigaciones, se deberá examinar si C4 ejerce efectos inmunomoduladores sobre la inmunidad mucosal, con el fin de tener un panorama completo de su potencial como agente modificador de la respuesta biológica.

#### **8.4.3. Efecto del tratamiento con *L. plantarum* C4 en la infección experimental con *Y. enterocolitica* O9 en el ratón.**

En un estudio previo encontramos que el curso de la excreción fecal de *Y. enterocolitica* O9 en ratones infectados por vía oral no se modificó por la administración previa de *L. plantarum* C4 adicionado a leche no fermentada (Bujalance *et al.*, 2014). Dado que, en el modelo de infección oral por ratón, las yersinias invaden las placas de Peyer (Oellerich *et al.*, 2007), decidimos determinar si el tratamiento con C4 afecta la persistencia de yersinias en las placas de Peyer. Los ratones recibieron C4 en leche fermentada una vez al día hasta el día de su sacrificio mientras que los ratones control solo recibieron leche fermentada. En el día 10, los animales fueron desafiados con IP383. Dos grupos de ratones infectados (control no tratado y ratones tratados con C4, n = 6 en cada grupo) se sacrificaron en diversos momentos después de la infección (días 14, 18, 22, 26 y 30) para la detección de yersinia en las PP. El tratamiento con C4 no fue capaz de acortar la persistencia de yersinias en la luz intestinal (datos no mostrados). Sin embargo, los resultados mostrados en la Figura 8.11. demuestran que los cultivos de las PP de ratones tratados con C4 se volvieron negativos antes que los de los ratones no tratados, y la diferencia fue estadísticamente significativa (P <0,05). Este experimento se repitió con

resultados similares (datos no mostrados). Esto sugiere que C4 promovió la eliminación de IP383 en las placas de Peyer del ratón.

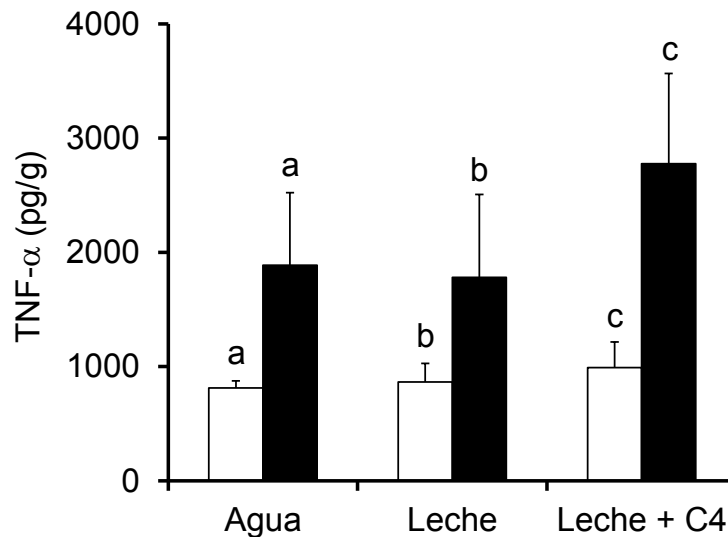


**Figura 8.11. Medición del curso temporal de la colonización de las PP por *Y. enterocolitica*.** Los grupos de seis ratones BALB/c control (línea continua) y tratados con C4 (línea discontinua) se sacrificaron en diversos momentos después de la infección para detectar yersinias en las PP. La diferencia en la cinética de depuración entre los ratones tratados con C4 y los controles no tratados fue significativa de acuerdo con la prueba de Wilcoxon ( $P < 0,05$ ).

#### 8.4.4. Efectos del tratamiento con *L. plantarum* C4 en la producción intestinal de citocinas e IgA en ratones no infectados e infectados con *Y. enterocolitica* O9.

Para examinar los efectos de C4 en la respuesta intestinal a la infección con IP383, y para diferenciarlos de los posibles efectos del vehículo de leche fermentada, los ratones se dividieron aleatoriamente en tres grupos (cada grupo de 12 ratones): Un grupo de ratones recibió C4 suspendido en leche fermentada durante 19 días consecutivos, otro grupo recibió leche fermentada y un tercer grupo (control no tratado) recibió agua durante el mismo período. La mitad de los animales de cada grupo se expusieron a IP383 el día 17. Las muestras cecales se tomaron al final del experimento, el día 20.

Como se muestra en la Figura 8.12 la infección con IP383 aumentó significativamente el nivel de la citokina proinflamatoria TNF- $\alpha$  en los ratones control ( $P < 0.01$ ), en los ratones que recibieron leche fermentada ( $P < 0.05$ ) y en aquellos tratados con C4 ( $P < 0.002$ ). Curiosamente, el nivel cecal de TNF- $\alpha$  fue significativamente mayor en ratones infectados que recibieron C4 que en ratones infectados que recibieron leche fermentada sola ( $P < 0.05$ ).

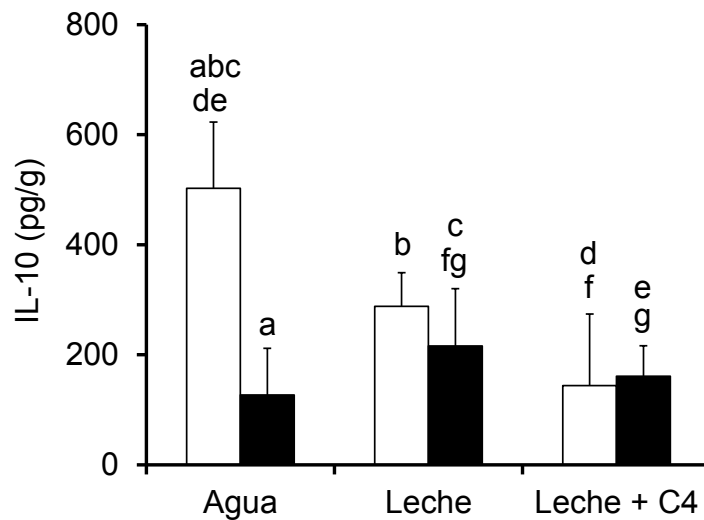


**Figura 8.12. Niveles de TNF- $\alpha$  en el contenido cecal de ratones no infectados (barras blancas) e infectados con *Y. enterocolitica* (barras negras).** Los resultados se informan como las medias más la desviación estándar de los datos de seis ratones. La misma letra sobre 2 barras indica que las diferencias entre los grupos correspondientes fueron estadísticamente significativas. Los valores de  $P$  están indicados en el texto.

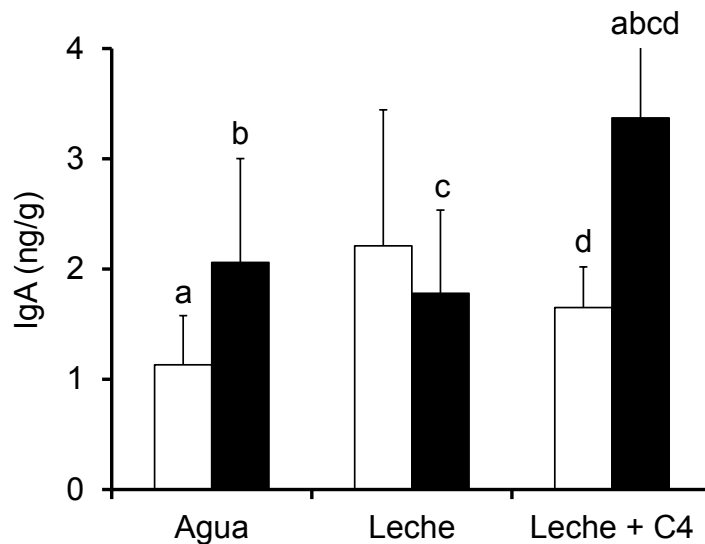
La Figura 8.13 muestra que la citokina antiinflamatoria IL-10 disminuyó significativamente en el contenido cecal de los animales tratados con leche fermentada ( $P < 0.01$ ) y en aquellos que recibieron leche fermentada que contiene C4 ( $P < 0.001$ ). La infección con IP383 redujo el nivel de IL-10 en ratones de control ( $P < 0,0001$ ), pero no tuvo efecto sobre esta citokina en animales tratados con C4 o solo con leche fermentada.

Las determinaciones de IgA total en los contenidos cecales son presentadas en la Figura 8.14. Solo en el grupo de animales tratados con C4 era una infección con IP383 asociada con un aumento significativo en producción de IgA ( $P < 0.005$ ). Además, los ratones tratados con C4 e infectado con IP383 tenían niveles totales de IgA más altos en comparación con los ratones infectados con

IP383 en el control no tratado grupo ( $P < 0.05$ ) y en el grupo tratado con la lechería vehículo solo ( $P < 0.005$ ).



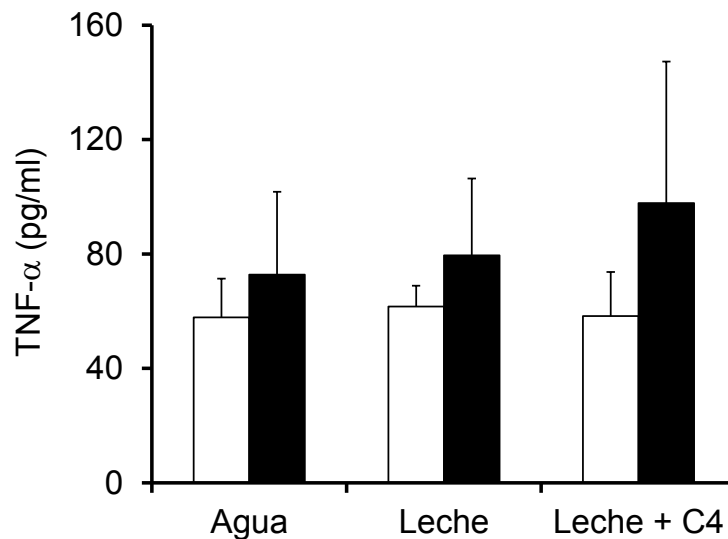
**Figura 8.13. Niveles de IL-10 en el contenido cecal de ratones no infectados (barras blancas) e infectados con *Y. enterocolitica* (barras negras).** Los resultados se informan como las medias más la desviación estándar de los datos de seis ratones. La misma letra sobre 2 barras indica que las diferencias entre los grupos correspondientes fueron estadísticamente significativas. Los valores de P están indicados en el texto.



**Figura 8.14. IgA total secretada en el contenido cecal de ratones no infectados (barras blancas) e infectados con *Y. enterocolitica* (barras negras).** Los resultados se informan como las medias más la desviación estándar de los datos de seis ratones. La misma letra sobre 2 barras indica que las diferencias entre los grupos correspondientes fueron estadísticamente significativas. Los valores de P están indicados en el texto.

#### 8.4.5. Efectos del tratamiento con *L. plantarum* C4 sobre los niveles plasmáticos de citocinas en ratones no infectados e infectados con *Y. enterocolitica* O9

Para comprender mejor la actividad inmunomoduladora de C4 a nivel sistémico, utilizamos el mismo diseño experimental descrito anteriormente para examinar las concentraciones de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IFN- $\gamma$  en el plasma de los ratones control, de los ratones tratados con leche fermentada y de los tratados con C4, tanto infectados como no infectados con IP383. La Figura 8.15 muestra que la concentración de TNF- $\alpha$  no se modificó significativamente por los tratamientos con C4 o con el vehículo lácteo solo. Además, la concentración de esta citokina no se vio afectada por la exposición a IP383.

