

**UNIVERSIDAD DE
GRANADA**
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR II



**UNIVERSIDAD
DE GRANADA**

TESIS DOCTORAL

Efecto de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 sobre la expresión génica de la mucosa intestinal de ratas obesas

CÁNDIDO ROBLES SÁNCHEZ
2017

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA

MOLECULAR II

TESIS DOCTORAL

Efecto de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034,
Lactobacillus rhamnosus CNCM I-4036 y *Bifidobacterium*
breve CNCM I-4035 sobre la expresión génica de la mucosa
intestinal de ratas obesas

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

Cándido Robles Sánchez

Bajo la dirección de los doctores:

Luis Fontana Gallego

Julio Ramón Plaza Díaz

Granada, 2017

Editor: Universidad de Granada. Tesis Doctorales
Autor: Cándido Robles Sánchez
ISBN: 978-84-9163-730-1
URI: <http://hdl.handle.net/10481/48945>

El doctorando Cándido Robles Sánchez y los directores de la tesis, los Dres. Luis Fontana Gallego y Julio Ramón Plaza Díaz, garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y, hasta donde nuestro 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, 11 de Octubre de 2017

Director/es de la Tesis

Doctorando

Fdo.:

Fdo.:

Luis Fontana Gallego

Cándido Robles Sánchez

Julio Ramón Plaza Díaz



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Bioquímica y
Biología Molecular **B B**
M 2

Luis Fontana Gallego, Profesor Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada “Efecto de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 sobre la expresión génica de la mucosa intestinal de ratas obesas”, de la que es autor Don Cándido Robles Sánchez, ha sido realizada bajo mi dirección y asesoramiento y reúne las condiciones y calidad científica deseadas para ser presentada por el interesado para optar al grado de Doctor.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Granada, a 11 de Octubre de 2017.



UNIVERSIDAD
DE GRANADA



Bioquímica y
Biología Molecular **B B**
M 2

Julio Ramón Plaza Díaz, Investigador asociado al departamento de Bioquímica y Biología Molecular II de la Universidad de Granada

CERTIFICA

Que la Tesis Doctoral titulada “Efecto de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 sobre la expresión génica de la mucosa intestinal de ratas obesas”, de la que es autor Don Cándido Robles Sánchez, ha sido realizada bajo mi dirección y asesoramiento y reúne las condiciones y calidad científica deseadas para ser presentada por el interesado para optar al grado de Doctor.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firmo el presente certificado en Granada, a 11 de Octubre de 2017.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
Resumen	3
ANTECEDENTES	7
Microbiota	9
Microbiota intestinal.....	10
Microbiota intestinal y salud	13
Función de la microbiota intestinal	14
Probióticos.....	16
Efectos producidos por probióticos	17
Los probióticos hoy en día en la medicina humana.....	18
Fuentes, aislamiento, caracterización y evaluación de bacterias probióticas	19
Fuentes.....	20
Aislamiento.....	24
Identificación.....	25
Caracterización	26
Seguridad.....	30
Evaluación	31
Evaluación clínica.....	32
Mecanismos de acción de los probióticos	39
Mejora de la barrera epitelial.....	41
Aumento de la adhesión a la mucosa intestinal.....	48
Exclusión competitiva de microorganismos patógenos.....	52
Producción de sustancias antimicrobianas	54
Probióticos y sistema inmunitario	58
NLRs y probióticos.....	68
Obesidad y síndrome de resistencia insulínica	69
La rata Zucker como modelo de obesidad y síndrome de resistencia insulínica.....	71
Estudios con probióticos en ratas Zucker	73
Microbiota intestinal, obesidad y resistencia insulínica	73
MATERIALES Y METODOS.....	77
Probióticos.....	79
Declaración de principios éticos.....	79
Diseño experimental	79
Concentración de proteína de unión a lipopolisacárido (LBP) en suero	80
Microarray de DNA.....	80
Muestras	81
Procesamiento de las muestras de mucosa intestinal.....	82
Síntesis de cDNA, fragmentación y marcaje.....	84
Hibridación y escaneado del <i>GeneChip Rat Gene 1.1 ST array</i> . Análisis de los controles	86
Análisis Bioinformático. Introducción	89
Análisis de <i>outliers</i>	91
Preprocesamiento y normalización de los datos.....	92
Pre-procesamiento	92
Primer filtrado de los datos.....	93

Normalización	93
Segundo filtrado de los datos.....	93
Análisis de Componentes Principales y Cluster jerárquico.....	94
Análisis estadístico, PCA y clúster jerárquico	97
Análisis de rutas metabólicas y procesos ontológicos.....	104
qRT-PCR	105
Western blott	106
Inmunofluorescencia	106
Análisis estadístico	107
RESULTADOS	109
DISCUSIÓN.....	11241
CONCLUSIONES.....	11751
BIBLIOGRAFÍA	11755
Bibliografía.....	15757

Esta tesis doctoral ha dado lugar a las siguientes publicaciones y comunicaciones a congresos:

Publicaciones

- Sáez-Lara MJ, Robles-Sánchez C, Ruiz-Ojeda FJ, Plaza-Díaz J, Gil A. Effects of Probiotics and Synbiotics on Obesity, Insulin Resistance Syndrome, Type 2 Diabetes and Non-Alcoholic Fatty Liver Disease: A Review of Human Clinical Trials. *Int J Mol Sci* 2016; 17: E928.

- Plaza-Díaz J, Robles-Sánchez C, Abadía-Molina F, Morón-Calvente V, Sáez-Lara MJ, Ruiz-Bravo A, Jiménez-Valera M, Gil A, Gómez-Llorente C, Fontana L. *Adamde1*, *Ednrb* and *Ptgs1/Cox1*, inflammation genes upregulated in the intestinal mucosa of obese rats, are downregulated by three probiotic strains. *Sci Rep* 2017; 7: 1939.

- Plaza-Díaz J, Robles-Sánchez C, Abadía-Molina F, Sáez-Lara MJ, Vilchez-Padial LM, Gil A, Gómez-Llorente C, Fontana L. Probiotic administration drives differential gene expression in intestinal mucosa of obese rats. *Sci data* 2017. En prensa.

Comunicaciones a congresos

- Plaza-Díaz J, Robles-Sánchez C, Fontana L, Chueca N, Fernández-Caballero JA, García F, Sáez-Lara MJ, Romero F, Gil A, Gómez-Llorente C. Effects of three probiotic strains on the intestinal microbiota composition of Zucker rats. *Ann Nutr Metab* 2015; 67 (Suppl 1): 279-280. (Póster). 12th FENS European Nutrition Conference. Berlín, Alemania. 20-23 octubre de 2015.

- Plaza-Díaz J, Vilchez-Padial, Fontana L, Robles-Sánchez C, Chueca N, López-Bueno J, García F, Sáez-Lara MJ, Gil A, Gómez-Llorente C. Administration of three probiotic strains modifies the intestinal microbiota in an obesity rat model. IUNS 21st International Congress of Nutrition. Póster. 15-20 octubre 2017. Buenos Aires, Argentina.

- Robles-Sánchez C, Plaza-Díaz J, Abadía-Molina F, Morón-Calvente V, Sáez-Lara MJ, Ruiz-Bravo A, Jiménez-Valera M, Gil A, Gómez-Llorente C, Fontana L. Adamdec1, Ednrb and Ptgs1/Cox1, inflammation genes upregulated in the intestinal mucosa of obese rats, are downregulated by three probiotic strains. I Jornadas científicas del Centro de Investigación Biomédica (CIBM). (Oral). 21 de junio de 2017, Granada.

RESUMEN

Los probióticos son microorganismos vivos que confieren un beneficio a la persona que los consume en cantidades adecuadas. Se ha descrito que ejercen efectos beneficiosos en alergia, enfermedades intestinales, enfermedad hepática crónica e infecciones respiratorias y del tracto urinario, entre otras. Como mecanismos de acción para explicar tales efectos se han propuesto la modificación de la microbiota intestinal, la adherencia competitiva a la mucosa y al epitelio, el fortalecimiento de la barrera epitelial del intestino y la modulación del sistema inmunitario.

Nuestro grupo de investigación viene trabajando en los últimos años con tres cepas de probióticos. Las cepas se identificaron como *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y están depositadas en el Instituto Pasteur. Fueron aisladas a partir de las heces de recién nacidos alimentados de forma exclusiva con leche materna.

La selección de las cepas se hizo en base a sus propiedades *in vitro*, como su adhesión a células intestinales, sensibilidad a antibióticos y resistencia a sales biliares y pH ácido. Hemos demostrado su seguridad tras ingestión aguda en ratones tanto inmunocompetentes como inmunodeprimidos. Además, inhiben *in vitro* el crecimiento de *Listeria monocytogenes* y las infecciones por rotavirus humanos. Del mismo modo, hemos demostrado la tolerancia y seguridad de las tres cepas en un estudio clínico multicéntrico, aleatorizado, doble-ciego y controlado por placebo en voluntarios sanos. La administración oral de las cepas modificó la microbiota intestinal de los voluntarios y además tuvo efectos inmunomoduladores, como aumentos de la IgA secretora intestinal y de citoquinas anti-inflamatorias en suero.

Posteriormente, continuamos investigando los efectos de las tres cepas en ratas obesas Zucker. Estas ratas exhiben muchas de las características del síndrome de resistencia a la insulina (SRI) como obesidad, hiperglucemia, resistencia a la insulina, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia y concentraciones elevadas en suero de ácidos grasos libres, en comparación con sus controles delgados, las ratas Zucker-lean *Lepr^{+/fa}*, por lo que es uno de los más empleados. Además, las ratas Zucker-*Lepr^{fa/fa}* tienen esteatosis hepática y transaminasas elevadas en suero, lo que indica que poseen el componente hepático del SRI.

Utilizando este modelo, hemos descrito que la administración de estos probióticos, además de modificar la microbiota intestinal de los animales, disminuye la esteatosis hepática y ejerce efectos anti-inflamatorios, entre los que caben destacar las disminuciones de las concentraciones séricas del factor de necrosis tumoral (TNF)- α , la interleuquina (IL-6) y el lipopolisacárido (LPS) bacteriano.

Algunos autores han descrito la capacidad de ciertas cepas probióticas para modificar la expresión génica. Por ejemplo, Dykstra *et al.* (2011) han descrito la inducción de Muc3 en el intestino delgado de ratas por efecto de *Lactobacillus plantarum* 299v, *Lactobacillus rhamnosus* R0011 y *Bifidobacterium bifidum* R0071. Ohtsuka *et al.* (2012) administraron *Bifidobacterium breve* M-16V a crías de ratas durante su periodo neonatal y encontraron una menor expresión en el colon de diversos genes implicados en inflamación.

En el presente trabajo de tesis se ha continuado la investigación con las ratas Zucker. Nuestro objetivo fue investigar si *L. paracasei* CNCM I-4034, *B. breve* CNCM I-4035 y *L. rhamnosus* CNCM I-4036 son capaces de modular la expresión de genes de la mucosa intestinal de las ratas.

Los animales se dividieron para recibir durante 30 días un placebo o una de las cepas probióticas. Se investigó la expresión de 27000 genes intestinales mediante un chip de DNA, centrándonos posteriormente en tres involucrados en inflamación por haber sido su expresión modificada por las tres cepas:

- *Adamdec1*, ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase)-like protein decysin-1, gen que codifica una metaloproteasa cuya expresión aumenta en la maduración de las células dendríticas;
- *Ednrb*, receptor de endotelina tipo B, gen que codifica un receptor acoplado a proteína G y que une de forma inespecífica las endotelinas 1, 2 y 3, con papeles potenciales en procesos de vasoconstricción/vasodilatación y proliferación celular; y,
- *Ptgs1/Cox1*, ciclooxigenasa-1, gen que participa en la síntesis de prostaglandinas).

La expresión génica se estimó a través de los niveles de mRNA y proteínas. Los resultados indicaron que: 1) la expresión de los tres genes aumentó en la mucosa intestinal de las ratas obesas en comparación con las ratas cuando aún eran delgadas, y 2) la administración de los probióticos inhibió la expresión de Adamdec1 y Ednrb a nivel de mRNA y proteína, y la de Ptgs1/Cox1 a nivel de mRNA, en las ratas obesas.

Hemos tratado asimismo de profundizar en el mecanismo por el que estas cepas modifican la expresión de los tres genes, encontrando que los resultados podrían deberse, al menos en parte, a la acción de los probióticos sobre algunos tipos celulares de la mucosa intestinal pues los marcadores de macrófagos proinflamatorios y células dendríticas aumentaron en las ratas obesas, y la administración de las cepas revirtió tales aumentos.

ANTECEDENTES

Microbiota

La microbiota es la comunidad abundante y diversa de especies microbianas como bacterias, hongos, arqueas y virus que viven en el cuerpo humano (Blum, 2017; Clemente *et al.*, 2012).

Desde el descubrimiento y uso del microscopio, conocemos que existen billones de microorganismos. La mayor parte de estos son bacterias que se localizan permanentemente en contacto con nuestros “órganos barrera” (Artis, 2014).

La piel es el órgano más importante en contacto con los microbios a través del epitelio, siendo el órgano más extenso del ser humano, y su función principal es la de actuar como barrera frente a agentes externos. Debido a esta función, numerosas colonias bacterianas son mantenidas en niveles no contagiosos (Sanford *et al.*, 2013).

Otra zona que nos protege de las agresiones externas tanto de manera pasiva como activa y que está en contacto con el exterior son las vías respiratorias, eje central para la defensa frente a patógenos, gracias a la doble función del epitelio combinada con las células secretoras de moco (Knight *et al.*, 2003), pero es en el intestino donde se localiza la mayor parte de acuerdo a su abundancia relativa, teniendo una relación de mutualismo (Jensen *et al.*, 2009; Bartlett *et al.*, 2008; Bäckhed *et al.*, 2005), influyendo en múltiples rutas metabólicas para mantener el nicho estable y desempeñando papeles esenciales en la salud y la enfermedad. A este conjunto de microorganismos se le conoce como microbiota intestinal (Daliri *et al.*, 2017).

En el intestino se halla la mayor diversidad de microorganismos en contacto con el ser humano debido a que se crean microambientes anaerobios ricos en nutrientes, lo que les facilita el desarrollo y la supervivencia (Whitman *et al.*, 1998).

De los 50 *Phyla* de bacterias y 13 de *Archea* que existen (Rappe y Giovannoni, 2003; Rondón *et al.*, 1999), solo 2 de estos *Phyla* de bacterias (*Bacteroidetes* y *Firmicutes*) y 1 de *Archea*, *Methanobrevibacter smithii* (Backhed *et al.*, 2005; Eckburg *et al.*, 2005), se encuentran en el intestino de manera muy representativa. Cuando un individuo se hace adulto, el intestino es capaz de albergar de 500 a 1000 especies diferentes (Tuddenham *et al.* 2015). A pesar de esta gran diversidad, no todo el mundo

tiene los mismos microorganismos, si bien unas 160 especies sí son constantes para la mayoría de los seres humanos (Plaza-Díaz y Gil, 2013).

A lo largo del tubo digestivo, los alimentos van sufriendo diversos procesos para facilitar su descomposición y asimilación. En cada punto del aparato digestivo se van a producir eventos donde van a variar parámetros como el pH, por lo que los microbios que habitan en el tubo digestivo también varían en los distintos tramos tanto en número como en género.

En el estomago y en el duodeno, donde se produce la secreción de bilis y el pH es muy bajo, la colonización de microorganismos se va a ver limitada a 10^1 - 10^3 UFC/ml, mientras que la parte distal del intestino delgado y el colon se ven más favorecidas, oscilando entre 10^5 - 10^7 UFC/ml y 10^{11} - 10^{12} UFC/ml, respectivamente (O'hara y Shanahan 2006). A pesar de las diferencias que existen en la composición de la microbiota intestinal a lo largo del intestino, enterobacterias y bifidobacterias representan los primeros colonizadores (Mountzouris *et al.*, 2002).

Microbiota intestinal

Las mismas condiciones de pH, actividad inmunitaria y nutrientes que determinan la presencia o ausencia de microorganismos van a condicionar el tipo de microorganismos que se localizan a lo largo del tracto digestivo creando diversos hábitats (Donaldson *et al.*, 2016).

En el intestino delgado, debido a sus condiciones tan hostiles, la diversidad es notablemente inferior que en el colon, destacando *Proteobacteria* y especies del género *Clostridium* (Zoetendal *et al.*, 2012) (Figura 1A), aunque también se encuentran mayoritariamente *Bacteroidetes*, *Streptococcus*, *Latobacillus* y *Enterococcus*. En el duodeno se localizan *Haemophilus*, *Actinomyces*, algunos anaerobios y algunos lactobacilos (Mackie *et al.*, 1999). En el yeyuno e íleon existe un incremento de la variedad apareciendo bifidobacterias, anaerobios facultativos (*Bacteroides* y *Fusobacterium*) y anaerobios estrictos que están presentes en número creciente a partir de la válvula ileocecal (Holzapfel *et al.*, 1998). En la parte terminal del intestino delgado donde las condiciones ya son más favorables, se pueden alcanzar densidades

bacterianas anaerobias estrictas similares a las encontradas en el intestino grueso (Jandhyala *et al.*, 2015).

Es en el intestino grueso donde se localizan las comunidades más densas y diversas de todos los hábitats que pueden encontrarse en el cuerpo, concretamente en el ciego y en el colon. Los filos *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, seguido de *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia* son los más abundantes (Hollister *et al.*, 2014). La reducción en péptidos antimicrobianos, la falta de oxígeno y de fuentes de carbono simples facilitan la abundancia de las familias *Bacteroidaceae* y *Clostridiaceae* (Figura 1A). Los géneros más abundantes son *Bacteroidetes*, *Clostridium*, *Prevotella*, *Porphyromonas*, *Eubacterium*, *Ruminococcus*, *Streptococcus*, *Enterobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Peptostreptococcus* y *Fusobacteria* (Jandhyala *et al.*, 2015).

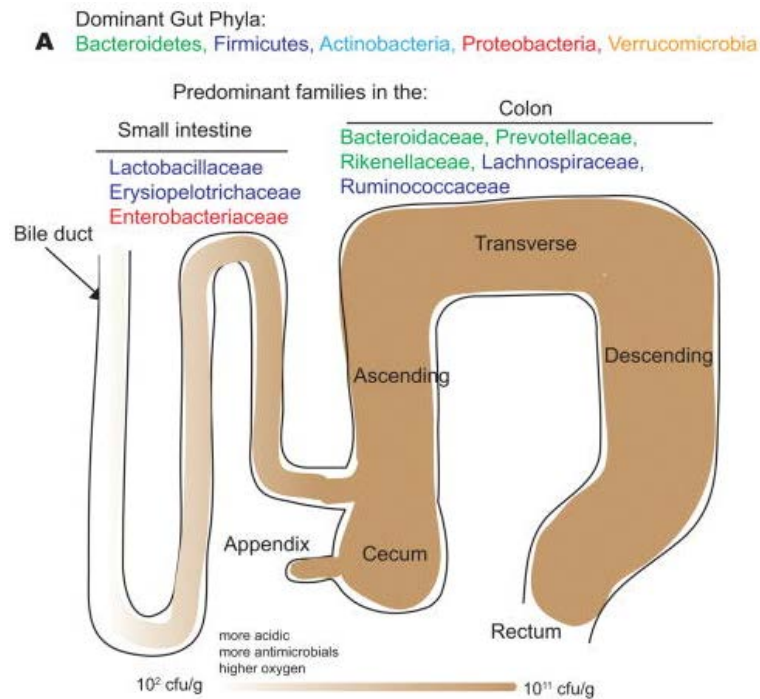


Figura 1A. Localización y distribución de la flora intestinal a lo largo del intestino delgado y grueso. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. Nat Rev Microbiol 2016; 14: 20-32.

Incluso dentro del propio intestino grueso, por su plegamiento, también va a haber diferencias bacterianas, encontrándose mayoritariamente los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* y *Ruminococcus* en la luz intestinal; y *Clostridium*, *Lactobacillus*,

Enterococcus y *Akkermansia* en las criptas y la mucosidad (figura 1B) (Swidsinski *et al.*, 2005).

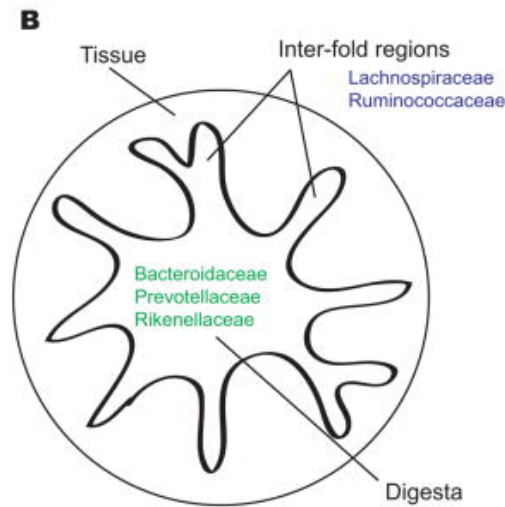


Figura 1B. Localización y distribución de los diferentes grupos de bacterias que se encuentran en un corte trasversal de intestino grueso. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. Nat Rev Microbiol 2016; 14: 20-32.

Existen diferencias entre el intestino grueso y delgado en lo que se refiere a las capas de moco y a la localización de la microbiota. El delgado solo tiene una capa de moco, mientras que el grueso posee dos. En el intestino delgado las bacterias se localizan por todo el moco mientras que en el grueso se localizan mayoritariamente en la capa externa (Figura 2) (Johansson *et al.*, 2008).

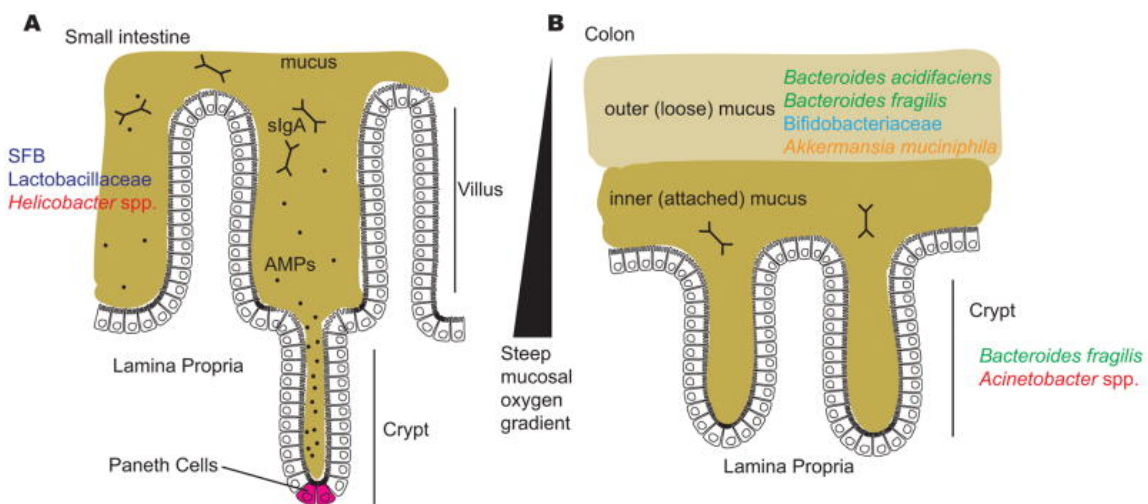


Figura 2. Diferentes localizaciones de las bacterias dependiendo de la mucosa intestinal delgada o gruesa. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. Nat Rev Microbiol 2016; 14: 20-32.

La compleja comunidad bacteriana presente en el intestino humano no permanece constante a lo largo del tiempo sino que puede variar por diversos factores entre los cuales podemos encontrar las propias condiciones ambientales del tubo digestivo, la cantidad y variedad de las bacterias en las diferentes regiones del mismo, la cual es determinada por una gran diversidad de factores complejos intrínsecos y extrínsecos (Mackie *et al.*, 1999). Existe a su vez, una relación recíproca entre el hospedador y la microbiota que lo habita, ya que la microbiota puede tener un importante impacto sobre el organismo que lo aloja y estos efectos pueden ser beneficiosos o perjudiciales para la salud del individuo (Hooper *et al.*, 2002).

Microbiota intestinal y salud

Existe una interacción entre la microbiota y el individuo, de forma que la alteración de la primera puede repercutir negativamente en el segundo. Algunos de los factores que afectan a la salud son:

- La diversidad. Cuanto mayor es la diversidad de la microbiota intestinal, mayor es la probabilidad de estar en un estado de salud (Claesson *et al.*, 2012).
- Las proporciones relativas de las bacterias (Ley *et al.*, 2006).
- La edad. Los recién nacidos aún no tienen establecida la microbiota. En el adulto de edad avanzada, las proporciones relativas varían produciéndose una disminución de la familia *Firmicutes*, bifidobacterias y *Faecalibacterium prausnitzii* y un aumento de *Escherichia coli*, estafilococos y *Proteobacteria* (Hollister *et al.*, 2014; Claesson *et al.*, 2011).
- La presencia de moco intestinal, que evita el contacto entre microbiota y sistema inmunitario intestinal, y la producción de antimicrobianos, mantienen al sistema inmunitario en un estado anti-inflamatorio (Johansson *et al.*, 2008; Kamada *et al.*, 2014).
- La genética del huésped. En individuos de la misma familia, sus microbiotas se asemejan más que en individuos no emparentados, así pues, si individuos sanos están genéticamente relacionados, tienen más probabilidad de estar en salud (Kamada *et al.*, 2014).

- La dieta. Se ha comprobado que el tipo de alimentación afecta mucho a la diversidad de la microbiota (Wu *et al.*, 2011; David *et al.*, 2014).
- Los antibióticos. También repercuten significativamente en la diversidad y en el conjunto de los microorganismos tanto a corto como medio y largo plazo (Dethlefsen *et al.*, 2011; Jernberg *et al.*, 2010).

Función de la microbiota intestinal

La microbiota intestinal mantiene una relación de simbiosis con el intestino y puede considerarse como un órgano propio del cuerpo. Esto es debido a que posee su propio genoma con sus propias funciones, encontrándose en un estado de equilibrio (O'Hara *et al.*, 2006).

Las bacterias forman una barrera de defensa natural que puede desarrollar actividades metabólicas que tienen por objetivo mantener la energía y mejorar la absorción de ciertos nutrientes, ejercer efectos tróficos importantes sobre la estructura y función inmunitaria del epitelio intestinal, así como proteger al hospedador frente a la colonización por otros microbios (Guarner y Magaleda, 2003; O'Hara y Shanahan, 2006).

Una de las funciones de la microbiota intestinal está relacionada con el proceso de digestión, que no es completo puesto que no todos los nutrientes pueden ser aprovechados por el individuo. Hidratos de carbono indigeribles se metabolizan a ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como butirato, propionato y acetato, los cuales resultan ricos en energía para el anfitrión (Macfarlane *et al.*, 2003; Sartor *et al.*, 2008). De este modo, bacterias del género *Bacteroides*, expresan numerosas enzimas que hidrolizan los hidratos de carbono, destacando *Bacteroides thetaiotaomicron* que cuenta con más de 260 hidrolasas diferentes (Cantarel *et al.*, 2012). Se ha descrito que el balance energético del anfitrión está mediado gracias a ligando-receptor donde los ácidos grasos de cadena corta se unen a un receptor Gpr41 acoplado a una proteína G (Samuel *et al.*, 2008).

Además de intervenir en el metabolismo glucídico, también intervienen en el metabolismo lipídico, produciendo en los adipocitos una supresión de la inhibición de la actividad de la lipoproteína lipasa (Hooper *et al.*, 2001), y en el metabolismo proteico, degradando proteínas y ayudando a las propias peptidasas del anfitrión. Gracias a la presencia de transportadores de aminoácidos en la membrana bacteriana, las bacterias incorporan

aminoácidos para la síntesis de péptidos antimicrobianos o bacteriocinas (Thomas *et al.*, 2012), como es el caso de *Lactobacillus* spp. capaz de producir ácido láctico, lo que provoca una interrupción de la membrana externa de la pared celular bacteriana produciendo un incremento de permeabilidad (Alakomi *et al.*, 2000).

Otra característica funcional de la microbiota es la síntesis de vitamina K, varios componentes de la vitamina B (Ramakrishna *et al.*, 2013; Leblanc *et al.*, 2013), y descomposición de polifenoles, que generalmente permanecen inactivos en la dieta. No obstante, son transformados en compuestos activos por las bacterias intestinales, después de que estas eliminen el resto de azúcar, entre otros factores (Marín *et al.*, 2015).

Se ha demostrado que la microbiota intestinal, induce la síntesis de proteínas antimicrobianas por el huésped, a través de sus componentes estructurales y metabolitos (Hooper *et al.*, 2009; Salzman *et al.*, 2007). Algunas de estas estructuras y sustancias que podemos encontrar se denominan patrones moleculares de microbios asociados a un organismo específico (mAmps o proteínas antimicrobianas (PAMs)), peptidoglicano, lipopolisacárido (LPS), lípido A, flagelos y RNA / DNA bacteriano (Takeuchi *et al.*, 2010; Carvalho *et al.*, 2012), quienes van a ser reconocidos por el individuo gracias a receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) donde se incluyen los receptores tipo Toll (*toll-like receptor*, TLRs), los receptores de lectina tipo C (CLR) y receptores tipo Nod (*Nod-Like Receptor*, NLRs) (Takeuchi *et al.*, 2010). De esta manera, los microorganismos desplazan a bacterias patógenas y además compiten con los patógenos por los PRR.

Del mismo modo se encargan de mantener a raya a bacterias patógenas mediante la producción de inmunoglobulina A (IgA); es un anticuerpo que juega un papel crucial en la función inmunitaria de las mucosas (Fagarasan *et al.*, 2003) de manera que bacterias son reconocidas por células dendríticas (CD) intestinales que mediante interacciones celulares inducen a las células plasmáticas en la mucosa intestinal para expresar IgA (He *et al.*, 2007).

Cada vez hay mayor conciencia de que la microbiota, aparte de las funciones bioquímicas, ayuda a mantener mecánicamente la estructura del tracto gastrointestinal de manera que ciertas bacterias, como *Bacteroides thetaiotaomicron*, se encargan de la producción de la proteína pequeña A2, rica en prolina y necesaria para el mantenimiento de los desmosomas en las vellosidades epiteliales (Sonnenberg *et al.*, 2012). También contribuye al

desarrollo estructural de la mucosa intestinal mediante la inducción del factor de transcripción angiogenina-3 (Stappenbeck *et al.*, 2002).

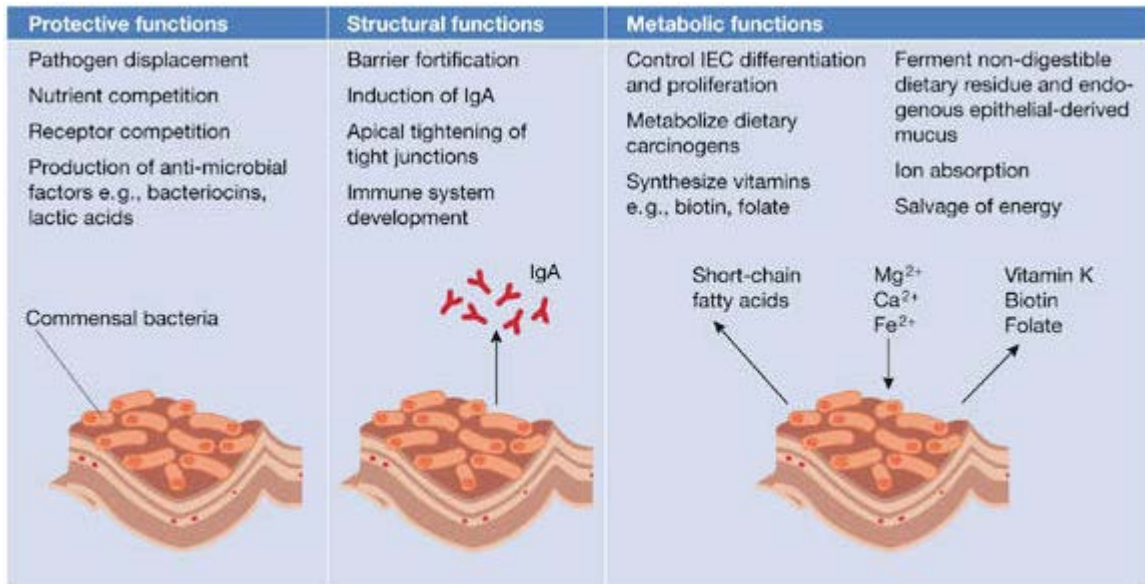


Figura 3. Esquema representativo de las funciones de la microbiota en el intestino. O'Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. EMBO Rep 2006; 7: 688-693

Probióticos

Los probióticos son ‘microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades apropiadas, confieren al huésped un beneficio para la salud’ (Guarner *et al.*, 1998).

El intestino es estéril al nacer pero empieza a ser colonizado por microorganismos inmediatamente tras el nacimiento. El desarrollo de la microbiota se produce principalmente durante la infancia, existiendo diferencias en la composición dependiendo de si la alimentación se ha llevado a cabo mediante leche materna o mediante fórmulas (Gomez-Llorente *et al.*, 2013). Estudios clínicos han demostrado el potencial de los probióticos en muchas patologías, tales como enfermedades alérgicas, diarrea, enfermedad inflamatoria intestinal e infección viral.

El mecanismo de acción de los probióticos no se conoce con exactitud aunque se sugieren las posibilidades que se detallan a continuación (Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

La primera de ellas hace referencia a la modulación de la microbiota del anfitrión mediante el efecto barrera. Los probióticos pueden producir resistencia

A la invasión de patógenos mediante la producción de bacteriocinas, metabolitos como los AGCC que van a disminuir el pH, con esto se genera un crecimiento poco favorable para bacterias enteropatógenas tales como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Shigella* (Juntunen *et al.*, 2001; Schiffrin *et al.*, 1997; Hirano *et al.*, 2003; Servin *et al.*, 2004; Muñoz-Quezada *et al.*, 2013).

Otro mecanismo de acción está relacionado con la modulación del sistema inmunitario, aumentando de manera significativa el contenido de IgA secretora fecal e interleuquinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-10, y disminuyendo la interleuquina pro-inflamatoria IL-12 en suero (Plaza-Díaz *et al.*, 2013; Gómez-Llorente *et al.*, 2010; Lebeer *et al.*, 2010; Butel *et al.*, 2014). Además, la mayoría de los mecanismos implican la regulación de la expresión génica en tejidos específicos, en particular el intestino y el hígado (Plaza-Díaz *et al.*, 2014).

Debido al incremento de la permeabilidad epitelial intestinal en condiciones de obesidad, se incrementa también la endotoxemia, como consecuencia se produce una inducción de la inflamación del hígado en la esteatohepatitis no alcohólica (NASH) y la enfermedad de hígado graso no alcohólico (NAFLD) (Plaza-Díaz *et al.*, 2014), y es aquí donde interviene el fortalecimiento de barrera epitelial que producen ciertos probióticos, de manera que esto estimula por un lado a las células epiteliales en las uniones intercelulares, a las células caliciformes produciendo moco intestinal y a las células de Paneth produciendo PAM (Ohland *et al.*, 2010; Anderson *et al.*, 2010).

Efectos producidos por probióticos

Algunos de los efectos beneficiosos de los probióticos en el intestino son los siguientes (Pandey *et al.*, 2015):

- Mejora de la salud intestinal y recupera la homeostasis tras procesos como disbiosis.
- Mitigan la intolerancia a la lactosa.
- Efectos anti-inflamatorios e inmunomoduladores.
- Actividad anticancerosa.

También ejercen efectos beneficiosos a nivel general, como (Ettinger *et al.*, 2014):

- Reducción de patógenos dentales.
- Favorecimiento de la conversión de nitrito a nitrato, lo que produce la aparición de óxido nítrico provocando un aumento de la vasodilatación, mejorando la función endotelial vascular, y disminuyendo la presión arterial.
- Mejora de la remodelación cardíaca y reducción de la hipertrofia después del infarto.
- Protección directa contra lesiones isquémicas mediante la producción de proteínas solubles y la activación de proteínas de choque térmico.
- Disminución del colesterol LDL a través de secuestro y procesamiento de sales biliares.
- Reducción del tamaño de las células adiposas y la masa grasa epididimal.
- Mejora de los niveles circulantes de leptina/adiponectina tras el infarto de miocardio.
- Reducción de la circulación y señalización de leptina en el cerebro tras infarto de miocardio.

Los probióticos hoy en día en la medicina humana

Como se ha descrito en la literatura, la disbiosis está relacionada con enfermedades como la obesidad, NAFLD y la enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras. Una de las estrategias para regenerar la microbiota es usar probióticos, lo que se ha intentado en estudios clínicos.

Por lo que se refiere a la obesidad, algunos trabajos han demostrado que *Lactobacillus gasseri* SBT2055, (Kadooka *et al.*, 2010), *Lactobacillus plantarum* (Sharafedinov *et al.*, 2013), o *Lactobacillus rhamnosus* (Sanchez *et al.*, 2014), reducen

el índice de masa corporal (IMC), adiposidad abdominal visceral y abdominal, perímetro de la cintura, adiponectina en suero, la presión arterial y el riesgo de padecer síndrome metabólico. Estos parámetros están relacionados con la grasa corporal y en definitiva con la obesidad.

Otra patología que se ha tratado con probióticos ha sido la diabetes mellitus tipo II. En esta patología donde se ha observado que el tratamiento con probióticos produce una mejora de los parámetros sanguíneos estudiados como glucosa plasmática en ayunas, hemoglobina glicosilada (HbA1c), una reducción de las concentraciones de insulina, LDL-colesterol y TNF- α en suero e incremento de las concentraciones de HDL-C e IL-10 (Razmpoosh *et al.*, 2016; Alokail *et al.*, 2013).

Una cepa probiótica que disminuye la concentración de glucosa en sangre tanto en ratas como en humanos es *Lactobacillus reuteri* GMN-32 (Lin *et al.*, 2014; Tonucci *et al.*, 2017; Mohamadshahi *et al.*, 2014).

En cuanto al hígado graso no alcohólico (NAFLD), *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus deslbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium bifidum* son algunos de los probióticos que en ensayos clínicos mejoran reduciendo la grasa hepática, los niveles de aspartato aminotransferasa y el colesterol total (Wong *et al.*, 2013; Ma *et al.*, 2013).

Fuentes, aislamiento, caracterización y evaluación de bacterias probióticas

Para encontrar microorganismos con propiedades probióticas es necesario seguir un procedimiento muy claramente definido. Este comienza con la investigación de diversas fuentes en las que se pueden encontrar tales bacterias, luego una etapa de caracterización en la que se evalúan la tolerancia a las condiciones gastrointestinales (tanto gástricas como intestinales), la capacidad de adherirse a la mucosa gastrointestinal y la competición frente a bacterias patógenas (Collins *et al.*, 1998, Ouwehand *et al.*, 2002, Muñoz-Quezada *et al.*, 2013). Finalmente, existe una etapa de evaluación que tiene como propósito investigar el efecto y/o beneficio en estudios experimentales y clínicos.

Las distintas etapas tienen como principios imprescindibles que las cepas halladas puedan (Bagheripoor *et al.*, 2015):

- Haber demostrado efectos beneficiosos en el hospedador.
- Ser no patógeno, no tóxico y no presentar ningún efecto adverso significativo.
- Ser capaz de sobrevivir a condiciones gastrointestinales en estudios *in vitro* e *in vivo*.
- Estar presente en un producto en cantidad adecuada de células viables para proporcionar beneficios en la salud.
- Ser compatible con la matriz del producto, procesamiento y condiciones de almacenamiento para mantener las condiciones deseadas (Collado *et al.*, 2010).

Cada una de las etapas mencionadas es detallada a continuación.

Fuentes

Los lácteos y los productos derivados de los lácteos son una buena fuente de probióticos (Liong *et al.*, 2011). En este contexto, las bacterias del ácido láctico (LAB, por sus siglas en inglés), bifidobacterias y otros microorganismos obtenidos a partir de leche fermentada, han sido utilizados durante siglos. Un ejemplo de ello es la fermentación espontánea de la leche realizada durante varias generaciones en regiones de Mongolia y África por conferir efectos beneficiosos (Yu *et al.*, 2011). En general, la gran parte de los microorganismos aislados a partir de los productos fermentados pertenecen al género *Lactobacillus* (Vizoso-Pinto *et al.*, 2006; Lim e Im, 2009; Won *et al.*, 2011), pero existen excepciones como el caso de una cepa de *Weisella*, aislada de alimentos fermentados nigerianos y seleccionada posteriormente como probiótico (Ayeni *et al.*, 2011).

Dentro de las leches tradicionales fermentadas que contienen diversas especies bacterianas no es raro encontrarse con bacterias candidatas que podrían ser consideradas probióticos. Así, se aislaron 148 cepas de LAB de una leche tradicional de yak llamada *Kurut*, que se fermenta de forma natural en regiones de China, siendo *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* las poblaciones microbianas predominantes (Sun *et al.*, 2010). Hay que destacar además que levaduras y cepas de *Lactobacillus* con propiedades probióticas han sido aisladas también de granos

de kéfir, leche Masai y *koumiss* (un fermentado de bebida de leche) (Lopitz-Otsoa *et al.*, 2006; Romanin *et al.*, 2010; Patrignani *et al.*, 2006; Ya *et al.*, 2008). Dentro de los productos lácteos fermentados, el queso es un producto con gran potencial como fuente de microorganismos probióticos para el intestino humano. Cepas de *L. plantarum* han sido aisladas de quesos italianos, argentinos y búlgaros (Zago *et al.*, 2011; Ugarte *et al.*, 2006; Georgieva *et al.*, 2008).