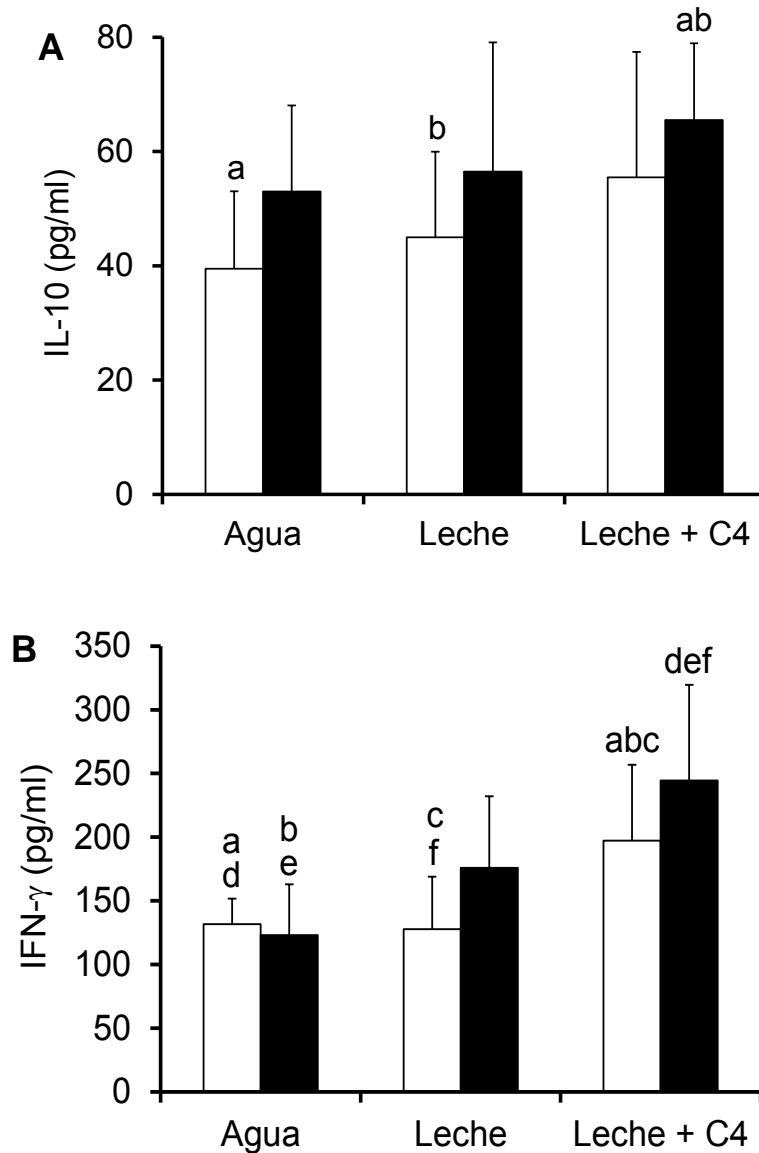


**Figura 8.15. Niveles de TNF- $\alpha$  en plasma de ratones no infectados (barras blancas) e infectados con *Y. enterocolitica* (barras negras).** Los resultados se informan como las medias más las desviaciones estándar de los datos de seis ratones. La misma letra sobre 2 barras indica que las diferencias entre los grupos correspondientes fueron estadísticamente significativas. Los valores de P están indicados en el texto.

Como se muestra en la Figura 8.16 (A), los niveles plasmáticos de IL-10 fueron significativamente mayores, solo en el grupo que recibió C4 e IP383 en comparación con el grupo control no infectado ( $P < 0.01$ ) y el grupo tratado con vehículo lácteo no infectado ( $P < 0.05$ ). Finalmente, la Figura 8.16 (B) muestra valores de IFN- $\gamma$  en plasma. Tanto si estaban infectados como si no, los ratones tratados con C4 mostraron concentraciones plasmáticas de IFN- $\gamma$  más



altas que las del grupo control no infectado ( $P < 0.02$  y  $P < 0.05$ , respectivamente), el grupo de control infectado ( $P < 0.01$  y  $P < 0.05$ ) y el grupo que recibió el vehículo lácteo solo ( $P < 0.02$  y  $P < 0.05$ ).



**Figura 8.16 Niveles de citocinas (IL-10 e IFN- $\gamma$ ) en plasma de ratones no infectados (barras blancas) e infectados con *Y. enterocolitica* (barras negras).** Los resultados se informan como las medias más las desviaciones estándar de los datos de seis ratones. La misma letra sobre 2 barras indica que las diferencias entre los grupos correspondientes fueron estadísticamente significativas. Los valores de P están indicados en el texto.

Nuestros estudios previos dirigidos a caracterizar el potencial probiótico de *L. plantarum* C4 demostraron que esta cepa no pudo modificar el curso de la infección intestinal con *Y. enterocolitica* en ratones cuando se midió por excreción fecal de yersinias, pero confirió protección parcial contra *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, sugiriendo que estaba implicado un mecanismo de inmunomodulación (Bujalance *et al.*, 2014). En el presente estudio, encontramos que la presencia de *Y. enterocolitica* en las placas de Peyer de ratones infectados experimentalmente se acortó significativamente por el pretratamiento con C4, lo que se asoció con la modulación de la respuesta biológica del huésped. *Y. enterocolitica* O9 es una bacteria bien adaptada al entorno intestinal, como lo demuestra su capacidad para permanecer en el intestino durante largos periodos de tiempo. El pretratamiento con C4 no fue capaz de acortar la persistencia de yersinias viables en el contenido intestinal, lo que parece excluir cualquier mecanismo de antibiosis de C4 contra *Y. enterocolitica*. De hecho, nuestros estudios *in vitro* demostraron que la acción inhibidora de C4 contra bacterias enteropatógenas se debe a la producción de ácido en medios ricos en dextrosa, pero no en muestras fecales (Bujalance *et al.*, 2014). Sin embargo, la capacidad de C4 para acelerar la depuración bacteriana en las PP sugiere un mecanismo inmunológico.

La citokina proinflamatoria TNF- $\alpha$  es una molécula clave en la inmunidad innata a la infección (Pfeffer, 2003). Los resultados presentados en este estudio indican que la infección intestinal con *Y. enterocolitica* induce una respuesta local de TNF- $\alpha$ . Esto es coherente con los informes que muestran que se requiere producción de TNF- $\alpha$  para la restricción de una infección primaria por *Y. enterocolitica* en ratones (Autenrieth y Heesemann, 1992; Autenrieth *et al.*, 1996). Nuestros datos demostraron que el pretratamiento con C4 aumentó la producción de TNF- $\alpha$  en respuesta a la infección, mientras que el pretratamiento con el vehículo de leche fermentada solo no tuvo ningún efecto. Por lo tanto, el pretratamiento con C4 podría ejercer un efecto protector contra la infección por *Y. enterocolitica* potenciando la respuesta del TNF- $\alpha$ . Este efecto protector de C4 podría extenderse a otros patógenos intestinales cuya eliminación está mediada por TNF- $\alpha$ . Sin embargo, junto con su papel defensivo, las respuestas de citocinas proinflamatorias pueden ser perjudiciales para el huésped; por lo tanto, existen mecanismos reguladores para limitar la extensión del daño colateral a los tejidos del huésped.

La IL-10 es un importante regulador de las respuestas del huésped, capaz de prevenir o limitar el desarrollo de lesiones causadas por una respuesta inflamatoria exacerbada inducida durante la infección (Mege *et al.*, 2006). Sin embargo, se ha documentado que la IL-10 puede proporcionar efectos

beneficiosos para las bacterias patógenas, permitiendo al patógeno eludir las defensas del huésped (Lee *et al.*, 2011). En infecciones con *Y. enterocolitica*, IL-10 puede impedir la depuración de patógenos y mejorar la inmunopatología (Schaake *et al.*, 2013). En nuestro estudio, todas las inoculaciones con bacterias (leche fermentada, C4 o *Y. enterocolitica*) produjeron reducciones significativas en los niveles de IL-10 en los contenidos cecales, pero el pretratamiento C4 no modificó la producción de IL-10 en respuesta a la infección con *Y. enterocolitica*. Por lo tanto, nuestros hallazgos sugieren que, a nivel intestinal, C4 promovió una respuesta defensiva proinflamatoria en lugar de una respuesta regulatoria.

Por otra parte, el tratamiento con C4 no modificó la concentración total de IgA en los contenidos cecales de animales no infectados, pero solo los animales pretratados con C4 respondieron a la infección por *Y. enterocolitica* con un aumento significativo en la IgA cecal. La IgA secretada es esencial para la defensa óptima de la mucosa, ya que es capaz de inhibir la colonización de la mucosa y la invasión por microorganismos patógenos (Brandtzaeg, 2003). La respuesta de IgA parece ser importante para proteger la mucosa intestinal contra la infección por *Y. enterocolitica* (Sugiura *et al.*, 2013). Aunque, en nuestro estudio, la respuesta de IgA específica a *Y. enterocolitica* no se midió, nuestros datos demuestran un efecto adyuvante de C4 sobre la producción de IgA secretada en ratones infectados.

Tomados en conjunto, nuestros datos sugieren que C4 promovió mecanismos de resistencia a la infección con *Y. enterocolitica*, lo que puede explicar la reducción en la duración de la colonización de las placas de Peyer por las yersinias en los animales tratados con el probiótico. Con el fin de obtener una imagen completa de la actividad inmunomoduladora de C4, se examinó el impacto de la infección intestinal en la inmunidad sistémica en los mismos animales en estudio. Las respuestas inflamatorias en el intestino no se reflejaron en los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  o IL-10, y el tratamiento con C4 no modificó significativamente las concentraciones de ninguna de las citocinas. Sin embargo, los niveles plasmáticos de IFN- $\gamma$  fueron mayores en los animales tratados con C4 que en los controles no tratados o en los ratones que recibieron leche fermentada. El IFN- $\gamma$  es producido por células NK y algunos subconjuntos de células T, y desempeña un papel inmunomodulador (Stark *et al.*, 1998).

La resistencia a muchas bacterias depende en gran medida de las acciones de IFN- $\gamma$ , que incluyen la activación de los macrófagos a un estado microbicida elevado (Taylor *et al.*, 2007). Por ejemplo, la producción de IFN- $\gamma$  se asocia con la resistencia de los ratones a *Y. enterocolitica* (Autenrieth y Hesseemann,

1992), y esta citokina está implicada en el control de la propagación de yersinias altamente patógena desde las placas de Peyer al bazo (Autenrieth *et al.*, 1996). Se ha demostrado que los ratones BALB/c son más susceptibles a *Y. enterocolitica* que los ratones C57BL/6 porque estos últimos expresan ARNm de IFN- $\gamma$  más rápidamente y en cantidades mayores que los BALB/c (Bohn *et al.*, 1994). Sin embargo, la depuración de las yersinias en las placas de Peyer de ratones pretratados con C4 comenzó después de 18 días de infección, y este período podría ser suficiente para la producción de IFN- $\gamma$  por ratones BALB/c (Autenrieth *et al.*, 1994). Por lo tanto, la potenciación de la producción de IFN- $\gamma$  no puede excluirse como uno de los mecanismos responsables del aumento de la resistencia a *Y. enterocolitica* inducida por C4.

En modelos experimentales de infección, los probióticos pueden actuar aumentando los mecanismos de defensa mediante la producción de citocinas proinflamatorias o, como alternativa, limitando el daño inflamatorio inducido por el patógeno. La mayor expresión de IL-10 antiinflamatoria inducida por algunas cepas probióticas puede, en algunos casos, ser beneficiosa para el huésped, pero también puede estar asociada con la falta de protección contra la infección (Steinberg *et al.*, 2014). Curiosamente, se ha informado que una cepa probiótica de *Bifidobacterium adolescentis* con actividad antiinflamatoria pudo proteger a los ratones de la generalización de la infección con una cepa altamente patógena del biotipo 1B de *Y. enterocolitica* (Frick *et al.*, 2007). Sin embargo, el pretratamiento con *B. adolescentis* no disminuyó la infección intestinal ni el número de yersinias en las placas de Peyer, pero sí su diseminación sistémica. La acción protectora de *B. adolescentis* se ha atribuido a la estimulación de la población intestinal de células dendríticas plasmocitoides que pueden inducir células T reguladoras (Wittmann *et al.*, 2013). Nuestros hallazgos demuestran que *L. plantarum* C4 ejerce un efecto protector contra la infección intestinal con *Y. enterocolitica*, y que esta protección se asocia con un estado proinflamatorio en la mucosa intestinal y un aumento en la producción de IgA secretada. Sin embargo, a nivel sistémico, C4 no promueve una respuesta proinflamatoria, aunque estimula la producción de la citokina inmunorreguladora IFN- $\gamma$ . Por lo tanto, C4 tiene un potencial anti-infeccioso, asociado a la actividad inmunomoduladora, que puede ser beneficioso para el huésped.

## 8.5. CONCLUSIONES

1<sup>a</sup>. La cepa C4 de *Lactobacillus plantarum* no induce producción de la citokina proinflamatoria TNF- $\alpha$  por la línea de macrófagos murinos Raw 264.7, lo que indica que esta bacteria probiótica carece de actividad inflamatoria *per se*.

2<sup>a</sup>. La cepa C4 de *Lactobacillus plantarum* potencia la respuesta de TNF- $\alpha$  inducida por la bacteria enteropatógena *Yersinia enterocolitica* O9 en la línea de macrófagos murinos Raw 264.7, lo que demuestra que la cepa C4 es capaz de estimular la inmunidad innata en situaciones de infección por esta bacteria.

3<sup>a</sup>. Las determinaciones de producción de IFN- $\alpha$  por células Raw 264.7 sugieren que la infección por *Yersinia enterocolitica* O9 se asocia a una moderada disminución de la resistencia antiviral, que es restaurada por acción de la *Lactobacillus plantarum* C4.

4<sup>a</sup>. La administración intragástrica de una dosis diaria de la cepa probiótica *Lactobacillus plantarum* C4 a ratones BALB/c, durante un periodo de 18 días, no ocasionó variaciones significativas en el número de esplenocitos, lo que corrobora la ausencia de capacidad patógena en esta cepa.

5<sup>a</sup>. La administración de *Lactobacillus plantarum* C4 a ratones BALB/c, no indujo ninguna modificación significativa en la capacidad de los esplenocitos para proliferar en respuesta a los mitógenos lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas y concanavalina A, que actúan sobre los linfocitos B y T, respectivamente, lo que sugiere una ausencia de efectos sobre la inmunidad sistémica en animales inmunocompetentes.

6<sup>a</sup>. El pretratamiento de ratones BALB/c con *L. plantarum* C4 disminuyó el tiempo de colonización de *Y. enterocolitica* O9 en las placas de Peyer de ratones. Este efecto estuvo asociado al estado proinflamatorio de la mucosa intestinal determinado por el aumento en la producción de TNF- $\alpha$  y un aumento en la secreción total de IgA.

7<sup>a</sup>. La administración de *Lactobacillus plantarum* C4 a ratones BALB/c, no indujo una respuesta proinflamatoria a nivel sistémico pero sí un aumento en la producción de la citokina inmunoreguladora IFN- $\gamma$ .

8<sup>a</sup>. La administración de la cepa probiótica *L. plantarum* C4 a ratones BALB/c durante un periodo de 18 días, incrementó la resistencia a la infección intestinal con *Y. enterocolitica* O9 a través de su actividad inmunomoduladora.

## **9. CONCLUSIONES**



## 9. CONCLUSIONES

El trabajo recogido en la presente memoria de Tesis Doctoral aporta nuevos conocimientos sobre las propiedades probióticas de *Lactobacillus plantarum* C4. Estos conocimientos se extienden al comportamiento de la bacteria en las condiciones de digestión gastrointestinal, sinergia con el fructooligosacárido FOS, interacciones de antibiosis con diversos patógenos intestinales, inactivación de citotoxinas de *Clostridium difficile*, actividad antimutágena, inmunomodulación *in vitro* e *in vivo* y resistencia a la infección experimental por *Yersinia enterocolitica*. A continuación se presentan las conclusiones concretas derivadas de este estudio, que se han incluido al final de cada capítulo.

1ª. *Lactobacillus plantarum* C4 resiste las condiciones de una simulación *in vitro* de la digestión gastrointestinal, mostrando al final del proceso un crecimiento moderado.

2ª. La adición de fructooligosacárido prebiótico (FOS) al medio en distintas condiciones experimentales, incluyendo medios de cultivo ricos y mínimos y un proceso de digestión gastrointestinal de leche descremada, no puede sustituir a la dextrosa como sustrato para el crecimiento de *Lactobacillus plantarum* C4, pero prolonga su viabilidad.

3ª. En el curso de un proceso de digestión gastrointestinal de vehículo lácteo adicionado de FOS, *Lactobacillus plantarum* ejerce un efecto inhibitorio sobre cepas de las bacterias patógenas intestinales *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Enterococcus faecalis*, siendo la presencia de FOS un requisito necesario para esta inhibición al menos en el caso de *Y. enterocolitica*.

4ª. La producción de ácidos por *Lactobacillus plantarum* C4 inactiva la toxicidad de los sobrenadantes de *Clostridium difficile* toxigénico, siendo el factor determinante de esta inactivación el pH y no la naturaleza de los ácidos.

5ª. La cepa C4 de *Lactobacillus plantarum* ejerce antibiosis *in vitro* sobre *Clostridium difficile*, sin que la presencia o ausencia de los genes responsables de la toxigenicidad influya en este efecto.

6ª. *Lactobacillus plantarum* C4 inhibe de forma significativa la mutagenicidad del 2-nitrofluoreno sobre la cepa auxotrofa *S. typhimurium* TA98 en el ensayo de Ames, en condiciones en las que la viabilidad de C4 se ve abolida, lo que sugiere un mecanismo de adsorción que faculta a esta bacteria para retirar el mutágeno.



7<sup>a</sup>. La cepa C4 de *Lactobacillus plantarum* no induce producción de la citokina proinflamatoria TNF- $\alpha$  por la línea de macrófagos murinos Raw 264.7, lo que indica que esta bacteria probiótica carece de actividad inflamatoria *per se*.

8<sup>a</sup>. La cepa C4 de *Lactobacillus plantarum* potencia la respuesta de TNF- $\alpha$  inducida por la bacteria enteropatógena *Yersinia enterocolitica* O9 en la línea de macrófagos murinos Raw 264.7, lo que demuestra que la cepa C4 es capaz de estimular la inmunidad innata en situaciones de infección por esta bacteria.

9<sup>a</sup>. Las determinaciones de producción de IFN- $\alpha$  por células Raw 264.7 sugieren que la infección por *Yersinia enterocolitica* O9 se asocia a una moderada disminución de la resistencia antiviral, que es restaurada por acción de la *Lactobacillus plantarum* C4.

10<sup>a</sup>. La administración intragástrica de una dosis diaria de la cepa probiótica *Lactobacillus plantarum* C4 a ratones BALB/c, durante un periodo de 18 días, no ocasionó variaciones significativas en el número de esplenocitos, lo que corrobora la ausencia de capacidad patógena en esta cepa.

11<sup>a</sup>. La administración de *Lactobacillus plantarum* C4 a ratones BALB/c, no indujo ninguna modificación significativa en la capacidad de los esplenocitos para proliferar en respuesta a los mitógenos lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas y concanavalina A, que actúan sobre los linfocitos B y T, respectivamente, lo que sugiere una ausencia de efectos sobre la inmunidad sistémica en animales inmunocompetentes.

12<sup>a</sup>. El pretratamiento de ratones BALB/c con *L. plantarum* C4 disminuyó el tiempo de colonización de *Y. enterocolitica* O9 en las placas de Peyer de ratones. Este efecto estuvo asociado al estado proinflamatorio de la mucosa intestinal determinado por el aumento en la producción de TNF- $\alpha$  y un aumento en la secreción total de IgA.

13<sup>a</sup>. La administración de *Lactobacillus plantarum* C4 a ratones BALB/c, no indujo una respuesta proinflamatoria a nivel sistémico pero sí un aumento en la producción de la citokina inmunoreguladora IFN- $\gamma$ .

14<sup>a</sup>. La administración de la cepa probiótica *L. plantarum* C4 a ratones BALB/c durante un periodo de 18 días, incrementó la resistencia a la infección intestinal con *Y. enterocolitica* O9 a través de su actividad inmunomoduladora.

## **10. BIBLIOGRAFÍA**

**Adam J., Banet A., Banet-Bellet C. (1977).** Essais cliniques contrôlés en double insu de l'Ultralevure lyophilisée. (Double-blind controlled trials with *Saccharomyces boulardii*—Ultralevure.) *Gazette Médicale de France* 84: 2072–2078.

**Adams C.A. (2010).** The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutr Res Rev* 23: 37-46.

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

**AICR/WCRF: “World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research” Fondo Mundial para la Investigación del Cáncer/Instituto Americano para la Investigación del Cáncer. (2007).** Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. [http://www.aicr.org/assets/docs/pdf/reports/Second\\_Expert\\_Report.pdf](http://www.aicr.org/assets/docs/pdf/reports/Second_Expert_Report.pdf) (consultada en agosto de 2017)

**Alakomi H.L., Skyttä E., Saarela M., Mattila-Sandholm T., Latva-Kala K. y Helander I.M. (2000).** Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol* 66 (5): 2001-2005.

**Alcalá L., Marín M., Mena A. y Niubó J. (2015).** Diagnóstico microbiológico de la infección por *Clostridium difficile*. Procedimientos en Microbiología Clínica de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). <https://www.seimc.org/contenidos/documentoscientificos/procedimientosmicrobiologia/seimc-procedimientomicrobiologia53.pdf>

**Altieri C., Bevilacqua A. y Sinigaglia M. (2011).** Prolonging the Viability of *Lactobacillus plantarum* through the Addition of Prebiotics into the Medium. *J Food Sci* 76 (6): 336-345.

**Alvarez-Olmos M. y Oberhelman R. (2001).** Probiotics agents and infectious diseases: A modern Perspective on a traditional therapy. *Clin Infect Dis* 32: 1567-1576.

**Ambalam P., Dave J.M., Nair B.M. y Vyas B.R. (2011).** *In vitro* mutagen binding and antimutagenic activity of human *Lactobacillus rhamnosus* 231. *Anaerobe* 17 (5): 217-222.