Una fuente importante de probióticos es la leche materna. Desde el descubrimiento de que la leche materna no es estéril, incluso cuando se extraía asépticamente, se planteó la posibilidad de que pudiera ser un inóculo bacteriano (West *et al.*, 1979). La presencia de bacterias en la leche materna había sido considerada siempre como consecuencia de una contaminación previa apartir de la piel. Sin embargo, los lactobacilos presentes en la leche humana son genotípicamente diferentes de los aislados de la piel (Martin *et al.*, 2009; O'Hara y Shanahan, 2006). Las cepas de LAB que se encuentran presentes en la leche materna se observan también en las heces de los lactantes alimentados con ella (Martin *et al.*, 2003). Por todo ello, la leche materna constituye una interesante fuente de LAB y bifidobacterias, tomando en consideración a estas cepas para incluirlas en fórmulas infantiles y alimentos destinados a infantes (Arbolea *et al.*, 2012).

Hay que agregar también que recién nacidos alimentados con leche materna tienen menos alergias e infecciones gastrointestinales que los que han recibido fórmulas, por lo que la microbiota intestinal de los niños que reciben leche materna podría ser considerada "más sana" (Solis *et al.*, 2010).

La leche materna humana contiene una variada gama de bacterias, encontrándose de manera predominante estafilococos, estreptococos, micrococos, lactobacilos, enterococos, lactococos y bifidobacterias (O'Hara y Shanahan, 2006; Martin *et al.*, 2003; Solis *et al.*, 2010; Gueimonde *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2004; Pérez-Cano *et al.*, 2010) y su ingesta favorece el predominio de las bifidobacterias y lactobacilos en la microbiota intestinal infantil. Varios autores han señalado que los lactobacilos aislados de la leche materna son una alternativa eficiente para el tratamiento de la mastitis infecciosa durante la lactancia comparados con los antibióticos comúnmente prescritos (Arroyo *et al.*, 2010; Jiménez *et al.*, 2008). Por otra parte, se ha descrito que dos cepas de *Lactobacillus* aisladas de la leche materna

humana mejoraban la respuesta inmunitaria a través de la activación de las células *natural killer* y la expansión de células T reguladoras (Pérez-Cano *et al.*, 2010).

Otra fuente importante de probióticos es el tracto gastrointestinal (TGI) humano. Más de 500 especies diferentes de bacterias residen en el intestino humano adulto. De hecho, muchas de las cepas de probióticos utilizadas en la actualidad han sido aisladas a partir de esta fuente, tales como *L. gasseri* y *L. reuteri* (Ryan *et al.*, 2008). Además, se ha descrito que *L. fermentum*, aislado a partir de muestras de biopsia de mucosa de colon humano, posee actividad antimicrobiana frente a patógenos transmitidos por los alimentos. Cepas probióticas tales como *B. longum* (Srutková *et al.*, 2011) y *L. acidophilus* RY2 (Lin *et al.*, 2009), han sido aisladas de muestras de heces de adultos sanos y lactantes, respectivamente. En concordancia con la lactancia materna, varios estudios han descrito también el aislamiento de probióticos de las heces de estos lactantes (Martin *et al.*, 2006; Acharya y Shah, 2002; Muñoz-Quezada *et al.*, 2013). En la figura 4 se muestran los diferentes pasos necesarios para la caracterización de cepas probióticas (Fontana *et al.*, 2013).

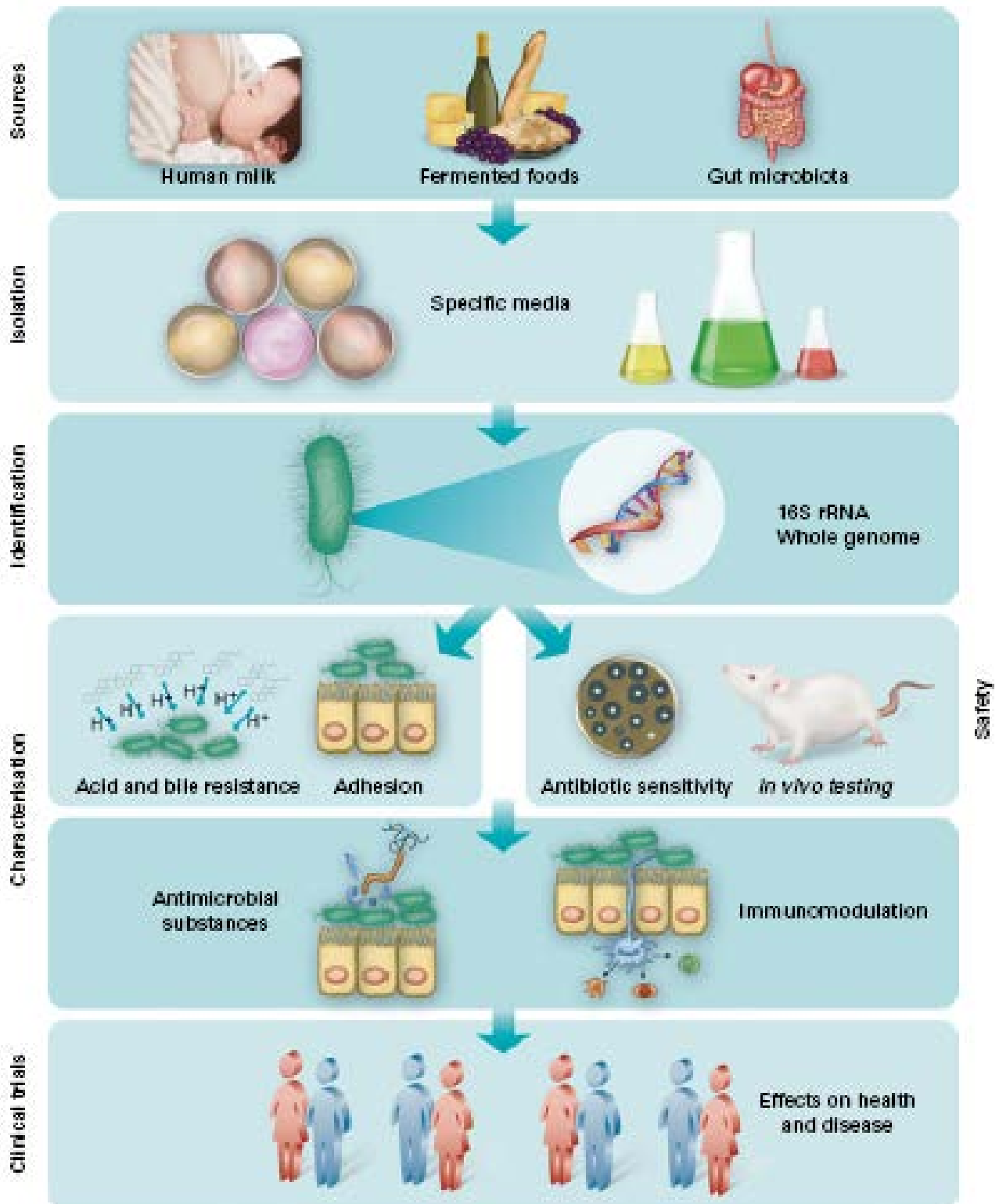


Figura 4. Diagrama de flujo que describe los diferentes pasos a seguir para que una cepa bacteriana pueda ser considerada como un nuevo probiótico. rRNA, ARN ribosomal. Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Muñoz-Quezada S, Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. Br J Nutr 2013; 109: 35-50.

El aislamiento de probióticos no se limita necesariamente al TGI humano. El TGI de varias especies de animales, como cerdos, ratas e incluso aves de corral, es una buena fuente de probióticos (Petrof, 2009). Recientemente, se aisló *L. johnsonii* CRL 1647 del intestino de la abeja *Apis mellifera* L., demostrando un efecto beneficioso sobre las colonias de éstas abejas (Audisio y Benítez-Ahrendts, 2011). También se han obtenido cepas probióticas del TGI de peces marinos y de agua dulce, tales como *Carassius auratus gibelio* (Chu *et al.*, 2011), la trucha arco iris (Pérez-Sánchez *et al.* 2011) y el camarón (Hill *et al.*, 2009).

Aunque la gran mayoría de las cepas probióticas se han obtenido a partir de productos lácteos, fermentados lácteos y del TGI, hay estudios que muestran que las cepas probióticas también se encuentran en sustratos fermentados no lácteos (Rivera-Espinoza y Gallardo-Navarro, 2010). Por ejemplo, en experimentos *in vitro* se ha demostrado que ciertas cepas bacterianas aisladas de la carne (*L. sakei*, *L. curvatus* y *Staphylococcus carnosus*) y de frutas (*L. paracasei* y *L. plantarum*), pueden expresar propiedades funcionales y metabólicas similares a las de las bacterias intestinales humanas (Haller *et al.*, 2001).

Aislamiento

Hoy día se acepta que los enfoques basados en métodos de cultivo proporcionan una imagen incompleta de la diversidad microbiana. Los nichos ecológicos presentan una compleja interrelación entre las diferentes especies de microbios, que no se pueden imitar utilizando métodos de cultivo tradicionales. Enfoques moleculares que omiten el paso de cultivo se han vuelto populares como método para identificar la diversidad microbiana de diferentes fuentes. Estos métodos suministran información importante sobre los ecosistemas microbianos.

El primer paso en el estudio de un ecosistema es el aislamiento de sus miembros (Fontana *et al.*, 2013). En el aislamiento de bacterias probióticas es importante mantener la muestra en condiciones adecuadas antes de proceder a incubarla en medios selectivos. La gran mayoría de los probióticos son anaeróbicos o anaeróbicos facultativos. Por ello, la muestra recogida debe ser inmediatamente puesta en condiciones de anaerobiosis y

procesada lo antes posible. Se recomienda que una vez obtenida, no se superen las 3 horas. Las muestras deben ser homogeneizadas rápidamente y luego diluidas para proceder a cultivarlas en medios selectivos (Muñoz-Quezada *et al.*, 2013).

Se han desarrollado varios medios de cultivo para el aislamiento selectivo de bifidobacterias y lactobacilos (Hartemink y Rombouts, 1999; Hartemink *et al.*, 1996; Beerens, 1990; Dave y Shah, 1995; Munoa y Pares, 1988; Nebra y Blanch, 1999; Silvi *et al.*, 1996; Rogosa *et al.*, 1951; Downes e Ito, 2001; MacFaddin, 1985). Rogosa *et al.* desarrollaron un medio selectivo para el aislamiento y recuento de lactobacilos y bifidobacterias, tanto orales como fecales, que contiene una base de agar Columbia suplementado con ácido propiónico. El pH ácido de este medio es fácilmente tolerado por lactobacilos y bifidobacterias, pero, además, inhibe el crecimiento de otros organismos presentes en las heces humanas, tales como especies de *Bacteroides* y *Eubacterium*. Las placas de agar son incubadas a 37 °C durante un rango de 48 a 72 horas en un ambiente anaeróbico para el crecimiento de bifidobacterias y otras especies. Otra alternativa es una atmósfera rica en CO₂ para favorecer el crecimiento de lactobacilos. Posteriormente, las colonias se aíslan y transfieren a un medio líquido o a una nueva placa de agar.

Identificación

La identificación de microbios aislados desde el TGI o de alimentos es la primera etapa en la selección de potenciales probióticos.

Para el caso de muchos ecosistemas, sólo un pequeño porcentaje de los microbios pueden crecer en los medios de cultivo utilizados hoy día (Amann *et al.*, 1995). La clasificación taxonómica podría ser definida como el proceso de catalogación de la biodiversidad basado en un enfoque con muchas fases (Vandamme *et al.*, 1996), que implica métodos genotípicos y fenotípicos. Históricamente, los métodos fenotípicos se han utilizado para identificar a las bacterias. La taxonomía durante muchas décadas se basó en el tipo de fermentación que se producía por las bacterias, determinado por cuál era el azúcar fermentado y los productos posteriormente generados. Por este motivo, los probióticos han sido principalmente clasificados como LAB.

Hoy en día, el análisis de la subunidad ribosomal 16S se ha convertido en el método de elección para su correcta identificación. Durante las últimas dos décadas, los microbiólogos han utilizado este fragmento conservado para la clasificación filogenética (Woese, 1987; Winker y Woese, 1991). También la relación entre los organismos se estima a través de la comparación de sus secuencias en las bases de datos disponibles, DDBJ (*DNA Data Bank of Japan*), ENA (*European Nucleotide Archive*) y GenBank (*National Institutes of Health (NIH) genetic sequence database*).

El análisis de la subunidad 16S se ha sido combinado con otros métodos para identificar comunidades bacterianas del intestino y fuentes ecológicas. Dentro de estas técnicas podemos nombrar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), la electroforesis en gel de agarosa, Inmunofluorescencia in situ (FISH) o la digestión con enzimas de restricción del fragmento amplificado correspondiente a la subunidad 16S (*terminal restriction fragment length polymorphism*, T-RFLP). Sin embargo, el fragmento obtenido es extremadamente pequeño, alrededor de 1500 pares de bases (pb) en comparación con el genoma bacteriano completo de 30.000 a 40.000 pb. Por lo tanto, es necesario obtener información complementaria para poder diferenciar cepas de una misma especie. La región intergénica (16S-23S) exhibe una gran variación que ha permitido diferenciar entre distintas especies de procariotas (Leblond-Bourget *et al.*, 1996). Finalmente, el análisis del genoma bacteriano es la herramienta más utilizada en la actualidad para identificar cualquier tipo de microorganismos.

Caracterización

Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* son los más importantes cuando nos referimos al término "probiótico", en cuanto a especies documentadas. Cuando éstas son ingeridas en un número suficiente deben superar el TGI y persistir durante algún tiempo para poder ejercer sus efectos beneficiosos. En la parte introductoria del tema se definieron los principios que debían poseer las cepas candidatas para ser consideradas como probióticas. Para ello, las bacterias debían ser administradas vivas, aunque algunos autores han demostrado que los efectos beneficiosos también pueden existir cuando las cepas se administran muertas (de los Reyes Gavilán *et al.*, 2011).

La capacidad de tolerar un pH extremadamente ácido (1,5 - 3,0), las enzimas gástricas, las sales biliares y otras enzimas intestinales presentes en el TGI son las distintas barreras que deben superar las cepas administradas para llegar en cantidad suficiente para ejercer sus efectos (Masco *et al.*, 2007). Varios ensayos *in vitro* han sido diseñados para imitar estas condiciones a las que son sometidas las cepas que se consideran potenciales probióticos.

Resistencia a pH ácido y sales biliares: La tolerancia a un medio ácido es uno de los criterios generales para la selección de posibles cepas probióticas, con la idea de garantizar su viabilidad y funcionalidad (FAO, 2002). Sistemas *in vitro*, en los que se incluyen incubaciones controladas con jugos gástricos reales y/o simuladas (pH 2,0 a 4,0 y 70-180 min), se han utilizado preferentemente en la evaluación de nuevas cepas probióticas (Sanz, 2006). También se han desarrollado modelos complejos que simulan el tránsito gastrointestinal (Masco *et al.*, 2007; Mainville *et al.*, 2005). Por otra parte, se han realizado incubaciones de 1 a 4 h en medios enzimáticos y/o químicos en intervalos de pH de 1,5 a 3,0. Las sales biliares facilitan la digestión de compuestos lipofílicos, pero también se comportan como agentes antimicrobianos por influir en el establecimiento de la microbiota intestinal. Las concentraciones fisiológicas de sales biliares en la bilis humana van desde 0,3 a 0,5% (Dunne *et al.*, 2001; Zavaglia *et al.*, 1998). Los ensayos *in vitro* con sales biliares se llevan a cabo con bilis bovina de concentraciones entre 0,3 y 0,7% durante 60-180 min.

Los probióticos muestran resistencia variable tanto a los medios ácidos como a los que presentan sales biliares, siendo esta característica dependiente de la cepa. Existen en la literatura controversias sobre la supervivencia de las bifidobacterias; hay estudios que han descrito que son muy sensibles a valores ácidos de pH. Algunas especies presentan tasas de supervivencia nula a pH 2,0 durante 90 min (Sanz, 2006; Charteris *et al.*, 1998), menos de 1% a pH 3,0 durante 2 h (Takahashi *et al.*, 2004) y un aumento de supervivencia cuando el pH varía desde 3,0 a 5,0 durante 3 h (Matsumoto *et al.*, 2004). En cambio, algunos autores destacan que los porcentajes más altos de tasas de supervivencia se han descrito para las bifidobacterias (Matto *et al.*, 2006; Chenoll *et al.*, 2011; Muñoz *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2010). Para las cepas de *Lactobacillus* se han demostrado altas resistencias a pH ácidos. Un estudio en el que se evaluaron 20 cepas de *Lactobacillus* demostró una tasa de supervivencia que variaba de 2 a 100% con un

pH de 3,0 durante 1 h. Sobre las sales biliares, la tasa de supervivencia de las bifidobacterias varía desde 1 a 70% en concentraciones de 0,3% de sales durante 90 min (Mainville *et al.*, 2005). Para el caso de los lactobacilos, se han probado dos cepas de *L. plantarum* que han tenido una supervivencia mayor al 50% con una concentración de sales biliares desde 0,3 a 1% durante 2 a 3 h (Bosch *et al.*, 2012).

Por los datos expuestos anteriormente, se observa que las bacterias desarrollan cierta adaptación cuando se les somete a condiciones de estrés, tales como medios con cantidades variables de nutrientes, distintos pH ácidos y porcentajes de sales biliares (Mills *et al.*, 2011).

Adherencia a células epiteliales intestinales: La adherencia a las células epiteliales intestinales y también al *mucus* es una característica importante de los probióticos para promover el tiempo de residencia en el intestino, la exclusión de algunos patógenos y las interacciones que pueden ocurrir con el hospedador y con el sistema inmunitario.

En los últimos 25 años, la línea celular Caco-2 ha sido la más usada para determinar la capacidad de adhesión de las cepas probióticas (Dicks y Botes, 2010). Las células Caco-2 forman una monocapa homogénea, que se asemeja a la de los enterocitos maduros humanos en el intestino delgado (Lenaerts *et al.*, 2007).

Existe otro tipo de línea celular de colon, la HT-29 que también muestra características típicas de diferenciación de enterocitos y se ha utilizado en ensayos de adhesión *in vitro* (Gopal *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos en los estudios de adhesión en modelos *in vitro*, líneas celulares y/o su combinación son muy variados (Laparra y Sanz, 2009). De hecho, lactobacilos, bifidobacterias y bacterias patógenas exhiben diferencias en la adhesión al *mucus*, células Caco-2, Caco-2 más *mucus*, HT-29-MTX y Caco-2/HT-29-MTX. Así por ejemplo, para *L. rhamnosus* GG se han obtenido capacidades de adhesión en los sistemas antes mencionados de 10,21%, 5,17%, 3,19%, 0,84% y 0,85%, respectivamente. Muchos estudios *in vitro* evalúan la adhesión de potenciales bacterias probióticas y las interacciones con patógenos en la interfaz del epitelio intestinal, obteniendo resultados que dependen fundamentalmente de la técnica y cepa utilizada (Izquierdo *et al.*, 2008).

Las diferencias existentes entre las condiciones experimentales utilizadas para la tolerancia en medio ácido, (medios acidificados usando ácido clorhídrico o láctico, con y sin enzimas), resistencia a sales biliares (dosis y origen de las sales biliares) y adhesión (*mucus*, líneas celulares, células más *mucus*) generan un problema a la hora de comparar los diferentes estudios y resultados. Además, es importante destacar que cada una de las etapas descritas tiene siempre la cualidad de ser cepa-específica, variando entre diferentes especies y géneros. Así, los estudios clínicos posteriores son la herramienta definitiva para establecer la verdadera funcionalidad de la cepa estudiada (Fontana *et al.*, 2013).

Actividad antimicrobiana: Los probióticos, por definición, cuando son administrados en cantidades adecuadas ejercen efectos beneficiosos para el hospedador. Uno de los más importantes es la actividad antimicrobiana frente a patógenos (Laparra y Sanz, 2009).

Las infecciones intestinales están mediadas por la adhesión de las bacterias patógenas a la superficie de las mucosas, lo que produce un cambio en la microbiota intestinal presente. Las bacterias probióticas pueden tener un rol protector a través de diversos mecanismos que incluyen la producción de sustancias antimicrobianas, la competencia con los propios patógenos por nutrientes, la adhesión a sitios de unión que impiden la posterior infección de los mismos y la estimulación del sistema inmunitario (Collado *et al.*, 2007).

Ferreira *et al.* evaluaron la capacidad de 7 cepas de *L. gasseri* para adherirse a la mucosa intestinal frente a los patógenos *Cronobacter sakazakii* (ATCC 29544) y *Clostridium difficile* (ATCC 1296). Estas cepas probióticas produjeron una disminución en la adhesión de estos patógenos (Ferreira *et al.*, 2011).

La capacidad de las cepas probióticas de inhibir el crecimiento de patógenos en medios de cultivo sólido y líquido y la posterior modulación mediante la producción de citoquinas y factores de crecimiento en líneas celulares, ha sido documentada usando modelos *in vitro* para la evaluación de sus efectos biológicos. Hay que añadir que también se han realizado estudios de actividad antimicrobiana de probióticos en modelos animales.

Finalmente, varias cepas de lactobacilos y bifidobacterias han demostrado la inhibición del crecimiento de *Escherichia coli* (Gopal *et al.*, 2001; Todoriki *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2008; Candela *et al.*, 2008), *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri* (Jankowska *et al.*, 2008; Tien *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2009) y *Clostridium difficile* (Pillai y Nelson, 2008).

Seguridad

Hasta el año 2002, fecha en que se creó la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés, *European Food Safety Authority*), no existía ninguna guía formal que detallara la seguridad en productos alimentarios que contuvieran microbios. En 2007, el Comité Científico sobre Nutrición Animal propuso las normas "*qualified presumption of safety*" (QRS), sobre presunción de seguridad en productos alimentarios que tuvieran algún microbio. Las LAB se convirtieron en uno de los primeros grupos sometidos a estas normas, que se basan en cuatro etapas que deben cumplirse obligatoriamente:

- Definición de la taxonomía del microbio.
- Entrega de información referente a literatura científica, historia de uso, aplicaciones industriales y datos en intervenciones animales y humanas para proporcionar el *status* de presunción de seguridad.
- Exclusión de la patogenicidad.
- Definición de su uso final.

Los factores que se deben considerar para evaluar la seguridad de los probióticos incluyen: historia de aislamiento y clasificación taxonómica del probiótico potencial, controles de fabricación que eliminen la contaminación (incluida la contaminación cruzada entre lotes) de probióticos con microbios u otras sustancias, evaluación de la existencia de asociación de los probióticos con infección y toxicidad a nivel de cepa y determinación del estado fisiológico de la población consumidora del producto, con especial consideración en bebés recién nacidos y pacientes en estado crítico (dosis administrada y método de administración).

Si se superan todas estas cuestiones, los probióticos son considerados generalmente como "seguros", pero esta hipótesis no puede ser asumida en términos absolutos, pues los análisis para asegurar la seguridad deben ser cada vez más específicos en alimentos y suplementos dietéticos que contengan alguna cepa y que sean administrados a la población general.

Una vez superadas las distintas etapas de aislamiento, identificación, caracterización y seguridad de la cepa se procede a la producción industrial. En ella hay dos aspectos fundamentales. En primer lugar, el microorganismo necesita ser cultivado en un medio adecuado que permita el crecimiento en grandes cantidades; y, en segundo lugar, se debe asegurar la viabilidad de las cepas durante la fabricación. Ambos aspectos son importantes y la producción se convierte en una fase clave para un posible probiótico que debe superar el crecimiento y los procesos a los que será sometido (Fontana *et al.*, 2013).

Evaluación

Estudios *in vitro*: Numerosos estudios han utilizado líneas celulares animales y humanas como modelos de intestino (Cencič y Langerholc, 2010), tales como células Caco-2, HT-29, IEC-6, IEC-18 y T84. En la mayoría de estos modelos experimentales *in vitro*, las células epiteliales son cultivadas en una monocapa, no pudiendo reproducir las particularidades del epitelio funcional. Para superar este problema, los investigadores han tratado de entender los mecanismos que explican las interacciones dinámicas entre el epitelio intestinal, las bacterias y el sistema inmunitario y han concluido que la mejor manera de aunar todo esto es utilizando co-cultivos de CD y epiteliales de intestino con probióticos (Borchers *et al.*, 2009), así como modelos en 3 dimensiones (Cencič y Langerholc, 2010). Los modelos en 3 dimensiones se generan usando una línea celular epitelial intestinal de origen no-carcinogénico que se cultiva en una membrana microporosa, permitiendo la polarización de las células intestinales. Por debajo de la membrana microporosa (lado basolateral), las células epiteliales forman otra capa con células inmunitarias (macrófagos y CD), imitando el tejido linfoide de la mucosa. La microbiota intestinal es añadida a la parte apical de la membrana para estudiar sus efectos. Estos tres componentes (epitelios, células inmunitarias y

microbiota) son los factores más importantes en el intestino; por tanto, estos modelos tratan de imitar la situación que realmente ocurre *in vivo*.

Evaluación clínica

Muchos estudios clínicos han tratado de evaluar una gran variedad de probióticos en diversas condiciones fisiológicas y patológicas. Sin embargo, muchos de estos estudios han sido cuestionados debido al pequeño número de pacientes utilizados o a la falta de un grupo de control. De hecho, la EFSA emite dictámenes científicos sobre la validez de las alegaciones de salud relacionadas con cepas probióticas. Un alto porcentaje de las alegaciones son rechazadas por la EFSA porque la relación de causa y efecto no está claramente establecida entre el consumo del probiótico y los efectos beneficiosos que se suponía que tenía. El método más fiable para evaluar los beneficios terapéuticos de cualquier cepa probiótica es el uso de ensayos aleatorizados, controlados con placebo, los cuales se revisan a continuación dividiéndolos por estado fisiológico y patología.

Embarazo y lactancia: Asemi *et al.* evaluaron los efectos del consumo diario de un yogur que contenía cepas probióticas sobre parámetros inflamatorios en mujeres embarazadas. Las mujeres consumieron 200 g de yogur probiótico con *L. acidophilus* La5 y *B. animalis* BB12, o 200 g de yogur convencional al día durante 9 semanas. El yogur probiótico disminuyó de manera significativa la expresión de la proteína C-reactiva, pero no tuvo ningún efecto sobre los niveles del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) en las mujeres embarazadas. Además, tuvo lugar un aumento de los niveles de glutatión reductasa en las embarazadas sin afectar a ningún otro índice de estrés oxidativo (Asemi *et al.*, 2012). Dugoua *et al.* describieron que *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* no presentaron ningún efecto sobre la incidencia de cesárea, peso al nacer y/o edad gestacional (Dugoua *et al.*, 2009).

Alergia: Vliagoftis *et al.* evaluaron la evidencia clínica para el uso de los probióticos como alternativa terapéutica en la rinitis alérgica y el asma. La revisión incluyó 12 estudios clínicos aleatorizados. Un total de 9 ensayos mostraron una mejora de la rinitis alérgica debido a la utilización de probióticos. Dentro de ellos, todos los ensayos relativos a rinitis alérgica persistente demostraron reducción en los síntomas y

cantidad de medicación administrada comparado con el placebo. Por otra parte, en los ensayos donde se evaluaba la rinitis alérgica estacional, se observó mejoría clínica. Los 9 estudios en los que se describieron diversas mediciones inmunológicas de alergia no mostraron ningún efecto significativo debido al probiótico, al igual que los estudios sobre el efecto de la administración de probióticos en el tratamiento del asma. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que los probióticos podrían tener un efecto beneficioso en la rinitis alérgica en dos aspectos: la reducción de algunos síntomas severos y de la medicación utilizada (Vliagoftis *et al.*, 2008).

En el estudio en el que se analizó el efecto simbiótico entre un probiótico y un prebiótico en la prevención de la enfermedad atópica, Kuitunen *et al.* evaluaron a niños de 1.223 madres embarazadas con un alto riesgo de alergia (por lo menos uno de los padres con asma diagnosticado, rinitis alérgica o eczema atópico). Cada mujer recibió dos veces al día una combinación probiótica de *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* LC705, *B. breve* BB99 y *Propionibacterium freudenreichii* ssp *shermanii* JS o un placebo durante 4 semanas antes del parto. Sus recién nacidos recibieron los mismos probióticos, agregando también 0,8 g de un galacto-oligosacárido o placebo una vez al día desde el nacimiento hasta los 6 meses de edad. Después, se realizó un seguimiento de los niños hasta los 2 años de edad por si desarrollaban cualquier enfermedad alérgica. En las muestras de sangre y heces se evaluaron los valores hematológicos, calprotectina, α -1-antitripsina, TNF- α e IgA. A los 6 meses, el grupo de niños que recibió el probiótico mostró una disminución significativa de los valores de hemoglobina comparado con el grupo placebo. Además, se encontró una correlación negativa entre los valores de hemoglobina a los 6 meses de edad y la expresión de calprotectina fecal a los 3 meses de edad. Los valores hematológicos fueron similares en ambos grupos a los 2 años de edad (Kuitunen *et al.*, 2009).

Olivares *et al.* realizaron un estudio doble ciego, controlado por placebo en 44 niños alérgicos, distribuidos aleatoriamente en dos grupos: un grupo de yogur y un grupo de probiótico. Se recogieron muestras de sangre y heces. El consumo del producto probiótico indujo una disminución significativa en el nivel de IgE en el plasma y un aumento en las células reguladoras T CD4⁺/CD25⁺. La disminución de IgE sérica se acompañó de un aumento significativo de IgA en la mucosa. No se detectaron cambios en otras células implicadas en las reacciones alérgicas. El consumo del

producto probiótico también produjo cambios significativos en la respuesta innata, con un aumento significativo de las células *natural killer* (Olivares *et al.*, 2006).

No hay evidencias que sugieran que los probióticos puedan ser un tratamiento efectivo para el eczema en los niños, pues la administración del probiótico ha llevado a la producción de eventos adversos (infecciones e isquemia intestinal), sin mostrar ningún beneficio en comparación con el placebo (Boyle *et al.*, 2009). Un meta-análisis de seis estudios clínicos de prevención y cuatro de tratamiento, doble ciegos, aleatorizados y controlados por placebo en niños entre 0 y 13 años de edad indicó que el uso de probióticos para la prevención de la dermatitis atópica pediátrica es favorable, pero no para el tratamiento (Lee *et al.*, 2008). Un análisis adicional en el que se excluyó el único estudio con un protocolo postnatal reveló un menor riesgo relativo, que en términos de tratamiento no mostró ninguna diferencia estadística.

Enfermedades relacionadas con el intestino: Olivares *et al.* investigaron el efecto de un producto fermentado que contenía dos cepas probióticas, *L. gasseri* CECT5714 y *L. coryniformis* CECT5711, sobre varios parámetros sanguíneos y fecales relacionados con la función intestinal de voluntarios sanos. Un total de 30 voluntarios sanos fueron divididos aleatoriamente en dos grupos, uno tomó un yogur estándar y el otro las cepas antes mencionadas administradas vía oral. El grupo que recibió los probióticos no tuvo ningún evento adverso significativo y, además, las cepas administradas pudieron aislarse de las heces de los voluntarios. De hecho, la concentración en las heces de LAB aumentó en el grupo probiótico. Adicionalmente, la administración oral de los probióticos mejoró algunos parámetros intestinales, como la producción de AGCC, humedad fecal, frecuencia y volumen de las heces (Olivares *et al.*, 2006).

Diarrea infecciosa: Una revisión Cochrane sobre la eficacia de los probióticos en el tratamiento de la diarrea infecciosa, que incluyó tanto niños como adultos, evaluó 63 estudios con un total de 8.014 participantes. No se atribuyeron eventos adversos relacionados a la administración de los probióticos y su uso disminuyó la duración de la diarrea. Sin embargo, el efecto fue muy variable en los estudios analizados. Los autores concluyeron que su uso es seguro y ejerce efectos beneficiosos en disminuir la duración de los episodios de diarrea y la frecuencia de las diarreas infecciosas agudas junto con una buena hidratación (Allen *et al.*, 2010).

Diarrea asociada al uso de antibióticos: Un meta-análisis realizado por Johnston *et al.* valoró los resultados obtenidos en los estudios clínicos, paralelos, aleatorizados y controlados por placebo realizados que investigaban la diarrea asociada al uso de antibióticos en niños de 0 a 18 años (Johnston *et al.*, 2011). El tratamiento con probióticos fue comparado frente al tratamiento con placebo, profilaxis alternativa y/o no tratamiento y la incidencia de diarrea secundaria al uso de antibióticos. Los estudios incluían el tratamiento con *Bacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Lactococcus* spp., *Leuconostoc cremoris*, *Saccharomyces* spp. y *Streptococcus* spp., de manera individual y/o combinada. A pesar de la gran heterogeneidad de las cepas probióticas utilizadas, la dosis y la duración y la calidad de los estudios, la evidencia global sugiere un efecto protector de los probióticos en la prevención de las diarreas asociadas al uso de antibióticos.

Diarrea persistente: Los resultados científicos que sugieren que los probióticos pueden ser efectivos en tratar la diarrea persistente en niños son escasos. Bernaloa *et al.* revisaron cuatro estudios clínicos aleatorizados comparando una cepa específica de probióticos frente a placebo en niños con diarrea persistente. En cuatro estudios, con un total de 464 participantes, el tratamiento con probióticos redujo la duración de la diarrea persistente en dos de los estudios. De manera similar, la frecuencia de las deposiciones disminuyó en el grupo de probióticos en dos de los estudios. En otro estudio, se informó de una disminución en los días de hospitalización, sin encontrarse eventos adversos (Bernaola Aponte *et al.*, 2010).

Enterocolitis necrotizante: Alfaleh *et al.* valoraron el empleo de probióticos en el tratamiento de la enterocolitis necrotizante (ENC) en 16 estudios aleatorizados y cuasi estudios clínicos en un meta-análisis que involucró a 2.842 niños prematuros de menos de 37 semanas de gestación y/o menos de 2.500 g de peso al nacer. Dentro de los estudios examinados existía una gran variabilidad en los criterios de inclusión (peso al nacer y edad gestacional), riesgo inicial de desarrollo de ENC para los grupos control, tiempo, dosis, formulación de probióticos y regímenes de alimentación. La administración enteral de probióticos redujo significativamente la incidencia de la ENC severa (etapa II o posterior) y la mortalidad. No hubo evidencia de una reducción significativa de sepsis nosocomial. Además, no se encontró evidencia de infección sistémica con el uso de probióticos en este estudio. Los autores concluyeron que la

administración enteral de probióticos previene la ENC severa, aunque son necesarios más estudios para asegurar la eficacia del uso de probióticos en caso extremos como niños con bajo peso al nacer, donde es de suma importancia establecer claramente la eficiencia de la formulación y la dosis a utilizar. Braga *et al.* evaluaron el efecto de la administración de una combinación de *L. casei* y *B. breve* en niños prematuros con bajo peso al nacer que desarrollarían ENC. El uso de la combinación tuvo un efecto beneficioso en la incidencia de ENC en la etapa II o posterior. Además, se asoció con una mejora en la motilidad intestinal en el tiempo necesario para alcanzar la alimentación enteral completa (Braga *et al.*, 2011).

Colitis ulcerosa: Se ha descrito que el tratamiento con probióticos es efectivo en la remisión de la colitis ulcerosa (CU) (Sang *et al.*, 2010). Trece estudios clínicos aleatorizados revisaron el tratamiento de la CU con probióticos. Comparado con el grupo placebo, se demostró que la tasa de remisión de la CU para el grupo de pacientes que recibieron probióticos fue del 2,0% (95% IC 1,35-2,96). Durante el curso del tratamiento, los pacientes que recibieron probióticos durante al menos 12 meses tuvieron una tasa de remisión de CU de 1,36% (95% IC 1,07-1,73) y la incidencia de CU en el grupo que tomó probióticos fue 0,69% (95% IC 1,01-2,47), comparados con el grupo placebo. Para el grupo de CU de gravedad media a moderada la tasa de recurrencia fue 0,25% (95% IC 0,12-0,51). Dentro de los grupos tratados con probióticos, el que recibió *B. bifidum* mostró una tasa de recurrencia de 0,25% (95% IC 0,12-0,50), comparados ambos con el grupo placebo.

La inflamación de la bolsa ileal (IBI) es la complicación más importante después de la anastomosis ileo-anal en pacientes con CU. Mimura *et al.* describieron que una dosis diaria de 6 g de la mezcla probiótica VSL#3 fue eficaz en la remisión de IBI en pacientes tratados durante 1 año. La remisión se mantuvo durante 1 año en el 85% de los pacientes del grupo de VSL#3, comparado con el 6% del grupo de placebo (Mimura *et al.*, 2004). En un trabajo más reciente, pacientes en remisión con IBI inducida por tratamiento con antibióticos fueron reclutados para recibir VSL#3 o placebo durante el mantenimiento de la remisión (Kühbacher *et al.*, 2006). Se obtuvieron biopsias antes y dos meses después del inicio de la administración de VSL#3 y del placebo. La terapia con VSL#3 aumentó el número total de células bacterianas intestinales, la riqueza y la diversidad de la microbiota bacteriana, especialmente la anaerobia, mientras que la

microbiota de hongos fue reprimida. En contraste, los pacientes que recibieron el placebo recayeron más con una marcada reducción en la diversidad de la microbiota.

Enfermedad de Crohn: Doherty *et al.* revisaron en 2010 los estudios clínicos que comparaban el uso de antibióticos y/o probióticos con placebo en la prevención de la recurrencia clínica de la enfermedad de Crohn (Doherty *et al.*, 2010). Incluyeron un total de siete estudios (2 estudios con antibióticos frente a placebo y 5 frente a probióticos y placebo). La administración de probióticos no se asoció con ninguna diferencia significativa en el riesgo de recurrencia de la enfermedad de Crohn cuando se comparó con el placebo.

Síndrome de intestino irritable: El síndrome de intestino irritable (SII) es una condición crónica que afecta de un 3 a 25% de la población y para la cual no existe disponible ningún tratamiento específico, tan solo sintomático. Cuando se descubrió que la microbiota intestinal normal se alteraba en el SII, se empezó a considerar el uso de probióticos en la mitigación de los síntomas. McFarland y Dublin revisaron 20 estudios clínicos que incluyeron un total de 1404 sujetos con SII. El uso de probióticos se asoció con una mejora en los síntomas globales de SII y un menor dolor abdominal comparados con el placebo (McFarland y Dublin, 2008). Gawrońska *et al.* investigaron la eficacia de *L. rhamnosus* GG para el tratamiento de la dispepsia funcional, SII y/o dolor abdominal en niños. Los autores encontraron que *L. rhamnosus* GG reducía la frecuencia de dolor en niños con SII (Gawrońska *et al.*, 2007). En contraste con los resultados anteriores, Bausserman y Michail encontraron que la administración de *L. rhamnosus* GG a 50 pacientes de entre 6 y 20 años con SII durante 6 semanas no disminuyó el dolor abdominal cuando se comparó con un placebo. No hubo diferencias significativas en otros síntomas gastrointestinales, exceptuando la percepción de la distensión abdominal (Bausserman y Michail, 2005).

Se ha observado que el tratamiento del SII con lisados de *Enterococcus faecalis* y *E. coli* ha sido efectivo y superior al placebo en la reducción de los síntomas típicos, tales como dolor abdominal y distensión (Enck *et al.*, 2008). En 297 pacientes con SII tratados durante 8 semanas con estos lisados en un estudio clínico, doble ciego y aleatorizado, los pacientes que respondieron al tratamiento tuvieron al menos un 50% menos de síntomas globales y de dolor abdominal. La tasa de éxito en los voluntarios tratados con probióticos, en lo que se refiere a síntomas globales, fue de 102/149

(68,5%) comparado con el placebo de 56/148 (37,8%, $P < 0,001$). El grupo probiótico mejoró el dolor abdominal en un 72,5% (108/149) y el placebo en un 44,6% (66/148). El promedio de respuesta del grupo tratado con los lisados fue de 4 a 5 semanas frente a las más de 8 semanas del placebo.

Enfermedad hepática crónica: Los pacientes con enfermedad hepática crónica generalmente tienen una microbiota intestinal desequilibrada que afecta directamente al desarrollo y empeoramiento de la enfermedad. Liu *et al.* efectuaron un estudio clínico aleatorizado, controlado por placebo. Los pacientes en el grupo tratado recibieron una leche fermentada durante 14 días que contenía *Bacillus bifidus*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*. Después de la intervención, el grupo con la leche fermentada tuvo un menor recuento de *E. coli* y menor desequilibrio en la microbiota intestinal que el grupo con placebo. Además, hubo una mejoría de los síntomas de la enfermedad, como ingesta de alimento, apetito, distensión abdominal y fluido ascítico (Liu *et al.*, 2010). Por otra parte, Aller *et al.* demostraron que la ingesta de un comprimido con 500 millones de bacterias de *L. bulgaricus* y *S. thermophilus* mejoraba los niveles de aminotransferasa hepática en pacientes con enfermedad de hígado graso no alcohólico (Aller *et al.*, 2011).

Pancreatitis aguda: Zhang *et al.* revisaron todos los estudios clínicos aleatorizados importantes que estudiaban el efecto de probióticos, prebióticos (ingredientes alimentarios no digeribles, que mejoran la salud humana por la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de las bacterias existentes en el colon) y la combinación de ambos (simbióticos) en pacientes con pancreatitis aguda. Se incluyeron un total de siete estudios clínicos aleatorizados con 559 pacientes. Ninguno de los tratamientos mostró influencia en la incidencia de infecciones postoperatorias, infección pancreática, fallo orgánico múltiple y síndrome de respuesta sistémica inflamatoria. Tampoco hubo diferencias significativas en la duración de la terapia con antibióticos y la mortalidad. Sin embargo, el tratamiento se asoció con una menor estancia hospitalaria (Zhang *et al.*, 2010).

Sharma *et al.* (2011) investigaron el papel de los probióticos en la permeabilidad del intestino y de la endotoxemia en pacientes con pancreatitis aguda. Los pacientes fueron asignados aleatoriamente para recibir un placebo o una mezcla de *L. acidophilus*, *B. longus*, *B. bifidum*, *B. infantalis* y 25 mg de fructo-oligosacáridos.