**Ames B.N., McCann J. y Yamasaki E. (1975).** Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat Res* 31: 347–364.

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

**Antonara S. y Leber A.L. (2016).** Diagnosis of *Clostridium difficile* Infections in Children. *J Clin Microbiol* 54 (6): 1425-1433.

**Arenahalli M. y Siddalingaiya P. (2012).** *In vitro* fermentation of prebiotics by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194: selectivity, viability and effect of metabolites on  $\beta$ -glucuronidase activity. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 901-908.

**Aronson J.K. (2017).** Defining ‘nutraceuticals’: neither nutritious nor pharmaceutical. *Br J Clin Pharmacol* 83: 8–19.

**Arroyo-López F.N., Blanquet-Diot S., Denis S., Thévenot J., Chalancon S., Alric M., Rodríguez-Gómez F., Romero-Gil V., Jiménez-Díaz R. y Garrido-Fernández A. (2014).** Survival of pathogenic and lactobacilli species of fermented olives during simulated human digestion. *Front Microbiol* 5 (540): 1-9.

**Asensio Á. y Monge D. (2012).** Epidemiología de la infección por *Clostridium difficile* en España. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 30 (6): 333–337.

**Asensio Á., Bouza E., Grau S., Rubio-Rodríguez D. y Rubio-Terrés C. (2013).** Coste de la diarrea asociada a *Clostridium difficile* en España. *Rev Esp Salud Pública* 87 (1): 25-33.

**Ashraf R. y Shah N.P. (2014).** Immune system stimulation by probiotic microorganisms. *Crit Rev Food Sci Nutr* 54 (7): 938-956.

**Auclair J., Frappier M. y Millette M. (2015).** *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R, and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 (Bio-K+): Characterization, Manufacture, Mechanisms of Action, and Quality Control of a Specific Probiotic Combination for Primary Prevention of *Clostridium difficile* Infection. *Clin Infect Dis* 60 (2): 135-143.

**Autenrieth I.B. y Heesemann J. (1992).** *In vivo* neutralization of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma abrogates resistance to *Yersinia enterocolitica* infection in mice. *Med Microbiol Immunol* 181: 333-338.

**Autenrieth I.B., Beer M., Bohn E., Kaufmann S.H. y Heesemann J. (1994).** Immune responses to *Yersinia enterocolitica* in susceptible BALB/c and resistant C57BL/6 mice: an essential role for gamma interferon. *Infect Immun* 62: 2590-2599.

**Autenrieth I.B., Kempf V., Sprinz T., Preger S. y Schnell A. (1996).** Defense mechanisms in Peyer's patches and mesenteric lymph nodes against *Yersinia enterocolitica* involve integrins and cytokines. *Infect Immun* 64: 1357-1368.

**Banerjee P., Merkel G.J. y Bhunia A.K. (2009).** *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* B-30892 can inhibit cytotoxic effects and adhesion of pathogenic *Clostridium difficile* to Caco-2 cells. *Gut Pathog* 1 (1):1-11.

**Barrangou R., Altermann E., Hutkins R., Cano R. y Klaenhammer T.R. (2003).** Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. *Proc Natl Acad Sci USA* 100 (15): 8957-8962.

**Barrangou R., Altermann E., Hutkins R., Cano R. y Klaenhammer T.R. (2003).** Functional and comparative genomic analyses of an operon involved in fructooligosaccharide utilization by *Lactobacillus acidophilus*. *Proc Natl Acad Sci* 100 (15): 8957-8962.

**Begley M., Hill C. y Gahan C.G. (2006).** Bile salt hydrolase activity in probiotics. *Appl Environ Microbiol* 72 (3): 1729-1738.

**Bergillos-Meca T., Cabrera-Vique C., Artacho R., Moreno-Montoro M., Navarro-Alarcón M., Olalla M., Giménez R. y Ruíz-López M.D. (2015).** Influence of milk ultrafiltration on Ca, Mg, Zn and P levels in fermented goat's milk. *Small Rumin Res* 124: 95-100.

**Bergillos-Meca T., Costabile A., Walton G., Moreno-Montoro M., Ruiz-Bravo A. y Ruiz-López M.D. (2015).** *In vitro* evaluation of the fermentation properties and potential probiotic activity of *Lactobacillus plantarum* C4 en batch culture systems. *LWT J Food Sci Technol* 60: 420-426.

**Bernardeau M., Vernoux J.P., Gueguen M. (2002).** Safety and efficacy of probiotic lactobacilli in promoting growth in post-weaning Swiss mice. *Int J Food Microbiol* 77: 19-27.

**Bernardeau M., Vernoux J.P., Henri-Dubernet S. y Guéguen M. (2008).** Safety assessment of dairy microorganisms: the *Lactobacillus* genus. *Int J Food Microbiol* 126 (3):278-285.

**Bevilacqua A., Corbo M.R., Mastromatteo M. y Sinigaglia M. (2008).** Combined effects of pH, yeast extract, carbohydrates and di-ammonium hydrogen citrate on the biomass production and acidifying ability of a probiotic *Lactobacillus plantarum* strain, isolated from table olives, in a batch system. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 1721–1729.

**Bibiloni R., Fedorak R.N., Tannock G.W., Madsen K.L., Gionchetti P., Campieri M., De Simone C. y Sartor R.B. (2005).** VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 100 (7): 1539-1546.

**Binns N. (2013).** Probiotics, Prebiotics and Gut Microbiota. Monografías del Instituto Internacional de Ciencias de la Vida de Europa/ “Europa International Life Sciences Institute - ILSI”. <http://ilsi.org/publication/probiotics-prebiotics-and-the-gut-microbiota/> (consultada en junio 2017).

**Black F.T., Andersen P.L., Orskov J., Orskov F., Gaarslev K. y Laulund S. (1989).** Prophylactic efficacy of lactobacilli on traveler’s diarrhea. *Travel Med* 7: 333–335.

**Bohn E., Heesemann J., Ehlers S. y Autenrieth I.B. (1994).** Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* 62: 3027-3032.

**Boyle R.J., Robins-Browne R.M. y Tang, M.L.K. (2006).** Probiotic use in clinical practice: What are the risk? *Am J Clin Nutr* 83: 1256-1264.

**Braat H., van den Brande J., van Tol E., Hommes D., Peppelenbosch M., van Deventer S. (2004).** *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4+ T cells via modulation of dendritic cell function. *Am J Clin Nutr* 80 (6): 1618-1625.

**Brandtzaeg P. (2003).** Role of secretory antibodies in the defence against infections. *Int J Med Microbiol* 293 (1): 3-15.

**Bujalance C. (2006).** Modificación de la respuesta biológica por microorganismos probióticos en modelos de animales inmunocompetentes e inmunocomprometidos. Tesis Doctoral. Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada. Editorial de la Universidad de Granada, Granada-España.

**Bujalance C., Jiménez-Valera M., Moreno E. y Ruiz-Bravo A. (2006).** A selective differential medium for *Lactobacillus plantarum*. *J Microbiol Methods* 66 (3): 572-575.

**Bujalance C., Jiménez-Valera M., Moreno E., Ruiz-López M.D., Lasserrot A., Ruiz-Bravo A. (2014).** Lack of correlation between *in vitro* antibiosis and *in vivo* protection against enteropathogenic bacteria by probiotic lactobacilli. *Res Microbiol* 165 (1): 14-20.

**Bujalance C., Moreno E., Jiménez-Valera M. y Ruiz-Bravo A. (2007).** A probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immunocompromised mice. *Int J Food Microbiol* 113: 28-34.

**Burns A. y Rowland I. (2004).** Antigenotoxicity of probiotics and prebiotics on faecal water-induced DNA damage in human colon adenocarcinoma cells. *Mutat Res* 551: 233–243.

**Burns A.J. y Rowland I.R. (2000).** Anticarcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* (1): 13-24.

**Caldini G., Trotta F., Villarini M., Moretti M., Pasquini R., Scassellati-Sforzolini G. y Cenci G. (2005).** Screening of potential lactobacilli antigenotoxicity by microbial and mammalian cell-based tests. *Int J Food Microbiol* 102: 37-47.

**Campbell J.M., Bauer L.L., Fahey G. C.Jr., Hogarth A.J., Wolf B.W. y Hunter D.E. (1997).** Selected fructooligosaccharide (1-kestose, nystose, and 1<sup>F</sup>-β-fructofuranosyl nystose) composition of foods and feeds. *J Agric Food Chem* 45 (8): 3076–3082.

**Carol M., Borrueal N., Antolin M., Llopis M., Casellas F., Guarner F. y Malagelada J.R. (2006).** Modulation of apoptosis in intestinal lymphocytes by a probiotic bacteria in Crohn's disease. *J Leukoc Biol* 79 (5): 917-922.

**Carter G.P., Rood J.I. y Lyras D. (2010).** The role of toxin A and toxin B in *Clostridium difficile*-associated disease. Past and present perspectives. *Gut Microbes* 1 (1): 58-64.

**Chen C., Zhao G., Chen W. y Guo B. (2015).** Metabolism of Fructooligosaccharides in *Lactobacillus plantarum* ST-III via Differential Gene Transcription and Alteration of Cell Membrane Fluidity. *Appl Environ Microbiol* 81 (22): 7697-7707.

**Chong E.S. (2014).** A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. *World J Microbiol Biotechnol* 30: 351–374.

**Christensen J.E., Dudley E.G., Pederson J.A. y Steele J.L. (1999).** Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76 (1-4): 217-246.

**Corgneau M., Scher J., Ritie-Pertusa L., Le D.T.L, Petit J., Nikolova Y., Banon S. y Gaiani C. (2017).** Recent advances on lactose intolerance: Tolerance thresholds and currently available answers. *Crit Rev Food Sci Nutr* 57 (15): 3344-3356.

**Corridoni D., Pastorelli L., Mattioli B., Locovei S., Ishikawa D., Arseneau K.O., Chieppa M., Cominelli F. y Pizarro T.T. (2012).** Probiotic bacteria regulate intestinal epithelial permeability in experimental ileitis by a TNF-dependent mechanism. *PLoS One* 7 (7): e42067.

**Cruz-Guerrero A., Hernández-Sánchez H., Rodríguez-Serrano G., Gómez-Ruiz L., García-Garibay M. y Figueroa-González I. (2014).** Commercial probiotic bacteria and prebiotic carbohydrates: a fundamental study on prebiotics uptake, antimicrobials production and inhibition of pathogens. *J Sci Food Agric* 94 (11): 2246-2252.

**Culpepper B.S.T. y Mai V. (2013).** Evidence for contributions of gut microbiota to colorectal carcinogenesis. *Curr Nutr Rep* 2: 10–18.

**Dalmaso G., Loubat A., Dahan S., Calle G., Rampal P. y Czerucka D. (2006).** *Saccharomyces boulardii* prevents TNF-alpha-induced apoptosis in EHEC-infected T84 cells. *Res Microbiol* 157 (5): 456-465.

**De Kok T.M. y van Maanen J.M. (2000).** Evaluation of fecal mutagenicity and colorectal cancer risk. *Mutat Res* 463: 53-101.

**De Moreno de Leblanc A. y Perdígón G. (2004).** Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. *Med Sci Monit* 10 (4): 96-104.

**De Prisco A y Mauriello G. (2016).** Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends Food Sci Technol* 48: 27-39.