Desafortunadamente, el estudio tuvo que ser suspendido de manera prematura por la gravedad de los pacientes.

Mecanismos de acción de los probióticos

Las defensas del hospedador deben realizar una criba del medio luminal para poder diferenciar entre microorganismos comensales y patógenos ocasionales ya que, dependiendo de si se trata de unos u otros, se producirá una respuesta distinta. Existen dos mecanismos de defensa frente a la colonización por microorganismos patógenos: mecanismos activos y pasivos. Los epitelios son los más relevantes, en particular el intestinal. Representa la primera línea de defensa frente a la colonización por patógenos.

Los enterocitos superficiales sirven como sensores del ambiente luminal, secretando péptidos antibacterianos, IgA y quimioquinas que alertan y dirigen la respuesta inmunitaria al sitio de la infección (Shanahan *et al.* 2005). Las células M están especializadas en toma de muestras del medio ambiente y transporte de antígenos del lumen a la capa mucosa para posteriormente presentar los antígenos a las células T. Finalmente, las CD intestinales juegan un papel crucial como sensores inmunitarios ya que pueden directamente controlar el contenido intestinal, o bien por la entrada directa de antígenos a través del epitelio o bien mediante la extensión de las dendritas entre los enterocitos superficiales sin alterar las uniones estrechas (Rescigno *et al.*, 2001)

La discriminación entre microorganismos comensales y patógenos está mediada por el sistema de receptores de PRR. La microbiota controla también la proliferación y diferenciación de las células epiteliales, y modula la maduración y la actividad de la respuesta inmunitaria innata y adaptativa (Plaza-Díaz y Gil, 2013; Thaïss *et al.*, 2016).

Diferentes cepas de la misma especie pueden tener efectos diversos. Lo único que tienen en común es crear un entorno más favorable en el intestino, favoreciendo un sistema digestivo e inmunológico saludable (Hill *et al.*, 2014; Reid., 2016).

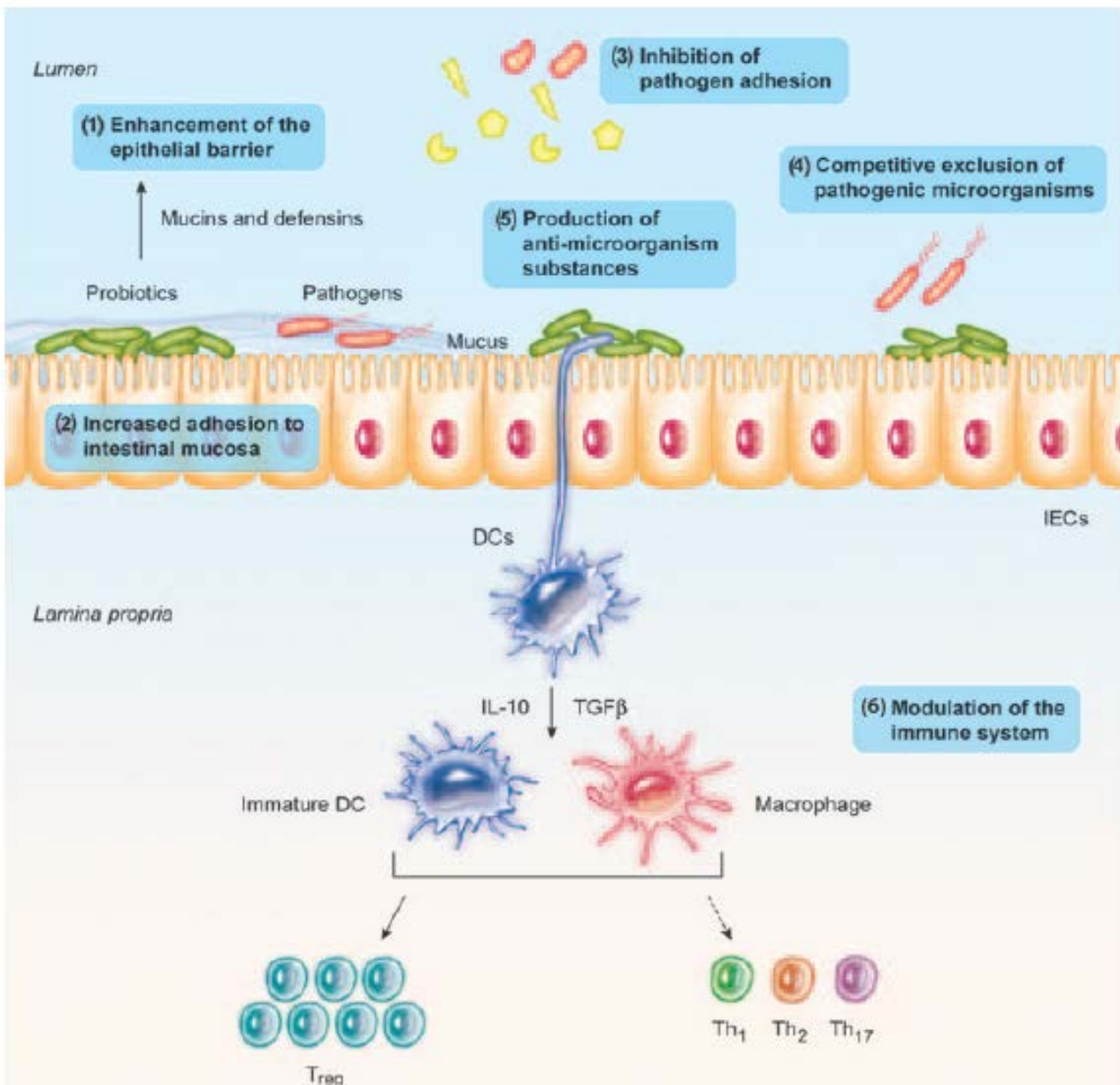


Figura 5. Mecanismos de acción de probióticos. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* 2012; 61: 160-174.

El mecanismo de acción de los probióticos no se conoce con exactitud aunque se han propuesto varios: la mejora de la barrera epitelial, el aumento de la adhesión a la mucosa intestinal, la inhibición concomitante del patógeno mediante la adhesión, la exclusión competitiva de los microorganismos patógenos, la producción de sustancias anti-microbianas y la modulación del sistema inmunitario (Figura 5) (Dos Reis *et al.*, 2017; Bron *et al.*, 2017).

Mejora de la barrera epitelial

La barrera intestinal se mantiene gracias a uniones estrechas entre las células epiteliales intestinales en las que intervienen proteínas asociadas a las membranas celulares que sellan el espacio intercelular conservando la integridad del epitelio y evitando la entrada de patógenos (Wan *et al.*, 2016).

Las defensas de la barrera intestinal comprenden la capa mucosa, péptidos antimicrobianos, IgA secretora y el complejo de adhesión para la unión epitelial (Ohland y Macnaughton, 2010). Se ha demostrado que los probióticos actúan estimulando la secreción de moco, fortaleciendo las uniones estrechas entre las células epiteliales, aumentando la protección de la proteína de choque térmico de las células y previniendo la apoptosis de las células epiteliales intestinales (Liu *et al.*, 2014). Cuando la función de barrera se pierde, los antígenos bacterianos y derivados de los alimentos pueden llegar a la submucosa e inducir respuestas inflamatorias, resultando en la aparición de desórdenes intestinales como el SII (Hooper *et al.*, 2001; Hooper *et al.*, 2003; Sartor, 2006). El consumo de bacterias no patógenas puede contribuir a la función de barrera intestinal, siendo los probióticos las bacterias más estudiadas por su participación en el mantenimiento de esta barrera. Sin embargo, los mecanismos por los que los probióticos mejoran la barrera intestinal no se entienden completamente (Wan *et al.*, 2016).

Datos recientes han indicado que los probióticos pueden iniciar la reparación de la función de barrera dañada. Así, por ejemplo, *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN1917) no sólo previene la disrupción de la barrera mucosa producida por *E. coli* enteropatógena, sino que restaura la integridad de la mucosa en células T84 y Caco-2. Este efecto está mediado por la mejora en la expresión y la redistribución de las proteínas de adhesión de las uniones estrechas (Zyrek *et al.*, 2007; Stetinova *et al.*, 2010). *Lactobacillus casei* DN-114001 y VSL#3 son capaces de mantener la función de barrera intestinal por mecanismos similares (Parassol *et al.*, 2005; Otte *et al.*, 2004).

En la prevención del daño epitelial inducido por citoquinas, característico en la enfermedad inflamatoria intestinal (Sartor, 2006), el uso de probióticos es eficaz, ya que contribuyen a la función de barrera de la mucosa. Dos péptidos secretados por *L. rhamnosus* GG, designadas p40 y p75, han demostrado recientemente prevenir la

apoptosis celular inducida por citoquinas a través de la activación de la proteína quinasa B y por inhibición de la proteína quinasa pro-apoptótica p38 activada por mitógenos (Yan *et al.*, 2002; Yan *et al.*, 2007).

Varios estudios sugieren que el aumento de la expresión de genes implicados en la señalización de las uniones estrechas entre las células epiteliales es un posible mecanismo para reforzar la integridad de la barrera intestinal (Anderson *et al.*, 2010). Por ejemplo, los lactobacilos regulan varios genes que codifican proteínas de adhesión, tales como E-cadherina y β -catenina, en un modelo de barrera con células T84. Además, la incubación de células intestinales con lactobacilos influye diferencialmente en la fosforilación de proteínas de adhesión y en la abundancia de las isoformas de la proteína quinasa C (PQC), tales como PQC δ , que afecta positivamente la función de barrera del epitelio (Hummel *et al.*, 2012).

El síndrome del intestino irritable se caracteriza entre otras cosas por incremento de la permeabilidad de la membrana intestinal. Se ha puesto de manifiesto que tratamientos con *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius* y dos cepas de *Bifidobacterium lactis* revierten este incremento (Nébot-Vivinus *et al.*, 2014) tanto *in vivo* como *in vitro*. Se determinó mediante la medición de ZO-1 y ocludina. El incremento de la permeabilidad *in vitro* se indujo con LPS en células T84. *In vivo*, ratones C57/BL6 fueron sometidos a estrés (impidiéndoles la ingesta de agua). En ambos casos aumentó la expresión de las proteínas de adhesión celular ZO-1 y ocludina (Nébot-Vivinus *et al.*, 2014).

Hsieh *et al.*, 2015 han examinado tres cepas probióticas de *Bifidobacterium*, *Enterococcus* y *Lactobacillus* en células Caco-2. Para ello, se alteró la membrana con TNF- α , que provoca daños en las proteínas de unión incluyendo claudina-1, ocludina y ZO-1, y su daño se evaluó mediante la resistencia eléctrica transepitelial (TER). Los resultados mostraron que *Bifidobacterium bifidum* incrementa la TER, mientras que *Enterococcus* la disminuye en comparación con los dos anteriores.

Lactobacillus plantarum incrementa los efectos protectores de la barreta epitelial intestinal en células NCM460 mediante la prevención del daño de expresión y reordenamiento de proteínas de unión intercelulares como claudina-1, ocludina, JAM-1 y zónula ocludens-1, y aumentando la secreción de mucosa (Liu *et al.*, 2014). El efecto

se realiza a través de un dominio denominado MIMP que poseen unas proteínas en la superficie bacteriana (SLP).

Un producto denominado BIFICO, que contiene: $1,0 \times 10^9$ UFC/g de bifidobacterias liofilizadas viables (*Bifidobacterium longum*), $1,0 \times 10^9$ UFC/g lactobacilos (*Lactobacillus acidophilus*) y $1,0 \times 10^9$ UFC/g *Enterococcus faecalis* se probó para estudiar sus efectos sobre la barrera intestinal. El estudio fue llevado a cabo *in vitro* con células Caco-2 dispuestas en monocapa y con la estimulación previa para incrementar la permeabilidad con *Escherichia coli*. También se llevó a cabo un estudio *in vivo* con ratones *Knock-out* (KO) para IL-10 y que padecen un estado inflamatorio, con lo que se altera la permeabilidad. En ambos casos, la administración de BIFICO mejoró la permeabilidad. En el estudio *in vivo* aumentó la expresión de ZO-1, claudina-1 y ocludina. En el estudio *in vitro* se incrementó la TER (Shi *et al.*, 2014). En otro estudio, *Lactobacillus plantarum* mejoró la permeabilidad (medida como TER) de células IPEC-J2 previamente dañadas con *E. coli*. También aumentó la expresión de proteínas de unión claudina-1, ocludina y ZO-1, y disminuyó a expresión de las citoquinas pro-inflamatorias IL-8 y TNF- α que pudo deberse a un descenso de expresión de NF- κ B y rutas de la proteína quinasa activada por mitógenos (MAPK) (Wu *et al.*, 2016; Yao *et al.*, 2017).

Salmonella typhimurium es un agente infeccioso que promueve el incremento de la permeabilidad intestinal y un estado pro-inflamatorio. Para combatir los efectos que produce, se ha estudiado junto con la cepa *Lactobacillus plantarum* MTCC 5690 en ratones macho Albino Swiss. Los resultados muestran que la permeabilidad mejoró con el probiótico. Se observó en el incremento de expresión intestinal de proteínas de unión ocludinas, claudinas y ZO-1. También se determinaron cambios a nivel inmunitario, en concreto un incremento de TLR2 y una disminución de TLR4 frente a *Salmonella* (Rokana *et al.* 2016).

Bifidobacterium animalis spp. *lactis* CNCM-I2494 también ejerce efectos protectores frente el incremento de la permeabilidad producida en ratones C57BL/6 macho mediante ácido dinitrobenceno sufónico (DNBS), restaurando los niveles de Th1/Th2, las células Th1 son las encargadas de producir INF- γ , TNF- β e IL-2 y se desarrollan principalmente después de infecciones por bacterias y virus. Las células Th2 son anti-inflamatorias y producen IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 y son responsables de una

fuerte producción de anticuerpos y de la activación de mastocitos, basófilos y eosinófilos (Hirahara *et al.*, 2016; Romagnani *et al.*, 1999). Esta cepa también restaura la permeabilidad intestinal alterada, mediante el incremento de los niveles de expresión proteico de claudina-3, 4, E-cadherina, ocludina y ZO-1 (Martín *et al.*, 2016).

Clostridium butyricum también mejora la permeabilidad intestinal. La evaluación del efecto de VSL# 3 se llevo a cabo en ratas Sprague-Dawley con cirrosis, encontrándose una disminución en la translocación bacteriana como consecuencia de una mayor expresión de proteínas de unión intercelulares como ocludinas (Sánchez *et al.*, 2015).

Lactobacillus fructosus C2 atenua el efecto de *E. coli* K88 y *Salmonella typhimurium* SL1344, que inducen cambios en células Caco-2. Los niveles de IL-8, p-ERK, y p-JNKc disminuyeron tras el uso del probiótico. Además se redujo la permeabilidad (Yu *et al.*, 2015).

El estrés es un factor que influye en la microbiota del individuo y también afecta a la integridad de la barrera epitelial intestinal. El tratamiento de probióticos se ha demostrado que mejora la permeabilidad reduciendo el proceso de translocación bacteriana, con lo que se reduce la probabilidad de inflamación.

Bacillus licheniformis, *Bacillus subtilis* y *Lactobacillus plantarum* se administraron a pollos machos sometidos a estrés por calor. Los resultados demostraron que tras la medición de TER y la cuantificación de proteínas de unión estrechas ocludina y ZO-1, los probióticos mejoraron de manera parcial la permeabilidad (Song *et al.*, 2014).

Distintas cepas de *Lactobacillus plantarum* (WCFS1, CIP104448 y TIFN101) se probaron en humanos para estudiar la permeabilidad intestinal tras la administración de indometacina, estimulador de estrés. La permeabilidad se midió mediante la ratio de lactulosa-ramnosa y se mostró que modulada la expresión de genes relacionados con la adhesión célula-célula, en concreto estimularon la expresión de ZO-1 y ocludina y Mucina 2. Además, se observó un efecto sobre la metaloproteasa-2 (Mujagic *et al.*, 2017).

Lactobacillus plantarum se ha tratado en lechones con diarrea provocada por *Escherichia coli* K88, encontrándose que previno el deterioro de la morfología intestinal y mejoró el funcionamiento de la barrera intestinal medida a través de los niveles de expresión de ZO-1 y ocludina (Yang *et al.*, 2014). Resultados similares se han encontrado con *Clostridium butyricum* en pollos tratados con *E. coli* K88 (Zhang *et al.*, 2016).

Escherichia coli Nissle 1917 mejora la barrera intestinal en células de cáncer de colon HT-29/B6. El efecto parece estar mediado por la proteína TCPC de *E. coli* Nissle 1917, que produce un incremento de la expresión de PKC ζ y ERK1/2 por parte de las células HT-29/B6. El incremento de la expresión de estos factores de transcripción se correlaciona con los niveles de expresión de la proteína de uniones estrechas intercelulares claudina-14 (Hering *et al.*, 2014). Así mismo, esta cepa también se evaluó en células T-84 y Caco-2 cultivadas en monocapas y sus resultados fueron similares (Alvarez *et al.*, 2016).

La combinación del prebiótico Salmosan (compuesto rico en β -galactomananos) y *Lactobacillus plantarum* aumentó la producción de citoquinas anti-inflamatorias (IL-10) y disminuyó la producción de TNF- α en células Caco-2 estimulados con TNF- α y macrófagos (THP-1 estimulados a su vez con LPS de *Salmonella enteritidis*) (Brufau *et al.*, 2017).

No solo el contacto directo entre los probióticos y las células epiteliales mejoran la barrera intestinal. El caso de las secreciones producidas por *Bifidobacterium infantis* y *Lactobacillus acidophilus* mejoró el TER en células Caco-2 cultivadas en monocapa tras la estimulación de IL-1 β . La mejora se debe al incremento de expresión de proteínas de unión ocludina y claudina-1 debido a la inhibición de NF- κ B en las células Caco-2 (Guo *et al.*, 2017).

La gliadina es un compuesto formado por glucoproteínas presentes en el trigo, que altera la permeabilidad de la barrera intestinal debido a que las moléculas no digeridas de la gliadina son resistentes a la degradación por las proteasas de la membrana del borde de cepillo gástrico. Se ha determinado que *Lactobacillus rhamnosus* GG mejora la barrera en un estudio realizado con células Caco-2 que fueron cultivadas con gliadina, de manera que reduce significativamente el contenido de

poliaminas (moléculas policatiónicas provenientes de la degradación de la gliadina) y se reduce la permeabilidad de la barrera. Sin embargo, la presencia de poliaminas es un pre-requisito de *Lactobacillus rhamnosus* GG para ejercer su capacidad de restauración de la permeabilidad afectando a la expresión de proteínas de unión como ZO-1, claudina-1 y ocludinas (Orlando *et al.*, 2014). El mismo efecto se ha determinado con la administración de *Bifidobacterium infantis* y *Lactobacillus acidophilus*, que disminuyen la permeabilidad de células Caco-2 estimuladas con IL-1 β (Guo *et al.*, 2016). *Lactobacillus rhamnosus* GG revierte las diarreas por rotavirus en lechones a través de la mejora de la barrera epitelial (mediante incremento de ZO-1, ocludina y Bcl-2 y disminución de Bax). Además, normalizó la microbiota intestinal (Mao *et al.*, 2016).

Se ha demostrado que el tratamiento de *Lactobacillus paracasei* JCM 1163 mejora la permeabilidad de la barrera intestinal en ratones C57BL/6. El efecto está mediado por la gran producción de cadenas de polifosfato inorgánico (PoliP) por parte de esta cepa (Saiki *et al.*, 2016). Estos PoliP son captados a través de la membrana plasmática en células Caco-2 por integrinas β 1. La inhibición de integrinas β 1 y caveolinas-1 promueve la reducción de incorporación de PoliP, que provoca una disminución en la proteína chaperona de choque térmico HSP27 y, en consecuencia, un empeoramiento de la permeabilidad epitelial (Tanaka *et al.*, 2015).

Lactobacillus rhamnosus GG, *Lactobacillus reuteri* P43-HUV y *Lactobacillus johnsonii* P47-HY incrementaron en células IPEC-J2 las proteínas de choque térmico HSP27 y HSP72 estimuladas con *E. coli*. También mejoraron la permeabilidad debido al incremento de las proteínas de unión ZO-1 (Liu *et al.*, 2015).

Para demostrar que los efectos de los probióticos se deben incluso a nivel de cepa, se compararon los efectos de *Bifidobacterium longum* CCDM372 y *Bifidobacterium longum* spp. *Longum* CCM7952 en ratones BALB/c a los que se indujo colitis mediante sulfato de dextrano sódico (DSS). CCM372 no produjo mejoría en la permeabilidad de la barrera intestinal; en cambio CCDM 7952 sí mostró mejora medida como una mayor expresión en las proteínas de uniones intercelulares ocludina y zonulina-1 (Srutkova *et al.*, 2015). En un estudio similar con *Lactobacillus paracasei* B21060 también se observaron mejoras en los parámetros de la permeabilidad (Simeoli *et al.*, 2015).

Las mucinas (MUC) son los principales constituyentes del moco epitelial y han sido durante mucho tiempo relacionadas con la salud y con el desarrollo de enfermedades. Los probióticos pueden promover la secreción mucosa, como un mecanismo que mejora la función de barrera y la exclusión de agentes patógenos. Varias especies de lactobacilos aumentan la expresión de mucinas en líneas celulares de intestino humano. Sin embargo, este efecto protector depende de la adhesión de los lactobacilos a la monocapa de células, algo que probablemente no se produce *in vivo* (Mack *et al.*, 2003; Mattar *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2015). Por el contrario, hay datos que demuestran que un extracto celular de *L. acidophilus* es suficiente para aumentar la expresión de *MUC2* en células HT29 independientemente del proceso de fijación (Kim *et al.*, 2008). Estudios *in vivo*, menos consistentes ya que sólo se han realizado unos pocos, muestran resultados controvertidos. Ratones que recibieron diariamente VSL#3 durante 14 días no presentaron ningún cambio en la expresión de mucinas (Gaudier *et al.*, 2005). Por el contrario, ratas que recibieron VSL#3 en una dosis similar a la anterior durante 7 días tuvieron una expresión de *MUC2* 60 veces superior. La secreción de mucinas también aumentó (Caballero-Franco *et al.*, 2007). Por consiguiente, la producción de moco puede incrementarse mediante el uso de probióticos *in vivo*, pero son necesarios más estudios para obtener conclusiones sólidas.

La administración de *Lactobacillus farciminis* a ratas Wistar impidiéndoles la ingesta de agua para inducirles estrés (WAS), aumentó los niveles de expresión de *Muc2* (Da Silva *et al.*, 2014).

Lactobacillus plantarum WCFS1 incrementó los niveles de moco intestinal en ratones *Ercc1^{-Δ7}*, los cuales poseen una capa delgada de moco. Se ha determinado que el mecanismo de acción que incrementa la producción de moco no involucra a los genes que se encargan de la producción de moco (van Beek *et al.*, 2016).

Aumento de la adhesión a la mucosa intestinal

La adhesión a la mucosa intestinal está considerada como un requisito fundamental para la colonización y para la interacción entre las cepas probióticas y el hospedador (Juntunen *et al.*, 2001; Beachey *et al.*, 1981; Schiffrin *et al.*, 1997). La adhesión también es importante en la modulación del sistema inmunitario y en el antagonismo frente a patógenos (Schiffrin *et al.*, 1997; Perdigon *et al.*, 2002; Hirano *et al.*, 2003). Para que las LAB se unan a la superficie es necesaria la interacción con las células epiteliales intestinales (CEI) y el moco epitelial. Las CEI secretan mucinas que evitan la adhesión de bacterias patógenas (Collado *et al.*, 2005; González-Rodríguez *et al.*, 2012). Además, en las CEI existen lípidos, proteínas libres, inmunoglobulinas y sales (Neutra, 1987). La interacción específica existente entre las proteínas de superficie de las bacterias probióticas con las CEI puede ser la principal causa en la exclusión competitiva de los probióticos frente a distintos patógenos (Ouwehand *et al.*, 2002; Haller *et al.*, 2001; Van Tassell *et al.*, 2011).

El proceso de adhesión está mediado por proteínas, aunque hay otros factores implicados como el ácido lipoteicoico (Vélez *et al.*, 2007). El ejemplo más estudiado de adhesinas bacterianas es el de proteínas unidas al moco epitelial producidas por *L. reuteri* (Buck *et al.*, 2005; Hynönen *et al.*, 2002). Bajo ciertas circunstancias, las proteínas pueden facilitar la colonización del intestino humano a través de la degradación de la matriz extracelular (Candela *et al.*, 2007; Candela *et al.*, 2009; Candela *et al.*, 2007; Guglielmetti *et al.*, 2008; Sánchez *et al.*, 2010). Probióticos tales como *L. plantarum* consiguen la inducción de las mucinas *MUC2* y *MUC3* para inhibir la adhesión de *E. coli* enteropatógena, proporcionando protección frente a la invasión de patógenos (Hirano *et al.*, 2003; Voltan *et al.*, 2007; Kim *et al.*, 2010).

Del mismo modo, Collado *et al.* (2006) evaluaron la adhesión de cepas de *B. longum* y *B. catenulatum* al moco intestinal humano y compararon los resultados obtenidos frente a cepas controles sensibles a los ácidos. Los resultados mostraron que las cepas que tenían capacidad de resistencia al medio ácido poseían además una alta capacidad de adhesión a la mucosa intestinal. Esta característica en la adhesión no siempre es mejorada con la adquisición de la resistencia al medio ácido. En general, la inducción de resistencia a un medio ácido en bifidobacterias puede ser una estrategia de

selección para cepas con mayor estabilidad y mejores propiedades probióticas (Collado *et al.*, 2006; Bermudez-Brito *et al.*, 2012).

Los probióticos pueden también modificar las mucinas intestinales para impedir la unión de patógenos (Kim *et al.*, 2010). El componente bacteriano encargado de la adhesión de cepas de *L. acidophilus* es una proteasa resistente asociada a la superficie bacteriana (Chauvière *et al.*, 1992; Coconier *et al.*, 1992; Greene y Klaenhammer, 1994). De manera singular, el componente bacteriano también se degrada en un péptido antimicrobiano con propiedades frente a patógenos que son beneficiosas para el hospedador (Gopal *et al.*, 2001).

Las cepas probióticas además pueden inducir la liberación de defensinas por las células epiteliales. Estos péptidos/proteínas pequeños estabilizan la función de barrera del intestino (Furrie *et al.*, 2005). Los estudios realizados indican que, en respuesta al ataque por bacterias patógenas, la primera línea de defensa química es el aumento en la producción de PAM, tales como α - y β -defensinas, catelicidinas, lectinas tipo-C y ribonucleasas (Ayabe *et al.*, 2000; O'neil *et al.*, 1999; Takahashi *et al.*, 2001; Ogushi *et al.*, 2001; Ganz, 2003; Gallo y Hooper, 2012). Muchas PAM son enzimas que matan bacterias por un ataque enzimático en las estructuras de la pared celular. Las enzimas expresadas por las células de Paneth atacan a las membranas bacterianas. La lisozima hidroliza el enlace glicosídico del peptidoglicano de la pared bacteriana (Müller *et al.*, 2005), y la fosfolipasa A2 hidroliza los fosfolípidos de la membrana (Koprivnjak *et al.*, 2002). Las defensinas constituyen una familia importante de los péptidos de membrana en los vertebrados. La interacción es noespecífica y principalmente por unión a los grupos fosfolípidos aniónicos de la superficie de la membrana, a través de interacciones electrostáticas. Esta interacción crea poros en la membrana bacteriana que alteran la integridad y promueven la lisis de los microorganismos (Kagan *et al.*, 1990). Las catelicidinas son generalmente catiónicas, péptidos en hélice α que se unen a las membranas bacterianas por interacciones electrostáticas y, como las defensinas, inducen la disrupción de la membrana (Bals y Wilson, 2003).

En el proceso de adhesión microbiana de las LAB se incluyen fuerzas pasivas, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas, fuerzas estéricas, ácidos lipoteicoicos y estructuras específicas, tales como apéndices externos cubiertos por lectinas. Una amplia variedad de moléculas que median la adhesión de bacterias

patógenas han sido caracterizadas. Sin embargo, el conocimiento de qué factores son claves para la adhesión de *Lactobacillus* aún está limitado y más estudios son necesarios (Abbot *et al.*, 2007; Westerlund y Korhonen, 1993; Sun *et al.*, 2012).

Uraipan *et al.*, (2015) han observado que las cepas de *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium bifidum* muestran una buena capacidad de adhesión a la mucina porcina, lo que inhibe la adhesión de patógenos y previene su translocación y posterior infección. Mukherjee *et al.* (2015) observaron los mismos resultados usando tres cepas de *Lactobacillus plantarum* (CRA21, CRA38 y CRA5) incubadas con colágeno tipo I derivado de placenta humana y mucina derivada de estómago porcino.

Tres cepas de *Lactobacillus mucosae* (CNPC006, CNPC007 y CNPC009) poseen los genes relacionados con la adherencia a la mucosa intestinal, facilitando su unión a ella y evitando la adhesión de patógenos. Estos genes son *Msa*, *Map* y *Mub* (de Moraes *et al.*, 2016). También se ha descrito recientemente que *Lactobacillus kefir* posee altas cualidades de adhesión al moco intestinal de cochinillo (Carasi *et al.*, 2014). *Listeria monocytogenes* disminuye su adhesión a células HT29 tras la incubación con *Lactobacillus rhamnosus* CTC1679, *Lactobacillus sakei* CTC494, *Enterococcus faecium* CTC8005 y *Lactobacillus casei* (Garriga *et al.*, 2015).

Propionibacterium acidipropionici Q4 ha demostrado en células HT-29 que contrarresta la adhesión de *Escherichia coli* C3 y *Salmonella Enteritidis* 90/390 debido principalmente a la exclusión por componentes de la superficie celular, tales como proteínas y carbohidratos, y no por agentes antimicrobianos o mediante la co-agregación (Zárate *et al.*, 2016).

Lactobacillus plantarum ZDY2013 puede inhibir significativamente la adhesión de la enterotoxina de *Bacillus cereus* ATCC14579 y *Bacillus cereus* HN001 produciendo sustancias anti-adherencia frente a patógenos y compitiendo por los receptores de unión al epitelio lo que provoca un desplazamiento de las cepas patógenas observado en células de Caco-2 (Zhang *et al.*, 2016).

Se ha observado que la mutación del gen *Balat_1410* en *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, que codifica el exopolisacárido de las bacterias, proporciona mayor resistencia frente a las condiciones gastrointestinales y, además, aumenta la

capacidad de adherencia a los enterocitos humanos HT29 en comparación con la cepa nativa (Hidalgo-Cantabrana *et al.* 2015).

Algunas proteínas relacionadas con la adhesión como fibronectina/proteína de unión a fibrinógeno-FbpA, NLP/proteína P60, FIMB, lipoproteína, proteína inmunogénica secretada, y la subunidad fimbrial FimA se han descrito en *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* KLDS (Zhu *et al.*, 2016). *Lactobacillus gasseri* SBT2055 se ancla a la mucosa debido a que posee proteínas que se localizan en la superficie y funcionan como moléculas de adhesión tales como las proteínas dependientes de Sortasa (SDP), las cuales poseen un dominio MucBP o Mub encargado de la adhesión. También expresa otras proteínas de unión a la mucina como APF1 y FbpA, aunque no son exclusivas de esta cepa. Se piensa que expresa otras SDP (Arai *et al.*, 2016). Lo mismo sucede con diferentes cepas de *Bifidobacterium* (Nishiyama *et al.*, 2014). Otra proteína de superficie celular (Ip_1643) de *Lactobacillus plantarum* WCFSI participa en la unión a moco intestinal. En concreto el dominio His-N2 se encarga de esta unión (Du *et al.*, 2015).

Diversas cepas del género *Lactobacillus* presentan diferentes adhesiones al epitelio intestinal, dependiendo de los componentes de matriz extracelular que mayoritariamente producen (Yadav *et al.*, 2015).

La elección de la fuente de carbono afecta a la capacidad de interacción entre los probióticos y las células epiteliales intestinales. Por ejemplo, cuando la fuente de carbono de *Bifidobacterium infantis* son oligosacáridos de leche humana, poseen mayor afinidad por células Caco-2 que cuando la fuente de carbono procede de glucosa o lactosa simple (Wickramasinghe *et al.*, 2015).

Las bacterias que forman la microbiota intestinal pueden incrementar la actividad de unas enzimas denominadas esterases cinamoilo, que liberan ácidos hidroxicinámicos con actividad quimioprotectora y antioxidante. *Lactobacillus fermentum* CRL1446 podría estimular dicha actividad esterasa de las células epiteliales facilitando así su adherencia (Mukdsi *et al.*, 2016). Por último, se ha demostrado que la presencia de pili spaCBA aumenta también la adhesión de *Lactobacillus* spp. a células Caco-2 (Markowicz *et al.*, 2014).

Lactobacillus reuteri LR1 exhibe una buena adherencia a las células IPEC-1 y puede inhibir la adhesión de *E. coli* enterotoxigénica, lo que promueve la estimulación de ZO-1 y gracias a esto, la permeabilidad se regula con lo que disminuyen citoquinas pro-inflamatorias (IL-6 y TNF- α), y aumenta los niveles de citoquina anti-inflamatoria (Wang *et al.* 2016).

Exclusión competitiva de microorganismos patógenos

Greenberg fue el primero en describir el término "exclusión competitiva", cuando se refirió al escenario en que especies de bacterias competían por sitios de unión con otras especies (Greenberg, 1969). Los mecanismos usados por las bacterias para la exclusión y/o la reducción en el crecimiento de otras especies es variable e incluye: la creación de un microambiente hostil, la disminución de los sitios de unión disponibles, la producción y la secreción de sustancias antimicrobianas, así como la disminución de los nutrientes esenciales para el crecimiento (Rolfe, 1991).

Las propiedades de adhesión específicas se deben a la interacción entre las proteínas de superficie y las mucinas. Lactobacilos y bifidobacterias inhiben un amplio rango de patógenos, en los que se pueden incluir *E. coli*, *Salmonella*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes* y *Rotavirus* (Chenoll *et al.*, 2011; Sgouras *et al.*, 2004; Todoriki *et al.*, 2001; Chu *et al.*, 2005; Tsai *et al.*, 2008; Muñoz *et al.*, 2011; Nakamura *et al.*, 2012). La exclusión se produce debido a diversos mecanismos y propiedades de los probióticos para inhibir la adhesión de patógenos, que incluyen la producción de PAM y la estimulación de CEI. La exclusión competitiva por bacterias intestinales se basa en la interacción bacteria-bacteria mediada por la competencia por los nutrientes disponibles y la adhesión a los sitios de la mucosa. Para obtener ventaja, las bacterias pueden modificar el ambiente para que sea menos adecuado para sus competidores. La producción de PAM es un ejemplo de la modificación del ambiente (Schiffrin *et al.*, 2002).

Los mecanismos por los que actúan los lactobacilos son diversos. *Lactobacillus rhamnosus* GG tiene actividad frente a enterococos resistentes a la vancomicina gracias a sus pili SpaCBA-SrtC1, que son estructuras con forma de apéndice de origen proteico que ayudan a la adhesión, y es gracias a ellos por lo que desplaza a *Enterococcus*

faecium E1165 (Tytgat *et al.*, 2016). *Lactobacillus curvatus* TUCO-5E posee un efecto de exclusión sobre *Salmonella* spp. TUCO-I7 y *Salmonella enterica* ATCC 13096 *in vitro* e *in vivo* (Quilodrán-Vega *et al.*, 2016).

Muchas especies de *Lactobacillus* poseen una capa superficial (capa S) de proteínas que se adhieren a la mucina de las células epiteliales y excluyen de la adhesión a bacterias patógenas. Este proceso se lleva a cabo por la obstrucción de DC-SIGN, proteína lectina tipo C de transmembrana de las CD, a las que se unen bacterias patógenas (Prado *et al.*, 2016).

Algunos lactobacilos y bifidobacterias comparten características en la unión de hidratos de carbono con algunos enteropatógenos (Nesser *et al.*, 2000; Fujiwara *et al.*, 2001), lo que hace posible que las cepas compitan con patógenos específicos por los sitios de unión (Mukai *et al.*, 2002). En general, las cepas probióticas son capaces de inhibir la unión de bacterias patógenas por medio del impedimento estérico en los receptores de patógenos de los enterocitos (Coconnier *et al.*, 1993). El efecto de las bacterias probióticas en la exclusión competitiva de patógenos se ha demostrado usando modelos de mucosa humana *in vitro* (Hirano *et al.*, 2003; Tuomola *et al.*, 1999), además de modelos a base de mucosas animales (Hirn *et al.*, 1992; Genovese *et al.*, 2000). Dentro de una misma especie de bacterias, podemos encontrar cepas virulentas y cepas probióticas, como es el caso de *Bacteroides fragilis*. Se ha comprobado que las *Bacteroides fragilis* no tóxicas desplazan a *Bacteroides fragilis* tóxicas gracias a un mecanismo de interacción célula-célula y secreción ampliamente distribuido entre bacterias Gram⁻ denominado sistema de secreción tipo VI (T6SS) por la cepa no tóxica (Hecht *et al.*, 2016). Hirano *et al.* demostraron que *L. rhamnosus*, una cepa con mucha capacidad de adhesión, es apta para inhibir la internalización de *E. coli* enterohemorrágica en una línea celular intestinal humana C2BBel (Hirano *et al.*, 2003).

Lactobacillus johnsonii FI9785 es un tratamiento efectivo de pollos Light Sussex infectados por *Campylobacter jejuni* pues disminuye la concentración de este patógeno en heces gracias a un mecanismo de exclusión competitiva (Mañes-Lázaro *et al.*, 2017). *Lactobacillus gasseri* SBT2055 también facilita la exclusión competitiva de *Campylobacter jejuni* mediante la segregación de factores APF1 y APF2 que facilitan la auto-agregación y la adhesión a células epiteliales humanas (Nishiyama *et al.*, 2015).

Producción de sustancias antimicrobianas

Unos de los mecanismos propuestos por el cual los probióticos ejercen beneficios en la salud es la formación de compuestos de bajo peso molecular, tales como ácidos orgánicos y PAM conocidos como bacteriocinas (Martinez *et al.*, 2013, Arena *et al.*, 2016).

Los ácidos orgánicos son considerados el principal componente antimicrobiano capaz de inhibir la actividad de los patógenos; en particular los ácidos acético y láctico tienen un efecto inhibitorio frente a bacterias Gram⁻ (Alakomi *et al.*, 2000; De Keersmaecker *et al.*, 2006; Makras *et al.*, 2006; Shokri *et al.*, 2017).

La forma no disociada de los ácidos orgánicos entra en la bacteria y se disocia dentro del citoplasma, ocurriendo una disminución del pH o una acumulación intracelular de las formas ionizadas que pueden conducir a la muerte del patógeno (Ouweland, 1998; Russel y Diez-Gonzalez, 1998). Las bacterias intestinales producen una gran variedad de ácidos grasos que promueven la salud. De hecho, ciertas cepas de bifidobacterias intestinales y lactobacilos han demostrado producir ácido linoleico conjugado (ALC), potente agente anticancerígeno (O'Shea *et al.*, 2012; Macouzet *et al.*, 2009). Recientemente, se ha demostrado la capacidad de modular la composición de los ácidos grasos del hígado y del tejido adiposo del hospedador tras la administración oral de bifidobacterias y lactobacilos productoras de ALC en ratones (O'Shea *et al.*, 2012, Lee *et al.*, 2007). Por último, las bacterias probióticas son capaces de producir derivados de las sales biliares, que tienen actividad antimicrobiana en comparación con las sales biliares sintetizados por el organismo. Sin embargo, queda por dilucidar cómo los probióticos se protegen a sí mismos de los distintos metabolitos con actividad microbiana que producen (Oelschlaeger, 2010). La administración de butirato producido por bacterias, provoca un aumento de mucina en células LS174T, lo que provoca una reducción en la adherencia de patógenos como *E. coli*, con lo que de manera indirecta disminuye el número de bacterias dañinas (Jung *et al.*, 2015). El ácido tropoditiético producido por *Phaeobacter inhibens* S4Sm, promueve la formación de biopelículas gracias a la expresión de *clpX* y *EXOP* (Zhao *et al.*, 2016).

Lactobacillus rhamnosus IMC 501, *Lactobacillus paracasei* IMC 502 y su combinación 1:1, llamada Synbio, tienen actividad frente a patógenos, si bien se

desconoce si se debe a la producción de bacteriocinas u otros compuestos (Coman *et al.*, 2014).

Con respecto a la producción de bacteriocinas, hay que destacar que varios estudios han puesto de manifiesto que la producción de las mismas confiere a las cepas productoras una ventaja competitiva dentro de entornos microbianos complejos, como consecuencia de su actividad antimicrobiana asociada. La producción de bacteriocinas puede permitir el establecimiento del microorganismo y aumentar la prevalencia de las cepas productoras, así como permitir la inhibición directa en la proliferación de patógenos dentro del TGI (O'Shea *et al.*, 2012).

Pseudoalteromonas piscicida presenta dos mecanismos de control de patógenos, siendo uno de ellos la producción de sustancias antimicrobianas, peptidasas y ácidos. Por otro lado, se ha descrito un mecanismo novedoso mediante la transferencia directa de vesículas digestivas a bacterias con las que compiten (Richards *et al.*, 2017).

Muchas LAB generan bacteriocinas con actividad sólo contra bacterias estrechamente relacionadas, pero existen algunas que incluso son activas frente a patógenos transmitidos por los alimentos (Nielsen *et al.*, 2010; Al Kassaa *et al.*, 2014; Swetwiwathana *et al.*, 2015). Los mecanismos comunes de acción de las bacteriocinas incluyen la destrucción mediante la formación de poros y/o inhibición de la síntesis de la pared celular (Hassan *et al.*, 2012). Por ejemplo, la nisina forma un complejo con el último precursor de la pared celular, el lípido dos, inhibiendo de este modo la biosíntesis de la pared celular y posteriormente formando un poro en la membrana bacteriana (Bierbaum y Sahl, 2009). Las LAB producen diferentes bacteriocinas, entre las que destacan: sakacin A, pediocina (PA-1), enterocinas (P, Q y L50), plantaricinas (EF y JK) y garvicina (ML), que modifican la microbiota en ratones reduciendo el número de patógenos como *Staphylococcus* por enterocinas, *Enterococcaceae* por GarML y *Clostridium* por plantaricinas (Umu *et al.*, 2016). Igualmente, algunas LAB ejercen un efecto inhibitorio sobre diferentes especies de *Listeria* mediante la producción de bacteriocinas. En concreto frente a *Enterococcus faecium* M3K31 que produce enterocina HF (Arbulu *et al.*, 2016).

Cepas bacterianas tales como *Lactobacillus reuteri* SD2112 son importantes para inhibir agentes patógenos en el intestino (Langa *et al.*, 2014).

Las bacteriocinas de *Lactobacillus plantarum* LZ206 se denominan plantaricinas. Tras el análisis genómico de esta cepa se ha comprobado que expresa varias plantaricinas de clase IIb PlnJK, NC8 $\alpha\beta$ y también la clase IIc (Li *et al.*, 2016). La cepa LZ95 de *Lactobacillus plantarum* posee en su material genético 15 genes implicados en la biosíntesis de bacteriocinas como PlnJ y PlnK y riboflavina (Li *et al.*, 2016). Otra cepa de *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9 también muestra genes precursores de bacteriocinas de clase II PlnJ, PlnK, pln ϵ , PlnF y plna (Liu *et al.*, 2016).

Algunos compuestos antibacterianos específicos han sido descritos para cepas de bifidobacterias y, dentro de ellos, sólo una bacteriocina (bifidocina B), producida por *B. bifidum* NCFB 1454, es activa frente a bacterias Gram⁺ (Makras *et al.*, 2006; Yildirim *et al.*, 1999). Liévin *et al.*, describieron una gran actividad de eliminación de dos cepas de *Bifidobacterium* contra varias bacterias patógenas, como *Salmonella enterica* ser. *typhimurium* SL1344 y *E. coli* C1845. Dicha actividad, fue atribuida a la producción de una molécula lipofílica de bajo peso molecular (Liévin *et al.*, 2000; Gibson y Wang, 1994).

Debido al incremento de resistencias a antibióticos por parte de microorganismos patógenos, en medicina se suele complementar el tratamiento con otros productos. *Lactobacillus rhamnosus* GG producen proteínas llamadas Llp1 y Llp2, que son estructuralmente similares al dominio N-terminal de leptinas, las cuales poseen la capacidad de inhibir la formación de biopelículas producidas por *Escherichia coli* y *Salmonella* (Petrova *et al.*, 2016), con lo que podría ayudar en el tratamiento antibiótico. *Pediococcus pentosaceus* y *Lactobacillus brevis* han mostrado el mismo efecto sobre las biopelículas generadas por *Streptococcus salivarius* B468 y *Bacillus cereus* ATCC14579 (Ben *et al.*, 2016).

Igualmente se ha descrito que *Bacillus clausii* O/C contrarresta los efectos tóxicos que provocan *Clostridium difficile* y *Bacillus cereus* en células Vero y Caco-2 (Ripert *et al.*, 2016).

Lactobacillus plantarum ST8Sh muestra un gran poder antimicrobiano frente a *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 y *Enterococcus faecalis* ATCC 19443 (Todorov *et al.*, 2017).

Carnobacterium produce bacteriocinas denominadas “divercinas” frente a *Listeria monocytogenes* observado en células HT29. Aparte de esta acción frente a patógenos, la producción de divercinas estimula la expresión de moco por parte de las células HT29, lo que facilita la adhesión de *Carnobacterium* y fomenta el poder antipatogénico (Pilchová *et al.*, 2016).

La eficacia de las bacteriocinas depende de la cepa contra la que va a actuar y de la cepa productora. *Lactobacillus rhamnosus* CJNU 0519 produce rhamnocina 519, que ha demostrado ser eficaz frente *Lactobacillus acidophilus*, *Listeria monocytogenes* y *Staphylococcus aureus* (Jeong *et al.*, 2015). *Bacillus licheniformis* MCC2514 presenta mayor eficacia frente a *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* y especies de *Klebsiella* y *Aeromonas*, mientras que *Bacillus licheniformis* MCC2512 también tuvo influencia sobre *Listeria monocytogenes* y *Salmonella typhimurium* (Shobharani *et al.*, 2015).

En algunos casos la adición de compuestos puede servir como ayudante en la estimulación de bacteriocinas. Es el caso de la sacarosa y la inulina, que potencian la bacteriocina generada por *Pediococcus pentosaceus* sobre *Enterococcus* y *Listeria* (de Souza de Azevedo *et al.*, 2017). *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* LDD01 tiene un efecto inhibitorio sobre *Klebsiella pneumoniae*, el cual se multiplica con la aplicación de proteinasa K (Mogna *et al.*, 2016).

La cepa *Bifidobacterium animals* produce una bacteriocina denominada Bifidocin A, que inhibe el crecimiento de una amplia gama de bacterias transmitidas por los alimentos. Esta bacteriocina produce la lisis, desestabilización y permeabilización de las membranas celulares como se ha demostrado con *E. coli* 1.90. Además posee actividad inhibitoria frente a levaduras, como *S. cerevisiae*, *K. marxianus* y *C. albicans* (Liu *et al.*, 2015).

Debido a los mecanismos de resistencias que desarrollan bacterias como *Escherichia coli* frente a antibióticos, es necesario aumentar el arsenal terapéutico. Dentro de los nuevos candidatos a agentes antibacterianos se encuentran la nisina y la enterocina DD14. Diversas combinaciones entre nisina, colistina y DD14 han demostrado gran eficacia frente a cepas de *E. coli* (Al Atya *et al.* 2016). Del mismo modo, se han descubierto nuevos compuestos de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356

y *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 efectivos contra *Serratia marcescens* (Vahedi *et al.*, 2016). Otras probióticos que producen bacteriocinas son los siguientes: *Enterococcus faecalis* DU10 (Perumal *et al.*, 2016); la lactococcina Z de clase II producida por *Lactococcus lactis* (Ishibashi *et al.*, 2015); BLIS, producida por *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Martinez *et al.*, 2015); BLISL23 y L60, por *Lactobacillus fermentum* L23 y *Lactobacillus rhamnosus* L60 (Ruíz *et al.*, 2015); la plantaricina ZJ5, por *Lactobacillus plantarum* ZJ5 (Song *et al.*, 2014); y la plantaricina DM5, por *Lactobacillus plantarum* DM5 (Das *et al.*, 2014).

Se ha encontrado una nueva bacteriocina frente a *Campylobacter jejuni* procedente de *Lactobacillus curvatus*. Este nuevo compuesto se ha denominado curvaticin DN317 y posee estructuras similares a la sakacina P y la curvaticina L442 (Zommiti *et al.*, 2016).

Para mejorar las bacteriocinas, se ha propuesto un mecanismo de recombinación génica en *Lactobacillus plantarum* LB-B1 quien produce pediocina PA-1, que posee efecto sobre bacterias Gram⁺ pero no sobre Gram⁻. Este mecanismo de recombinación se basa en la expresión de microcina V pero usando la secuencia génica del péptido líder de pediocina PA-1. La recombinación parece tener un efecto de más amplio espectro (Ma *et al.*, 2016).

Otro mecanismo para desarrollar nuevas bacteriocinas es por modificación de aminoácidos de bacteriocinas ya existentes. Es el caso de la enterocina A, cuya modificación en los aminoácidos A24 y T27 produce un mayor efecto (McClintock *et al.*, 2016).

Probióticos y sistema inmunitario

El control y reconocimiento por parte de las células que controlan el medio luminal, células epiteliales, células M y CD, se realiza mediante PRRs que detectan microorganismos o partes de microorganismos a través de estructuras moleculares conservadas (Fong *et al.*, 2016). La expresión de estos receptores y la cascada de señales que desencadena debido a su activación es imprescindible debido a que la ausencia de especificidad en el epitelio puede conducir a una brecha en la barrera

intestinal, lo que pondría en contacto las bacterias comensales y la lamina media provocando inflamación (Hevia *et al.*, 2015, Villena *et al.*, 2014). Los TLRs son proteínas transmembrana expresadas en diversas células, tanto inmunitarias como no, entre las que se encuentran las células B, células *natural killer*, CD, macrófagos, fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales. En los mamíferos, la familia de TLRs incluye 11 proteínas

(TLR1-TLR11). En los seres humanos, TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10 se encuentran en la membrana plasmática asociados principalmente a la respuesta de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Los receptores TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se encuentran en la superficie de los endosomas, respondiendo a los PAMP de virus y bacterias (Figura 6) (Gómez-Llorente *et al.*, 2010). En el intestino sano, los enterocitos expresan bajos niveles de TLR 2 y 4 y del co-receptor MD-2 (Abreu *et al.*, 2001; *et al.*, 2004). La activación de los PRR de los enterocitos por parte de microorganismos produce péptidos antimicrobianos (incluyendo RegIII γ , RegIII β , Ang4 y Itln1), moco, IL-18 (induce la activación de células NK y linfocitos T citotóxicos, además estimula la producción de IF- γ e incrementa el efecto de la IL-12) (Wawrocki *et al.*, 2016). Los TLR que junto con el receptor GPR109 estimula la síntesis de Pro-IL-18. Para que Pro-IL-18 sea funcional, es necesaria una escisión post-transcripcional que se lleva a cabo en el inflamasoma NLRP6. IL-18 también puede provenir de células inmunes ayudando a regular las respuestas antimicrobianas de las células epiteliales (Thaiss *et al.*, 2016).

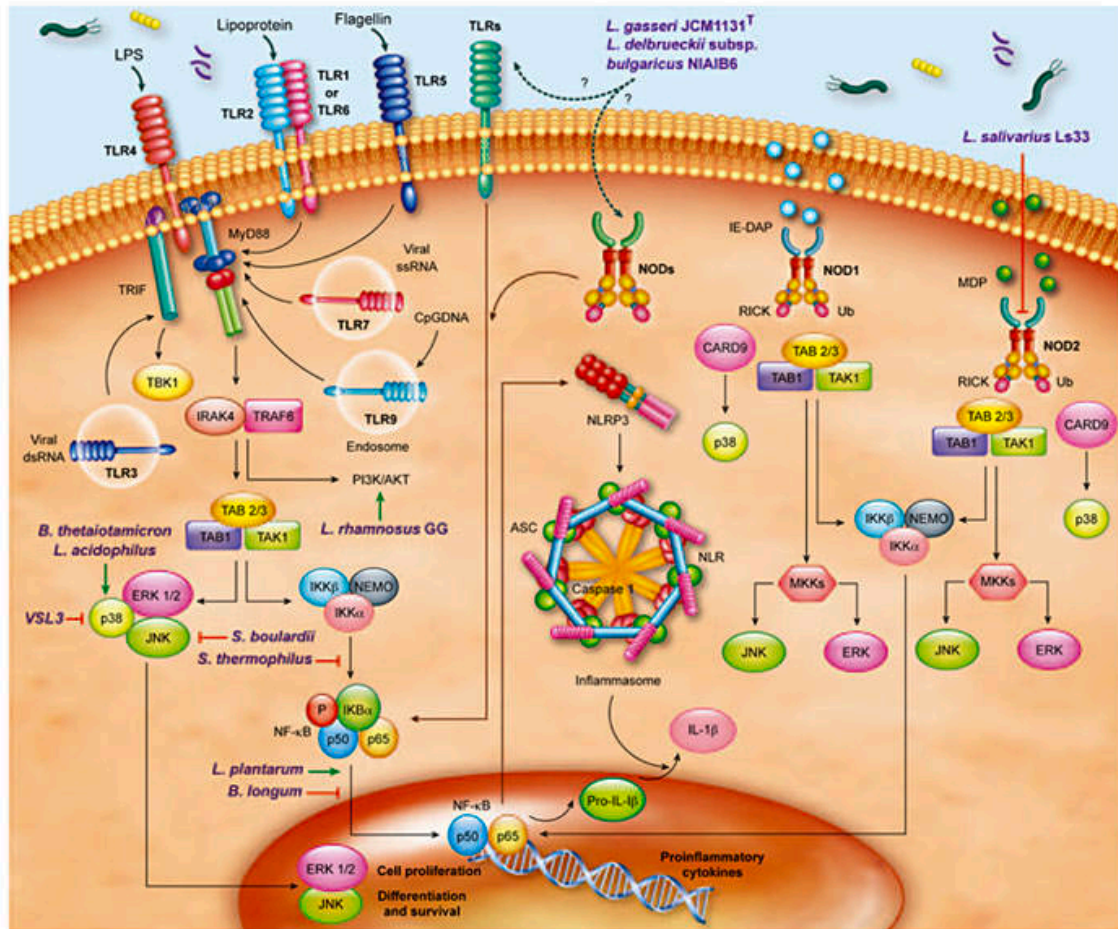


Figura 6. Interacción de los probióticos con el sistema inmunitario en el intestino. Bermúdez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* 2012; 61: 160-174.

La vía de señalización de los TLRs, a excepción del receptor TLR3, implica el reclutamiento de MyD88 (proteína de respuesta primaria de diferenciación mieloide), que activa las vías de MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) y la del factor nuclear (NF)-kappa B (Lebeer *et al.*, 2010; Kawai y Akira, 2010; Wells, 2011). El receptor TLR3 utiliza el TRIF (adaptador que contiene el dominio TIR —receptor *toll*/interleuquina (IL)-1— que induce interferón β), lo que lleva a la expresión de interferón tipo I (Wells, 2011). La señalización mediada por TLRs ha demostrado controlar la maduración de las CD induciendo la sobreexpresión de varios marcadores de maduración, tales como CD80, CD83 y CD86, así como el receptor de quimioquinas CCR7.

Por otra parte, los microorganismos comensales y los probióticos pueden crear un estado de tolerancia general mediado por la acción de TLRs en las CD. La señalización del receptor TLR9 es esencial en la intervención de la acción anti-inflamatoria producida por los probióticos. Sin embargo, otros estudios han implicado a otros TLRs, tales como TLR3 y TLR7, en la tolerancia inducida por bacterias comensales y probióticas (Gómez-Llorente *et al.*, 2010). Así probióticos estimulan la síntesis de TLR3, lo que facilita la inmunidad innata antiviral (Tada *et al.*, 2016).

Después de la activación producida por los microorganismos comensales y probióticos, las CD inician una respuesta adecuada, como la diferenciación de células Th0 a Treg, que tiene un efecto inhibitor sobre las respuestas inflamatorias Th1, Th2 y Th17. Está bien establecido que los probióticos pueden suprimir la inflamación intestinal a través de la regulación a la baja de la expresión de TLRs, la secreción de metabolitos que pueden inhibir al TNF- α y la inhibición de la señalización de NF- κ B en los enterocitos (Gómez-Llorente *et al.*, 2010).

El receptor TLR2 reconoce al peptidoglicano, principal componente de las bacterias Gram⁺, entre las que se incluyen los géneros *Lactobacillus*. Varios estudios han demostrado que TLR2 es necesario para que algunas cepas de *Lactobacillus* puedan ejercer sus efectos inmunomoduladores. Vinderola *et al.* (2005) demostraron que *L. casei* CRL 431 interactúa con las CEI a través de TLR2, y que esta interacción induce un incremento en el número de receptores CD-206 y TLR2, principalmente en las células implicadas en la respuesta inmunitaria innata. Además, los componentes de la pared celular de los lactobacilos pueden potenciar la señal de unión de TLR2 en combinación con TLR6. Los anclajes de la membrana diacilados de lipoproteínas y ácidos lipoteicoicos se unen a TLR2 y TLR6, promoviendo así la dimerización y activación mediada por MyD88, de la vía canónica de NF- κ B (Wells, 2011) o mediante MAPK (Anderson *et al.*, 2016). La estimulación de TLR2 aumenta la producción de citoquinas y su activación tiene un papel importante en la mejora de la resistencia transepitelial a las bacterias invasoras (Vizoso Pinto *et al.*, 2009).

En este sentido, Shida *et al.* mostraron que *L. casei* induce altos niveles de IL-12, tanto en macrófagos normales como en deficientes de TLR2, y que el peptidoglicano induce bajos niveles de IL-12 en macrófagos normales e incluso más bajos en los deficientes de TLR2. Por lo tanto, los autores sugirieron que el

peptidoglicano intacto de los lactobacilos en realidad actúa vía TLR2 inhibiendo la producción de IL-12. Aunque, el reconocimiento por TLR2 es esencial, sólo del 12 al 48% de la producción de IL-12 en los macrófagos deficientes de TLR2 fue inhibida por el peptidoglicano, lo que sugiere que otros mecanismos independientes de TLR2 pueden estar implicados (Shida *et al.*, 2009).

Igualmente, se ha demostrado que cepas de *L. rhamnosus* GG y *L. plantarum* BFE 1685 aumentan la expresión de TLR2 en experimentos con células intestinales humanas. Más recientemente, *L. casei* CRL431 ha demostrado ejercer efectos similares en ratones sanos y ratones infectados con *S. enterica* serovar *typhimurium* (Abreu *et al.*, 2005; Castillo *et al.*, 2011). La administración de probióticos a ratones sanos produjo un aumento en la expresión de TLR2, TLR4 y TLR9, y mejoró la secreción de TNF- α , IFN- γ e IL-10 en las placas de Peyer (Castillo *et al.*, 2011). Recientemente, Yao *et al.*, (2017) han demostrado que el tratamiento con Golden bifid (mezcla de *Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) produce un efecto contrario, donde disminuye la expresión de TLR2 y TLR4 en ratones que poseen colitis ulcerosa. El efecto se debe a la disminución de TNF- α e IL-1 β , citoquinas relacionados con la inflamación.

TLR2 también tiene un papel importante en el reconocimiento de las bifidobacterias. Hoarau *et al.* han descrito que el producto de fermentación por *B. breve* C50 puede inducir la maduración y producción de IL-10, así como prolongar la supervivencia de las CD vía TLR2 (Hoarau *et al.*, 2006). *Lactobacillus casei* Lbs2 produce de la misma manera en las CD un incremento de TLR2, activando células Th0 a Treg, lo que conlleva a una respuesta anti-inflamatoria (Thakur *et al.*, 2016), y del mismo modo, Zeuthen *et al.* señalaron que CD sin el gen *TLR2* producen más IL-2 y menos IL-10 en respuesta a bifidobacterias, concluyendo que los efectos inmunoinhibitorios dependen de TLR2 (Zeuthen *et al.*, 2008). *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 reduce TNF- α en adultos sanos a partir de la inhibición de NF- κ B, mediante la interacción con TLR-2 en monocitos de sangre periférica estimulados con LPS (Meng *et al.*, 2017).

Con respecto al receptor de TLR4 se ha observado que tiene un papel en la defensa del hospedador frente a las infecciones *in vivo* de *Salmonella*. En ratones sanos, *L. casei* CRL 431 activa este receptor y es capaz de utilizarlo como mecanismo de

supervivencia frente a bacterias patógenas (Castillo *et al.*, 2011). La activación de TLR4 induce mediadores pro-inflamatorios, un aumento en la expresión de TLR2 y una reducción en su propia expresión, que cursa con un reclutamiento de células inflamatorias y con el inicio de una respuesta apropiada en el bazo (Castillo *et al.*, 2011; Weiss *et al.*, 2004; Totemeyer *et al.*, 2003). Del mismo modo los efectos anti-inflamatorios de *Lactobacillus delbrueckii* TUA4408L dependen de la activación de TLR2, pero no de TLR4 (Wachi *et al.*, 2014). El tratamiento con *Lactobacillus rhamnosus* GG reduce los procesos inflamatorios en ratones KO para TLR4 con colitis ulcerosa inducida por *Citrobacter rodentium*, lo que demuestra el poder anti-inflamatorio, aunque en ratones KO para TLR2 no se observó una mejoría (Ryu *et al.*, 2016). La inducción de TLR4 puede conducir a la producción de citoquina inflamatoria a través de la activación de dos vías de señalización, una dependiente de MyD88 y otra independiente.

La inhibición de TLR4 en procesos anti-inflamatorios mediante *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 T estimula la síntesis de reguladores negativos a través de TLR2, como Tollip y IRAK-M y disminuyendo la síntesis de NF- κ B. Además, se produce una disminución de las proteínas de choque térmico Hsp72 y Hsp90, las cuales son cruciales para el funcionamiento de TLR4, lo que conlleva una disminución de citoquinas pro-inflamatorias en células Caco-2 / TC7 y explantes de cerdo (Finamore *et al.*, 2014).

Asimismo, cepas de *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* inactivadas por calor pueden disminuir la expresión de TLR4, de manera similar a la del lipopolisacárido (LPS), en CD derivadas de monocitos humanos tras 12 h de incubación. Estas cepas probióticas pueden alterar la respuesta inmunitaria a nivel post-transcripcional por modificación de la expresión del microARN (Giahi *et al.*, 2012).

Otro TLR relevante es el TLR9, que reconoce ADN bacteriano con islotes CpG. Fragmentos de ADN no metilado que contiene CpG son liberados por probióticos *in vivo* teniendo un efecto anti-inflamatorio, a través de la señalización de TLR9 en la superficie. Se sabe que las especies de *Lactobacillus* difieren en su composición G+C. Por lo tanto, la capacidad de distintas especies de estimular TLR9 puede ser diferente (Wells, 2011; Hemmi *et al.*, 2000). La estimulación de TLR9 a través de las superficies

apical y basolateral activa diferentes vías de señalización intracelular en células epiteliales polarizadas. Mientras el TLR9 basolateral activa la degradación de I κ B α y la activación de la vía de NF- κ B, el TLR9 apical induce una acumulación citoplasmática de I κ B ubiquitinada e inhibe a NF- κ B (Lee *et al.*, 2006). No siempre TLR-9 se estimula tras la intervención de probióticos. Cepas de *B. breve* (NumRes 204), *L. rhamnosus* (NumRes 1) y *L. casei* (DN-114001) inducen distintos niveles de producción de citoquinas en células inmunitarias primarias de humanos y ratones. Se ha demostrado que la cepa de *B. breve* genera niveles mucho más bajos de IFN- γ que *L. rhamnosus* y *L. casei*. Por otra parte, la cepa de *B. breve* y lactobacilos estimulan citoquinas de manera independiente de TLR9 y disminuyen la inflamación por efectos inhibitorios de TLR2 (Plantiga *et al.*, 2011). También se ha observado en ratones, que *Lactobacillus rhamnosus* HN001, puede proteger contra el desarrollo de enterocolitis necrotizante en un proceso que requiere la activación del receptor TLR9. Además, se puso de manifiesto que el propio ADN de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 poseía el mismo efecto que el propio *Lactobacillus rhamnosus* HN001, reduciéndose el grado de señalización pro-inflamatorio y los niveles de TLR4 en enterocitos cultivados (Good *et al.*, 2014).

Aparte de los efectos anteriormente mencionados, TLR2 también es capaz de modular la respuesta en células de la placas de Peyer y en la lámina propia un incremento de IgA estimulado por *Lactobacillus gasseri* SBT2055. El fenómeno se lleva a cabo mediante las CD, provocando en linfocitos B la activación de genes *BAFF* que codifica citoquinas y además participan en la proliferación, producción de IL-6 y IL-10, y en el cambio de clase de IgA a IgA⁺ (Sakai *et al.*, 2014). Los niveles de secreción de IgA por parte de los enterocitos se afectan por la acción de *Lactobacillus helveticus* KLDS 1,8701 y *Lactobacillus acidophilus* KLDS AD1, AD2 mejorado los niveles de IFN- γ y IL-4, que son claves en la inducción de respuestas de Th1 y Th2 en ratones (Bian *et al.*, 2016). De la misma manera las LAB estimulan la producción de IgA en las placas de Peyer y favorece las uniones intercelulares (Kim *et al.*, 2016) y por *Saccharomyces cerevisiae* (García *et al.*, 2016).

Bifidobacterium adolescentis DB-2458, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* GB-1496 y *Bifidobacterium longum* HB-762 inducen la producción de citoquinas anti-inflamatorias TGF- β e IL-10 en ratones (Chiu *et al.*, 2014, del Carmen *et al.*, 2014).

Lactobacillus rhamnosus RC007 incrementa el ratio IL-10/TNF- α en ratas con colitis inducida por TNBS (Dogi *et al.*, 2016). Del mismo modo, *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 promueve la síntesis de IL-10 en CD (Rossi *et al.*, 2016; Strisciuglio *et al.*, 2015). En los macrófagos el aumento de IL-10 viene determinado por la activación de TLR-2 como consecuencia de la expresión de MyD88 (Kanai *et al.*, 2015). *Lactobacillus pseudocatenulatum* CECT7765 produce una activación de TLR2 que induce en linfocitos intestinales de ratones una represión de CCR6, CCR9, CXCR3, CXCR6, TNF- α y sus receptores TNF-RI y TNF-RII; sin embargo, se incrementan los niveles de IL-10 y IL-10R (Moratalla *et al.*, 2016).

Además de estudiar la producción de citoquinas anti-inflamatorias, algunas cepas de probióticos modulan la producción de citoquinas pro-inflamatorias, como es el caso de IL-8. El uso de *Enterococcus faecium* HDRsEf1 tuvo efectos positivos sobre la diarrea en lechones. En células IPEC-J2 estimuladas con *Escherichia coli* K88ac como agente promotor en el incremento de la permeabilidad y por ende de un estado inflamatorio. Los resultados demostraron que *Enterococcus faecium* HDRsEf1 HDRsEf1 desplaza a *Escherichia coli* K88ac de la capa de células IPEC-J2 y además, modula la liberación de IL-8 por las células IPEC-J2 con lo que disminuye dicha inflamación (Tian *et al.*, 2016). Otra cepa de *Enterococcus faecium*, CM33, posee los genes que codifican para enterocinas A, 31 y X (Nami *et al.*, 2015). En células Caco-2 tras su incubación con de *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM1014, disminuyen los niveles de IL-8 cuando se estimulan con *Salmonella*. La regulación ocurre a través de PI3K/Akt cuando la cepa probiótica se administra previamente al patógeno, o bien puede ocurrir a través de la expresión de la proteína 2 cuando el probiótico se administra después del patógeno (Huang *et al.*, 2016). La regulación de IL-8 no está mediada por NF- κ B en células HT-29 (Rolny *et al.*, 2016). *Lactobacillus plantarum* Lp62 también inhibió los niveles de IL-8, TNF- α , IL1- β , y IL-17 secretada por macrófagos J774 (Ferreira *et al.*, 2016). Novotny *et al.*, (2015) observaron una disminución de citoquinas pro-inflamatorias IL-6, IL-17 y TNF- α por *Lactobacillus casei* CRL 431. También, en los adipocitos, provoca una disminución de la secreción de proteína quimio-atrayente de monocitos 1 (MCP-1) disminuyendo procesos de inflamación.

Lactobacillus plantarum inhibe la activación de NF- κ B, reduce los linfocitos T en los tejidos epiteliales aumenta las citoquinas anti-inflamatorias IL-1, IL-6 y TGF- β y disminuye las citoquinas pro-inflamatorias TNF- α , IL-1 β y INF- γ . Estos efectos se realizan a través de la proteína SLP de la capa superficial del probiótico. El dominio MIMP de la misma es quien determina estos efectos (Liu *et al.*, 2014). La ingesta de *Lactobacillus plantarum* CECT 7315/7316 (LP3457) atenúan las reacciones de endotoxemia tanto aguda como crónica provocadas por LPS en ratas Zucker, provocando una disminución de IL-1 β , IL-6 y de la proteína C reactiva (CRP) así como un aumento de IL-10. Este aumento de IL-10 se debe a la disminución de NF- κ B lo que produce una disminución de la acción de mieloperoxidasa (MPO) localizada en células polimorfonucleares (Vilahur *et al.*, 2015; Čitar *et al.*, 2015). Un estudio con *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus paracasei* LS2 mostró resultados similares en ratones, restaurando los niveles Th1/Th2, incrementando los niveles de IL anti-inflamatorias, y disminuyendo las pro-inflamatorias (Sharma *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2017).

Lactobacillus rhamnosus Lcr35 participa en procesos anti-inflamatorios disminuyendo la concentración de IL-23, TGF- β , IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , e IL-12. IL-17 que viene producida por Th17 tras el tratamiento en ratas Sprague Dawley inducidas con ácido trinitrobencenosulfónico (TNBS). Th17 participa en procesos pro-inflamatorios y se estimula a través de CD80/CD86 y CD40 lo que conlleva la activación del factor de transcripción ROR γ t, (Owaga *et al.*, 2015; Darbaky *et al.*, 2017)

La presencia de inulina como prebiótico mejora el crecimiento de *B. longum* BB536, *B. animalis* subsp. *lactis* BB12, *B. lactis* LAFTI B94, y estimula la producción de ácidos grasos de cadena corta. Este incremento inhibe significativamente la concentración de citoquinas pro-inflamatorias tales como (TNF- α , IL-12, TGF- β 1 y IFN- γ), además de inducir una mayor producción de citoquinas anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10) en células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMCs) (Asarat *et al.*, 2015).

Bifidobacterium bifidum MIMBb75 expresa una proteína en la superficie externa llamada TgaA. Esta proteína posee dos dominios, uno de ellos es una mureína transglucosilasa lítica (LT) y una amidohidrolasa/peptidasa dependiente de cisteína e

histidina (CHAP), siendo este último la región inmune activa de la proteína, capaz de activar las CD y desencadenar la producción de IL-2 (Guglielmetti *et al.*, 2014).

Se conoce que la capa de mucosa producida por las células caliciformes ayuda a controlar a las bacterias enteropatógenas. Se ha evaluado VSL#3 en ratones C57BL/6 que poseen el gen que codifica para la producción de moco *Muc2*^{+/+} y en otro grupo que carece de este gen *Muc2*^{-/-}. La administración de VSL#3 mejora la barrera epitelial, independientemente de si poseen capa de mucosa o no. La mejora se asoció con una disminución de especies reactivas de oxígeno por parte de los macrófagos peritoneales, la restauración de la expresión génica del péptido antimicrobiano y el aumento de la abundancia de bacterias comensales en el intestino. En el análisis se observó una reducción de la permeabilidad. También se observó una reducción de MPO y otros parámetros inmunológicos como IL-1 β , TNF- α y IFN- γ , proteína inflamatoria de macrófagos 2, proteína quimiotáctica de monocitos-1 y disminución de ROS por los macrófagos peritoneales quedando demostrado así que incluso con patologías alteradas en la producción de moco intestinal, los probióticos incrementan la permeabilidad y disminuyen la inflamación (Kumar *et al.*, 2017).

Asimismo, los probióticos pueden actuar directamente sobre los linfocitos. Es el caso de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* en ratones C57BL/6 infectados con oocistos de ME49, cepa de *Toxoplasma gondii*. El probiótico tuvo una acción inmunomoduladora, induciendo la proliferación de linfocitos CD19 (Ribeiro *et al.*, 2016), y Treg (Jiang *et al.*, 2016), a través de la expresión de Foxp3 (Xie *et al.*, 2016).

Como se mencionó anteriormente, las funciones de los probióticos son específicas de cada cepa. Así, en ratones libres de patógenos, *Lactobacillus fermentum* AGR1487 produce mayores niveles de biomarcadores inflamatorios y aumenta de la expresión en colon de genes implicados en vías pro-inflamatorias, comparado con la cepa AGR 1485 (Anderson *et al.*, 2016).

NLRs y probióticos

Los NLRs se encuentran localizados en el citoplasma y son importantes en los tejidos donde TLRs se expresan en niveles muy bajos. Los miembros más caracterizados son NOD1 y NOD2, pero actualmente hay más de 20 NLRs identificados (Hakansson y Molin, 2011). NOD1 se expresa de forma ubicua. NOD2 se expresa en macrófagos, células de Paneth, CD, células intestinales, células de pulmón y células epiteliales orales, y en bajos niveles en células T. El receptor NOD1 puede detectar restos de peptidoglicano, asociado principalmente a la identificación de bacterias Gram⁺; y NOD2 puede detectar motivos dipeptídicos de ácido murámico, lo que permite el reconocimiento de un amplio rango de bacterias (Biswas *et al.*, 2012). Después del reconocimiento de su agonista, tanto NOD1 como NOD2 se oligomerizan para reclutar y activar la proteína adaptadora RICK, una proteína-quinasa que regula la apoptosis mediada por CD95, esencial en la activación de MAPK y NF- κ B, aumentando la transcripción y producción de mediadores inflamatorios, entre ellos citoquinas, quimio-atractantes, ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la enzima óxido nítrico sintasa inducible (Chen *et al.*, 2009).

Hay algunos estudios que demuestran el efecto de los probióticos en los NLRs. Fernandez *et al.* (2011), señalaron recientemente que la capacidad protectora de *L. salivarius* Ls33 se correlaciona con la producción local de IL-10, que fue neutralizada en ratones deficientes de NOD2. De hecho, estos autores establecen que el efecto anti-inflamatorio de Ls33 está mediado por NOD2.

Otra importante vía activada por los NLRs implica la escisión de pro-IL-1 β y pro-IL-18 en sus formas maduras y activas. Los NLRs participan en la formación del inflamasoma, lo que conduce a la activación de la caspasa-1. Existen tres inflasomas principales: NLRP1, NLRP3 y NLRC4. El NLRP3 detecta LPS, muramildipéptidos, ARN bacteriano y viral (Chen *et al.*, 2009). Existen dos pasos fundamentales para la completa activación del inflamasoma NLRP3, uno necesario para inducir la transcripción del ARN mensajero de NLRP3 y otro en el que se reconozcan los PAMP para la completa expresión de NLRP3 (Bauernfeind *et al.*, 2009; Bauernfeind *et al.*, 2010). *Escherichia coli* Nissle 1917 provoca una menor activación del inflamasoma NLRP3 (Becker *et al.*, 2014).

Se ha sugerido que NLRP3 tiene un papel importante en la regulación de la inflamación intestinal en adultos, como en el caso de la enfermedad de Crohn (Hirota *et al.*, 2011). A su vez, una alteración en la expresión de NLRP3 resulta en una interrupción en la homeostasis inmunitaria asociada a enfermedades auto-inflamatorias en humanos (Anderson *et al.*, 2008). Debido a que el nivel de expresión de NLRP3 es bajo en las células inmunitarias, la inducción de la expresión de NLRP3 es un primer paso para la activación apropiada del NLRP3 con el fin de responder al estímulo producido por los PAMP (Bauernfeind *et al.*, 2009; Bauernfeind *et al.*, 2010; Meylan *et al.*, 2006; Martinon *et al.*, 2009).

Obesidad y síndrome de resistencia insulínica

La obesidad es una enfermedad crónica compleja y de origen multifactorial, caracterizada por el aumento excesivo de masa corporal y, particularmente, de masa grasa. La obesidad representa una de las patologías más importantes para la salud pública, siendo el exceso de peso corporal el sexto riesgo más importante que contribuye al desarrollo de enfermedad en el mundo (WHO/FAO, 2002; Haslam & James, 2005). Actualmente se considera que la causa principal de la obesidad es la interacción ambiental en individuos con haplotipos de genes susceptibles o candidatos de obesidad (Bell *et al.*, 2005).

La prevalencia de obesidad está aumentando rápidamente en la mayor parte de los países, alcanzando proporciones de pandemia. Actualmente, existen en todo el mundo más de 1.100 millones de adultos con sobrepeso de los cuales 312 millones son obesos (Hossain *et al.*, 2007). Además, al menos 155 millones de niños tienen sobrepeso o son obesos según la *International Obesity Task Force* (IOFT) de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Esta última ha revisado la definición de obesidad para ajustar las diferencias étnicas y considera que la prevalencia de sobrepeso y obesidad alcanza la cifra de 1.700 millones de sujetos en el mundo (WHO/FAO, 2002). Durante los últimos 20 años, las proporciones de obesidad no sólo han aumentado en los países desarrollados sino que se han triplicado en los países en vías de desarrollo que han adoptado un estilo de vida occidental, caracterizado por una menor actividad física y consumo excesivo de alimentos energéticamente densos y baratos

(Haslam & James 2005; Hossain *et al.*, 2007). Se ha estimado que en 2002 la prevalencia de sujetos mayores de 15 años con índice de masa corporal (IMC) superior a 30 kg/m² era del 5,7% para los hombres y de 9,4% para las mujeres y aumentará hasta el 8,0% y 12,3% en el año 2010, respectivamente (Yach *et al.*; 2006). Asimismo, en 2025 la OMS estima que el número de obesos alcanzará la cifra de 600 millones.

En particular, la prevalencia de la obesidad infantil está creciendo de forma alarmante en los países desarrollados, alcanzando también a los países en vías de desarrollo. En la mayoría de los países, la obesidad infantil ha aumentado en la última década como consecuencia de un entorno caracterizado por la fácil disponibilidad de alimentos baratos ricos en calorías combinado con un estilo de vida cada vez más sedentario. Recientemente, se ha revisado la tendencia mundial de la obesidad infantil, en poblaciones en edad escolar de 25 países y en edad preescolar de 42 países, observándose que la prevalencia de sobrepeso infantil ha aumentado más dramáticamente en países económicamente desarrollados y en poblaciones urbanizadas (Wang & Lobstein, 2006). En Europa, la prevalencia de sobrepeso alcanza desde el 12% en la República Checa y Holanda, hasta el 36% en Italia (Lobstein & Frelut, 2006).

En la población infantil y juvenil española (2-24 años), de acuerdo con los resultados del estudio enKid, la prevalencia de obesidad se estima en un 13,9% y la de sobrepeso en un 12,4%. La obesidad es significativamente más prevalente en varones (15,6%) que en mujeres (12,0%). En el grupo de varones, las tasas más elevadas se observaron entre los 6 y los 13 años. En las chicas, las tasas de prevalencia más elevadas se observaron entre los 6 y los 9 años (Serra-Majem *et al.*, 2003).

La prevalencia creciente de la diabetes tipo 2, de las enfermedades cardiovasculares (ECV) y de algunos tipos de cáncer está estrechamente ligada a la obesidad. Así, alrededor del 90% de la diabetes tipo 2 es atribuible al exceso de peso y se estima que aproximadamente 197 millones de personas en el mundo tienen intolerancia a la glucosa y síndrome metabólico (SM), esperándose que esta cifra aumente hasta 420 millones en el año 2025 (Wang & Lobstein, 2006). En consecuencia la diabetes está emergiendo rápidamente como un problema de salud pública mundial que alcanzará proporciones de pandemia en tan solo unos años. Por otra parte, se estima que el sobrepeso y la obesidad contribuyen al aumento de hipertensión: 1000 millones

de personas tenían hipertensión en el año 2000 y se espera que esta cifra aumente hasta 1560 millones en el año 2025 (Kearney *et al.*, 2005).

La obesidad está asociada al SM o síndrome de resistencia a la insulina (SRI), caracterizado por hiperinsulinemia y resistencia periférica a la acción insulínica, intolerancia a la glucosa o diabetes tipo 2, hipertrigliceridemia, disminución de HDLc y otras alteraciones asociadas a riesgo de ECV como la hipertensión arterial (Alberti & Zimmet, 1998; Weiss *et al.*, 2003; Gil-Campos M *et al.*, 2004; Reaven, 2005; Cañete *et al.*, 2007). Se ha descrito que la prevalencia de SM en jóvenes obesos es muy elevada, oscilando del 39 al 49,7% según las edades, y que el incremento en el IMC se asocia con un incremento en el riesgo de SM (Gil-Campos M *et al.*, 2004). Asimismo, nuestro grupo de investigación ha descrito que niños españoles obesos en edad prepuberal (6-10 años) tienen una elevada resistencia insulínica; además el 53% de los niños obesos que son remitidos a la consulta de endocrinología pediátrica desde las consultas de medicina primaria presentan características de SM (Weiss *et al.*, 2003)). En esta población existen ya biomarcadores que se relacionan con el riesgo de padecer ECV (Gil-Campos M *et al.*, 2004; Del Valle *et al.*, 2002).

La rata Zucker como modelo de obesidad y síndrome de resistencia insulínica

La obesidad y el síndrome de resistencia a la insulina se incluyen dentro de los problemas más graves de la salud pública actual dado que su incidencia sigue aumentando en todo el mundo. Con el fin de investigar estas enfermedades, se vienen realizando estudios en modelos animales que reproducen sus síntomas y fisiopatología.

En humanos la obesidad puede ser consecuencia de factores genéticos. Estos factores no necesariamente se limitan a un solo gen, sino que pueden ser poligénicos o ambientales. Los modelos genéticos animales de obesidad se pueden clasificar según presenten uno o varios genes modificados. Dentro de los modelos monogénicos se incluye la rata Zucker, que tiene alterado el gen del receptor de la leptina. Otro modelo es el de la rata *Otsuka Long Evans Tokushima Fatty* (OLETF); es una rata KO para el receptor CCK-1, relacionado con la saciedad. Su fenotipo es más leve que el de la Zucker.

La mutación del receptor de la leptina (*Lep^{fa}*) (Hufnagel *et al.*, 1999), se descubrió en 1961 en un *stock* de ratas de Lois y Theodore Zucker, y la línea se estableció como modelo genético de obesidad en 1991 (White *et al.*, 1997). Dicho modelo es uno de los mejores caracterizados y muestra además de obesidad los síntomas metabólicos típicos del obeso humano, caracterizados por la resistencia insulínica y la hiperlipidemia que conducen a la aparición de diabetes tipo 2 (Kasiske *et al.*, 1992).