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

**De Vrese M., Rautenberg P., Laue C., Koopmans M., Herremans T. y Schrezenmeir J. (2005).** Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination. *Eur J Nutr* 44 (7): 406-413.



**Dethlefsen L. y Relman D.A. (2011).** Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 (1): 4554-4561.

**Di Bella S., Ascenzi P., Siarakas S., Petrosillo N. y di Masi A. (2016).** *Clostridium difficile* Toxins A and B: Insights into Pathogenic Properties and Extraintestinal Effects. *Toxins* 8 (134): 1-25.

**Di Giacinto C., Marinaro M., Sanchez M., Strober W. y Boirivant M. (2005).** Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J Immunol* 174 (6): 3237-3246.

**Dong H., Rowland I., Thomas L.V. y Yaqoob P. (2013).** Immunomodulatory effects of a probiotic drink containing *Lactobacillus casei* Shirota in healthy older volunteers. *Eur J Nutr* 52 (8): 1853-1863.

**Donkor O.N., Ravikumar M., Proudfoot O., Day S.L., Apostolopoulos V., Paukovics G., Vasiljevic T., Nutt S.L. y Gill H. (2012).** Cytokine profile and induction of T helper type 17 and regulatory T cells by human peripheral mononuclear cells after microbial exposure. *Clin Exp Immunol* 167: 282-295.

**Donnet-Hughes A., Rochat F., Serrant P., Aeschlimann J.M. y Schiffrin E.J. (1999).** Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J Dairy Sci* 82 (5): 863-869.

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

**EFSA: Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA) (2016).** Guidance on the scientific requirements for health claims related to the immune system, the gastrointestinal tract and defence against pathogenic microorganisms. *EFSA J* 14 (1): 4369-4392. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2016.4369/epdf> (consultada en junio 2017).

**Engelbrektson A.L., Korzenik J.R., Sanders M.E., Clement B.G., Leyer G., Klaenhammer T.R. y Kitts C. (2006).** Analysis of treatment effects on the microbial ecology of the human intestine. *FEMS Microbiol Ecol* 57: 239-250.

**Eom J.S., Song J. y Choi H.S. (2015).** Protective effects of a novel probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* JSA22 from traditional fermented soybean food against infection by *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Microbiol Biotechnol* 25: 479-491.

**Eun C.S, Kim Y.S., Han D.S., Choi J.H., Lee A.R. y Park Y.K. (2011).** *Lactobacillus casei* prevents impaired barrier function in intestinal epithelial cells. *APMIS* 119 (1): 49-56.

**Fang S.B., Shih H.Y., Huang C.H., Li L.T., Chen C.C. y Fang H.W. (2014).** Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG upregulate gene expression of pro-inflammatory cytokines in 5-fluorouracil-pretreated Caco-2 cells. *Int Arch Allergy Immunol* 22: 1647-54.

**Ferlay J., Steliarova-Foucher E., Lortet-Tieulent J., Rosso S., Coebergh J.W., Comber H., Forman D. y Bray F. (2013).** Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012 (Section of Cancer Information, International Agency for Research on Cancer (IARC), France). *Eur J Cancer* 49 (6): 1374-1403.

**Ferreira J. y Luengo E. (2007).** La dieta como concepto terapéutico. Conceptos de alimento funcional y de nutraceutico. Situación actual de los alimentos funcionales y nutraceuticos. Aspectos legales. En: Luengo E. (eds). Alimentos funcionales y nutraceuticos. Sociedad Española de Cardiología, Madrid. pp. 1-12.

**Forsythe P. y Bienenstock J. (2010).** Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria. *Immunol Invest* 39 (4-5): 429-448.

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

**Frick J.S., Fink K., Kahl F., Niemiec M.J., Quitadamo M., Schenk K. y Autenrieth I.B. (2007).** Identification of commensal bacterial strains that modulate *Yersinia enterocolitica* and dextran sodium sulfate-induced inflammatory responses: implications for the development of probiotics. *Infect Immun* 75 (7): 3490-3497.

**Fuentes S., Egert M., Jiménez-Valera M., Monteoliva-Sánchez M., Ruiz-Bravo A. y Smidt H. (2008a).** A strain of *Lactobacillus plantarum* affects segmented filamentous bacteria in the intestine of immunosuppressed mice. *FEMS Microbiol Ecol* 63 (1): 65-72.

**Fuentes S., Egert M., Jiménez-Valera M., Ramos-Cormenzana A., Ruiz-Bravo A., Smidt H. y Monteoliva-Sánchez M. (2008b).** Administration of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* affects the diversity of murine intestinal lactobacilli, but not the overall bacterial community structure. *Res Microbiol* 159 (4): 237-243.

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

Gagnière J., Raisch J., Veziat J., Barnich N., Bonnet R., Buc E., Bringer M.A., Pezet D. y Bonnet, M. (2016). Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 22 (2): 501-518.

Galceran J., Ameijide A., Carulla M., Mateos A., Quirós J. R., Rojas D., Alemán A., Torrella A., Chico M., Vicente M., Díaz J. M., Larrañaga N., • R. Marcos-Gragera R., Sánchez M.J., Perucha J., Franch P., Navarro C., Ardanaz E., Bigorra J., Rodrigo P. y Bonet R.P (2017). REDECAN Working Group: Cancer incidence in Spain, 2015. *Clin Transl Oncol* 19 (7): 799-825.

Galdeano C.M. y Perdigón G. (2006). The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vaccine Immunol* 13 (2): 219-226.

Gänzle M.G y Follador R. (2012). Metabolism of oligosaccharides and starch in lactobacilli: a review. *Front Microbiol* 3 (340): 1-15.

Gatehouse D. (2012). Bacterial Mutagenicity Assays: Test Methods. *Methods Mol Biol* 817: 21-34.

Ghadimi D., Njeru P.N., Guigas C., Farghaly M.H., Fölster-Holst R., Geis A., de Vrese M., Schrezenmeir J. y Heller K.J. (2014). Molecular identification of potential Th1/Th2 responses-modulating bacterial genes using suppression subtractive DNA hybridization. *Immunobiology* 219: 208-217.

Gibson G., Karen P., Scott K., Rastall R., Tuohy K., Hotchkiss A., Dubert-Ferrandon A., Gareau M., Murphy E., Saulnier D., Loh G., Macfarlane S., Delzenne N., Ringel Y., Kozianowski G., Dickmann R., Lenoir-Wijnkoop I., Walker C. y Buddington R. (2010). Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci Technol Bull: Functional Foods* 7 (1): 1-19. [file:///C:/Users/David%20J/Downloads/gibson%20prebiotic%20definition%2010%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/David%20J/Downloads/gibson%20prebiotic%20definition%2010%20(1).pdf) (consultada en agosto 2017).

Gibson G., Probert H., van Loo J., Rastall R. y Roberfroid M. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 17 (2): 259-275.

Gibson G.R. y Rastall R.A. (2006). Prebiotics: Development & Application. John Wiley & Sons Ltd (Ed.) England.

**Gilbert R.I. (1980).** The analysis of fluctuation test. *Mutat Res* 74 (4): 283-289.

**Gill C.I. y Rowland I.R. (2002).** Diet and cancer: assessing the risk. *Br J Nutr* 88 (1): 73–87.

**Gill H.S. (2003).** Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 17 (5): 755-773.

**Gill H.S., Rutherford K.J. y Cross M.L. (2001b).** Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J Clin Immunol* 21 (4): 264-271.

**Gill H.S., Rutherford K.J., Cross M.L. y Gopal P.K. (2001a).** Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr* 74 (6): 833-839.

**Gill H.S., Shu Q., Lin H., Rutherford K.J. y Cross M.L. (2001).** Protection against translocating *Salmonella typhimurium* infection in mice by feeding the immunoenhancing probiotic *Lactobacillus rhamnosus* strain HN001. *Med Microbiol Immunol* 190 (3): 97-104.

**Goh Y.J., Lee J.H. y Hutkins R.W. (2007).** Functional analysis of the fructooligosaccharide utilization operon in *Lactobacillus paracasei* 1195. *Appl Environ Microbiol* 73 (18): 5716-5724.

**Govender M., Choonara Y.E., Kumar P., du Toit L.C., van Vuuren S. y Pillay V.A. (2014).** A review of the advancements in probiotic delivery: Conventional vs. non-conventional formulations for intestinal flora supplementation. *AAPS Pharm Sci Tech* 15 (1): 29-43.

**Granucci F. y Ricciardi-Castagnoli P. (2003).** Interactions of bacterial pathogens with dendritic cells during invasion of mucosal surfaces. *Curr Opin Microbiol* 6 (1):72-76.

**Gratz S.W., Wallace R.J. y El-Nezami H.S. (2011).** Recent perspectives on the relations between fecal mutagenicity, genotoxicity, and diet. *Front Pharmacol* 2 (4): 1-9.

**Gueimonde M. y Collado M.C. (2012).** Metagenomics and probiotics. *Clin Microbiol Infection* 18 (Suppl. 4): 32-34.

**Guio F., Rodríguez M.A., Almeciga-Diaz C.J. y Sanchez O.F. (2009).** Recent trends in fructooligosaccharides production. *Recent Pat Food Nutr Agric* 1 (3): 221-230.

**Haller D., Bode C., Hammes W.P., Pfeifer A.M., Schiffrin E.J. y Blum S. (2000).** Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 47 (1): 79-87.

**Hardy H., Harris J., Lyon E., Beal J. y Foey A.D. (2013).** Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients* 5 (6): 1869-1912.

**Hasler C.M. (2002).** Functional foods: benefits, concerns and challenges. A position paper of the American Council on Science and Health. *J Nutr* 132 (12): 3772-3781.

**Hidalgo-Cantabrana C., Delgado S., Ruiz L., Ruas-Madiedo P., Sánchez B. y Margolles A. (2017).** *Bifidobacteria* and Their Health-Promoting Effects. *Microbiol Spectr* 5 (3). doi: 10.1128/microbiolspec.BAD-0010-2016.

**Hilton E., Isenberg H.D., Alperstein P., France K. y Borenstein M.T. (1992).** Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* as prophylaxis for candida vaginitis. *Ann Intern Med* 116 (5): 353-357.

**Hilton E., Rindos P. e Isenberg H.D. (1995).** *Lactobacillus* GG vaginal suppositories and vaginitis. *J Clin Microbiol* 33 (5): 1433.

**Hoser M.J., Mansukoski H.K., Morrical S.W. y Eboigbodin K.E. (2014).** Strand invasion based amplification (SIBA®): a novel isothermal DNA amplification technology demonstrating high specificity and sensitivity for a single molecule of target analyte. *PLoS one* 9 (11): 1-20.

**Howarth G.S. y Wang H. (2013).** Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients* 5 (1): 58-81.

**Huxley R., Woodward M. y Clifton P. (2013).** The epidemiologic evidence and potential biological mechanisms for a protective effect of dietary fiber on the risk of colorectal cancer. *Curr Nutr Rep* 2: 63–70.

**Isolauri E. (2001).** Probiotics in human disease. *Am J Clin Nutr* 73 (6): 1142-1146.

**Isolauri E., Arvola T., Sütas Y., Moilanen E. y Salminen S. (2000).** Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 30 (11): 1604-1610.

**Jiménez-Valera M., Moreno E., Ruiz-López M.D., Bergillo-Meca T., Moreno-Montoro M., Lasserrot A. y Ruiz-Bravo A. (2013).** *Lactobacillus plantarum* C4 inhibe la respuesta de citoquinas proinflamatorias inducida por bacterias patógenas en macrófagos murinos por un mecanismo independiente de la interleuquina 10. *Nutr Hosp* 28 (1): 23-24.

**Kalliomäki M., Salminen S., Arvilommi H., Kero P., Koskinen P. e Isolauri E. (2001).** Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 357 (9262): 1076-1079.

**Kalra E.K. (2003).** Nutraceutical - definition and introduction. *AAPS PharmSci* 5 (3): 1-2.

**Kanmani P., Satish Kumar R., Yuvaraj N., Paari K.A., Pattukumar V. y Arul V. (2013).** Probiotics and Its Functionally Valuable Products - A review. *Crit Rev Food Sci Nutr* 53 (6): 641-658.

**Kaplan H. y Hutkins R.W. (2000).** Fermentation of Fructooligosaccharides by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Appl Environ Microbiol* 66 (6): 2682-2684.

**Karlsson M., Scherbak N., Reid G. y Jass J. (2012).** *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 enhances NF-kappaB activation in Escherichia coli-stimulated urinary bladder cells through TLR4. *BMC Microbiol* 22: 12-15.

**Katan M.B. (2012).** Why the European Food Safety Authority was right to reject health claims for probiotics? *Benef Microbes* 3 (2): 85-89.

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

**Kim M.S., Yoon Y.S., Seo J.G., Lee H.G., Chung M.J. y Yum D.Y. (2013).** A study on the prevention of salmonella infection by using the aggregation characteristics of lactic acid bacteria. *Toxicol Res* 29: 129-135.

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

**Kirjavainen P.V., Salminen S.J. e Isolauri E. (2003).** Probiotic bacteria in the management of atopic disease: undescoring the importance of viability. *J Ped Gast Nutr* 36: 223-227.

**Kleessen B., Hartmann L. y Blaut M. (2001).** Oligofructose and long-chain inulin: influence on the gut microbial ecology of rats associated with a human faecal flora. *Br J Nutr* 86 (2): 291-300.

**Klewicka E., Nowak A., Zduńczyk Z., Juśkiewicz J. y Cukrowska B. (2012).** Protective effect of lactofermented red beetroot juice against aberrant crypt foci formation, genotoxicity of fecal water and oxidative stress induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine in rats model. *Environ Toxicol Pharmacol* 34 (3): 895-904.

**Kligler B. y Cohrssen A. (2008).** Probiotics. *Am Fam Physician* 78: 1073-1078.

**Klinder A., Forster A., Caderni G., Femia A.P. y Pool-Zobel B.L. (2004).** Fecal water genotoxicity is predictive of tumor-preventive activities by inulin-like oligofructoses, probiotics (*Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis*), and their symbiotic combination. *Nutr Cancer* 49: 144-155.

**Kruis W., Fric P., Pokrotnieks J., Lukás M., Fixa B., Kascák M., Kamm M.A., Weismueller J., Beglinger C., Stolte M., Wolff C. y Schulze J. (2004).** Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 53 (11): 1617-1623.

**Kuijper E.J., Barbut F., Brazier J.S., Kleinkauf N., Eckmanns T., Lambert M.L., Drudy D., Fitzpatrick F., Wiuff C., Brown D.J., Coia J.E., Pituch H., Reichert P., Even J., Mossong J., Widmer A.F., Olsen K.E., Allerberger F., Notermans D.W., Delmée M., Coignard B., Wilcox M., Patel B., Frei R., Nagy E., Bouza E., Marin M., Åkerlund T., Virolainen-Julkunen A., Lyytikäinen O., Kotila S., Ingebretsen A., Smyth B., Rooney P., Poxton I.R. y Monnet D.L. (2008).** Update of *Clostridium difficile* infection due to PCR ribotype 027 in Europe, 2008. *Euro Surveill* 13 (31): 1-7.

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

**Kuo S.M., Merhige P.M. y Hagey L.R. (2013).** The effect of dietary prebiotics and probiotics on body weight, large intestine indices, and fecal bile acid profile in wild type and IL10-/- mice. *PLoS One* 8 (3): e60270.

**Lebeer S., Vanderleyden J. y De Keersmaecker S.C. (2008).** Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol Biol Rev* 72: 728-764.

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

**Lee I.C., Tomita S., Kleerebezem M. y Bron P.A. (2013).** The quest for probiotic effector molecules--unraveling strain specificity at the molecular level. *Pharmacol Res* 69: 61-74.

**Lee K.S., Jeong E.S., Heo S.H., Seo J.H., Jeong D.G. y Choi Y.K. (2011).** IL-10 suppresses bactericidal response of macrophages against *Salmonella* Typhimurium. *J Microbiol* 49 (6): 1050-1053.

**Leiva M. (2008).** Modificación de la respuesta biológica por telitromicina. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia, Departamento de Microbiología, Universidad de Granada, Granada-España. Editorial de la Universidad de Granada, Granada.

**Levri K.M., Ketvertis K., Deramo M., Merenstein J.H. y D'Amico F. (2005).** Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. *J Fam Pract* 54 (7): 613-620.

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

**Liévin-Le V. y Servin A.L. (2014).** Anti-infective activities of *Lactobacillus* strains in the human intestinal microbiota: from probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clin Microbiol Rev* 27 (2): 167-99.

**Llewellyn A. y Foey A. (2017).** Probiotic Modulation of Innate Cell Pathogen Sensing and Signaling Events. *Nutrients* 9 (1156):1-31.

**Lyras D., O'Connor J.R., Howarth P.M., Sambol S.P., Carter G.P., Phumoonna T., Poon R., Adams V., Vedantam G., Johnson S., Gerding D.N. y Rood J.I. (2009).** Toxin B is essential for virulence of *Clostridium difficile*. *Nature* 458 (7242): 1176-1179.



**Maassen C.B., van Holten-Neelen C., Balk F., den Bak-Glashouwer M.J., Leer R.J., Laman J.D., Boersma W.J. y Claassen E. (2000).** Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* 18 (23): 2613-2623.

**Macfarlane G.T. y Gibson G.R. (1994).** Metabolic Activities of the Normal Colonic Flora. In: Gibson S.A.W. (eds) *Human Health*. Springer Series in Applied Biology. Springer, London. pp.17-52

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

**Macfarlane S., Macfarlane G.T. y Cummings J.H. (2006).** Review article: prebiotics in the gastrointestinal tract. *Aliment Pharmacol Ther* 24 (5): 701–714.

**Macfarlane S., McBai A.J. y Macfarlane G.T. (1997).** Consequences of biofilm and sessile growth in the large intestine. *Adv Dent Res* 11 (1): 59–68.

**Mack D.R. (2011).** Probiotics in Inflammatory Bowel Diseases and Associated Conditions. *Nutrients* 3 (2): 245–264.

**Mack D.R., Ahrne S., Hyde L., Wei S. y Hollingsworth M.A. (2003).** Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells *in vitro*. *Gut* 52 (6): 827-833.

**Madhu A. y Prapulla S. (2012).** *In vitro* fermentation of prebiotics by *Lactobacillus plantarum* CFR 2194: selectivity, viability and effect of metabolites on  $\beta$ -glucuronidase activity. *World J Microbiol Biotechnol* 28: 901–908.

**Mainville I., Arcand Y. y Farnworth E.R. (2005).** A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. *Int J Food Microbiol* 99 (3): 287-296.

**Matsumoto M. y Benno Y. (2004).** Consumption of *Bifidobacterium lactis* LKM512 yogurt reduces gut mutagenicity by increasing gut polyamine contents in healthy adult subjects. *Mutat Res* 568 (2): 147-153.

**Matsuzaki T. (1998).** Immunomodulation by treatment with *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Int J Food Microb* 41: 133-140.

**Mattia A. y Merker R. (2008).** Regulation of probiotic substances as ingredients in Foods: Premarker approval or Generally Recognized as Safe notification. *Clin Infect Dis* 46 (2): 115-118.

**Mazigh D., Alonso J.M. y Mollaret H.H. (1983).** Simple method for demonstration of differential colony morphology of plasmid-associated virulent clones of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol* 17 (3): 555-557.

**Mazmanian S.K., Liu C.H., Tzianabos A.O. y Kasper D.L. (2005).** An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell* 122: 107-118.

**McCracken V.J., Chun T., Baldeón M.E., Ahrné S., Molin G., Mackie R.I. y Gaskins H.R. (2002).** TNF- $\alpha$  sensitizes HT-29 colonic epithelial cells to intestinal lactobacilli. *Exp Biol Med* 227 (8): 665-670.

**McFarland L.V., Surawicz C.M., Greenberg R.N., Elmer G.W., Moyer K.A., Melcher S.A., Bowen K.E. y Cox J.L. (1995).** Prevention of beta-lactam-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii* compared with placebo. *Am J Gastroenterol* 90 (3): 439-448.

**Mege JLee.L., Meghari S., Honstettre A., Capo C. y Raoult D. (2006).** The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect Dis* 6: 557-569.

**Mejía J.A., Chacón Z., Guerrero B., Otoniel J. y López G. (2006).** Obtención de cepas de *Lactobacillus*. Caracterización *in vitro* como potenciales probióticas. *Rev Cient* 17 (2): 178-185.

**Mentschel J. y Claus R. (2003).** Increased butyrate formation in the pig colon by feeding raw potato starch leads to a reduction of colonocyte apoptosis and a shift to the stem cell compartment. *Metabolism* 52: 1400–1405.

**Miller P.E., Lazarus P., Lesko S.M., Cross A.J., Sinha R., Laio J., Zhu J., Harper G., Muscat J.E. y Hartman T.J. (2013).** Meat-related compounds and colorectal cancer risk by anatomical subsite. *Nutr Cancer* 65: 202–226.

**Mobarez A.M., Doust R.H., Hassan Z.M. y Kamali S. (2007).** Antimutagenic effect of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* isolated from Iranian yoghurt on 2-nitrofluorene. *Res J Microbiol* 2: 524-529.

**Möndel M., Schroeder B.O., Zimmermann K., Huber H., Nuding S., Beisner J., Fellermann K., Stange E.F. y Wehkamp J. (2009).** Probiotic *E. coli* treatment mediates antimicrobial human beta-defensin synthesis and fecal excretion in humans. *Mucosal Immunol* (2): 166-172.

**Monge D., Morosini M., Millán I., Pérez Canosa C., Manso M., Guzman M.F. y Asensio A. (2011).** Risk factors for *Clostridium difficile* infections in hospitalized patients. *Med Clin* 137 (13): 575-80.

**Monteoliva-Sánchez M., Aguilera M., Jiménez-Pranteda M. y Ramos-Cormenzana A. (2012).** En: Ramos-Cormenzana A., Monteoliva-Sánchez M. y Nader F. (eds). Probióticos y Salud. Díaz de Santos (eds). España. pp. 115-130.

**Mora S. y Corado J.A. (2003).** Inmunología actual. Bases fisiológicas para la comprensión de las alteraciones del sistema inmunitario. Alfa Impresores (eds). Universidad de Carabobo, Valencia-Venezuela.

**Morita H., He F., Fuse T., Ouwehand A.C., Hashimoto H., Hosoda M., Mizumachi K. y Kurisaki J. (2002).** Cytokine production by the murine macrophage cell line J774.1 after exposure to lactobacilli. *Biosci Biotechnol Biochem* 66 (9): 1963-1966.