Los animales homocigotos para el gen receptor de la leptina pueden presentar varios tipos de mutaciones como A409E, W664R, H684P y R612H, lo que ocasiona una funcionalidad disminuida del receptor de la leptina. Es necesario señalar que en la mayor parte de los obesos humanos se da también una resistencia funcional a la leptina aunque su origen es usualmente diferente al de las ratas Zucker (Wasim *et al.*, 2016).

Las características metabólicas de este modelo asociadas a la obesidad son hiperglucemia variable, intolerancia a la glucosa, hiperinsulinemia, resistencia periférica a la insulina (incluyendo hígado, músculo esquelético, corazón y tejido adiposo), hiperlipidemia, hipercorticosteronemia y estrés oxidativo. Además, las ratas presentan hiperfagia, hiperplasia de los adipocitos, aumento de la eficiencia energética y gasto energético disminuido.

Por lo que se refiere a las alteraciones cardiovasculares, las ratas Zucker son hipertensas y presentan hipertrofia cardiaca y reactividad vascular anormal. En cuanto a las alteraciones musculares existe una disminución de la translocación del transportador GLUT4, una densidad de la microvasculatura reducida y fatiga muscular prematura. Además, los animales presentan esteatosis hepática, glucolisis aumentado, alteración de la síntesis de glucógeno, así como excreción renal aumentada de albúmina y de otras proteínas plasmáticas, reabsorción tubular aumentada de sodio, hipertrofia adrenal y glomeruloesclerosis focal (Diom *et al.*, 2017). Finalmente, las ratas Zucker muestran neuropatía periférica con alteración de la regulación del apetito mediado por neuropéptido Y y actividad simpática y parasimpática alterada (Navar *et al.*, 2006).

Todas estas alteraciones son compatibles con las que ocurren en los humanos obesos con SRI.

Otros modelos animales de obesidad muy usados no son genéticos, sino por exposición a un ambiente obesogénico, como el modelo de la dieta con alto contenido en grasa pudiendo presentar fenotipo obeso (DIO) o no (DR) (Lutz *et al.*, 2012).

Estudios con probióticos en ratas Zucker

Estudios recientes utilizando *Lactobacillus plantarum* CECT 7315/7316 en ratas Zucker han obtenido la misma conclusión. Tras la inducción de inflamación mediante LPS se observó una disminución de IL-1 β , IL-6, proteína-C reactiva (CRP) y MPO, y un aumento de citoquinas anti-inflamatorias IL-10. Además disminuyó la expresión de genes de diferentes componentes del inflamasoma, incluyendo Myd88, TNF- α , Traf6, Nod2 y NLRP3 (Vilahur *et al.*, 2015).

Hamad *et al.*, (2009) demostraron que *Lactobacillus gasseri* SBT2055 reduce el tamaño de los adipocitos y el nivel de leptina en ratas Zucker-lean^{+/*fa*}, pero no en ratas Zucker-Lepr^{*fa/fa*}.

El ácido ferúlico, que puede ser producido por *Lactocobillus fermentum* NCIMB 5221, es un compuesto que posee propiedades antioxidantes, reducción del colesterol, y propiedades anti-tumorigénicas. El tratamiento de *L. fermentum* NCIMB 5221 a ratas Zucker redujo la hiperinsulinemia, la resistencia a insulina, la hipertrigliceridemia y la hipercolesterolemia (Tomaro-Duchesneau *et al.*, 2014).

Microbiota intestinal, obesidad y resistencia insulínica

Evidencias recientes indican que la microbiota intestinal es un determinante fundamental del peso corporal y de la cantidad de masa grasa, y ello sugiere que desempeña un papel fundamental en el desarrollo del SRI y de la diabetes tipo 2 (Backhed *et al.*, 2005; Turbaugh *et al.*, 2006; Ley *et al.*, 2006).

La nueva hipótesis sobre la implicación de la microbiota en el desarrollo de la obesidad propone que ésta es responsable del incremento de la energía corporal almacenada mediante dos mecanismos (Backhed *et al.*, 2004; Backhed *et al.*, 2005; Backhed *et al.*, 2007). El primero de ellos estima que la microbiota incrementa la

disponibilidad energética al transformar la energía no digerible de la fibra en nutrientes absorbibles, y el segundo que la microbiota regula la expresión de genes intestinales, reduciendo específicamente la expresión del factor de los adipocitos inducido por ayuno (FIAF), una proteína que inhibe la actividad de la lipoproteína lipasa. Esta inhibición favorece la liberación de los ácidos grasos libres (FFA) de las lipoproteínas plasmáticas, haciéndolos más disponibles para el hígado y otros tejidos que los almacenarían más eficientemente (Kersten *et al.*, 2000). Igualmente, un cambio de la microbiota intestinal favorecería la producción de ácidos grasos de cadena corta los cuales son activadores de la síntesis de triglicéridos.

Estos dos mecanismos pueden explicar por qué los ratones axénicos (o libres de gérmenes) son más delgados que los ratones normales. Por el contrario, la colonización de los ratones axénicos con microbiota convencional aumenta su peso corporal (Backhed *et al.*, 2004). Este aumento está asociado a un descenso en la expresión del factor FIAF y la modulación de otros genes que están implicados en el metabolismo de la glucosa y de los lípidos (Backhed *et al.*, 2007).

La composición de la microbiota también cambia en las enfermedades metabólicas (Turnbaugh *et al.*, 2006; Ley *et al.*, 2006; Turnbaugh *et al.*, 2007; Cani *et al.*, 2007a; Cani *et al.*, 2007b; Cani *et al.*, 2008a; Cani *et al.*, 2008b). Así, los ratones con déficit de leptina *ob/ob* se caracterizan por una reducción del número de *Bacteroidetes* y un aumento del número de *Firmicutes*, comparado con los ratones "salvajes" delgados; esto no parece deberse a un cambio en la calidad del alimento sino a la mayor cantidad de alimento ingerido (Ley *et al.*, 2005). Sin embargo, con independencia de la cantidad, la calidad es un factor importante en la regulación de los perfiles metagenómicos intestinales. Asimismo, recientemente se ha descrito que la alimentación con una dieta rica en grasa cambia dichos perfiles de manera muy profunda de manera que se produce una reducción del número total de bacterias y particularmente de las bacterias Gram⁺ y un aumento proporcional de las bacterias Gram⁻. (Cani *et al.*, 2007a; Cani *et al.*, 2007b; Cani *et al.*, 2008a; Cani *et al.*, 2008b).

Por otra parte, también se han descrito cambios en la microbiota intestinal de los humanos. Así, los sujetos obesos adultos presentan una relación alterada de la proporción *Firmicutes-Bacteroidetes* (Ley *et al.*, 2005; Turnbaugh *et al.*, 2006; Ley *et al.*, 2006), que se normaliza al cabo de varias semanas cuando se produce una pérdida

de peso significativa (Ley *et al.*, 2006). Todo ello indica que la microbiota intestinal puede ser adaptada mediante terapia nutricional, lo que significa que los perfiles metagenómicos pueden ser reversibles (Serino *et al.*, 2009).

Una elevación de la proporción LDL/HDL define la dislipidemia típica del SRI y de la diabetes de tipo 2. El lipopolisacárido (LPS), componente principal de la pared de las bacterias Gram⁻ y una de las más poderosas sustancias pro-inflamatorias, es también un componente de las partículas de lipoproteínas (Vreugdenhil *et al.*, 2003; Ghoshal *et al.*, 2009). El LPS se asocia con la dislipidemia y este factor es un desencadenante en el desarrollo de enfermedad metabólica inducida por la dieta rica en grasa (Cani *et al.*, 2007a).

La elevación exagerada del LPS desencadena una respuesta atípica Th2 mediada por células "*natural killer* no clásicas" (NKT) que producen una elevada cantidad de IL-13 y generan un potencial citotóxico exacerbado en las células de la pared intestinal. Este no es el caso de la dislipidemia asociada al SRI o la diabetes de tipo 2, pero la alteración del sistema inmunitario innato puede conducir en estas situaciones a la hipersensibilidad de macrófagos y linfocitos dando lugar a una respuesta pro-inflamatoria sistémica debido a la sobreproducción de citoquinas. De hecho, se acepta actualmente que la resistencia a la insulina se asocia a un estado inflamatorio (Hotamisligil, 2006).

Datos recientes han mostrado que la expresión diferencial de genes a lo largo del eje intestinal determinada mediante *microarrays* en ratones C57BL/6J alimentados con una dieta diabetógena rica en grasa, después de 2, 4 y 8 semanas de intervención ocurre sobre todo en la sección del intestino medio (de Wit *et al.*, 2008). Los genes afectados están relacionados con el ciclo celular, el metabolismo lipídico y la inflamación, y los cambios producidos dan lugar a cambios sistémicos debido a la producción de moléculas de señalización que actúan sobre órganos periféricos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Probióticos

Se utilizaron las cepas probióticas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 descritas anteriormente por nuestro grupo (Muñoz-Quezada *et al.*, 2013). Estas cepas están depositadas en la *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes* (CNCM) del Instituto Pasteur (París, Francia).

Declaración de principios éticos

El estudio se llevó a cabo de acuerdo a las recomendaciones de las guías para la investigación animal de la Universidad de Granada (España). Todos los animales recibieron cuidado humano. El diseño experimental fue aprobado por el Comité de Ética de Experimentación Animal de la Universidad de Granada (Permiso número: 2011-377).

Diseño experimental

Cuarenta y ocho ratas macho obesas Zucker-Lepr^{fa/fa} y 16 ratas Zucker-lean^{+/fa} que pesaban entre 168 y 180 g fueron compradas a los Laboratorios Charles River (Barcelona, España). Las ratas fueron alojadas en jaulas metabólicas con un ciclo de luz/oscuridad de 12 h y acceso libre a agua y comida. Tras 5 días de adaptación, 8 ratas Zucker-lean^{+/fa} y 8 ratas Zucker-Lepr^{fa/fa} fueron sacrificadas como referencia (grupos iniciales). Las restantes 40 ratas obesas Zucker-Lepr^{fa/fa} fueron divididas aleatoriamente para recibir un placebo, 10¹⁰ UFC de una de las tres cepas probióticas o una mezcla de *L. paracasei* CNCM I-4034 y *B. breve* CNCM I-4035 por vía oral durante 30 días. Un grupo adicional de 8 ratas Zucker-lean^{+/fa} recibieron placebo durante 30 días. El placebo contenía 67% de leche de vaca en polvo, 32,5% de sacarosa y 0,56% de vitamina C.

Tras la intervención los animales fueron anestesiados y sedados con una mezcla de ketamina y xilazina. La sangre fue extraída directamente de la aorta y se centrifugó durante 10 minutos a 1000 × g y 4 °C para separar el suero de las células. Las muestras de íleon, se congelaron en nitrógeno líquido y se mantuvieron a -80 °C, o bien se fijaron con paraformaldehído al 4% para su posterior análisis.

Concentración de proteína de unión a lipopolisacárido (LBP) en suero

La concentración de proteína de unión a lipopolisacárido (LBP proteína serica producida por los hepatocitos encargada de la unión a LPS bacteriano y CD14 para la producción de una respuesta inmunitaria (Kim et al., 2017)), en suero se midió con un kit de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas de Cloud-Clone Corp. (Houston, Texas, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Microarray de DNA

Los datos obtenidos del microarray de un subgrupo de muestras de la mucosa intestinal de las ratas Zucker tratadas con las diferentes cepas cumplen con los requisitos *MIAME* (mínima información sobre un experimento de microarray) y se almacenaron en la base de datos *Gene Expression Omnibus* (GEO) con el título datos de *Expresión de mucosa intestinal de ratas Zucker* con la referencia GSE73848 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE73848>).

El análisis de expresión génica se realizó utilizando la tecnología *GeneChip*® de *Affymetrix*®. Tanto el procesamiento de las muestras como la hibridación, revelado, escaneado de los chips y análisis de los resultados se llevó a cabo siguiendo los protocolos y equipos oficialmente recomendados por *Affymetrix Inc.* (Santa Clara, California, EE. UU.). De manera breve, a partir del RNA total que obtuvimos se sintetizó cDNA con el que, después de fragmentar, se preparó la mezcla de hibridación con la que se hibridaron los chips correspondientes. El protocolo utilizado fue el recomendado por *Affymetrix*, utilizando el *Ambion*® *WT Expression Kit* (Thermo Fisher, Carlsbad, California, EE. UU.), y el *GeneChip*® *WT Terminal Labeling kit* (Affymetrix, Santa Clara, California, EE. UU.). Para el estudio se empleó el *GeneTitan*™ de *Affymetrix*, que permite hibridar, revelar, lavar y escanear los arrays en placas de 96, 24 ó 16 arrays cada una. El software utilizado para el procesamiento de los chips y de los resultados fue el *Command Console* (AGCC 3.1, Affymetrix®) y el *Expression Console* (EE 1.1, Affymetrix®). Para el análisis bioinformático se utilizaron los programas *Partek Genomics Suite* y *dChip* (www.dchip.org) (Li y Wong 2001).

Muestras

Las muestras de mucosa intestinal seleccionadas fueron 4 muestras de cada uno de los 8 grupos y con ellas se realizaron los experimentos de análisis de la expresión génica (Tabla 1).

Tabla 1. Muestras correspondientes para análisis de la expresión génica a partir de las muestras de tejido de mucosa intestinal de rata.

Condición	Código cliente	Código Progenika	Fecha de Recepción
ref. delgada	C01	11SE560	30/09/2011
ref. delgada	C02	11SE561	30/09/2011
ref. delgada	C03	11SE562	30/09/2011
ref. delgada	C04	11SE563	30/09/2011
ref. obesa	Z01	11SE564	30/09/2011
ref. obesa	Z02	11SE565	30/09/2011
ref. obesa	Z03	11SE566	30/09/2011
ref. obesa	Z04	11SE567	30/09/2011
control delgado	C11	11SE568	30/09/2011
control delgado	C13	11SE569	30/09/2011
control delgado	C15	11SE570	30/09/2011
control delgado	C16	11SE571	30/09/2011
control obeso	Z11	11SE572	30/09/2011
control obeso	Z13	11SE573	30/09/2011
control obeso	Z15	11SE574	30/09/2011
control obeso	Z16	11SE575	30/09/2011
grupo Mezcla cepas probióticas	Z21	11SE576	30/09/2011
grupo Mezcla cepas probióticas	Z23	11SE577	30/09/2011
grupo Mezcla cepas probióticas	Z25	11SE578	30/09/2011
grupo Mezcla cepas probióticas	Z26	11SE579	30/09/2011
grupo <i>B. breve</i> CNCM I-4035	Z31	11SE580	30/09/2011
grupo <i>B. breve</i> CNCM I-4035	Z33	11SE581	30/09/2011
grupo <i>B. breve</i> CNCM I-4035	Z35	11SE582	30/09/2011
grupo <i>B. breve</i> CNCM I-4035	Z36	11SE583	30/09/2011
grupo <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034	Z41	11SE584	30/09/2011
grupo <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034	Z43	11SE585	30/09/2011
grupo <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034	Z45	11SE586	30/09/2011
grupo <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034	Z46	11SE587	30/09/2011
grupo <i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036	Z51	11SE588	30/09/2011
grupo <i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036	Z57	11SE589	30/09/2011
grupo <i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036	Z55	11SE590	30/09/2011
grupo <i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036	Z56	11SE591	30/09/2011

ref delgada y ref. obesa, son los grupos de ratas que se sacrificaron al terminar el período de adaptación. Control delgado y obeso recibieron placebo.

Procesamiento de las muestras de mucosa intestinal

Cada muestra de tejido se pulverizó en mortero en presencia de nitrógeno líquido. Se extrajo el RNA total utilizando *RNeasy Mini kit* de *Qiagen* (Qiagen, Barcelona, España) y de forma automatizada en *QIacube* (Qiagen). La cantidad y calidad de cada de las muestras de RNA extraídas se estimó mediante medida espectrofotométrica en *Nanodrop* (tabla 2) y además se chequeó una alícuota en *Bioanalyzer* (Figura 7) (NanoDrop Technologies, Winooski, Vermont, EE. UU., y Agilent Genomics, Santa Clara, California, EE. UU.).

Tabla 2. Medida de la concentración y pureza del RNA

muestra	Datos Nanodrop			Datos Bioanalyzer	
	ng/ μ l	A260/280	μ g totales	rRNA Ratio [28s / 18s]	RIN
11SE560	613.77	2.14	30.7	2.9	9.6
11SE561	641.5	2.14	32.1	2.9	9.8
11SE562	327.41	2.12	16.4	2.1	9.5
11SE563	483.22	2.13	24.2	2.0	8.7
11SE564	308.59	2.11	15.4	2.3	8.9
11SE565	220.18	2.11	11.0	1.9	7.8
11SE566	627.53	2.14	31.4	2.4	9.3
11SE567	571.27	2.11	28.6	2.8	9.6
11SE568	600.73	2.15	30.0	2.6	9.8
11SE569	264.58	2.1	13.2	2.3	9.7
11SE570	179.78	2.09	9.0	2.7	9.4
11SE571	103.32	2.09	5.2	2.3	9.4
11SE572	734.6	2.13	36.7	2.3	9.7
11SE573	377.85	2.09	18.9	1.5	9.5
11SE574	462.3	2.06	23.1	1.4	9.1
11SE575	212.53	2.11	10.6	2.0	9.1
11SE576	559.07	2.1	28.0	2.5	9.6
11SE577	414.15	2.08	20.7	2.1	8.9
11SE578	430.84	2.07	21.5	2.0	9.5
11SE579	220.12	2.08	11.0	2.2	9.2
11SE580	154.26	2.11	7.7	2.4	8.7
11SE581	399.36	2.07	20.0	1.8	9.3
11SE582	522.45	2.13	26.1	2.7	10
11SE583	618.66	2.12	30.9	1.9	9.2
11SE584	633.81	2.11	31.7	2.6	9.8
11SE585	148.74	2.12	7.4	2.1	9.2
11SE586	572.73	2.13	28.6	2.3	9.4
11SE587	443.4	2.03	22.2	2.1	9.4
11SE588	177.48	2.07	8.9	2.1	9.3
11SE589	231.02	2.11	11.6	2.1	9.5
11SE590	81.03	2.07	4.1	2.2	9.2
11SE591	178.11	2.14	8.9	1.8	7.4

La figura 7 muestra las medidas de cantidad y calidad de cada RNA extraído y comprobado mediante *Bioanalyzer*.

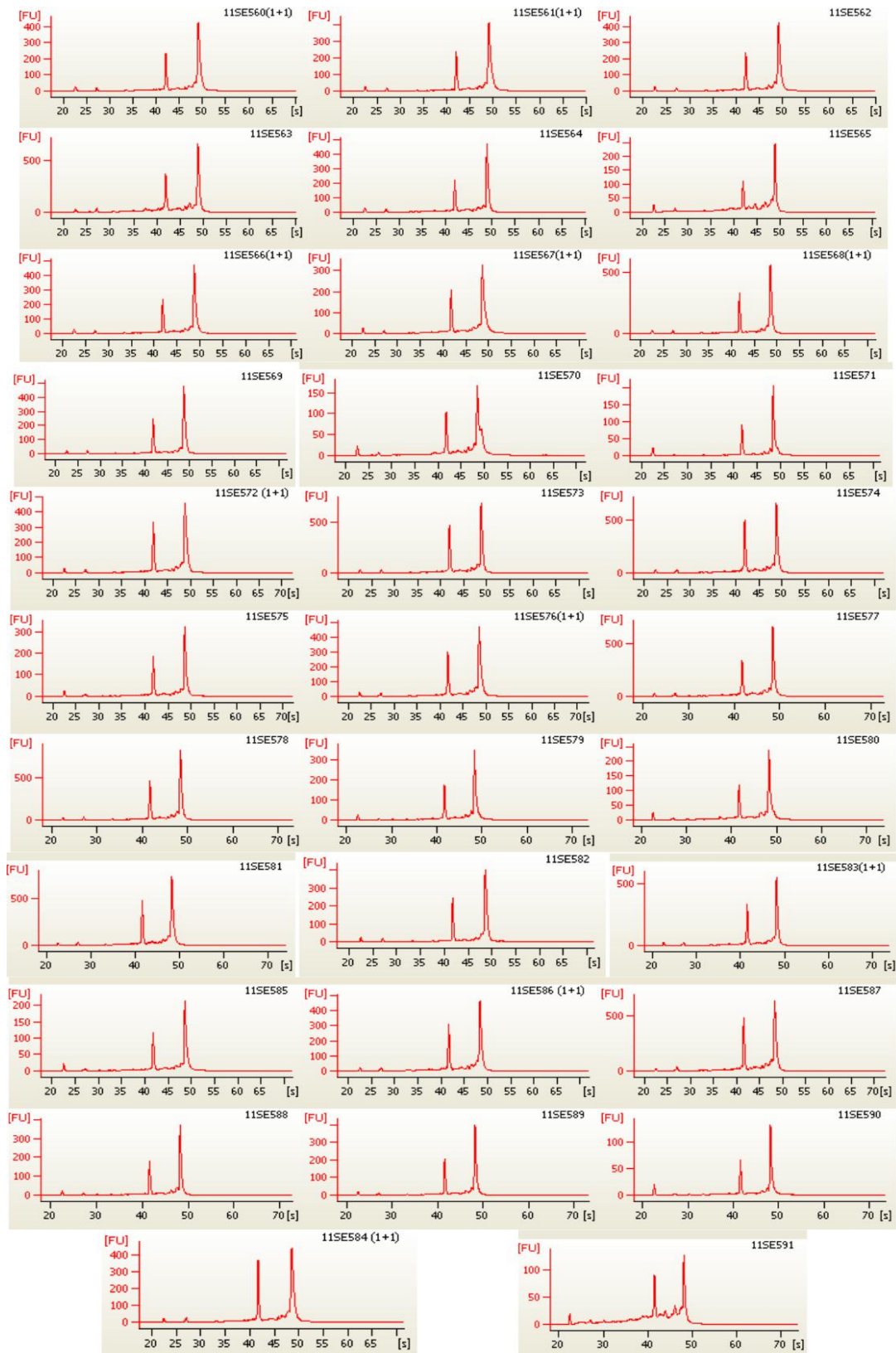


Figura 7. Comprobación en *Bioanalyzer* de los RNAs.

Síntesis de cDNA, fragmentación y marcaje

A partir de 300 ng de RNA total se sintetizó cDNA con *Ambion WT Expression kit*, siguiendo las indicaciones del proveedor. Los principales pasos del protocolo fueron: síntesis de cDNA con oligonucleótidos al azar que incluyeron el promotor de T7; transcripción *in vitro*; nueva síntesis de cDNA a partir del cRNA resultante del paso anterior incluyendo dUTP. El cDNA obtenido fue fragmentado utilizando UDG (Uracil DNA Glycosylase) y APE1 (Apurinic/aprimidinic endonuclease 1). El cDNA fragmentado se marcó con transferasa terminal utilizando el *WT Terminal Labeling kit*.

Tabla 3. Medida de la concentración y pureza de los cDNAs

Muestra	Concentración	Pureza	µg	Muestra	Concentración	Pureza	µg
11SE560	325.42	1.97	9.8	11SE576	324.2	1.97	9.7
11SE561	326.06	1.97	9.8	11SE577	318.9	1.99	9.6
11SE562	309.77	1.96	9.3	11SE578	322.18	1.97	9.7
11SE563	313.35	1.98	9.4	11SE579	288.28	1.96	8.6
11SE564	318.93	1.97	9.6	11SE580	314.86	1.98	9.4
11SE565	301.8	1.97	9.1	11SE581	312.48	1.98	9.4
11SE566	310.26	1.99	9.3	11SE582	319.05	1.96	9.6
11SE567	312.47	1.97	9.4	11SE583	277.31	1.97	8.3
11SE568	321.95	1.97	9.7	11SE584	322.63	1.98	9.7
11SE569	318.68	1.98	9.6	11SE585	346.09	1.98	10.4
11SE570	322.06	1.97	9.7	11SE586	308.65	1.97	9.3
11SE571	313.51	1.96	9.4	11SE587	314.26	1.97	9.4
11SE572	317.23	1.98	9.5	11SE588	227.54	1.95	6.8
11SE573	314.88	1.98	9.4	11SE589	289.11	1.99	8.7
11SE574	305.53	1.96	9.2	11SE590	279.85	1.99	8.4
11SE575	317.92	1.96	9.5	11SE591	307.99	1.99	9.2

Se fragmentaron 5,5µg de cDNA de cada una de las muestras y se marcó con biotina utilizando transferasa terminal. La correcta fragmentación de los cDNAs fue comprobada mediante chequeo de una alícuota en *Bioanalyzer*.

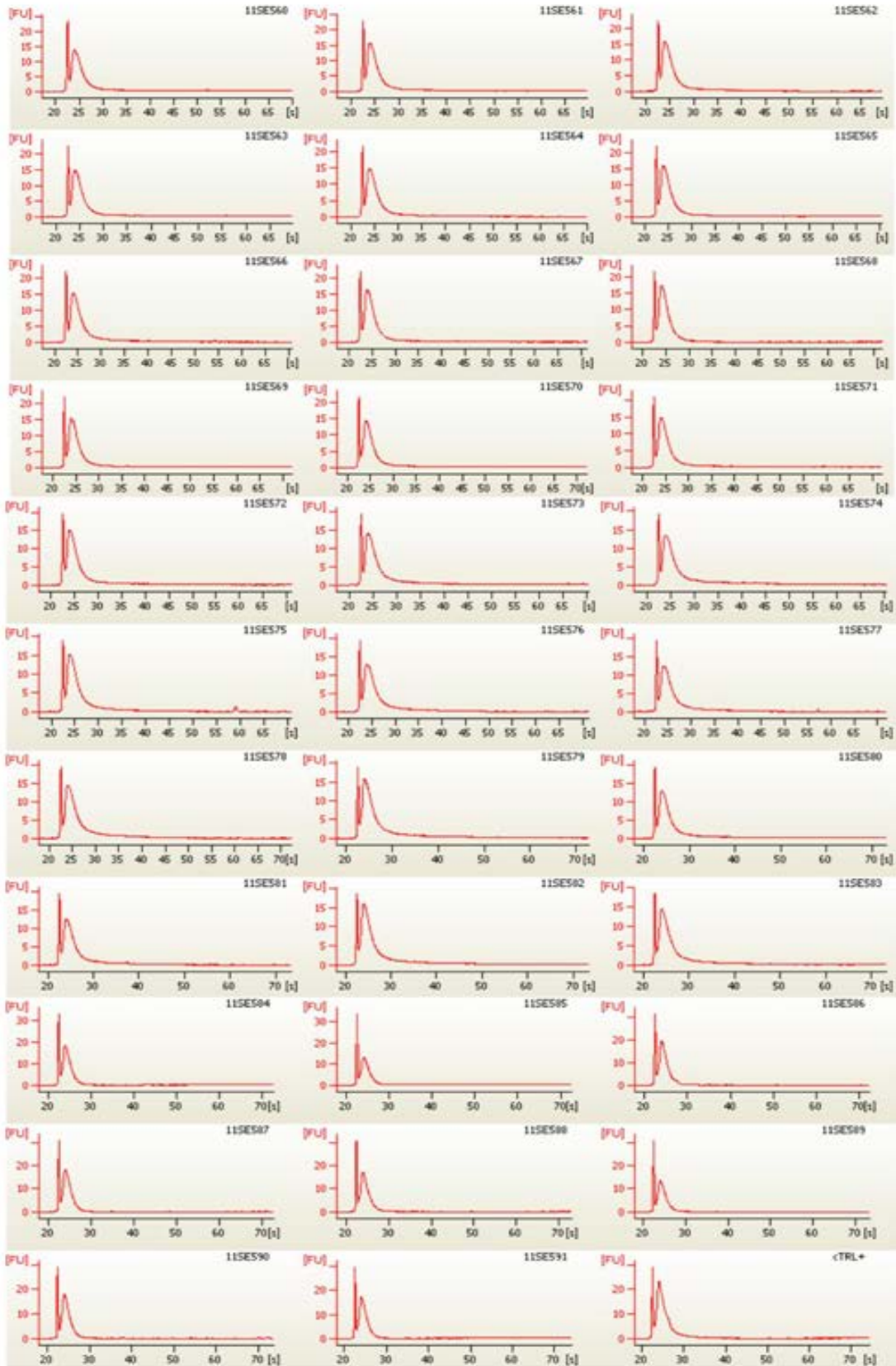


Figura 8. Comprobación en *Bioanalyzer* de los cDNAs fragmentados

Hibridación y escaneado del *GeneChip Rat Gene 1.1 ST array*. Análisis de los controles

Los principales controles de calidad a inspeccionar fueron de tres tipos: controles de la hibridación, controles del marcaje y controles de la muestra.

Los controles de hibridación (*spike controls*) son sondas control para secuencias que se incluyen en la mezcla de hibridación. La presencia de estos controles indica que los procesos de hibridación, lavados, revelado y escaneado han resultado correctos. Los *spike controls* utilizados fueron BioB, BioC, BioD y Cre. Cada uno de los oligos se incluyeron en la mezcla en concentraciones crecientes de forma que $\text{BioB} < \text{BioC} < \text{BioD} < \text{Cre}$. Por lo tanto, la intensidad de cada una de las sondas debe ser proporcional a la cantidad de oligo presente en la mezcla. La forma de comprobar que el proceso de hibridación (desde la preparación de la mezcla de hibridación hasta el escaneado) era correcto fue representar los valores de intensidad de cada una de estas sondas en todas las muestras y comprobar que los valores eran crecientes, proporcionales a la concentración. En esta representación se esperaba observar, en cada muestra, un aumento de la intensidad de cada *spike* en función de la concentración. El valor absoluto no era tan importante como la tendencia general, es decir, que no se cruzasen las líneas. En el experimento los valores de intensidad y la relación entre ellos se encontraron dentro de lo esperado (Figura 9).

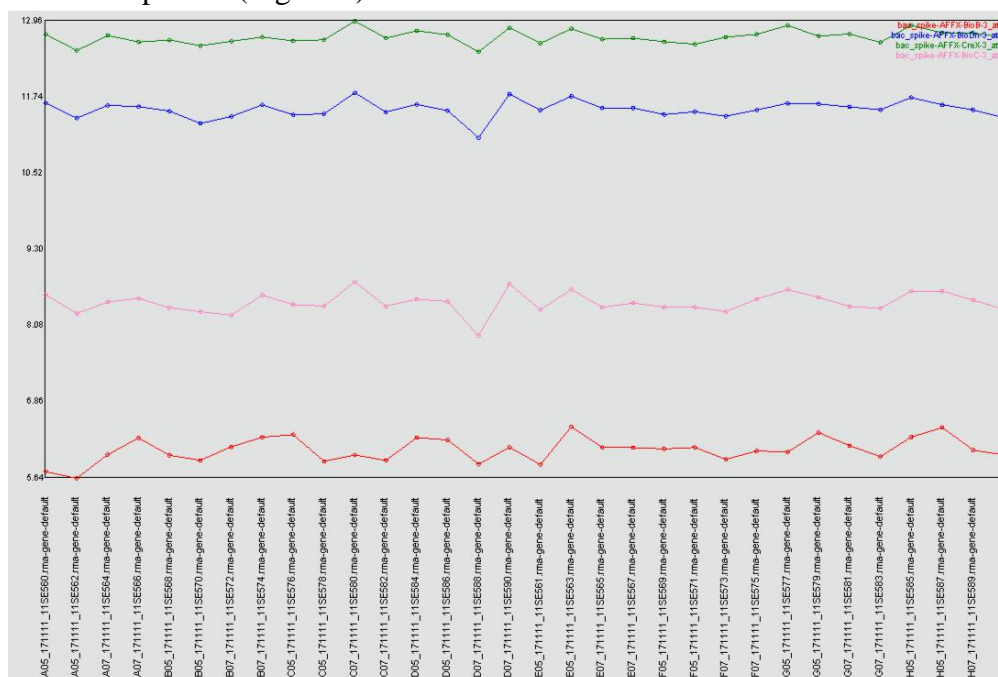


Figura 9. Valores de intensidad normalizados para los *spike controls* en cada una de las muestras analizadas

Los controles de marcaje analizados fueron los *polyA controls*. Los *PolyA controls* son transcritos de *Bacillus subtilis* añadidos, en concentraciones crecientes, al RNA de la muestra durante el procesamiento. La observación de los valores de intensidad de cada *PolyA control* en cada muestra permite comprobar si los procesos de síntesis de cDNA-cRNA han transcurrido correctamente. Como en el caso de los *spike controls*, la forma de comprobar que el procesamiento de las muestras fue correcto, era representar los valores de intensidad de cada una de la sondas en todas las muestras y comprobar que los valores eran crecientes, proporcionales a la concentración. En esta representación se espera observar en cada muestra un aumento de la intensidad de cada *PolyA control* en función de la concentración. El valor absoluto no era tan importante como la tendencia general, es decir, que no se cruzasen las líneas. En este experimento los valores de intensidad y la relación entre ellos se encontraron dentro de lo esperado (Figura 10).

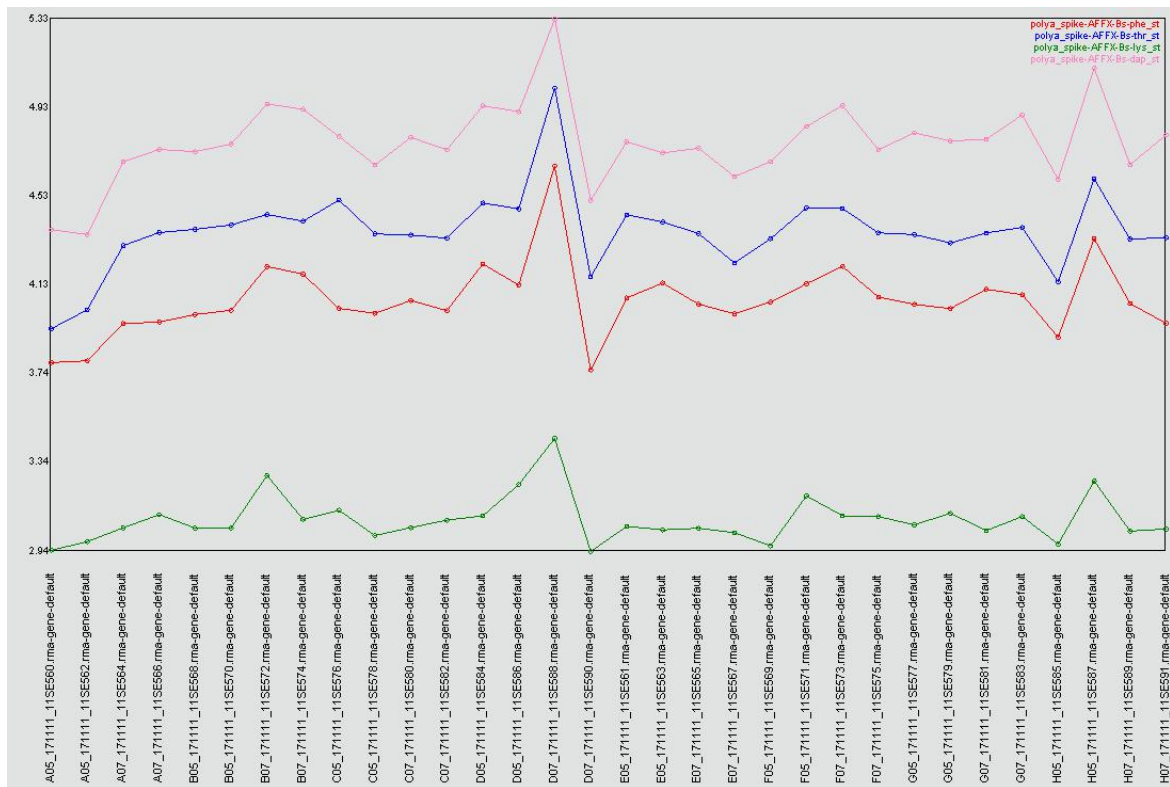


Figura 10. Valores de intensidad normalizados para los *PolyA controls* en cada una de las muestras analizadas

Los parámetros de calidad calificados como controles de muestra permiten identificar muestras *outliers*, es decir, con un comportamiento significativamente diferente al de resto de muestras.

Los parámetros analizados en este estudio fueron:

- *Pos_vs_neg_auc*: representa una medida de la detección de los controles positivos frente a la falsa detección de los controles negativos. Es una medida robusta de la calidad global de los datos. Los valores típicos se encuentran entre 0,8 y 0,9, siendo 1,0 el valor perfecto, mientras que un valor de 0,5 refleja que no hay una diferencia entre los controles positivos y negativos. Valores inferiores a 0,8 inducen a pensar que la muestra podría tratarse de un outlier. Todas las muestras tuvieron un valor aceptable.
- *All Probe set Mean*: representa la media de la señal de todas las probe sets incluidas en el análisis. Este parámetro permite identificar arrays demasiado brillantes o demasiado oscuros. Los valores deberían ser más consistentes para réplicas biológicas que para muestras de diferente tipo. Las diferencias observadas no consideran ninguna de las muestras como *outlier*.
- *All Probe Set RLE Mean*: la señal de cada probe set es comparada con la media de la señal de esa probe set en el estudio. Este parámetro es la media de estas diferencias para todas las probe sets. Generalmente, valores altos indican que las señales en un *array* son muy diferentes a las del resto del estudio. En este tipo de *array*, los valores oscilan entre 0,27 y 0,61 para estudios que incluyen muestras de diferentes tejidos y entre 0,1 y 0,23 para réplicas técnicas. Los valores fueron consistentes.

En la tabla 4 se recogen los valores de cada muestra para cada parámetro de control de calidad mencionado anteriormente.

Tabla 4. Controles de calidad de la muestra

Muestra	pos_vs_neg_auc	all_probeset_mean	all_probeset_rle_mean
11SE560	0.85422	5.541424	0.241511
11SE561	0.878029	5.57988	0.171301
11SE562	0.865219	5.507742	0.248986
11SE563	0.864947	5.589251	0.175722
11SE564	0.864352	5.5837	0.173877
11SE565	0.877761	5.56282	0.161048
11SE566	0.871477	5.586922	0.175144
11SE567	0.877053	5.580364	0.167735
11SE568	0.860977	5.579972	0.140385
11SE569	0.880092	5.582358	0.217311
11SE570	0.882	5.574604	0.148582
11SE571	0.888591	5.56232	0.194358
11SE572	0.876405	5.570266	0.133905
11SE573	0.879322	5.56958	0.12135
11SE574	0.875899	5.572968	0.116654
11SE575	0.863548	5.58026	0.129136
11SE576	0.864426	5.589662	0.15491
11SE577	0.871134	5.576477	0.129484
11SE578	0.88545	5.576419	0.128479
11SE579	0.866908	5.576636	0.127985
11SE580	0.857355	5.586262	0.153071
11SE581	0.867117	5.574453	0.131372
11SE582	0.88222	5.572265	0.130127
11SE583	0.874066	5.581122	0.141788
11SE584	0.880905	5.571299	0.122088
11SE585	0.846603	5.579253	0.170314
11SE586	0.876601	5.576181	0.131724
11SE587	0.872058	5.566449	0.226278
11SE588	0.904137	5.559667	0.184642
11SE589	0.873042	5.570007	0.150338
11SE590	0.842198	5.593665	0.170785
11SE591	0.879472	5.567289	0.125395

En los apartados posteriores, como parte del procesamiento bioinformático, se analizaron otra serie de parámetros de calidad para tratar de identificar posibles *outliers*.

Análisis Bioinformático. Introducción

Los resultados de expresión génica obtenidos a partir de las 32 muestras de RNA fueron analizadas y sus características se detallan en la Tabla 5. El chip utilizado fue el *Rat Gene1.1ST array plate* (Affymetrix Inc., Santa Clara, California, EE. UU.).

El objetivo de este análisis fue obtener secuencias diferencialmente expresadas entre las condiciones estudiadas. Para conseguir estos objetivos, el análisis bioinformático siguió los siguientes pasos:

- a) Control de calidad de los *arrays*.
- b) Pre-procesamiento de los datos por el método RMA.
- c) Normalización global de los *arrays* para la obtención de la lista de trabajo.
- d) Aplicación de herramientas bioinformáticas para obtener diferencias en la expresión génica.
- e) Búsqueda de rutas metabólicas y procesos ontológicos significativamente expresados a partir de las listas de genes significativos obtenidos.

Al aplicar herramientas estadísticas se obtuvieron listas de sondas que presentan diferencias de expresión entre las muestras comparadas (con un valor de significación p , que por defecto es seleccionado como 0,05). Para el cálculo de la tasa de cambio de expresión entre las distintas condiciones, se seleccionaron como condición basal o línea base la condición que se encuentra en segundo lugar en la comparación. Todos estos pasos son descritos con más detalle en los siguientes apartados.

Tabla 5. Descripción de las muestras utilizadas en el análisis

Tipo	Condición	muestras
Referencia	Delgada	11SE560, 11SE561, 11SE562, 11SE563
Referencia	Obesa	11SE564, 11SE565, 11SE566, 11SE567
Control	Delgado	11SE568, 11SE569, 11SE570, 11SE571
Control	Obesa	11SE572, 11SE573, 11SE574, 11SE575
Mezcla cepas probióticas	Obesa	11SE576, 11SE577, 11SE578, 11SE579
<i>B. breve</i> CNCM I-4035	Obesa	11SE580, 11SE581, 11SE582, 11SE583
<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034	Obesa	11SE584, 11SE585, 11SE586, 11SE587
<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036	Obesa	11SE588, 11SE589, 11SE590, 11SE591

Análisis de outliers

La calidad de los arrays se determinó mediante la realización de los siguientes controles:

Array Outlier: indica el porcentaje de transcritos cuyos niveles en un array son inconsistentes con los niveles en el resto de arrays del experimento. El programa de análisis utilizado, *dChip* (Li et al, 2001), recomienda tomar con precaución aquellas muestras que superen el valor de 5%, y eliminar aquellas que superen el 15%. La muestra 11SE562 presentó un valor que indica tomar dicha muestra con precaución por lo que se observó su comportamiento en los sucesivos pasos del análisis.

Tabla 6. Porcentajes del parámetro indicador de calidad de los datos en los *arrays*

Muestra	% Array outlier	Muestra	% Array outlier
11SE560	3.305	11SE576	0.23
11SE561	0.271	11SE577	0.254
11SE562	6.853	11SE578	0.274
11SE563	0.192	11SE579	0.237
11SE564	0.394	11SE580	0.405
11SE565	0.329	11SE581	0.281
11SE566	0.291	11SE582	0.254
11SE567	0.339	11SE583	0.298
11SE568	0.312	11SE584	0.35
11SE569	0.668	11SE585	0.422
11SE570	0.312	11SE586	0.35
11SE571	0.35	11SE587	0.405
11SE572	0.302	11SE588	0.566
11SE573	0.298	11SE589	0.291
11SE574	0.288	11SE590	0.247
11SE575	0.247	11SE591	0.226

Porcentaje de transcripciones cuyos niveles en la matriz son inconsistentes con los niveles en el resto de matrices del experimento.

Relative Log Expression: El programa *Expression Console de Affymetrix* se utilizó para obtener valores *RLE* en los que cada valor de expresión de cada probe set de cada muestra se normaliza respecto de un *array* de referencia. Este *array* de referencia se construye a partir de la mediana de todos los *arrays* para cada probe set. Se asume, que la mayoría de los valores de expresión no cambian con respecto a la mediana por lo que en teoría todos estos valores calculados rondaran en torno a 0. Todas las muestras presentaron correctos valores de *RLE* en Figura 11.

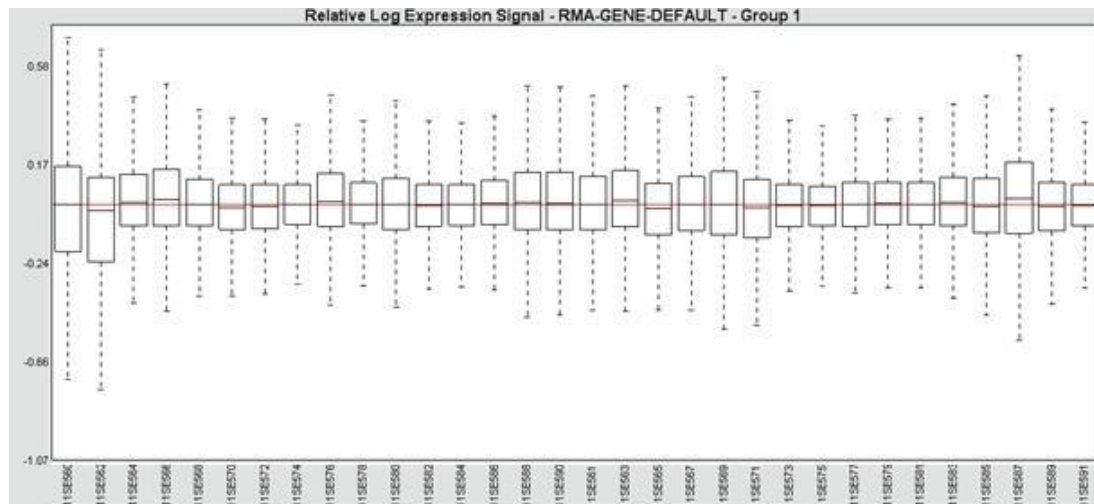


Figura 11. Control de calidad tras ajustar el modelo lineal. Gráfica *RLE* representando en un diagrama de cajas la distribución de los valores de *RLE* en todas las muestras del experimento

Preprocesamiento y normalización de los datos

Para medir la expresión génica de forma precisa y fiable, es importante tener en cuenta la variabilidad experimental (debida a las muestras) y sistemática (debida al procesado) que puede asociarse a un experimento de estas características. El término normalización hace referencia al proceso llevado a cabo para minimizar los efectos de dicha variación sobre el análisis. Así pueden distinguirse más fácilmente las diferencias biológicas, al mismo tiempo que nos permite la comparación de niveles de expresión en el conjunto de los arrays estudiados.

Pre-procesamiento

Los valores de intensidad de cada sonda en el array fueron procesados y normalizados por el método RMA (*Robust Multichip Average*) para obtener un valor de intensidad individual para cada set de sondas. A continuación, todo el conjunto de valores de expresión de cada uno de los exones se promediaron para obtener valores de expresión únicos por gen para obtener un listado de 29214 probe sets, o set de sondas.

Primer filtrado de los datos

Los datos de los *GeneChips* se filtraron para eliminar aquellas secuencias con señal de hibridación cercana al fondo (*background*). El número de secuencias que pasaron dicho filtrado (secuencias seleccionadas) fueron de 10015.

Normalización

En el análisis que nos ocupa se llevó a cabo un paso de normalización, método de normalización por cuantiles (como parte del proceso de normalización por RMA), utilizando el programa de análisis *Partek Genomics Suite* v6.10 (Partek, St. Louis, Missouri, EE. UU.), a los datos de los *arrays* almacenados en los archivos *.cel (ficheros de salida de Affymetrix).

Segundo filtrado de los datos

Por último, esta lista de 10015 secuencias se filtró para eliminar aquellas sondas que no presentasen ningún cambio de expresión en todas las muestras, basándose en la desviación estándar de los datos de intensidad normalizados. El valor utilizado como límite de cambio de expresión entre condiciones permite eliminar secuencias que no varían en la comparación entre cualquier muestra del experimento y por lo tanto no son informativas. Este filtrado dio lugar a un listado de 6990 secuencias que forman la lista de trabajo.

En este experimento, se analizaron los cambios de expresión génica como consecuencia de la interacción del tipo y la condición.

De manera previa a la realización de cualquier prueba estadística, se realizó un análisis que permitió observar en qué medida las diferentes variables afectan a los resultados Figura 12.

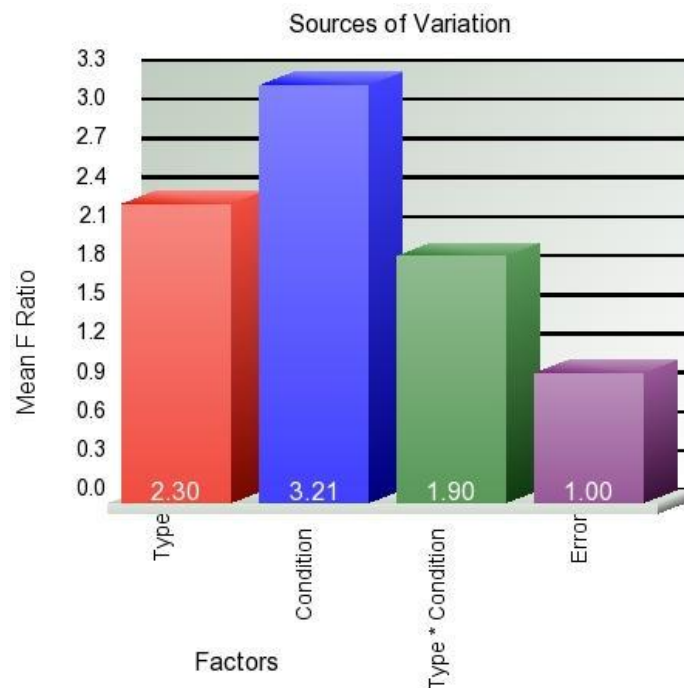


Figura 12. Fuentes de variación causantes de las diferencias entre las muestras en base a la media del estadístico F.

Se pudo observar que las mayores diferencias fueron las debidas al factor condición. Así, es previsible que en las comparaciones de la interacción que se realicen y que impliquen diferentes variables del factor condición (Delgada y Obesa) obtengan un número mayor de genes que aquellas en las que la condición sea la misma en ambos casos. Además se indica en la última columna el error no controlable asociado a este experimento.

Análisis de Componentes Principales y Cluster jerárquico

El Análisis de Componentes Principales (PCA) es una técnica estadística de síntesis de la información, o reducción de la dimensión de los datos (en este caso los valores de expresión de cada sonda). El objetivo principal que persigue el PCA es la representación de las medidas numéricas de las sondas en un espacio de pocas dimensiones donde nuestros sentidos puedan percibir relaciones que de otra manera permanecerían ocultas en dimensiones superiores. Dicha representación debía ser tal que al desechar dimensiones superiores (generalmente de la tercera o cuarta en adelante)

la pérdida de información fuera mínima. Es decir, ante un banco de datos con muchas variables (cada uno de los valores de expresión de cada gen), el objetivo era reducirlas a un menor número perdiendo la menor cantidad de información posible. La elección de los factores o componentes se realizó de tal forma que el primero recogía la mayor proporción posible de la variabilidad original presente en el experimento; el segundo factor debía recoger la máxima variabilidad posible no recogida por el primero, y así sucesivamente. El número de factores o componentes principales que se tomó para la representación gráfica es de 3 y con él se explicó un porcentaje de la varianza existente especificado en el gráfico. La imagen resultante se comparó con los factores experimentales conocidos con el fin de asociar la variabilidad observada (o lo que es lo mismo, diferencias) a alguno de ellos. El software permitió colorear las muestras en función de distintos factores.

Los resultados obtenidos a partir de la lista de trabajo (6990 secuencias) se muestran en la Figura 13.

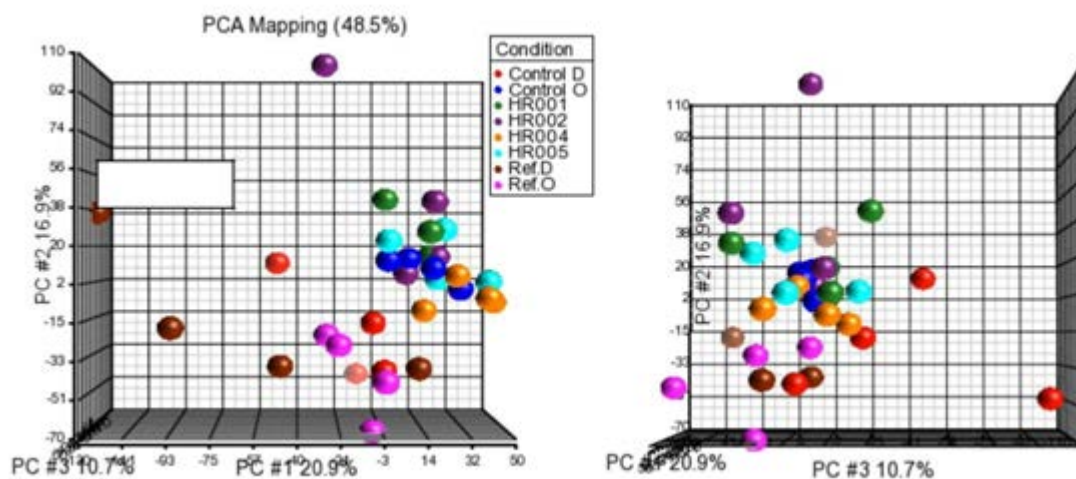


Figura 13. Dos visiones de PCA. Columna izquierda: Primera visión de PCA. Columna derecha: Visión girada 90° a la izquierda sobre el eje vertical (eje z; componente 3) realizadas a partir de la lista de trabajo (6990 secuencias). En las dos imágenes las muestras están coloreadas de acuerdo a la condición y tipo al que pertenecen. Porcentaje de variabilidad: 20.9% (eje 1); 16.9% (eje 2); 10.7% (eje 3)

Este análisis de componentes principales mostró una gran variabilidad que no permitió la clasificación de las muestras de acuerdo a la condición a la que pertenecen. Asimismo, se pudo observar que la muestra 10SE562, clasificada como a tomar con precaución en los controles de calidad, no presentó una clasificación muy divergente con respecto al resto de las muestras.

Un *cluster* o árbol jerárquico es un método estadístico que permite la clasificación de objetos, en este caso perfiles de expresión de genes o muestras, en grupos o clústeres por similitud entre ellos. Para llevar a cabo este procedimiento se calculó la distancia de cada gen o muestra con todos los demás y se agruparon los dos genes que presentaban una correlación más alta. A continuación se calculó la media del perfil de expresión de esos dos y con este gen o muestra “sintético” se repitió el cálculo de la distancia para todos los demás objetos. Este proceso se repitió hasta que todos los genes o muestras fueron agrupados por parejas. Posteriormente, se calcularon los ratios de separación y la medida de similitud que organizaron el árbol formando grupos discretos y ramificaciones, respectivamente.

Los *clusters* jerárquicos del estudio se realizaron utilizando el software *Partek Genomics Suite*, aplicando como medida de similitud la distancia euclídea y como método de agrupación el método de “*Average linkage*”.

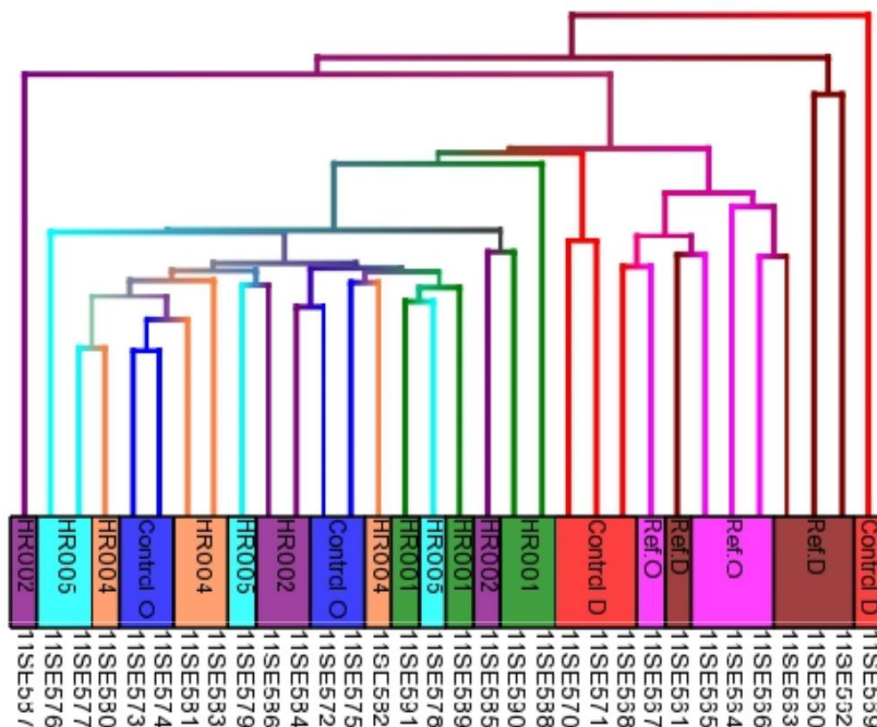


Figura 14. *Cluster* jerárquico de muestras realizado a partir de la lista de trabajo (6990 secuencias). Cada muestra se presenta en un recuadro que hace referencia a la condición y el tipo al que pertenece.

En lo que se refiere al *cluster*, no mostró una separación de las muestras de acuerdo a la condición a la que pertenecen. Al igual que en el PCA, la muestra 10SE562 no tenían un comportamiento diferente. Por lo tanto, se decidió conservar dicha muestra en el experimento.

La elaboración de este *cluster* y PCA no supervisados (los genes no son el resultado de la aplicación de un test estadístico) permiten hacerse una idea aproximada de las diferencias existentes entre cada una de las condiciones, así como de la variabilidad dentro de cada condición. La elevada variabilidad observada permite augurar un bajo número de genes significativos al realizar las comparaciones estadísticas.

Análisis estadístico, PCA y clúster jerárquico

Para la identificación de cambios en expresión estadísticamente significativos entre los grupos de muestras se realizaron diversos modelos de regresión lineal teniendo en cuenta los diversos factores contemplados en el presente análisis:

$$[1] Y_i = \text{Tipo} + \text{Condición} + \text{Tipo} * \text{Condición} + \varepsilon$$

donde Y_i es la intensidad Y para cada secuencia i . “Tipo” hace referencia al tratamiento de la muestra. “Condición” se refiere al hecho de ser delgada/obesa, “Tipo*Condición” a la interacción de ambas variables y ε es el error no medible que reúne la parte no predicha del resto de variables. De esta manera, se pueden obtener las secuencias diferencialmente expresadas debido a cada uno de los factores estudiados.

El interés fue identificar las diferencias de expresión debidas a la interacción de los factores Tipo y Condición. Además a partir de la lista de genes significativos obtenida, se agruparon las muestras en un PCA y en un *cluster*

Los resultados del análisis estadístico se resumen en la Tabla 7. Se muestra el valor de p asociado a cada secuencia. Cuanto menor es el valor de p , más significativa es la diferencia de expresión entre las condiciones. Se requirió un estudio individual gen a gen para verificar si esas diferencias son relevantes a nivel biológico. A continuación se muestran los valores de cambio de expresión (*fold change*, FC) de cada secuencia relativa a la línea base considerada, que fue la que se encontraba en segundo lugar en la comparación.

Tabla 7. Resultado del análisis estadístico.

Nº	Comparación	Corrección test multiple	Nº Secuencias significativas	Falsos positivos
1	Anova Tipo*Condición	No	936	349.5
		FDR	1	0.05
		Bonferroni	1	0.05
2	<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036 vs Control D	No	1640	349.5
		FDR	522	26.1
		Bonferroni	36	0.05
3	<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036 vs Control O	No	663	349.5
		FDR	5	0.25
		Bonferroni	1	0.05
4	<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034 vs Control D	No	2205	349.5
		FDR	970	4.85
		Bonferroni	44	0.05
5	<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034 vs Control O	No	404	349.5
		FDR	0	-
		Bonferroni	0	-
6	<i>B. breve</i> CNCM I-4035 vs Control D	No	1524	349.5
		FDR	390	19.5
		Bonferroni	39	0.05
7	<i>B. breve</i> CNCM I-4035 vs Control O	No	211	349.5
		FDR	0	-
		Bonferroni	0	-
8	Mezcla cepas probióticas vs Control D	No	1469	349.5
		FDR	392	19.6
		Bonferroni	33	0.05
9	Mezcla cepas probióticas vs Control O	No	162	349.5
		FDR	0	-
		Bonferroni	0	-
10	Referencia D vs Control D	No	1622	349.5
		FDR	322	16.1
		Bonferroni	13	0.05
11	Referencia O vs Control O	No	1500	349.5
		FDR	428	21.4
		Bonferroni	34	0.05

ref delgada y ref. obesa, son los grupos de ratas que se sacrificaron al terminar el período de adaptación. Control delgado y obeso recibieron placebo. El grupo HR-110324-005 corresponde a la mezcla de cepas probióticas, el grupo HR-110324-004 corresponde a *B. breve* CNCM I-4035, el grupo HR-110324-002 corresponde a *L. paracasei* CNCM I-4034 y finalmente el grupo HR-110324-001 corresponde a *L. rhamnosus* CNCM I-4036.

Cuando se buscan diferencias significativas entre varias condiciones, algunas secuencias pueden aparecer como significativas por azar, es decir, ser falsos positivos (error de tipo I). El propósito de la aplicación de un test de corrección múltiple fue tratar de disminuir la probabilidad de que aparecieran falsos positivos de manera más rigurosa que el especificado por el nivel de significación. El test de corrección múltiple (Bonferroni) es de los más conservadores que existen y determina el número de falsos

positivos en función del valor de significación asignado. Al considerar un valor de corte de 0,05, se estima que existe un 5% de posibilidades de que cada uno de los genes sea un falso positivo. Además se aplicó otro test FDR, que es uno de los estadísticos más relevantes en los estudios de genómica y hace referencia a la tasa de error de las secuencias seleccionadas como discriminantes. Se trata del porcentaje de falsos positivos en cada uno de los factores estudiados. Al aplicar una significación de 0,05, se estima que el 5% de las secuencias significativas obtenidas podría ser un falso positivo. Por último, cuando no se aplican correcciones se estima que el número de secuencias que podrían haber sido seleccionadas de forma casual es igual al 5% de las pruebas estadísticas realizadas.

En este experimento, con una lista de trabajo de 6990 secuencias, es decir 6990 pruebas estadísticas, se estimó que el 5% (349,5 secuencias) podrían ser falsos positivos cuando no se aplicaban correcciones múltiples.

En las listas de genes expresados diferencialmente se mostraron los datos normalizados como valores de cambio entre condiciones (*Fold Change*, FC). Para ello, los datos de las dos condiciones experimentales que se compararon estaban normalizados frente a la media geométrica de los *arrays* de las muestras pertenecientes a la condición que se consideraba línea base que era la que se encontraba en segundo lugar en la comparación. El valor utilizado en las listas es el FC. A mayor valor absoluto de FC (con signo negativo para las secuencias reprimidas y positivo para las sobre expresadas) la tasa de cambio era mayor.

El *Volcano plot* es un gráfico que permite de una manera efectiva y de fácil interpretación la observación de los valores de significación y de la tasa de cambio asociada a cada sonda. Para ello el *Volcano plot* representa los genes en dos dimensiones de acuerdo a significancia biológica y estadística. En el eje X se representa la tasa de cambio entre los dos grupos comparados y en el eje Y se representa el valor de p asociado a cada sonda. El eje X nos muestra el impacto biológico del cambio, el segundo eje informa acerca de la evidencia estadística o de la fiabilidad del cambio. Asimismo, se muestra marcado con una línea roja horizontal el umbral a partir del cual las sondas son significativas. Este gráfico ayuda a la selección de los mejores candidatos para una posterior validación. El *volcano plot* obtenido a partir de los valores

de significación son corrección del test estadístico para las 6990 secuencias en la comparación 2 realizada se muestra en la Figura 15.

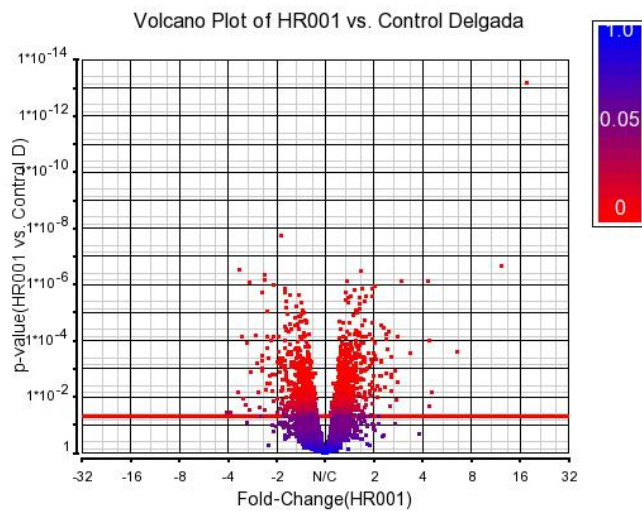


Figura 15. Volcano plot realizado a partir de los valores de significación de cada sonda de la lista de trabajo (6990 secuencias) en la comparación 2. Cada uno de los puntos del gráfico representa una de las sondas de la lista de trabajo. Las sondas se colorean de acuerdo a la significación obtenida para dicha sonda.

A modo de ejemplo se puede observar los valores normalizados de expresión de la sonda más significativa en la comparación 1 en el siguiente grafico:

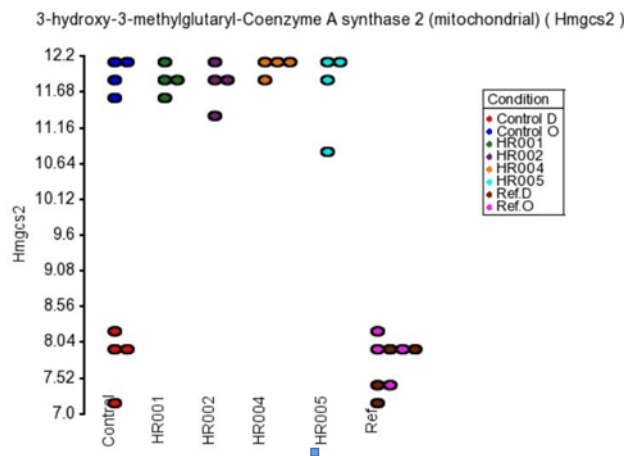


Figura 16. Valores de expresión normalizados del gen Hmgcs2 para cada una de las muestras implicadas. Las muestras se encuentran coloreadas de acuerdo a su condición y conectadas entre sí por su emparejamiento.

Después se realizó un PCA y un *cluster* jerárquico supervisados (Figura 17 y Figura 18. Los genes son resultado de un análisis estadístico) y se expresa en la siguiente tabla.

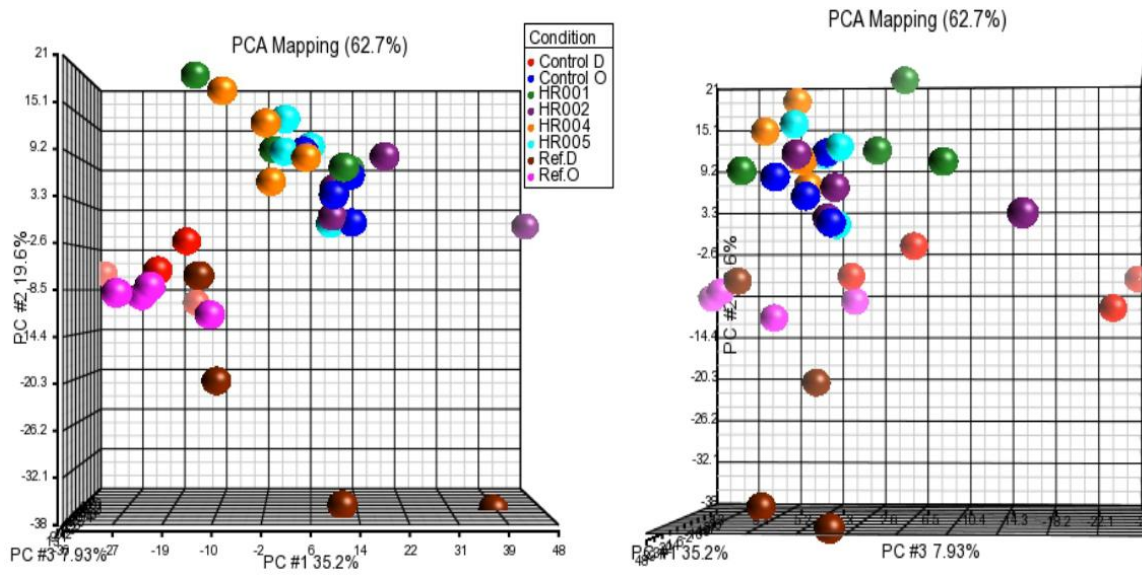


Figura 17. Dos visiones de PCA. Columna izquierda: Primera visión de PCA. Columna derecha: Visión girada 90° a la izquierda sobre el eje vertical (eje z; componente 3) realizadas a partir de la lista de secuencias $p < 0.05$ ANOVA Tipo*Condición (936 secuencias). Las muestras están coloreadas de acuerdo a su condición y tipo. Porcentaje de variabilidad: 35.2 % (eje 1), 19.6% (eje 2); 7.93% (eje 3).

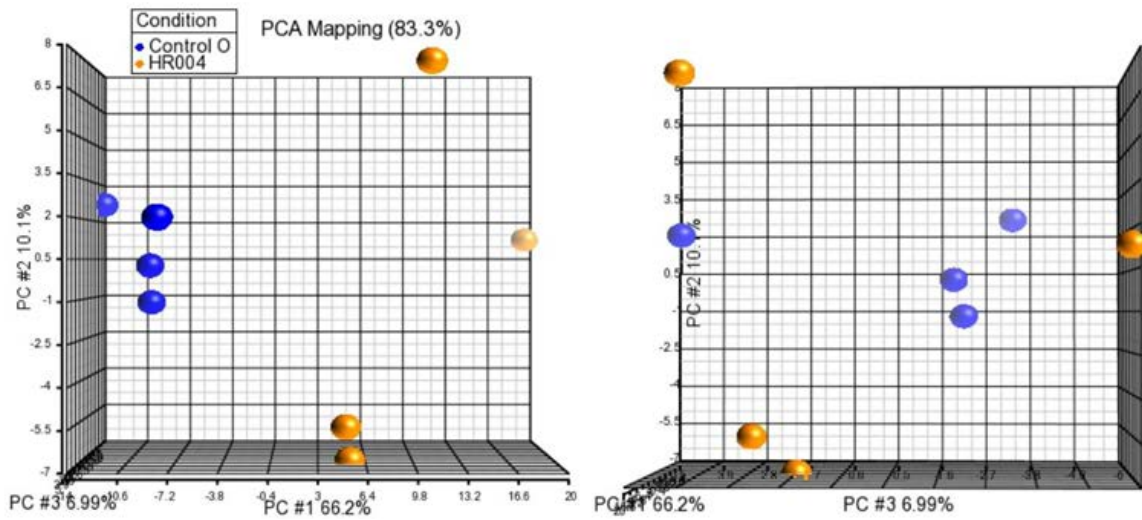


Figura 18. Dos visiones de PCA: Columna izquierda: Primera visión de PCA. Columna derecha: Visión girada 90° a la izquierda sobre el eje vertical (eje z; componente 3) realizadas a partir de la lista de secuencias $p < 0.05$ HR004 vs Control O (211 secuencias). Las muestras están coloreadas de acuerdo a su condición. Porcentaje de variabilidad: 66.2 % (eje 1), 10.1% (eje 2); 6.99% (eje 3).

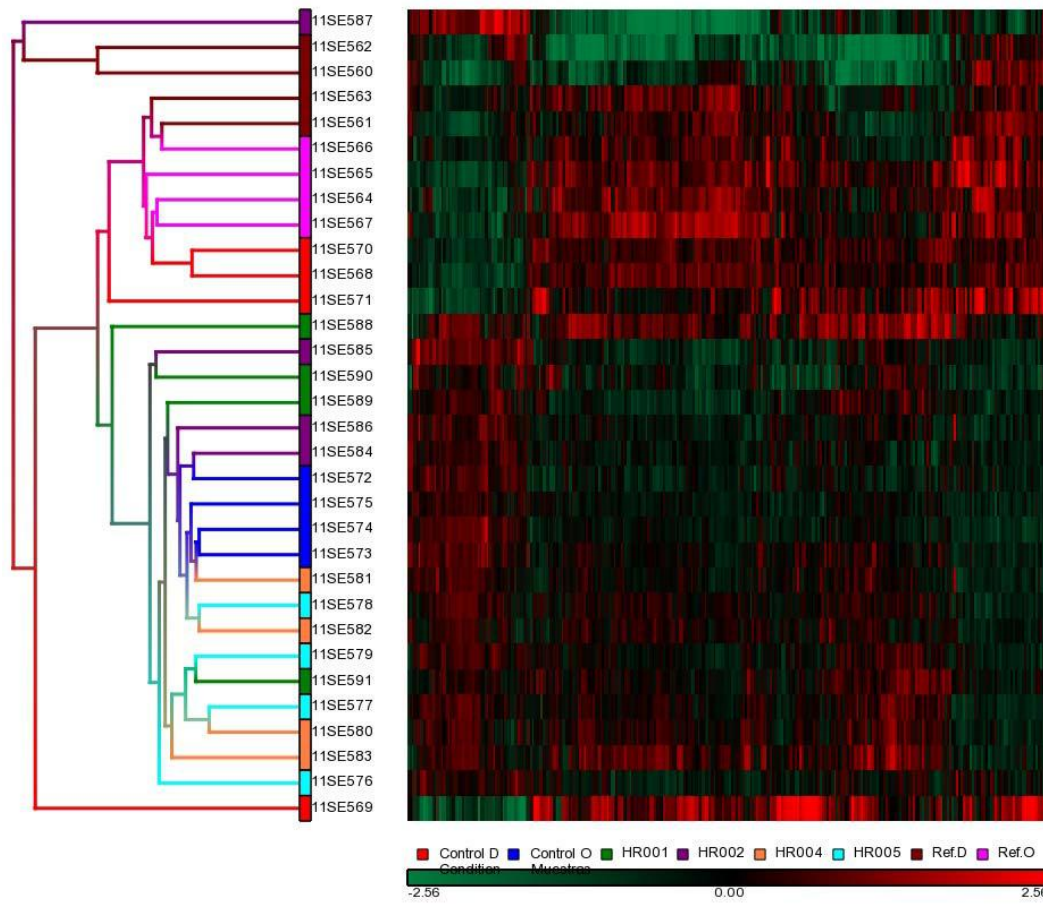


Figura 19. Cluster jerárquico bidimensional de muestras y genes realizado a partir de las listas de secuencias significativas ($p < 0.05$) en un Anova donde se ha comparado Tipo* y Condición (936 secuencias). Cada muestra presenta un recuadro con información respecto a la condición y al tipo.

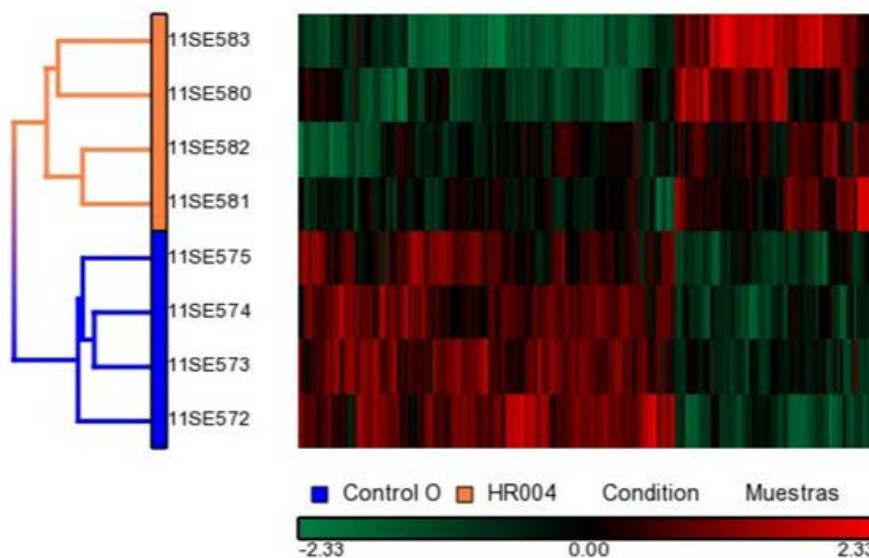


Figura 20. Cluster jerárquico bidimensional de muestras y genes realizado a partir de las listas de secuencias significativas ($p < 0.05$) entre HR004 (que probiotico es') vs Control O (211 secuencias). Cada muestra presenta un recuadro con información respecto a la condición.

En las figuras 17 y 19 se aprecia que la elevada variabilidad existente hizo que las muestras no pudieran clasificarse de acuerdo a la condición y tipo al que pertenecen. En cambio, al tener en cuenta solo 2 condiciones, las muestras se clasifican de acuerdo a la condición a la que pertenecen tal y como se aprecia en las figuras 18 y 20.

Con objeto de determinar los genes que diferencian la respuesta al tratamiento con probióticos respecto a los controles, se realizaron sendos diagramas de Venn en el que se cruzaron los diferentes genes (respecto del Control Obeso-placebo).

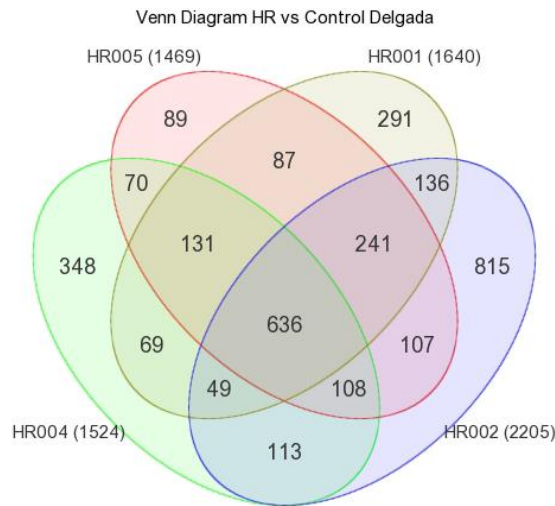


Figura 21. Diagrama de Venn para determinar genes específicos y comunes de tratamiento respecto de Control D.

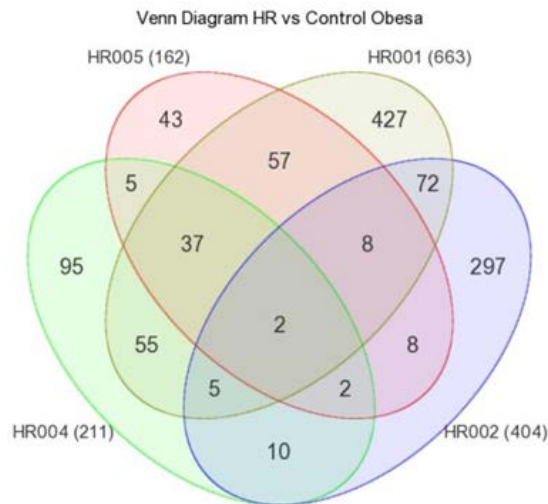


Figura 22. Diagrama de Venn para determinar genes específicos y comunes de tratamiento respecto de Control D.

De la Figura 21 y Figura 22 se puede deducir que los genes comunes para todas las muestras (636 y 2 respectivamente), son genes cuya expresión se ve modificada por el tratamiento independientemente de la naturaleza del mismo. La distinta naturaleza de cada uno de los tratamientos nos proporciona asimismo listas de genes comunes entre algunas comparaciones. Los genes exclusivos de cada lista se corresponderían con efectos específicos derivados de la naturaleza del tratamiento. Estos gráficos son de carácter orientativo ya que hay que tener en cuenta que a pesar de que la mayoría de los genes son coincidentes en el sentido del cambio, hay algún caso en el que no lo son.

Análisis de rutas metabólicas y procesos ontológicos

Se realizó una anotación ontológica de la base de datos de Gene Ontology (www.geneontology.org), rutas metabólicas KEGG (www.genome.jp/kegg/) utilizando la herramienta DAVID (Huang y cols. 2009; Dennis G Jr y cols. 2003) (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) del [National Institute of Allergy and Infectious Diseases \(NIAID\)](http://www.niaid.nih.gov/) de EE. UU. para las secuencias significativas.

Tabla 8. Resultado del análisis ontológico y de rutas metabólicas.

Comparación	Secuencias significativas	Rutas Metabólicas	Ontología de Genes		
			Proceso Biológico	Función Molecular	Componente Celular
<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036 vs Control D	1640	30	217	87	53
<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036 vs Control O	663	9	70	26	36
<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034 vs Control D	2205	34	352	73	74
<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034 vs Control O	404	5	72	20	19
<i>B. breve</i> CNCM I-4035 vs Control D	1524	23	206	71	57
<i>B. breve</i> CNCM I-4035 vs Control O	211	2	39	15	14
Mezcla cepas probióticas vs Control D	1469	21	266	81	55
Mezcla cepas probióticas vs Control O	162	1	9	2	2
Referencia D vs Control D	1622	23	209	70	65
Referencia O vs Control O	1500	24	184	59	59

qRT-PCR

Para la validación de los resultados obtenidos en el *microarray* de DNA se utilizó la plataforma RT²-Profiler PCR array (SABiosciences Corporation, Frederick, Maryland, EE. UU.), que es una qRT-PCR en dos pasos. Brevemente, el RNA total fue extraído utilizando el RNeasy Mini Kit (Qiagen, Barcelona, España) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. El ARN aislado se trató con DNasa libre de RNasa (Qiagen, Barcelona, España). La concentración final de RNA y la calidad se determinaron usando un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (NanoDrop Technologies, Winooski, Vermont, EE. UU.). El cDNA fue sintetizado a partir de RNA total con un RT² Kit First-Strand (SABiosciences). El análisis de las muestras de qRT-PCR Real-time se realizó utilizando una matriz de PCR (SABiosciences), incluyendo pares de cebadores específicos para 14 genes implicados: *Rgs16*, *per1*, *Slc7a11*, *Fkbp5*, *Alox5ap*, *Ednrb*, *Adamdec1*, *Ptgs1*, *Tlr9*, *Naip*, *Nfkbia* y *Nfkb1*. Como genes de referencia se utilizaron *Gapdh* y *Actb*. El cDNA se sometió a PCR en tiempo real con un kit de RT²-PCR real-time SYBR green/ROX (SABiosciences) en un detector de secuencia ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Foster City, California, EE. UU.).

Los cebadores para *F4/80* (UniqueAssayID: qRnoCID0007957), *Cd40* (UniqueAssayID: qRnoCID0003897), y *Gapdh* (UniqueAssayID: qRnoCID0057018) se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). La PCR cuantitativa se realizó con ABI Prism 7900 (Applied Biosystems, Foster City, California, EE. UU.), utilizando SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, California, EE. UU.).

Las condiciones de PCR fueron 1 ciclo de 95 °C durante 10 min seguido de 40 ciclos de 95 °C durante 15 s y 60 °C durante 1 minuto. El nivel de expresión de cada gen se analizó con el software RT² Profiler PCR de análisis de datos de matriz (versión 3.4, SABiosciences). Los cambios en la expresión de genes se expresaron como *fold changes* (Fc).