**Morotomi M. y Mutai M. (1986).** *In vitro* binding of potent mutagenic pyrolysates to intestinal bacteria. *J Natl Cancer Inst* 77: 195-201.

**Morrow L.E., Gogineni V. y Malesker M.A. (2012).** Probiotic, prebiotic, and synbiotic use in critically ill patients. *Curr Opin Crit Care* 18 (2):186-191.

**Mortelmans K. y Zeiger E. (2000).** The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res* 455: 29-60.

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

**Mylyluoma E., Ahonen A.M., Korpela R., Vapaatalo H. y Kankuri E. (2008).** Effects of multispecies probiotic combination on *Helicobacter pylori* infection *in vitro*. *Clin Vaccine Immunol* 15: 1472-1482.

**Naaber P., Smidt I., Stsepetova J., Brilene T., Annuk H. y Mikelsaar M. (2004).** Inhibition of *Clostridium difficile* strains by intestinal *Lactobacillus* species. *J Med Microbiol* 53 (6): 551-554.

**Nader C.J., Spencer L.K. y Weller R.A. (1981).** Mutagen production during pan-broiling compared with microwave irradiation of beef. *Cancer Lett* 13: 147–152.

**Nguyen T.D., Kang J.H., Lee M.S. (2007).** Characterization of *Lactobacillus plantarum* PH04, a potential probiotic bacterium with cholesterol-lowering effects. *Int J Food Microbiol* 113 (3): 358-361.

**Noh S.Y., Kang S.S., Yun C.H. y Han S.H. (2015).** Lipoteichoic acid from *Lactobacillus plantarum* inhibits Pam2CSK4-induced IL-8 production in human intestinal epithelial cells. *Mol Immunol* 64: 183-189.

**Nowak A., Śliżewska K. y Otlewska A. (2015).** Antigenotoxic activity of lactic acid bacteria, prebiotics, and products of their fermentation against selected mutagens. *Regul Toxicol Pharmacol* 73 (3): 938-946.

**Oberreuther-Moschner D.L., Jahreis G., Rechkemmer G. y Pool-Zobel B.L. (2004).** Dietary intervention with the probiotics *Lactobacillus acidophilus* 145 and *Bifidobacterium longum* 913 modulates the potential of human faecal water to induce damage in HT29 clone 19A cells. *Br J Nutr* 91: 925-932.

**Oellerich M.F., Jacobi C.A., Freund S., Niedung K., Bach A., Heesemann J., Trülsch K. (2007).** *Yersinia enterocolitica* infection of mice reveals clonal invasion and abscess formation. *Infect Immun* 75 (8): 3802-3811.

**Ohland C.L. y MacNaughton W.K. (2010).** Probiotic bacteria and intestinal epithelial function. *Am J Physiol Gastrointest* 298: 807-819.

**OMGE: Organización Mundial de Gastroenterología (2011).** Guía práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y Prebióticos. [http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/2012%20Probiotics\\_NEW%20FINAL\\_sp.pdf](http://www.worldgastroenterology.org/assets/export/userfiles/2012%20Probiotics_NEW%20FINAL_sp.pdf) (consultada en julio 2017).

**OMS: Organización Mundial de la Salud.** Global Health Estimates 2015 Summary Tables: Global deaths by cause, age and sex, 2000-2015. [http://www.who.int/healthinfo/global\\_burden\\_disease/en/](http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/) (consultada en agosto de 2017).

**Oßwald K., Becker T.W., Grimm M., Jahreis G. y Pool-Zobel B.L. (2000).** Inter- and intra-individual variation of faecal water—genotoxicity in human colon cells. *Mutat Res* 472: 59–70.

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

**Papadimitriou K., Zoumpopoulou G., Foligné B., Alexandraki V., Kazou M., Pot B. y Tsakalidou E. (2015).** Discovering probiotic microorganisms: *in vitro*, *in vivo*, genetic and omics approaches. *Front Microbiol* 6: 58.

**Parvez S., Malik K.A., Ah Kang S. y Kim H.Y. (2006).** Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J Appl Microbiol* 100 (6): 1171-1185.

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

**Perdigón G., Maldonado-Galdeano C., Valdez J.C. y Medici M. (2002).** Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr* 56 (4): S21-26.

**Perelle S., Gibert M., Bourlioux P., Corthier G. y Popoff M.R. (1997).** Production of a complete binary toxin (actin-specific ADP-ribosyltransferase) by *Clostridium difficile* CD196. *Infect Immun* 65: 1402-1407.

**Pfeffer K. (2003).** Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev* 14: 185-91.

**Plummer S., Weaver M.A., Harris J.C., Dee P. y Hunter J. (2004).** *Clostridium difficile* pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. *Int Microbiol* 7 (1): 59-62.

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

**Prescott L.M., Harley J.P. y Klein D.A. (2005).** Microbiology (6th ed.). S.A. McGraw-Hill/Interamericana de España.

**Pridmore R.D., Pittet A.C., Praplan F. y Cavadini C. (2008).** Hydrogen peroxide production by *Lactobacillus johnsonii* NCC 533 and its role in anti-*Salmonella* activity. *FEMS Microbiol Lett* 283 (2): 210-215.

**Puertollano E., de Cienfuegos G.A., Ruiz-Bravo A., de Pablo M.A. y Puertollano M.A. (2013).** Culture supernatants from *Lactobacillus plantarum* induce necrosis on a human promyelocytic leukemia cell line. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 13 (2): 195-203.

**Puertollano E., Puertollano M.A., Cruz-Chamorro L., Álvarez de Cienfuegos G., Ruiz-Bravo A. y de Pablo M.A. (2008).** Orally administered *Lactobacillus plantarum* reduces pro-inflammatory interleukin secretion in sera from *Listeria monocytogenes* infected mice. *Br J Nutr* 99 (4): 819-825.

**Puertollano E., Puertollano M.A., Cruz-Chamorro L., de Cienfuegos G.A., Ruiz-Bravo A. y de Pablo M.A. (2009).** Effects of concentrated supernatants recovered from *Lactobacillus plantarum* on *Escherichia coli* growth and on the viability of a human promyelocytic cell line. *J Appl Microbiol* 106 (4): 1194-1203.

**Quigley E.M. (2011a).** Gut microbiota and the role of probiotics in therapy. *Curr Opin Pharmacol* 11 (6): 593-603.

**Quigley E.M. (2011b).** Prebiotics and probiotics; modifying and mining the microbiota. *Pharmacol Res* 61 (3): 213-218.

**Rachid M.M., Gobbato N.M., Valdéz J.C., Vitalone H.H. y Perdigón G. (2002).** Effect of yogurt on the inhibition of an intestinal carcinoma by increasing cellular apoptosis. *Int J Immunopathol Pharmacol* 15 (3): 209-216.

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

**REDECAN: Red Española de Registros de Cáncer.** Informe: Estimaciones de la incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa. <http://redcan.org/es/index.cfm> (consultada en agosto de 2017).

**Reid G., Jass J., Sebulsky M.T. y McCormick J.K. (2003).** Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 16 (4): 658-72.

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

**Riedel C.U., Foata F., Goldstein D.R., Blum S. y Eikmanns B.J. (2006).** Interaction of bifidobacteria with Caco-2 cells: adhesion and impact on expression profiles. *Int J Food Microbiol* 110: 62-68.

**Rieger M.A., Parlesak A., Pool-Zobel B.L., Rechkemmer G. y Bode C. (1999).** Diets high in fat and meat, but low in fiber increase the genotoxic potential of fecal water. *Carcinogenesis* 20: 2317-2326.

**Roberfroid M., Gibson G., Hoyles L., McCartney A., Rastall R., Rowland I., Wolvers D., Watzl B., Szajewska H., Stahl B., Guarner F., Respondek F., Whelan K., Coxam V., Davicco M.J., L otoing L., Wittrant Y., Delzenne N.M., Cani P.D., Neyrinck A.M. y Meheust A. (2010).** Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. *Br J Nut* 104 (2): 1-63.

**Rowland I., Capurso L., Collins K., Cummings J., Delzenne N., Goulet O., Guarner F., Marteau P. y Meier R. (2010).** Current level of consensus on probiotic science. *Gut Microb* 1: 436-439.

**Roy M.K., Kuwabara Y., Hara K., Watanabe Y. y Tamai Y. (2002).** Antimutagenic effect of amino acids on the mutagenicity of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). *Biosci Biotechnol Biochem* 66 (6): 1400-1402.

**Ruiz L., Margolles A. y S nchez B. (2013).** Bile resistance mechanisms in *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. *Front Microbiol*: 4 (396): 1-8.

**Rupnik M., Wilcox M.H. y Gerding D.N. (2009).** *Clostridium difficile* infection: new developments in epidemiology and pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 7 (7): 526-536.

**Saarela M., Mogensen G., Fond n R., M tt  J. y Mattila-Sandholm T. (2000).** Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J Biotechnol* 84 (3): 197-215.

**Saavedra J.M., Bauman N.A., Oung I., Perman J.A. y Yolken R.H. (1994).** Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. *Lancet*. 344: 1046-1049.

**Sah B.N.P., Vasiljevic T., McKechnie S. y Donkor O.N. (2016).** Antibacterial and antiproliferative peptides in synbiotic yogurt-Release and stability during refrigerated storage. *J Dairy Sci* 99 (6): 4233-4242.

**Salminen S. (1996).** Uniqueness of probiotic strains. *IDF Nutr News Lett* 5: 16-18.

**Salminen S., Gueimonde M. e Isolauri E. (2005).** Probiotics That Modify Disease Risk *J Nutr* 135: 1294-1298.

**Salsali H.R., Parker W.J. y Sattar S.A. (2006).** Impact of concentration, temperature, and pH on inactivation of *Salmonella* spp. by volatile fatty acids in anaerobic digestion. *Can J Microbiol* 52 (4): 279-286.

**Sánchez B., Urdaci M.C. y Margolles A. (2010).** Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa–bacteria interactions. *Microbiology* 156: 3232–3242.

**Sanders M.E. y Klaenhammer T.R. (2001).** Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. *J Dairy Sci* 84 (2): 319-331.

**Sanders M.E., Akkermans L.M.A., Haller D., Hammerman C., Heimbach J., Huys G., Mack D., Phothirath P., Constable A., Salano-Aguilar G., Vauchan E., Hormansperger G. y Lutgendorff F. (2010).** Safety assessment of probiotics for human use. *Gut microb* 1: 164-185.

**Sangeetha P.T., Ramesh M.N. y Prapulla S.G. (2005).** Recent trends in the microbial production, analysis and application of fructooligosaccharides. *Trends Food Sci Technol* 16: 442–457.

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

**Scaldaferri F., Gerardi V., Lopetuso L.R., Del Zompo F., Mangiola F., Boškoski I., Bruno G., Petito V., Laterza L., Cammarota G., Gaetani E., Sgambato A. y Gasbarrini A. (2013).** Gut microbial flora, prebiotics, and probiotics in IBD: their current usage and utility. *Biomed Res Int* 2013: 1-9.

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

**Schaake J., Kronshage M., Uliczka F., Rohde M., Knuuti T., Strauch E., Fruth A., Wos-Oxley M. y Dersch P. (2013).** Human and animal isolates of *Yersinia enterocolitica* show significant serotype-specific colonization and host-specific immune defense properties. *Infect Immun* 81 (11): 4013-4025.