Western blott

Las muestras de mucosa intestinal se homogenizaron en 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM de NaCl, 2 mM de EDTA, 1% de Triton X-100, 10% de glicerol y un cóctel inhibidor de proteasas (Thermo Scientific) y se colocaron en hielo durante 20 min. Después de la centrifugación (30 min, $13.000 \times g$, 4 °C), se determinó el contenido de proteína en el sobrenadante usando el Kit de Ensayo de Proteínas II (Bio-Rad Laboratories). Las muestras contenían 50 µg de proteína cada una, se mezclaron con tampón de muestra 3X SDS-PAGE (100 mM Tris-HCl, pH 6,8, 25% de SDS, 0,4% de azul de bromofenol, 10% β-mercaptoetanol y 2% de glicerol), en un gel TGX para cualquier kDa (Bio-Rad Laboratories, California, EE. UU.) y se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories, California, EE. UU.). Después de la incubación en tampón de bloqueo (Solución salina 5% de leche no grasa y 1% de Tween 20 en Tris tamponada con, TBS), las membranas se hibridaron con los siguientes anticuerpos: anti-EDNRB (1:2000 en 5% de albúmina de suero bovino (BSA), ab117529), anti-ADAMDEC1 (1:1000 en leche 5% no grasa, NBP1-59146) anti-PTGS1 (1:2000 en 5% de BSA, ab109025), y anti-HSP-70 (control interno; 1:500 en 5% de leche desnatada, sc-7298). Se detectaron señales inmunorreactivas mediante quimioluminiscencia mejorada (SuperSignal West Dura Substrato quimioluminiscente, 34075, Thermo Scientific, Illinois. EE. UU.), y se obtuvieron imágenes digitales de las membranas y se analizaron utilizando el software ImageJ (Universidad de Wisconsin-Madison, Wisconsin y Madison, EE. UU.) para el análisis densitométrico. Los resultados se expresan como el cambio (*fold change*) en la expresión con respecto al control.

Inmunofluorescencia

Las muestras de mucosa intestinal se fijaron en Tissue-Tek Compuesto OCT (Sakura Finetek, Torrance, California, EE. UU.). Se obtuvieron secciones de 8 µm de espesor para el análisis de microscopía confocal. Las muestras se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 15-20 minutos a 4 °C. Después, se añadió Triton X-100 0,2% en PBS y posteriormente suero de cabra normal (NGS) 1:10. Los anticuerpos primarios fueron anti-EDNRB (1:2000 en PBS, ab117529), anti-ADAMDEC1 (1: 250 en PBS, TA323936 Origene), y anti-PTGS-1 (1:100 en PBS,

ab109025). Las muestras se incubaron durante 2 h 45 min a temperatura ambiente. Las secciones se lavaron 3 veces con PBS durante 5 min por lavado. Después, el anticuerpo secundario (anti-rabbit green Alexa 1:1000 en PBS, A11008) se incubó durante 50 min y se lavó con PBS más Hoechst H6024 (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, EE. UU.), 1:1000 en PBS. Por último, se añadió Dako (Agilent Soluciones de productos, Barcelona, España) para fijar las secciones con cubreobjetos (Menzel-Glaser, 24 × 60 mm # 1, Dinamarca).

Análisis estadístico

Todos los resultados se expresan como media \pm SEM. Las diferencias entre los efectos en las ratas de línea base y tras la intervención de 30 días para Zucker Lepr^{+fa} o Zucker-Lepr^{fa/fa} se evaluaron ya sea mediante pruebas paramétricas (t de Student para datos independientes) o pruebas no paramétricas (Mann-Whitney *U*-test). Las diferencias para cualquier variable entre Zucker-Lepr^{fa/fa} que recibieron placebo y cualquier grupo de Zucker-Lepr^{fa/fa} que recibieron una cepa específica se analizaron mediante ANOVA de un factor y *a posteriori* mediante el test de Bonferroni. $P < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo. Todos los análisis se realizaron con el paquete estadístico IBM SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) Versión 20 (Somers, Nueva York, EE. UU.).

RESULTADOS

De los clústers obtenidos en la comparación de los grupos tratados con probióticos con el grupo obeso, hemos seleccionado aquellos genes que presentan un cambio en su transcripción, de acuerdo a los siguientes criterios:

- ✓ Fold change (FC) $\geq 1,50$
- ✓ $p < 0,05$
- ✓ Homogeneidad entre los grupos estudiados

Los genes que cumplen los criterios mencionados aparecen en la Tabla 9.

Tabla 9. Genes que cumplen los criterios estadísticos.

<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036		<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034			
gene_assignment	Gene Symbol	gene_assignment	Gene Symbol	gene_assignment	Gene Symbol
NM_031345	Tsc22d3	NM_017333	Ednrb	NM_012521	S100g
NM_053551	Pdk4	NM_001106046	Adamdec1	FQ225348	–
NM_001106611	Lsm3	BC091243	Igha	BC098746	–
NM_053600	Fez2	NM_012802	Pdgfra	BC092582	LOC314509
ENSRNOT00000065436	Grsf1	NM_031048	Lifr	ENSRNOT00000040099	LOC502822
NM_001108321	Rtp4	NM_017272	Aldh1a7	<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034- <i>B. breve</i> CNCM I-4035	
NM_001034012	Adamts14	ENSRNOT00000057971	RGD1564318	gene_assignment	Gene Symbol
ENSRNOT00000053807	–	BC088423	IgG-2a	NM_013096	Hba-a2
ENSRNOT00000054185	–	BC097960	Igj	NM_013096	Hba-a2
ENSRNOT00000052628	–	NM_022407	Aldh1a1	NM_001111269	LOC689064
ENSRNOT00000053902	–	NM_001007728	Mpz11	NM_198776	Hbb-b1
ENSRNOT00000054104	–	L22652	IgG-2a	<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034- <i>B. breve</i> CNCM I-4035- Mezcla cepas probióticas	
ENSRNOT00000053447	–	NM_017043	Ptgs1	gene_assignment	Gene Symbol
ENSRNOT00000053929	–	NM_031086	Pros1	ENSRNOT00000058247	RGD1563231
ENSRNOT00000053402	–	NM_001134469	Lrrc49	<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036- <i>B. breve</i> CNCM I-4035- Mezcla cepas probióticas	
<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036- <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034		ENSRNOT00000041272	RGD1564284	gene_assignment	Gene Symbol
gene_assignment	Gene Symbol	NM_001017502	Ccdc117	NM_001077589	Rgs16
NM_001107673	Slc7a11	NM_017260	Alox5ap	NM_001034125	Per1
NM_001012174	Fkbp5	NM_053566	Ptch1	<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036- <i>B. breve</i> CNCM I-4035	
ENSRNOT00000053268	–	NM_001009920	Gsta5	gene_assignment	Gene Symbol
ENSRNOT00000053276	–	NM_133583	Ndrp2	ENSRNOT00000053105	–
<i>B. breve</i> CNCM I-4035		BC088423	IgG-2a	ENSRNOT00000052978	–
gene_assignment	Gene Symbol	NM_001105779	Nhp2	FQ233900	–
NM_033234	Hbb	NM_022508	Mthfd1		
ENSRNOT00000053328	–	NM_031523	Klk1b3		

El color rojo indica si el gen está inducido. El verde, si está inhibido. Los encabezados muestran el gen y su símbolo. Se describen los genes que cumplen los criterios para cada grupo individual, así como los genes que son comunes a más de un grupo.

Como se aprecia en la Tabla 2, hay una gran cantidad de genes asociados a la actividad de los probióticos, en especial, genes inhibidos.

SCIENTIFIC REPORTS

OPEN **Adamdec1, Ednrb and Ptgs1/Cox1, inflammation genes upregulated in the intestinal mucosa of obese rats, are downregulated by three probiotic strains**

Received: 31 January 2017
Accepted: 7 April 2017
Published online: 16 May 2017

Julio Plaza-Díaz^{1,2,3}, Cándido Robles-Sánchez^{1,2,3}, Francisco Abadía-Molina⁴, Virginia Morón-Calvente⁴, María José Sáez-Lara^{2,5}, Alfonso Ruiz-Bravo⁶, María Jiménez-Valera⁶, Ángel Gil^{1,2,3,7}, Carolina Gómez-Llorente^{1,2,3,7} & Luis Fontana^{1,2,3}

We have previously reported that administration of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 to obese Zucker-Lepr^{fa/fa} rats attenuates liver steatosis and exerts anti-inflammatory effects. The goal of the present work was to investigate the modulation of gene expression in intestinal mucosa samples of obese Zucker-Lepr^{fa/fa} rats fed the probiotic strains using a DNA microarray and postgenomic techniques. We also measured secretory IgA content in the gut and lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) in serum. Expression of three genes (*Adamdec1*, *Ednrb* and *Ptgs1/Cox1*) was up-regulated in the intestinal mucosa of the obese rats compared with that in the rats when they were still lean. Probiotic administration down-regulated expression of *Adamdec1* and *Ednrb* at the mRNA and protein levels and that of *Ptgs1/Cox1* at the mRNA level, and this effect was in part mediated by a decrease in both macrophage and dendritic cell populations. Probiotic treatment also increased secretory IgA content and diminished the LBP concentration. Based on results reported in this work and else where, we propose a possible mechanism of action for these bacterial strains.

Metabolic syndrome, better referred to as insulin resistance syndrome (IRS), was originally defined as concomitant hyperlipidemia, hypertension, insulin resistance and obesity^{1,2}. IRS often precedes the onset of type 2 diabetes and increases the risk of cardiovascular disease^{3,4}; accordingly, IRS has reached pandemic levels and become a major public health concern. The Zucker rat shows many of the features of IRS; therefore, it is one of the most commonly used genetic models of this syndrome⁴. Zucker-Lepr^{fa/fa} rats exhibit obesity, hyperglycemia, insulin resistance, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and elevated serum free fatty acid concentrations in contrast to Zucker lean Lepr^{+/fa} rats. In addition, Zucker-Lepr^{fa/fa} rats have hepatic steatosis, as well as elevated serum AST and ALT activities, indicating that the liver component of IRS is also present in this model⁵.

Probiotics are live microorganisms that, when consumed in adequate amounts, confer a health effect on the host⁶. Beneficial effects of probiotics have been reported in allergy, intestinal-related diseases, chronic liver disease, urinary tract infections and respiratory infections, among others⁷. Lactobacilli and bifidobacteria are the genera most frequently used as probiotics. A variety of mechanisms underlying their beneficial effects have been proposed: modification of the gut microbiota, competitive adherence to the mucosa and epithelium,

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology II, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain. ²Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Biomedical Research Center, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, University of Granada, Granada, Spain. ³Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Granada, Spain. ⁴Department of Cell Biology, School of Sciences, University of Granada, Granada, Spain. ⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology I, School of Sciences, University of Granada, Granada, Spain. ⁶Department of Microbiology, School of Pharmacy, University of Granada, Granada, Spain. ⁷CIBEROBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain. Correspondence and requests for materials should be addressed to L.F. (email: fontana@ugr.es)

strengthening of the gut epithelial barrier and modulation of the immune system to convey an advantage to the host⁸.

Some authors have described the modulation of gene expression by probiotics. Dykstra *et al.*⁹ reported the induction of the gene coding for mucin 3 (*Muc3*) in the small intestine of rats fed *Lactobacillus plantarum* 299 v, *Lactobacillus rhamnosus* R0011, or *Bifidobacterium bifidum* R0071. Ohtsuka *et al.*¹⁰ administered *Bifidobacterium breve* M-16V to rat pups during the newborn period and found a lower expression of various inflammation-related genes in the colon.

We have previously reported that the administration of three probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) to healthy human volunteers for 30 days is totally safe¹¹ and that their administration for the same period of time to obese Zucker rats attenuates the accumulation of fat in the rats' liver and exerts anti-inflammatory effects such as lower serum concentrations of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6 and bacterial lipopolysaccharide (LPS)⁵.

The goal of the present study was to investigate whether these bacterial strains may modulate the gene expression of the intestinal mucosa. For this purpose and with the help of DNA microarray technology, we began by studying the modulation of a great number of genes in intestinal mucosa samples from obese Zucker rats. Subsequent validation of candidate genes by postgenomic techniques narrowed the number of genes affected by the three probiotic strains down to 12. Of these 12 genes, we focused on 3: ADAM-like protein decysin-1 (*Adamdec1*, a gene encoding a metalloprotease whose expression increases in dendritic cell maturation), endothelin receptor type B (*Ednrb*, a gene encoding a G-protein-coupled receptor that nonspecifically binds to endothelin-1, -2 and -3, with a potential role in vasoconstriction/vasodilation and cell proliferation), and cyclooxygenase (COX)-1 (*Ptgs1/Cox1*, a gene encoding an enzyme that participates in prostaglandin synthesis). These three genes were found to be overexpressed in the intestinal mucosa of obese Zucker-*Lepr^{fa/fa}* rats. Our results also show that *L. paracasei* CNCM I-4034, *B. breve* CNCM I-4035 and *L. rhamnosus* CNCM I-4036 were able to inhibit expression of *Adamdec1* and *Ednrb* at the mRNA and protein levels, as well as expression of *Ptgs1/Cox1* at the mRNA level, in the intestinal mucosa of the obese Zucker-*Lepr^{fa/fa}* rats.

Results

In this work, we investigated whether the administration of the probiotic strains *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 modulate the expression of genes in the intestinal mucosa of obese Zucker-*Lepr^{fa/fa}* rats. For this purpose, over 27,000 rat genes were studied using a DNA array. The analysis of the results revealed effects due to the obese phenotype and others due to probiotic administration.

Intestinal gene expression in the obese phenotype compared with the lean phenotype. We found changes in gene expression due to the "obese" condition, that is, when Zucker-*Lepr^{fa/fa}* rats at baseline (when they were still lean) are compared with Zucker-*Lepr^{fa/fa}* rats that were fed placebo for 30 days. Zucker-*Lepr^{fa/fa}* rats were obese in comparison with Zucker lean *Lepr^{+/fa}* rats after 30 days of feeding with the placebo (Zucker-*Lepr^{fa/fa}*, 294.4 \pm 5.7 g versus Zucker lean *Lepr^{+/fa}*, 241.5 \pm 5.6 g, $P < 0.001$).

Expression of 6 genes changed when the rats turned obese (Supplementary Table 1). Three of the 6 genes became induced, namely, *Adamdec1*, *Ednrb* and *Ptgs1/Cox1*. Protein levels were studied by western blotting and immunofluorescence (Figs 1 and 2). Whereas administration of the placebo did not affect the levels of the proteins encoded by these 3 genes in Zucker lean *Lepr^{+/fa}* (Fig. 1, panels A–C, and Fig. 2), they were increased 3-, 5- and 2.5-fold, respectively, in obese Zucker-*Lepr^{fa/fa}* after 30 days of feeding with the placebo (Fig. 1, panels D–F, and Fig. 2).

Gene expression changes after probiotic administration. The rats that received the mixture of *L. paracasei* CNCM I-4034 and *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 exhibited changes in 162 sequences in the intestinal mucosa; the rats that received exclusively *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 had changes in 211 sequences; administration of *L. paracasei* CNCM I-4034 modified 663 sequences; and *L. rhamnosus* CNCM I-4036 administration changed 404 sequences. All data were compared with those from the Zucker-*Lepr^{fa/fa}* rats that received placebo for 30 days (Supplementary Figure 2).

The results of the array showed changes in the expression of 40 genes for *L. paracasei* CNCM I-4034; 12 genes for *B. breve* CNCM I-4035; 24 genes for *L. rhamnosus* CNCM I-4036; and 3 genes for the mixture of *L. paracasei* CNCM I-4034 and *B. breve* CNCM I-4035. We discarded those genes that i) were not up- or down-regulated ≥ 1.5 -fold compared with Zucker-*Lepr^{fa/fa}* rats that received a placebo instead of a probiotic strain, and ii) were not modulated by at least two of the probiotic strains (Supplementary Table 2).

qRT-PCR was subsequently used to validate the DNA array data. We focused on three genes that fulfilled the aforementioned criteria, *Adamdec1*, *Ednrb* and *Ptgs1*. All three mRNA levels significantly decreased due to probiotic administration (Supplementary Table 3).

Our next step was to study protein levels corresponding to these genes by both western blot and immunofluorescence techniques. Administration of the probiotic strains for 30 days to obese Zucker-*Lepr^{fa/fa}* rats significantly decreased the levels of *Adamdec1* and *Ednrb* proteins in the rats' intestinal mucosa compared with Zucker-*Lepr^{fa/fa}* rats that received the placebo, as shown for *L. paracasei* CNCM I-4034 in Fig. 3 (the two proteins decreased 4- and 7-fold, respectively); for *B. breve* CNCM I-4035 in Fig. 4 (the two proteins decreased 2.4- and 7-fold, respectively); and for *L. rhamnosus* CNCM I-4036 in Fig. 5 (the two proteins decreased 2- and 12-fold, respectively). *Ptgs1* protein levels remained unchanged after the administration of the bacterial strains (not shown).

As an additional effect on the intestine, the content of secretory IgA was measured in the feces of the various groups of rats. Administration of probiotic strains, either alone or in combination, induced an increase in the

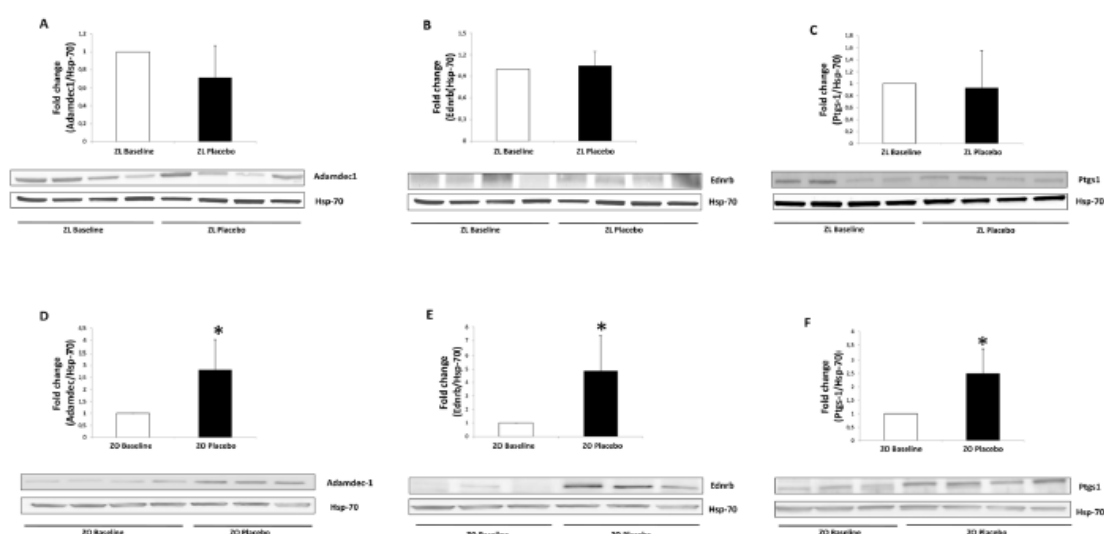


Figure 1. Western blot analysis of Adamdec1, EdnrB and Ptgs1 proteins from Zucker lean *Lepr^{+/fa}* and Zucker-Lepr^{fa/fa} rats both at baseline and after 30 days of placebo administration. Panels A–C show results for Zucker lean *Lepr^{+/fa}* rats at baseline compared with Zucker lean *Lepr^{+/fa}* rats fed the placebo for 30 days. Panels D–F show results for Zucker-Lepr^{fa/fa} rats at baseline compared with Zucker-Lepr^{fa/fa} rats fed the placebo 30 days. The top graph included 7–8 rats per group, and the lower part shows a representative crop blot. Hsp-70 was used as a loading control. ZL, Zucker lean *Lepr^{+/fa}* rats; ZO, Zucker-Lepr^{fa/fa} rats; **P* < 0.05.

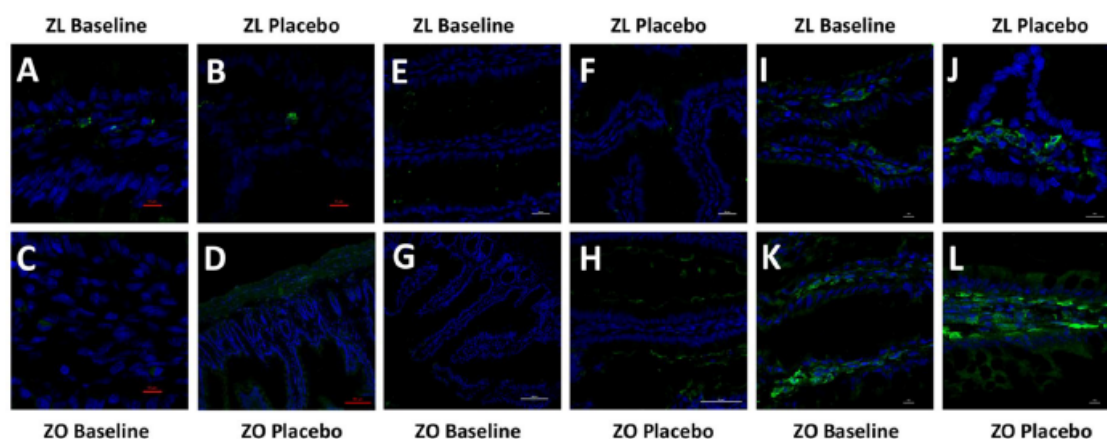


Figure 2. Immunofluorescence analysis of Adamdec1, EdnrB and Ptgs1 proteins from Zucker-lean^{+/fa} and Zucker-Lepr^{fa/fa} rats both at baseline and after 30 days of placebo administration. Panels A–D show results for Adamdec1. Panels E–H show results for EdnrB. Panels I–L show results for Ptgs1. The green color corresponds to Alexa Fluor 488 dye. ZL, Zucker lean *Lepr^{+/fa}* rats; ZO, Zucker-Lepr^{fa/fa} rats. *n* = 4 rats per group.

content of secretory IgA in Zucker-Lepr^{fa/fa} rats compared with the rats that received the placebo, although this increase was statistically significant only for the *L. paracasei* CNCM I-4034 group (2-fold increase, Supplementary Figure 3). Likewise, since probiotic administration has been reported to induce a decrease in bacterial LPS in the rats' serum⁵, we decided to measure LPS-binding protein (LBP) concentration. These results appear in Fig. 6, which shows that LBP decreased in the serum of the rats fed probiotic strains.

The obese Zucker-Lepr^{fa/fa} phenotype is characterized by increases in the number of proinflammatory macrophages and dendritic cells, and the probiotic treatment reversed such effects. To investigate whether the effects of probiotic administration were mediated by changes in the cell population of the intestinal mucosa, qRT-PCR for specific markers of macrophages and dendritic cells was performed (Supplementary Figure 4). Expression of F4/80 was 2-fold higher in Zucker-Lepr^{fa/fa} rats after 30 days of feeding with the placebo compared with baseline, suggesting an increase in the number of macrophages (Supplementary Figure 4A). The number of dendritic cells was also 2-fold higher in the obese rats as indicated by

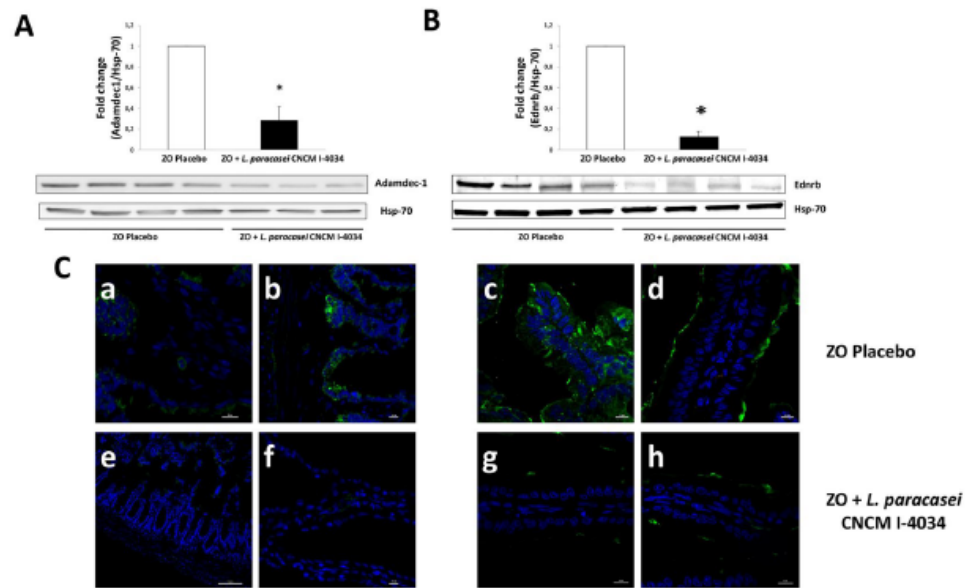


Figure 3. Immunofluorescence and western blot analysis of Adamdec1 and Ednrb proteins from Zucker-Lepr^{fa/fa} rats fed the placebo compared with Zucker-Lepr^{fa/fa} rats fed *L. paracasei* CNCM I-4034. In panels A and B, top graphs include 7–8 rats per group, and the lower parts show a representative crop blot. Hsp-70 was used as a loading control. **p* < 0.05. In panel C, micrographs a,b (ZO placebo), and e,f (ZO + *L. paracasei* CNCM I-4034) show results for Adamdec1, and micrographs c,d (ZO placebo), and g,h (ZO + *L. paracasei* CNCM I-4034) show results for Ednrb. The green color corresponds to Alexa Fluor 488 dye. ZO, Zucker-Lepr^{fa/fa} rats.

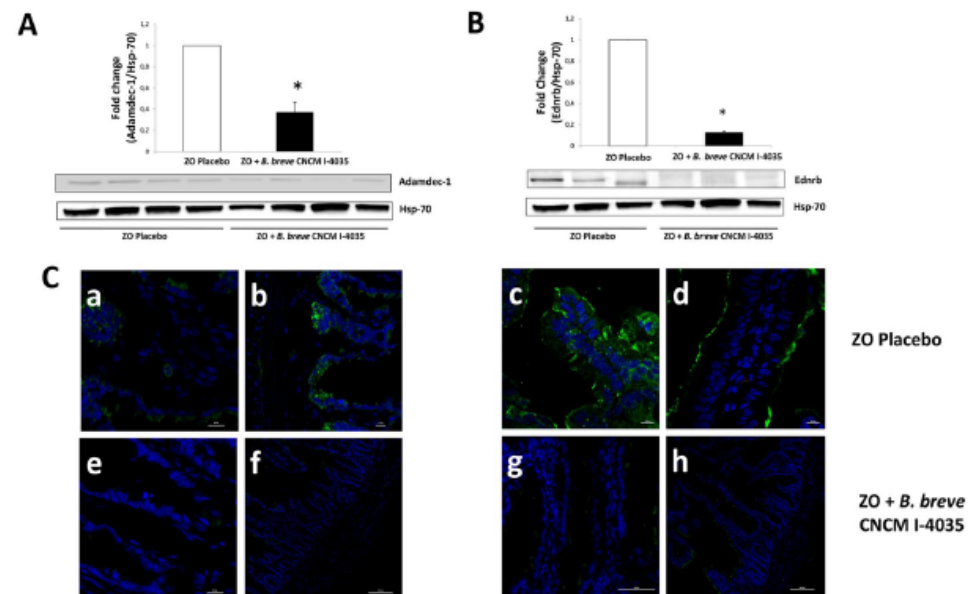


Figure 4. Immunofluorescence and western blot analysis of Adamdec1 and Ednrb proteins from Zucker-Lepr^{fa/fa} rats fed the placebo compared with Zucker-Lepr^{fa/fa} rats fed *B. breve* CNCM I-4035. In panels A and B, top graphs include 6–8 rats per group, and the lower parts show a representative crop blot. Hsp-70 was used as a loading control. **P* < 0.05. In panel C, micrographs a,b (ZO placebo) and e,f (ZO + *B. breve* CNCM I-4035) show results for Adamdec1, and micrographs c,d (ZO placebo) and g,h (ZO + *B. breve* CNCM I-4035) show results for Ednrb. The green color corresponds to Alexa Fluor 488 dye. ZO, Zucker-Lepr^{fa/fa} rats.

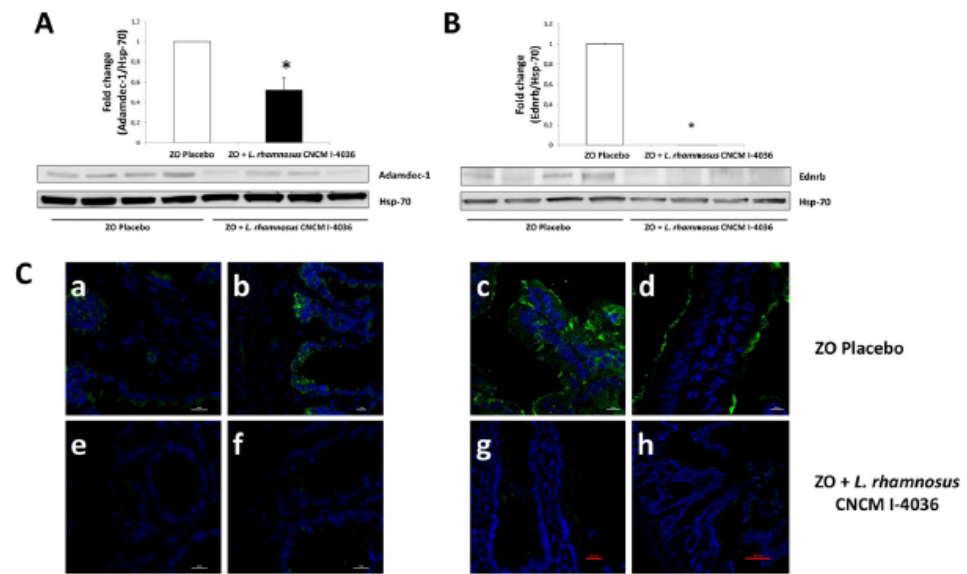


Figure 5. Immunofluorescence and western blot analysis of Adamdec1 and Ednrb proteins from Zucker-Lepr^{fa/fa} rats fed the placebo compared with Zucker-Lepr^{fa/fa} rats fed *L. rhamnosus* CNCM I-4036. In panels A and B, top graphs include 8 rats per group, and the lower parts show a representative crop blot. Hsp-70 was used as a loading control. **P* < 0.05. In panel C, micrographs a,b (ZO placebo) and e,f (ZO + *L. rhamnosus* CNCM I-4036) show results for Adamdec1, and micrographs c,d (ZO placebo) and g,h (ZO + *L. rhamnosus* CNCM I-4036) show results for Ednrb. The green color corresponds to Alexa Fluor 488 dye. ZO, Zucker-Lepr^{fa/fa} rats.

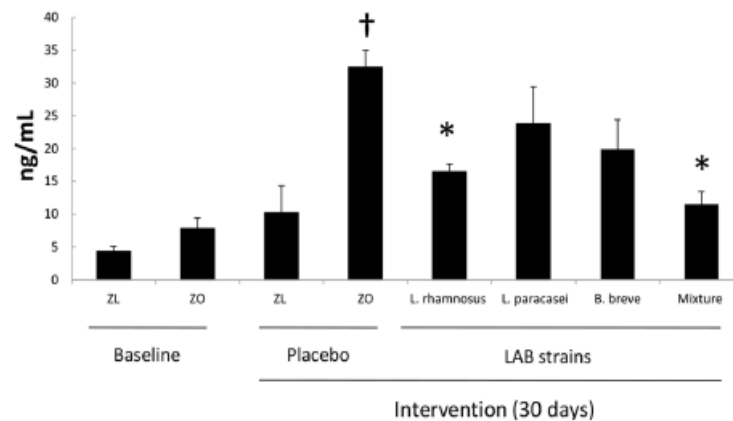


Figure 6. Lipopolysaccharide binding protein (LBP) concentrations in serum of Zucker lean Lepr^{+/fa} rats and Zucker-Lepr^{fa/fa} rats that were fed either a placebo or probiotic strains for 30 days. Values are expressed as the mean ± SEM, n = 8 rats per group. †*P* < 0.05 versus ZL placebo, and **P* < 0.05 versus ZO placebo. ZL, Zucker lean Lepr^{+/fa} rats; ZO, Zucker-Lepr^{fa/fa} rats.

Discussion

We have described elsewhere the isolation of three probiotic strains from the feces of breastfed newborns. The strains were selected based on their probiotic properties, such as adhesion to intestinal mucus, sensitivity to antibiotics and resistance to biliary salts and low pH. They were identified as *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036¹² and demonstrated their safety in mice¹² and humans¹¹.

The main findings of this work were: i) the up-regulation of *Adamdec1*, *Ednrb* and *Ptgs1/Cox1* in the intestinal mucosa of obese Zucker rats in comparison with their lean controls; and ii) the repression of two of those genes, *Adamdec1* and *Ednrb*, in the intestinal mucosa of obese Zucker rats fed *L. paracasei* CNCM I-4034, *B. breve* CNCM I-4035 and *L. rhamnosus* CNCM I-4036 for 30 days in comparison with obese Zucker rats fed a placebo for the same period of time. Repression occurred at both the mRNA and protein levels.

ADAMDEC1 is a unique member of the ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase) family and is under-expressed in approximately 10% of Crohn disease patients. This protein is almost exclusively found in macrophages and dendritic cells in the small and large bowel lamina propria. Although its main role as a protease is tissue repair, it has also been hypothesized to play a role in immunity. O'Shea *et al.*¹³ recently exposed *Adamdec1*^{-/-} mice to dextran sodium sulfate or infected them orally with *Citrobacter rodentium* or *Salmonella typhimurium*, finding that the loss of *Adamdec1* rendered mice more susceptible to the induction of bacterial and chemical-induced colitis, as evidenced by increased neutrophil infiltration, greater IL-6 and IL-1 β secretion, more weight loss and increased mortality. In the absence of *Adamdec1*, greater numbers of *Citrobacter rodentium* were found in the spleen, suggestive of a breakdown in mucosal immunity that resulted in bacteremia. Although apparently contradictory to our results, the *Adamdec1*^{-/-} mouse, a model in which the gene is completely knocked out, is a situation very different from the Zucker rats. The work of O'Shea *et al.*¹³ proves the role of *Adamdec1* in immunity. However, an inflammatory state in the intestine, such as the one that develops in obesity, is characterized by an increased number of macrophages and dendritic cells. In fact, we found a higher expression of both dendritic cells and macrophages in the intestinal mucosa of the obese rats, which might explain *Adamdec1* induction. Probiotic administration diminished the number of macrophages and dendritic cells and therefore helped attenuate the inflammation.

The endothelin family comprises 3 peptides of 21 amino acids each (ET-1, ET-2, and ET-3), which act through the activation of G-protein-coupled receptors. These receptors seem to have relevant functions in pulmonary and arterial hypertension, atherosclerosis, cerebral vasospasm, and inflammatory signals including edema, fever, pain, and leukocyte recruitment¹⁴. Endothelin receptor B mutant (*Ednrb*^{-/-}) mice develop Hirschsprung's disease, an abnormality of the enteric nervous system characterized by a lack of ganglion cells along a variable length of the distal intestine, resulting in the absence of peristalsis in the aganglionic segment and dilation of the colon proximally¹⁵. The disease is associated with a severe inflammation of the intestinal mucosa. Yildiz *et al.*¹⁵ studied mucus barrier properties in *Ednrb*^{-/-} mice and found that both passive and active transport (by which particles and microbes translocate across the mucosa, respectively) are diminished in the *Ednrb*^{-/-} compared to the wild-type proximal colon. As was the case for *Adamdec1*, it is likely that *Ednrb* was induced in the inflamed mucosa of the obese Zucker rats and the probiotic strains exerted an anti-inflammatory effect by decreasing macrophage and dendritic cell numbers. The higher content of secretory IgA found in the obese rats treated with probiotic strains compared with those that received the placebo is in support of such anti-inflammatory effect.

Probiotic administration was also found to down-regulate mRNA levels of a gene involved in prostaglandin synthesis, namely, *Ptgs1/Cox1*. COX-1 is a member of the myeloperoxidase family present in some cell types such as macrophages and hematopoietic cells, which regulates the inflammatory response¹⁶. Two COX isoforms have been identified: whereas COX-2 is the inducible form, COX-1 is constitutive. Therefore, it is not surprising that probiotic administration did not affect *Ptgs1/Cox1* protein levels.

Our probiotic strains were also found to exert two protective effects: an increase in the production of secretory IgA in the intestine and a decrease in the concentration of serum LBP. The latter result correlates with the lower levels of LPS that we found in the serum of the obese rats treated with all three bacterial strains⁵. Regarding the higher levels of secretory IgA, similar results have been described in healthy subjects¹¹.

Based on the recapitulation of our results reported in this work and elsewhere, we propose a possible mechanism of action of these bacterial strains (Fig. 7). Administration of *L. paracasei* CNCM I-4034, *B. breve* CNCM I-4035 and *L. rhamnosus* CNCM I-4036 induces changes in gut microbiota composition^{11,17}, which translate into a greater secretion of IgA¹¹ and the turning off of *Adamdec1* and *Ednrb* (this work). These changes would result in less bacterial translocation in the intestine and, accordingly, in lower concentrations of LPS-LBP in serum⁵. This, in turn, would have a less severe impact in the liver, which would improve steatosis⁵, and in the white adipose tissue. These two organs would respond by decreasing their production of IL-6 and TNF- α . In fact, we have previously reported low plasma levels of these two cytokines in the Zucker rat model after treatment with the abovementioned probiotics⁵.

Works by other authors support this proposed mechanism of action. A few such works are cited below to support the sequence of events: (1) Reports describing the modification of gut microbiota by probiotics are numerous¹⁸. For instance, a recent study conducted in high fat diet (HFD)-fed mice by Wang *et al.*¹⁹ found that probiotic administration shifted the overall structure of the HFD-disrupted gut microbiota toward that of lean mice fed a normal diet. (2) Higher secretion of IgA due to probiotic feeding has been reported in mice by Kemgang *et al.*²⁰. (3) In addition to the works by Dykstra *et al.*⁹ and Ohtsuka *et al.*¹⁰ mentioned before, the study by Tannock *et al.*²¹ can be cited as an example of gene modulation by probiotics. These authors have described the up-regulation of three apoptosis-related genes in the small bowel of mice treated with *L. rhamnosus* HN001. (4) The lesser bacterial translocation in the gut might be due to a greater integrity of the mucosal tight junctions. Thus, Balakumar *et al.*²² have recently described increases in occludin and zonula occludens-1 transcriptional levels in mice with HFD-induced obesity that received *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* MTCC5690 and *L. fermentum* MTCC5689. Also, supernatants from *Faecalibacterium prausnitzii* and *Escherichia coli* Nissle 1917 have been shown to increase crypt depth in the jejunum of rats with 5-fluorouracil-induced mucositis²³. (5) Two strains of *Lactobacillus* have been found to lower circulating IgA in HFD-fed rats²⁴. (6) Many works describe an attenuation of hepatic steatosis by probiotic administration in mice and rats²⁵, as well as a modulation of cytokine production.

In summary, we report that administration of the probiotic strains *L. paracasei* CNCM I-4034, *B. breve* CNCM I-4035 and *L. rhamnosus* CNCM I-4036 to obese Zucker rats increased the content of secretory IgA in

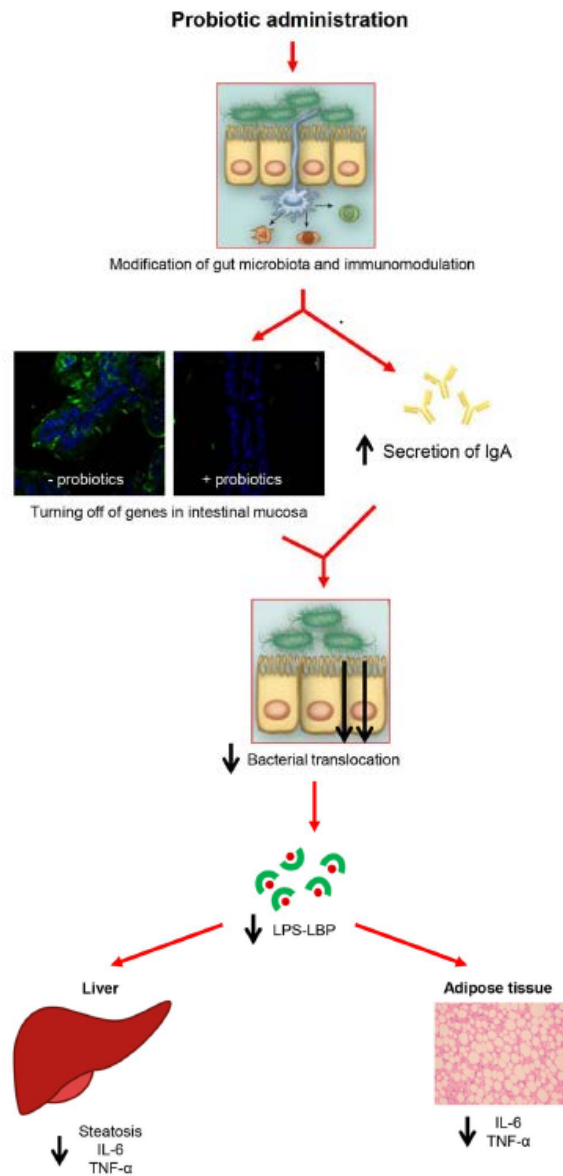


Figure 7. Potential mechanism of action of *L. paracasei* CNCM I-4034, *B. breve* CNCM I-4035 and *L. rhamnosus* CNCM I-4036. LPS: Lipopolysaccharide. LBP: LPS binding protein.

the gut, diminished the LBP concentration in the serum, and normalized expression of *Adamdec1* and *Ednrb* at the mRNA and protein levels and that of *Ptgs1/Cox1* at the mRNA level in the intestinal mucosa, previously up-regulated in obese Zucker rats.

Materials and Methods

Microorganisms. The probiotic strains *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 have been characterized and are described elsewhere¹². These strains were deposited in the Collection Nationale de Cultures de Microorganismes (CNCM) of the Institute Pasteur¹².

Ethical statement. This study was conducted in strict accordance with the recommendations in the guidelines for animal research of the University of Granada (Spain). All animals received humane care. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Granada (Permit Number CEEA: 2011-377).