**Schenck L.P., Beck P.L. y MacDonald J.A. (2015).** Gastrointestinal dysbiosis and the use of fecal microbial transplantation in *Clostridium difficile* infection. *World J Gastrointest Pathophysiol* 6 (4): 169-180.



**Schiffrin E.J., Rochat F., Link-Amster H., Aeschlimann J.M. y Donnet-Hughes A. (1995).** Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 78 (3): 491-497.

**Schlee M., Harder J., Köten B., Stange E.F., Wehkamp J. y Fellermann K. (2008).** Probiotic lactobacilli and VSL#3 induce enterocyte beta-defensin 2. *Clin Exp Immunol* 151 (3): 528-535.

**Schrezenmeir J. y de Vrese M. (2001).** Probiotics, prebiotics, and synbiotics--approaching a definition. *Am J Clin Nutr* 73 (2): 361-364.

**Schulze-Koops H. y Kalden J.R. (2001).** The balance of T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 15: 677-691.

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

**SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica.** Informe anual: Las cifras del cáncer en España 2017. <https://www.seom.org/en/prensa/el-cancer-en-espanyacom/105941-las-cifras-del-cancer-en-espana-2017> (consultada en agosto de 2017).

**Shin J.H., Chaves-Olarte E. y Warren C.A. (2016).** *Clostridium difficile* Infection. *Microbiol Spectrum* 4 (3): 1-21.

**Siitonen S., Vapaatalo H., Salminen S., Gordin A., Saxelin M., Wikberg R. y Kirkkola A.L. (1990).** Effect of *Lactobacillus* GG yoghurt in prevention of antibiotic associated diarrhoea. *Ann Med* 22 (1): 57-59.

**Silverman S.H., Turnell D.C., Youngs D.J. y Keighley MR. (1986).** What is the role of histidine in studies of faecal mutagenicity? *Mutat Res* 173 (2): 99-104.

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

**Siró I., Kápolna E., Kápolna B. y Lugasi A. (2008).** Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance: a review. *Appetite* 51: 456-467.

**Slavin J. (2013).** Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. *Nutrients* 5: 1417-1435.

**Smits H.H., Engering A., van der Kleij D., de Jong E.C., Schipper K., van Capel T.M., Zaat B.A., Yazdanbakhsh M., Wierenga E.A., van Kooyk Y. y Kapsenberg M.L. (2005).** Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* 115 (6): 1260-1267.

**Stark G.R., Kerr I.M., Williams B.R., Silverman R.H. y Schreiber R.D. (1998).** How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 67: 227-264.

**Steinberg R.S., Silva L.C., Souza T.C., Lima M.T., de Oliveira N.L., Vieira L.Q., Arantes R.M., Miyoshi A., Nicoli J.R., Neumann E. y Nunes A.C. (2014).** Safety and protective effectiveness of two strains of *Lactobacillus* with probiotic features in an experimental model of salmonellosis. *Int J Environ Res Public Health* 11: 8755-8776.

**Stevens M.G., Olsen S.C., Pugh Jr. G.W. y Palmer M.V. (1994).** Immune and pathologic responses in mice infected with *Brucella abortus* 19, RB51, or 2308. *Infect Immun* 62: 3206–3212.

**Stubbs S., Rupnik M., Gibert M., Brazier J., Duerden B. y Popoff M. (2000).** Production of actin-specific ADP-ribosyltransferase (binary toxin) by strains of *Clostridium difficile*. *FEMS Microbiol Lett* 186 (2): 307-312.

**Sugiura Y., Kamdar K., Khakpour S., Young G., Karpus W.J., DePaolo R.W. (2013).** TLR1-induced chemokine production is critical for mucosal immunity against *Yersinia enterocolitica*. *Mucosal Immunol* 6 (6): 1101-1119.

**Surawicz C.M., Elmer G.W., Speelman P., McFarland L.V., Chinn J. y van Belle G. (1989).** Prevention of antibiotic-associated diarrhea by *Saccharomyces boulardii*: a prospective study. *Gastroenterology* 96 (4): 981-988.

**Syngai G.G., Gopi R., Bharali R., Dey S., Lakshmanan G.M. y Ahmed G. (2016).** Probiotics: the versatile functional food ingredients. *J Food Sci Technol* 53: 921-533.

**Takemura N., Hagio M., Ishizuka S., Ito H., Morita T. y Sonoyama K. (2010).** Inulin prolongs survival of intragastrically administered *Lactobacillus plantarum* No. 14 in the gut of mice fed a high-fat diet. *J Nutr* 140 (11): 1963-1969.

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

- Taranto M.P., Medici M., Perdigon G., Ruiz Holgado A.P. y Valdez G.F. (1998).** Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J Dairy Sci* 81 (9): 2336-2340.
- Taranto M.P., Medici M., Perdigon G., Ruiz Holgado A.P. y Valdez G.F. (2000).** Effect of *Lactobacillus reuteri* on the prevention of hypercholesterolemia in mice. *J Dairy Sci* 83 (3): 401-403.
- Taylor G.A., Feng C.G. y Sher A. (2007).** Control of IFN-gamma-mediated host resistance to intracellular pathogens by immunity-related GTPases (p47 GTPases). *Microbes Infect* 9: 1644-1651.
- Tejada-Simon M.V., Lee J.H., Ustunol Z. y Pestka J.J. (1999).** Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *J Dairy Sci* 82 (4): 649-660.
- Theriot C.M. y Young V.B. (2015).** Interactions Between the Gastrointestinal Microbiome and *Clostridium difficile*. *Annu Rev Microbiol* 69: 445-461.
- Thiele O.E, Fan H., Tam A.J., Dejea C.M., Destefano S., Wu S., Chung L., Finard B.B., Wu X., Fathi P., Ganguly S., Fu J., Pardoll D.M., Sears C.L. y Housseau F. (2017).** The myeloid immune signature of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*-induced murine colon tumorigenesis. *Mucosal Immunol* 10 (2): 421-433.
- Tsuda H., Hara K. y Miyamoto T. (2008).** Binding of mutagens to exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* mutant strain 301102S. *J Dairy Sci* 91: 2960-2966.
- Turrone F., Milani C., Duranti S., Ferrario C., Lugli G.A., Mancabelli L., van Sinderen D. y Ventura M. (2017).** *Bifidobacteria* and the infant gut: an example of co-evolution and natural selection. *Cell Mol Life Sci* doi:10.1007/s00018-017-2672-0.
- Valdés-Varela L., Hernández-Barranco A.M., Ruas-Madiedo P. y Gueimonde M. (2016).** Effect of *Bifidobacterium* upon *Clostridium difficile* Growth and Toxicity When Co-cultured in Different Prebiotic Substrates. *Front Microbiol* 7 (738): 1-9.
- Von Schilde M.A., Hörmannspurger G., Weiher M., Alpert C.A., Hahne H., Bäuerl C., van Huynegem K., Steidler L., Hrcir T., Pérez-Martínez G., Kuster B. y Haller D. (2012).** Lactocepine secreted by *Lactobacillus* exerts anti-inflammatory effects by selectively degrading proinflammatory chemokines. *Cell Host Microbe* 11: 387-396.

**Vossenkämper A., Marchès O., Fairclough P.D., Warnes G., Stagg A.J., Lindsay J.O., Evans P.C., Luong le A., Croft N.M., Naik S., Frankel G. y MacDonald T.T. (2010).** Inhibition of NF- $\kappa$ B signaling in human dendritic cells by the enteropathogenic *Escherichia coli* effector protein NleE. *J Immunol* 185 (7): 4118-4127.

**Voth D.E. y Ballard J.D. (2005).** *Clostridium difficile* Toxins: Mechanism of Action and Role in Disease. *Clin Microbiol Rev* 18 (2): 247-263.

**Walker R. y Buckley M. (2006).** Probiotic microbes: the scientific bases. A report from the American Academy of Microbiology. ASM Press, Washington. <https://www.asm.org/index.php/colloquium-reports/item/4509-probiotic-microbes-the-scientific-basis> (consultada septiembre 2017):

**Wang G., Petzke M.M., Iyer R., Wu H. y Schwartz I. (2008).** Pattern of proinflammatory cytokine induction in Raw 264.7 mouse macrophages is identical for virulent and attenuated *Borrelia burgdorferi*. *J Immunol* 180: 8306-8315.

**Wang Y., Xie J., Wang N., Li Y., Sun X., Zhang Y. y Zhang H. (2013).** *Lactobacillus casei* Zhang modulate cytokine and toll-like receptor expression and beneficially regulate poly I: C-induced immune responses in Raw 264.7 macrophages. *Microbiol Immunol* 57: 54-62.

**Wells J.M., Rossi O., Meijerink M. y van Baarlen P. (2011).** Epithelial crosstalk at the microbiota – mucosal interface. *Proc Natl Acad Sci USA* 108 (1): 4607-4614.

**Wheeler J.G., Shema S.J., Bogle M.L., Shirrell M.A., Burks A.W., Pittler A. y Helm R.M. (1997).** Immune and clinical impact of *Lactobacillus acidophilus* on asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol* 79 (3): 229-233.

**Wittmann A., Autenrieth I.B. y Frick J.S. (2013).** Plasmacytoid dendritic cells are crucial in *Bifidobacterium adolescentis*-mediated inhibition of *Yersinia enterocolitica* infection. *PLoS One* 8 (8): e71338.

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

**Wong J.M., de Souza R., Kendall C.W., Emam A. y Jenkins D.J. (2006).** Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol* 40 (3): 235-243.

**Xiao J.Z., Kondo S., Takahashi N., Miyaji K., Oshida K., Hiramatsu A., Iwatsuki K., Kokubo S. y Hosono A. (2003).** Effects of milk products fermented by

*Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. *J Dairy Sci* 86 (7): 2452-2461.

**Yamamoto Y., Kurachi M., Yamaguchi K. y Oda T. (2007).** Induction of multiple cytokine secretion from Raw 264.7 cells by alginate oligosaccharides. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 238-241.

**Yamazaki K., Tsunoda A., Sibusawa M., Tsunoda Y., Kusano M., Fukuchi K., Yamanaka M., Kushima M., Nomoto K. y Morotomi M. (2000).** The effect of an oral administration of *Lactobacillus casei* strain shirota on azoxymethane-induced colonic aberrant crypt foci and colon cancer in the rat. *Oncol Rep* 7 (5): 977-982.

**Yan F. y Polk D.B. (2012).** *Lactobacillus rhamnosus* GG: An Updated Strategy to Use Microbial Products to Promote Health. *Funct Food Rev* 4 (2): 77-84.

**Zakostelska Z., Kverka M., Klimesova K., Rossmann P., Mrazek J., Kopecny J., Hornova M., Srutkova D., Hudcovic T., Ridl J. y Tlaskalova-Hogenova H. (2011).** Lysate of probiotic *Lactobacillus casei* DN-114 001 ameliorates colitis by strengthening the gut barrier function and changing the gut microenvironment. *PLoS One* 6: e27961.

**Zeisel S. (1999).** Regulation of nutraceuticals. *Science* 285:1853-1855.

**Zhang Y.Z. y Li Y.Y. (2014).** Inflammatory bowel disease: Pathogenesis. *WJG* 20 (1): 91-99.