Experimental design. Forty-eight Zucker-Lepr^{fa/fa} and 16 Zucker lean Lepr^{+/-fa} male rats weighing 168–180 g were purchased from Harlan Laboratories (Charles River, Barcelona, Spain). The rats were housed in metabolic cages with a 12-h light-dark cycle and had free access to water and food. After 5 days of adaptation, 8 Zucker lean Lepr^{+/-fa} and 8 Zucker-Lepr^{fa/fa} rats were euthanized as a reference (baseline). The remaining 40 Zucker-Lepr^{fa/fa} rats were then randomly assigned to receive 10¹⁰ colony-forming units (CFU) of one of the three probiotic strains, a mixture of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 and *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, or a placebo by oral administration each day for 30 days. An additional group of 8 Zucker lean Lepr^{+/-fa} rats received the placebo for 30 days. The placebo contained 67% cow's milk powder, 32.5% sucrose, and 0.56% vitamin C.

After the intervention, the animals were anesthetized and sedated with ketamine and xylazine. Blood was drawn from the aorta and centrifuged for 10 min at 1000 × g and 4 °C to separate the serum from the cells. Samples of intestinal mucosa were also taken.

DNA microarray. We used Affymetrix Rat Gene 1.1 ST Array Plates (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA) following the manufacturer's directions. Briefly, RNA extraction was performed using the RNeasy Mini Kit and Qiacube system. A quantity of 300 mg total RNA was utilized in cDNA synthesis with the Ambion WT Expression kit, and the resulting cDNA was fragmented using uracil-DNA glycosylase and APE1 (apurinic/apyrimidinic endonuclease-1). The labeling process was performed using the WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix) with deoxynucleotidyl transferase linked to biotin. After fragmentation, 5.5 µg cDNA was hybridized using the GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit from Affymetrix. GeneChips were scanned using the GeneTitan™. The data were analyzed with the Command Console (AGCC 3.1, Affymetrix) and the Expression Console (EE 1.1, Affymetrix). The value definition was performed using the RMA (Robust Multichip Average) signal intensity.

The complete data set in the present study complies with the MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) requirements and was uploaded into the *Gene Expression Omnibus* (GEO) database with the title *Expression data from intestinal mucosa of Zucker rats* and reference GSE73848 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

The intensity value of each probe in the array analysis was normalized with the Robust Multichip Average (RMA) using the Partek Genomics Suite version 6.10 (Partek) to obtain an individual intensity for each set of probes. All expression data were averaged to achieve a unique expression value for the gene, and the background was deleted. The identification of expression changes was performed using multiple regression models comparing the intensity of each gene with the interaction (Zucker lean Lepr^{+/-fa} or Zucker-Lepr^{fa/fa} rats that received placebo versus Zucker-Lepr^{fa/fa} rats that received any probiotic strain). The two-dimensional hierarchic cluster with the statistically significant sequences (n = 936) appears in Supplementary Figure 1, according to the intensity and the aforementioned interactions.

qRT-PCR. For validation of the DNA microarray results we used the RT²-Profiler PCR array (SABiosciences Corporation, Frederick, MD), which is a two-step qRT-PCR platform. Briefly, total RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Barcelona, Spain) according to the manufacturer's recommendations. Isolated RNA was then treated with the RNase-Free DNase Set (Qiagen, Barcelona, Spain). The final RNA concentration and quality were determined using a NanoDrop 2000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Winooski, Vermont, USA). The cDNA was synthesized from total RNA with an RT² First-Strand Kit (SABiosciences). Real-time qRT-PCR analysis of the samples was performed using a PCR array (SABiosciences), including primer pairs specific for 14 genes involved: *Rgs16*, *Per1*, *Slc7a11*, *Fkbp5*, *Alox5ap*, *Ednrb*, *Adamdec1*, *Ptgs1*, *Tlr9*, *Naip*, *Nfkb1a*, and *Nfkb1*. The housekeeping genes *Gapdh* and *Actb* were used as a control. The cDNA was then subjected to real-time PCR with an RT² real-time PCR SYBR green/ROX kit (SABiosciences) on an ABI Prism 7900HT sequence detector (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Primers for F4/80 (UniqueAssayID: qRnoCID0007957), Cd40 (UniqueAssayID: qRnoCID0003897), and *Gapdh* (UniqueAssayID: qRnoCID0057018) were obtained from Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA). The qPCR was performed with an ABI Prism 7900 instrument (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

The PCR conditions were 1 cycle of 95 °C for 10 min followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The expression level of each gene was analyzed with RT² Profiler PCR Array Data Analysis software (version 3.4, SABiosciences). Changes in gene expression were expressed as fold changes (Fc).

Western blotting. Intestinal mucosa samples were harvested in 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10% glycerol and a protease inhibitor cocktail (Thermo Scientific) and were placed on ice for 20 min. After centrifugation (30 min, 13,000 × g, 4 °C), the protein content in the supernatant was determined using the Protein Assay Kit II (Bio-Rad Laboratories). Samples containing 50 µg protein each were mixed with 3X SDS-PAGE sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 25% SDS, 0.4% bromophenol blue, 10% β-mercaptoethanol and 2% glycerol), separated via SDS-PAGE using a TGX Any kD gel (Bio-Rad Laboratories, California, USA) and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad Laboratories, California, USA). After incubation in blocking buffer (5% non-fat milk and 1% Tween 20 in Tris-buffered saline, TBS), the membranes were probed with the following antibodies: anti-Ednrb (1:2000 in 5% bovine serum albumin (BSA), ab117529), anti-Adamdec1 (1:1000 in 5% non-fat milk, NBP1-59146) anti-Ptgs1 (1:2000 in 5% BSA, ab109025), and anti-Hsp-70 (internal control; 1:500 in 5% non-fat milk, sc-7298). Immunoreactive signals were detected via enhanced chemiluminescence (SuperSignal West Dura Chemiluminescent Substrate, 34075, Thermo Scientific, Europe), and the membranes were digitally imaged and analyzed using ImageJ software for densitometric analysis. The results are expressed as the fold change in expression relative to the control.

Immunofluorescence analysis. Intestinal mucosa samples were fixed in Tissue-Tek O.C.T. Compound (Sakura Finetek, USA). Sections 8 μ m in thickness were obtained for confocal microscopy analysis. Samples were washed with phosphate-buffered saline (PBS) for 15–20 min at 4 °C. Then, Triton X-100 0.2% in PBS and normal serum goat (NGS) 1:10 were added. The primary antibodies were anti-Ednrb (1:2000 in PBS, ab117529), anti-Adamdec1 (1:250 in PBS, TA323936 Origene), and anti-Ptgs-1 (1:100 in PBS, ab109025). Samples were incubated for 2 h 45 min at room temperature. Sections were washed 3 times with PBS for 5 min per wash. Then, the secondary antibody (anti-rabbit green Alexa 1:1000 in PBS, A11008) was added for 50 min and washed out with PBS plus Hoechst H6024 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), 1:1000 in PBS. Finally, Dako (Agilent Product Solutions, Barcelona, Spain) was used to fix sections with cover slips (Menzel-Glaser, 24 \times 60 mm #1, Denmark).

Serum lipopolysaccharide binding protein (LBP) concentration. Serum LBP was measured with an enzyme-linked immunosorbent assay kit from Cloud-Clone Corp. (Houston, USA), following the manufacturer's directions.

Determination of the fecal content of secretory IgA. Secretory IgA was analyzed in feces by enzyme-linked immunosorbent assay (Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany) according to the manufacturer's instructions.

Statistical analysis. All results are expressed as the mean \pm SEM. Differences between effects at baseline and after 30 days for Zucker lean *Lepr^{+/fa}* or Zucker-*Lepr^{fa/fa}* rats were assessed by either parametric (unpaired Student's t-test) or non-parametric (Mann-Whitney U-test) tests. Differences for any variable between Zucker-*Lepr^{fa/fa}* rats that received placebo and any group of Zucker-*Lepr^{fa/fa}* rats that received a specific strain were analyzed using a one-way ANOVA and a *posteriori* Bonferroni test. $P < 0.05$ was considered statistically significant. All analyses were performed using the statistical package IBM SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) Statistics version 20 (Somers, NY).

References

1. Reaven, G. M. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**, 1595–1607, doi:10.2337/diab.37.12.1595 (1988).
2. Reaven, G. M. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. *Endocrinol Metab Clin North Am* **33**, 283–303, doi:10.1016/j.ecl.2004.03.002 (2004).
3. Lakka, H. M. *et al.* The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* **288**, 2709–2716, doi:10.1001/jama.288.21.2709 (2002).
4. Kahn, R. *et al.* The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* **28**, 2289–2304, doi:10.2337/diacare.28.9.2289 (2005).
5. Plaza-Díaz, J. *et al.* Effects of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 on hepatic steatosis in Zucker Rats. *PLOS ONE* **9**, e98401, doi:10.1371/journal.pone.0098401 (2014).
6. Guarner, F. & Schaafsma, G. J. Probiotics. *Int J Food Microbiol* **39**, 237–238, doi:10.1016/S0168-1605(97)00136-0 (1998).
7. Fontana, L., Bermúdez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S. & Gil, A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br J Nutr* **109**, S35–50, doi:10.1017/S0007114512004011 (2013).
8. Bermúdez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C. & Gil, A. Probiotic mechanism of action. *Ann Nutr Metab* **61**, 160–174, doi:10.1159/000342079 (2012).
9. Dykstra, N. *et al.* Pulse probiotic administration induces repeated small intestinal *Muc3* expression in rats. *Pediatr Res* **69**, 206–211, doi:10.1203/PDR.0b013e3182096ff0 (2011).
10. Ohtsuka, Y. *et al.* Effects of *Bifidobacterium breve* on inflammatory gene expression in neonatal and weaning rat intestine. *Pediatr Res* **71**, 46–53, doi:10.1038/pr.2011.11 (2012).
11. Plaza-Díaz, J. *et al.* Safety and immunomodulatory effects of three probiotic strains isolated from the feces of breast-fed infants in healthy adults: SETOPROB study. *PLOS ONE* **8**, e78111, doi:10.1371/journal.pone.0078111 (2013).
12. Muñoz-Quezada, S. *et al.* Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) from the faeces of exclusively breast-fed infants. *Br J Nutr* **109**, S51–S62, doi:10.1017/S0007114512005211 (2013).
13. O'Shea, N. R. *et al.* Critical Role of the Disintegrin Metalloprotease ADAM-like Decysin-1 [ADAMDEC1] for Intestinal Immunity and Inflammation. *J Crohns Colitis* **10**, 1417–1427, doi:10.1093/ecco-jcc/jjw111 (2016).
14. Zarpelon, A. C. *et al.* Endothelin-1 induces neutrophil recruitment in adaptive inflammation via TNF- α and CXCL1/CXCR2 in mice. *Can J Physiol Pharmacol* **90**, 187–199, doi:10.1139/y11-116 (2012).
15. Yildiz, H. M., Carlson, T. L., Goldstein, A. M. & Carrier, R. L. Mucus barriers to microparticles and microbes are altered in Hirschsprung's disease. *Macromol Biosci* **15**, 712–718, doi:10.1002/mabi.201400473 (2015).
16. Saraswathi, V. *et al.* Impact of hematopoietic cyclooxygenase-1 deficiency on obesity-linked adipose tissue inflammation and metabolic disorders in mice. *Metabolism* **62**, 1673–1685, doi:10.1016/j.metabol.2013.07.007 (2013).
17. Plaza-Díaz, J. *et al.* Pyrosequencing analysis reveals changes in intestinal microbiota of healthy adults who received a daily dose of immunomodulatory probiotic strains. *Nutrients* **7**, 3999–4015, doi:10.3390/nu7063999 (2015).
18. Brahe, L. K., Astrup, A. & Larsen, L. H. Can we prevent obesity-related metabolic diseases by dietary modulation of the gut microbiota? *Adv Nutr* **7**, 90–101, doi:10.3945/an.115.010587 (2016).
19. Wang, J. *et al.* Modulation of gut microbiota during probiotic-mediated attenuation of metabolic syndrome in high fat diet-fed mice. *ISME J* **9**, 1–15, doi:10.1038/ismej.2014.99 (2015).
20. Kemgang, T. S., Kapila, S., Shanmugam, V. P., Reddi, S. & Kapila, R. Fermented milk with probiotic *Lactobacillus rhamnosus* S1K3 (MTCC5957) protects mice from *Salmonella* by enhancing immune and nonimmune protection mechanisms at intestinal mucosal level. *J Nutr Biochem* **30**, 62–73, doi:10.1016/j.jnutbio.2015.11.018 (2016).
21. Tannock, G. W. *et al.* Altered transcription of murine genes induced in the small bowel by administration of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *Appl Environ Microbiol* **80**, 2851–2859, doi:10.1128/AEM.00336-14 (2014).
22. Balakumar, M. *et al.* Improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity by probiotic strains of Indian gut origin in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Eur J Nutr* **10.1007/s00394-016-1317-7** (2016).
23. Wang, H., Jatmiko, Y. D., Bastian, S. E., Mashtoub, S. & Howarth, G. S. Effects of supernatants from *Escherichia coli* Nissle 1917 and *Faecalibacterium prausnitzii* on intestinal epithelial cells and a rat model of 5-fluorouracil-induced mucositis. *Nutr Cancer* **69**, 307–318, doi:10.1080/01635581.2017.1263747 (2017).

24. Tian, P. *et al.* Antidiabetic (type 2) effects of *Lactobacillus* G15 and Q14 in rats through regulation of intestinal permeability and microbiota. *Food Funct* 7, 3789–3797, doi:10.1039/c6fo00831c (2016).
25. Cani, P. D. & Van Hul, M. Novel opportunities for next-generation probiotics targeting metabolic syndrome. *Curr Opin Biotechnol* 32, 21–27, doi:10.1016/j.copbio.2014.10.006 (2015).

Acknowledgements

This paper will be part of Cándido Robles-Sánchez's doctorate, which is being completed as part of the "Biochemistry and Molecular Biology Program" at the University of Granada, Spain. This work was funded by the company Hero Spain, S. A. (grant #3545 managed by Fundación General Empresa-Universidad de Granada) and by CEIBiotic, University of Granada, Spain (grant CEI2013P-11).

Author Contributions

A.G., C.G.L. and L.F. contributed to the study concept and design. J.P.D., C.R.S., V.M.C., F.A.M., M.J.S.L., A.R.B. and M.J.V. participated in the acquisition of data. J.P.D. and A.G. did the statistical analysis. All authors took part in the analysis and interpretation of data, the drafting of the manuscript and the critical revision of the manuscript. A.G., C.G.L. and L.F. obtained funding. J.P.D. and L.F. wrote the manuscript.

Additional Information

Supplementary information accompanies this paper at doi:10.1038/s41598-017-02203-3

Competing Interests: The authors declare that they have no competing interests.

Accession codes: Microarray data were uploaded into the *Gene Expression Omnibus (GEO) database with the title Expression data from intestinal mucosa of Zucker rats* and reference GSE73848 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

Publisher's note: Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2017

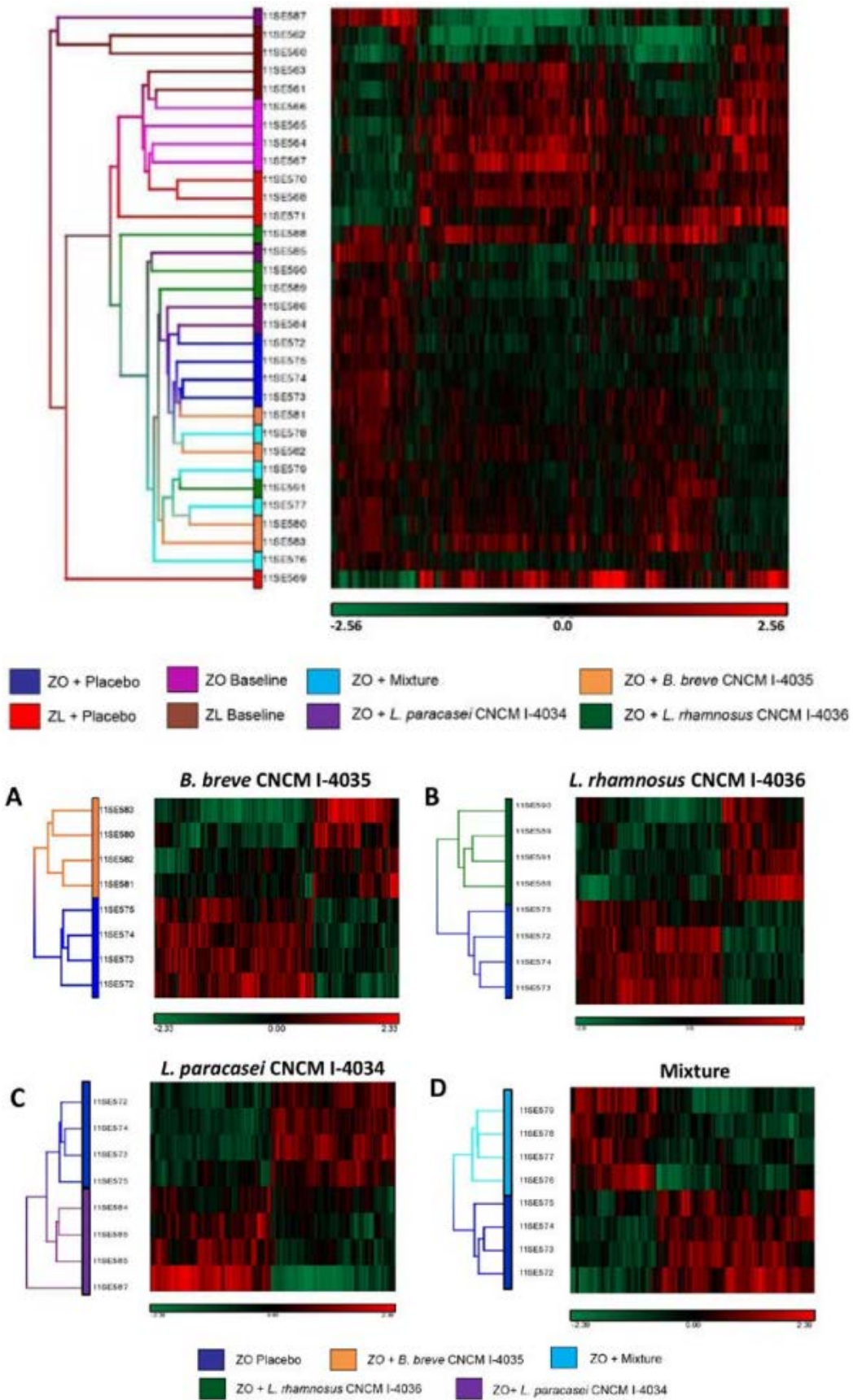
Material suplementario del artículo: Plaza-Díaz J, Robles-Sánchez C, Abadía-Molina F, Morón-Calvente V, Sáez-Lara MJ, Ruiz-Bravo A, Jiménez-Valera M, Gil A, Gómez-Llorente C, Fontana L. *Adamdec1*, *Ednrb* and *Ptgs1/Cox1*, inflammation genes upregulated in the intestinal mucosa of obese rats, are downregulated by three probiotic strains. *Sci Rep* 2017; 7: 1939

Title: *Adamdec1*, *Ednrb* and *Ptgs1/Cox1*, inflammation genes upregulated in the intestinal mucosa of obese rats, are downregulated by three probiotic strains

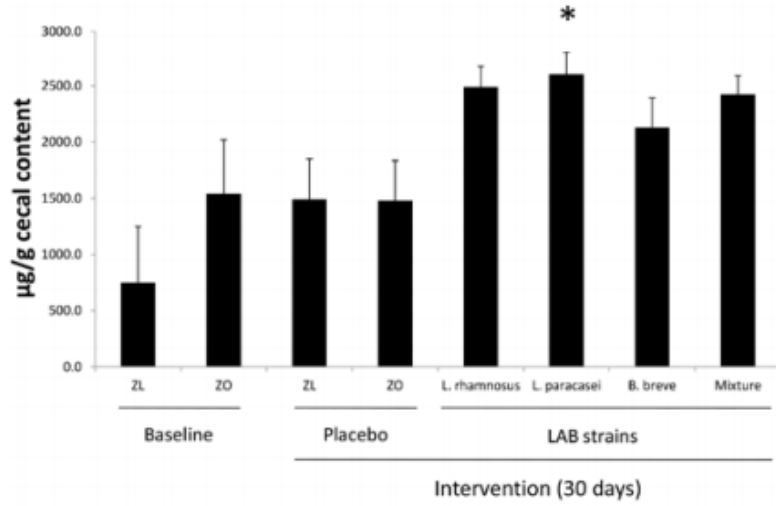
Authors: Julio Plaza-Díaz^{1,2,3}, Candido Robles-Sánchez^{1,2,3}, Francisco Abadía-Molina⁴, Virginia Morón-Calvente⁴, Maria Jose Sáez-Lara^{2,5}, Alfonso Ruiz-Bravo⁶, Maria Jiménez-Valera⁶, Angel Gil^{1,2,3,7}, Carolina Gómez-Llorente^{1,2,3,7} & Luis Fontana^{1,2,3,#}

Institutions: ¹Department of Biochemistry and Molecular Biology II, School of Pharmacy, University of Granada, Spain. ²Institute of Nutrition and Food Technology "José Mataix", Biomedical Research Center, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, University of Granada, Spain. ³Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Spain. ⁴Department of Cell Biology, University of Granada, Granada 18071, Spain, Biomedical Research Center, University of Granada, Granada 18016, Spain. ⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology I, School of Sciences, University of Granada, Spain. ⁶Department of Microbiology, School of Pharmacy, University of Granada, Spain. ⁷CIBEROBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

***Corresponding author:** Luis Fontana, Ph. D. Dept. Biochemistry and Molecular Biology II, School of Pharmacy, Campus de Cartuja s/n, 18071 Granada, Spain. Phone: 34958242335. Fax: 34958248960. E-mail: fontana@ugr.es

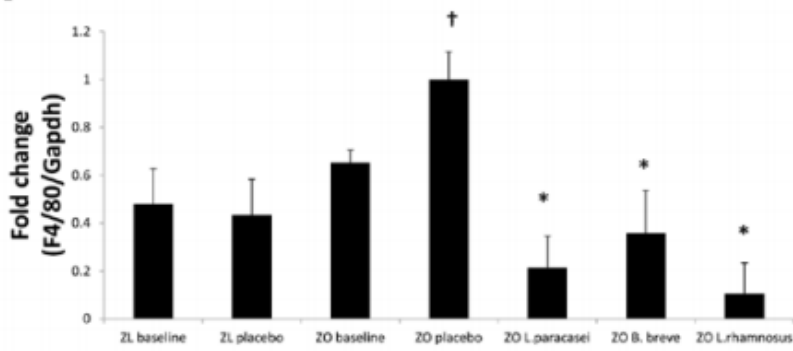


Supplementary Figure 2

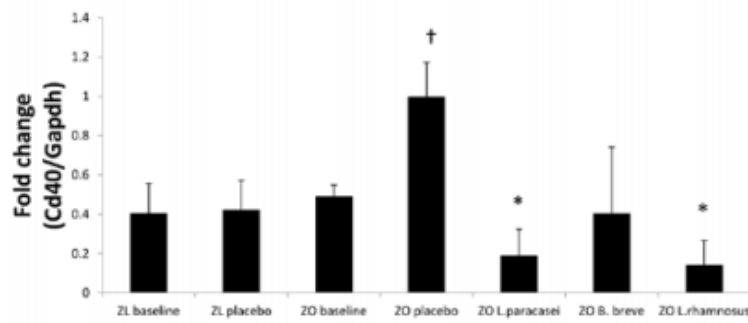


Supplementary Figure 3

A



B



Supplementary Figure 4

Supplementary Figure 1. Microarray results obtained with the Rat Gene 1.1 ST Array Plate (Affymetrix®). These results were uploaded to the Gene Expression Omnibus (GEO) platform as “GSE73848 *Expression data from intestinal mucosa of Zucker rats.*” ZL, Zucker lean $\text{Lepr}^{+/fa}$ rats; ZO, Zucker- $\text{Lepr}^{fa/fa}$ rats; Mixture, *L. paracasei* CNCM I-4034 plus *B. breve* CNCM I-4035 strains. n=4 rats per group.

Supplementary Figure 2. Microarray expression data from the intestinal mucosa of Zucker- $\text{Lepr}^{fa/fa}$ rats treated with *B. breve* CNCM I-4035 **(A)**, *L. rhamnosus* CNCM I-4036 **(B)**, *L. paracasei* CNCM I-4034 **(C)**, or mixture **(D)** compared with Zucker- $\text{Lepr}^{fa/fa}$ rats fed the placebo. ZO, Zucker- $\text{Lepr}^{fa/fa}$ rats; Mixture, *L. paracasei* CNCM I-4034 plus *B. breve* CNCM I-4035 strains. n=4 rats per group.

Supplementary Figure 3. Total content of secretory IgA in the feces of Zucker-lean $^{+/fa}$ rats and Zucker- $\text{Lepr}^{fa/fa}$ rats that were fed either a placebo or probiotic strains for 30 days. Values are expressed as the mean \pm SEM, n=8 rats per group. * $P < 0.05$ versus ZO placebo. ZL, Zucker lean $\text{Lepr}^{+/fa}$ rats. ZO, Zucker- $\text{Lepr}^{fa/fa}$ rats.

Supplementary Figure 4. Obese rats develop intestinal inflammation, and probiotic treatment mitigates it. qRT-PCR showing mRNA levels for (A) F4/80, and (B) Cd40. Values are expressed as the mean \pm SEM, n=8 rats per group. $\dagger P < 0.05$ versus ZL baseline, ZL placebo and ZO baseline. * $P < 0.05$ versus ZO placebo. ZL, Zucker lean $\text{Lepr}^{+/fa}$ rats. ZO, Zucker- $\text{Lepr}^{fa/fa}$ rats.

Supplementary Table 1. Validation of microarray results for obese Zucker-Lepr^{fa/fa} rats fed the placebo

Intestinal mucosa genes (qRT-PCR)	ZO baseline versus ZO placebo	P value
Slc7a11	↓-1.548	0.0315
Fkbp5	↓-1.395	0.0362
Ednrb	↑3.682	0.0001
Adamdec1	↑5.941	<0.001
Prgs1	↑1.46	0.0101
Nfkbia	↓-1.18	0.0269

This table shows the fold change in gene expression as quantitated by qRT-PCR, as well as the statistical significance (P value) compared with Zucker-Lepr^{fa/fa} rats at baseline. Inhibited genes appear as ↓, whereas induced genes appear as ↑. n=8 rats per group.

Supplementary Table 2. List of genes (symbol and reference) whose expression was modulated by the probiotic strains

<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036 group		<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034 group	
gene_assignment	Gene Symbol	gene_assignment	Gene Symbol
NM_031345	↓Tsc22d3	NM_017333	↓Ednrb
NM_053551	↓Pdk4	NM_001106046	↓Adamdec1
NM_001106611	↓Lsm3	BC091243	↓Igha
NM_053600	↓Fez2	NM_012802	↓Pdgrfa
ENSRNOT00000065436	↓Grsf1	NM_031048	↓Lifr
NM_001108321	↓Rtp4	NM_017272	↓Aldh1a7
NM_001034012	↓Adamtsl4	ENSRNOT00000057971	↓RGD1564318
ENSRNOT00000053807	-	BC088423	↓IlgG-2a
ENSRNOT00000054185	-	BC097960	↓Igj
ENSRNOT00000052628	-	NM_022407	↓Aldh1a1
ENSRNOT00000053902	-	NM_001007728	↓Mpzl1
ENSRNOT00000054104	-	L22652	↓IlgG-2a
ENSRNOT00000053447	-	NM_017043	↓Ptgs1
ENSRNOT00000053929	-	NM_031086	↓Pros1
ENSRNOT00000053402	-	NM_001134469	↓Lrrc49
<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036 and <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034 groups		<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034, <i>B. breve</i> CNCM I-4035 and mixture groups	
gene_assignment	Gene Symbol	gene_assignment	Gene Symbol
NM_001107673	↓Slc7a11	NM_001017502	↓Ccdc117
NM_001012174	↓Fkbp5	NM_017260	↓Alox5ap
ENSRNOT00000053268	-	NM_053566	↓Ptch1
ENSRNOT00000053276	-	NM_001009920	↓Gsta5
<i>B. breve</i> CNCM I-4035 group		NM_133583	↓Ndrp2
gene_assignment	Gene Symbol	BC088423	↓IlgG-2a
NM_033234	↑Hbb	NM_001105779	↓Nhp2
ENSRNOT00000053328	-	NM_022508	↓Mthfd1
		NM_031523	↑Klk1b3
		ENSRNOT00000058247	↓RGD1563231
		<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036, <i>B. breve</i> CNCM I-4035 and mixture groups	
gene_assignment	Gene Symbol	gene_assignment	Gene Symbol
		NM_001077589	↓Rgs16
		NM_001034125	↓Per1
		<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036 and <i>B. breve</i> CNCM I-4035 groups	
gene_assignment	Gene Symbol	gene_assignment	Gene Symbol
		ENSRNOT00000053105	-
		ENSRNOT00000052978	-
		FQ233900	-

Listed genes were selected from the microarray results based on two criteria: 1) Up- or down-regulation ≥ 1.5 -fold compared with Zucker-Lepr^{fa/fa} rats fed the placebo, and 2) expression regulated by at least two of the probiotic strains. Comparisons were made versus Zucker-Lepr^{fa/fa} rats fed the placebo. Inhibited genes appear as ↓, whereas induced genes appear as ↑. Genes lacking name or symbol are of unknown function (dash). n=4 rats per group.

Supplementary Table 3. Validation of microarray results for obese Zucker-Lepr^{fa/fa} rats that received probiotic strains

Intestinal mucosa genes (qRT-PCR)	Mixture	P value	<i>B. breve</i> CNCM I-4035	P value	<i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036	P value	<i>L. paracasei</i> CNCM I-4034	P value
Rgs16	-1.4475		-1.1794		1.3041			
Per1	-1.1103		-1.0346		-1.1194			
Slc7a11	↓-1.562	0.045			-1.5256		-1.4578	
Fkbp5					↓-1.8928	0.0061	↓-1.4582	0.0229
Alox5ap	↓-2.0045	<0.001	↓-1.7617	0.0169	-1.5037		↓-1.6926	0.0016
Ednrb	-1.2308		↓-2.2192	0.0063	-2.3345		↓-1.8782	0.0004
Adamdec1	↓-1.6176	0.0429	↓-3.3604	<0.001	↓-3.3349	<0.001	↓-2.7512	<0.001
Ptgs1	-1.2382		↓-1.6275	0.0004	-1.4031		↓-1.3756	0.006
Tlr9	-1.0266		-1.0109		1.8727	0.14	1.4146	0.0611
Naip	1.0523		↓-1.58	0.0409	1.0592		-1.32	
Nfkbia	1.0191		1.04		1.0348		1.0373	
Nfkb1	-1.003		-1.0792		1.0121		-1.12	

This table shows the fold change in gene expression as quantitated by qRT-PCR, as well as the statistical significance (*P* value) compared with Zucker-Lepr^{fa/fa} rats fed the placebo. Inhibited genes appear as ↓. n=8 rats per group.

Artículo en prensa

Title

Probiotic administration drives differential gene expression in intestinal mucosa of obese rats

Authors

Julio Plaza-Díaz^{1,2,3,#}, Cándido Robles-Sánchez^{1,2,3}, Francisco Abadía-Molina⁴, María José Sáez-Lara^{2,5}, Laura María Vilchez-Padial², Ángel Gil^{1,2,3,6}, Carolina Gómez-Llorente^{1,2,3,6} & Luis Fontana^{1,2,3,#}

Affiliations

¹Department of Biochemistry and Molecular Biology II, School of Pharmacy, University of Granada, Spain. ²Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Biomedical Research Center, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, University of Granada, Spain. ³Instituto de Investigación Biosanitaria ibs.GRANADA, Spain. ⁴Department of Cell Biology, School of Sciences, University of Granada, Spain, Biomedical Research Center, University of Granada, Spain. ⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology I, School of Sciences, University of Granada, Spain. ⁶CIBEROBN, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Corresponding author(s):

Luis Fontana and Julio Plaza-Díaz. Institute of Nutrition and Food Technology “José Mataix”, Biomedical Research Center, Parque Tecnológico Ciencias de la Salud, Laboratory 150, Avenida del Conocimiento s/n, Armilla, 18016 Granada, Spain.

E-mails: fontana@ugr.es and jrplaza@ugr.es

Phone: 34958241000, extension 20322

Abstract

In this work, we investigated whether the administration of the probiotic strains *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 modulate the expression of genes in the intestinal mucosa of obese Zucker-Lepr^{fa/fa} rats. For this purpose, over 27,000 rat genes were studied using a DNA array. We found changes in expression of 1501 genes due to the obese condition. The results of the array also showed changes in the expression of 40 genes for *L. paracasei* CNCM I-4034; 12 genes for *B. breve* CNCM I-4035; 24 genes for *L. rhamnosus* CNCM I-4036; and 3 genes for the mixture of *L. paracasei* CNCM I-4034 and *B. breve* CNCM I-4035.

Background & Summary

Metabolic syndrome, better referred to as insulin resistance syndrome (IRS), was originally defined as concomitant hyperlipidemia, hypertension, insulin resistance and obesity^{1,2}. IRS often precedes the onset of type 2 diabetes and increases the risk of cardiovascular disease^{3,4}. Accordingly, IRS has reached pandemic levels and become a major public health concern.

The Zucker rat shows many of the features of IRS; therefore, it is one of the most commonly used genetic models of this syndrome⁴. Zucker-Lepr^{fa/fa} rats exhibit obesity, hyperglycemia, insulin resistance, hypercholesterolemia, hypertriglyceridemia, and elevated serum free fatty acid concentrations in contrast to Zucker lean Lepr^{+/fa} rats. In addition, Zucker-Lepr^{fa/fa} rats have hepatic steatosis, as well as elevated serum AST and ALT activities, indicating that the liver component of IRS is also present in this model⁵.

Probiotics are live microorganisms that, when consumed in adequate amounts, confer a health effect on the host⁶. Beneficial effects of probiotics have been reported in allergy, intestinal-related diseases, chronic liver disease, urinary tract infections and respiratory infections, among others⁷. Lactobacilli and bifidobacteria are the genera most frequently used as probiotics. A variety of mechanisms underlying their beneficial effects have been

proposed: modification of the gut microbiota, competitive adherence to the mucosa and epithelium, strengthening of the gut epithelial barrier and modulation of the immune system to convey an advantage to the host⁸.

We have previously reported that the administration of three probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036) to healthy human volunteers for 30 days is totally safe⁹ and that their administration for the same period of time to Zucker-Lepr^{fa/fa} rats attenuates the accumulation of fat in the rats' liver and exerts anti-inflammatory effects such as lower serum concentrations of tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-6 and bacterial lipopolysaccharide (LPS)⁵.

This descriptor is based on the data of our recently published work¹⁰, where we investigated whether these bacterial strains may modulate the gene expression of the intestinal mucosa. For this purpose and with the help of DNA microarray technology, we began by studying the modulation of a great number of genes in intestinal mucosa samples from obese Zucker rats. Figure 1 represents the workflow scheme. Expression of three genes (*Adamdec1*, *Ednrb* and *Ptgs1/Cox1*) was up-regulated in the intestinal mucosa of the obese rats compared with that in the rats when they were still lean. Probiotic administration down-regulated expression of *Adamdec1* and *Ednrb* at the mRNA and protein levels and that of *Ptgs1/Cox1* at the mRNA level, and this effect was in part mediated by a decrease in both macrophage and dendritic cell populations. Probiotic treatment also increased secretory IgA content and diminished the LBP concentration.

Methods

These methods are expanded versions of descriptions in our related work¹⁰.

Microorganisms

The probiotic strains *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 have been characterized and are described elsewhere¹¹. These strains were deposited in the *Collection Nationale de Cultures de Microorganismes* (CNCM) of the Institute Pasteur¹¹.

Ethical statement

This study was conducted in strict accordance with the recommendations in the guidelines for animal research of the University of Granada (Spain). All animals received humane care. The protocol was approved by the Committee on the Ethics of Animal Experiments of the University of Granada (Permit Number CEEA: 2011–377).

Experimental design

Forty-eight Zucker-Lepr^{fa/fa} and 16 Zucker lean Lepr^{+/fa} male rats weighing 168–180 g were purchased from Harlan Laboratories (Charles River, Barcelona, Spain). The rats were housed in metabolic cages with a 12-h light-dark cycle and had free access to water and food. After 5 days of adaptation, 8 Zucker lean Lepr^{+/fa} and 8 Zucker-Lepr^{fa/fa} rats were euthanized as a reference (baseline). The remaining 40 Zucker-Lepr^{fa/fa} rats were then randomly assigned to receive 10¹⁰ colony-forming units (CFU) of one of the three probiotic strains, a mixture of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034 and *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035, or a placebo by oral administration each day for 30 days. An additional group of 8 Zucker lean Lepr^{+/fa} rats received the placebo for 30 days.

After the intervention, the animals were anesthetized and sedated with ketamine and xylazine. Blood was drawn from the aorta and centrifuged for 10 min at 1000 x g and 4°C to separate the serum from the cells. Samples of intestinal mucosa were also taken.

DNA microarray

We used Affymetrix Rat Gene 1.1 ST Array Plates (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA) following the manufacturer's directions. Briefly, RNA extraction was performed using the RNeasy Mini Kit and Qiacube system. A quantity of 300 mg total RNA was utilized in cDNA synthesis with the Ambion WT Expression kit, and the resulting cDNA was fragmented using uracil-DNA glycosylase and APE1 (apurinic/apyrimidinic endonuclease-1). The labeling process was performed using the WT Terminal Labeling Kit (Affymetrix) with deoxynucleotidyl transferase linked to biotin. After fragmentation, 5.5 µg cDNA was hybridized using the GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit from Affymetrix. GeneChips were scanned using the GeneTitan™. The data were analyzed with the Command Console (AGCC 3.1, Affymetrix) and the Expression Console (EE 1.1, Affymetrix). The value definition was performed using the RMA (Robust Multichip Average) signal intensity.

The intensity value of each probe in the array analysis was normalized with the Robust Multichip Average (RMA) using the Partek Genomics Suite version 6.10 (Partek) to obtain an individual intensity for each set of probes. All expression data were averaged to achieve a unique expression value for the gene, and the background was deleted. The identification of expression changes was performed using multiple regression models comparing the intensity of each gene with the interaction (Zucker lean $Lepr^{+/fa}$ or Zucker- $Lepr^{fa/fa}$ rats that received placebo versus Zucker- $Lepr^{fa/fa}$ rats that received any probiotic strain). The two-dimensional hierarchic cluster with the statistically significant sequences (n=936) appears in Figure 2, according to the intensity and the aforementioned interactions.

Data Records

The complete data set in the present study complies with the MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) requirements and was uploaded into the *Gene Expression Omnibus* (GEO) database with the title *Expression data from intestinal mucosa of Zucker rats* and reference GSE73848 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE73848>). Detailed information about each sample is in Table 1.

Technical Validation

Sample processing

Tissue samples were freeze-clamped in liquid nitrogen, and total RNA was extracted in an automatized fashion using the RNeasy Mini kit (Qiagen, Barcelona, Spain) in QIacube system (Qiagen). RNA quantity and quality were estimated in a Nanodrop and Bioanalyzer (NanoDrop Technologies, Winooski, Vermont, USA, and Agilent Genomics, Santa Clara, CA, USA, respectively).

cDNA synthesis, fragmentation and labeling

cDNA was synthesized from 300 ng of total RNA using Ambion WT Expression kit (Thermo Fisher, Carlsbad, CA, USA), following the manufacturer's directions. The main steps of the protocol were: cDNA synthesis with random primers that included the T7 promoter; *in vitro* transcription; new cDNA synthesis from the cRNA obtained in the previous step including dUTP. cDNA was fragmented with Uracil DNA Glycosylase (UDG) and Apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 (AP1), and subsequently labeled using terminal transferase and WT Terminal Labeling kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

An aliquot of each sample containing 5.5 µg of cDNA was fragmented and labeled with biotin using terminal transferase. The correct fragmentation was ensured by checking an aliquot in Bioanalyzer (Figure 3A), and the correct labeling was checked by a gel-shift assay (Figure 3B),

Hybridization and scanning of GeneChip Rat Gene 1.1 ST array.

Analysis of controls

Three quality controls were used: hybridization, labeling and sample controls:

1. Hybridization (spike) controls were probes for sequences included in the hybridization mixture, and indicate that the hybridization, washing and development steps were correct. The spike controls used were BioB, BioC, BioD and Cre. Each was included in the mixture in increasing concentrations so $\text{BioB} < \text{BioC} < \text{BioD} < \text{Cre}$. Accordingly, the intensity of each probe must be proportional to the amount of oligo present in the mixture. The way to ensure that hybridization was correct (from the preparation of the hybridization mixture to the scanning) is to represent the intensity values of each probe in all samples, which must show increasing values, proportional to the concentration. The intensity values normalized by the spike controls in all samples appear in Figure 4A. These values and the relationship among them were as expected. The absolute values are not as important as the general trend, that is, the lines must not cross.

2. Labeling controls were polyA controls. These were transcripts from *Bacillus subtilis* added in increasing concentrations to the RNA of the sample during the processing. The intensity values of each polyA control in each sample allows to check whether cDNAcRNA synthesis was correct. As was the case for spike controls, intensity values of each probe in all samples were plotted and showed an increasing trend proportional to the concentrations. The intensity values normalized for polyA controls in each of the samples analyzed appear in Figure 4B.

In this plot, an increase in the intensity of each polyA control is expected to occur as a function of the concentration. The absolute value is not as important as the general trend, that is, the lines must not cross one another. In our experiment the intensity values and the relationship among them were as expected.

3. Sample controls allowed the identification of outliers, that is, samples with a behavior - Pos_vs_neg_auc: it is a measure of the detection of the positive controls versus the false detection of the negative controls. It is a robust measure of the global quality of the data. Typical values range 0.8-0.9, being 1.0 the perfect value. In contrast, 0.5 indicates a lack of difference between positive and negative controls. Values < 0.8 indicate that the sample may be an outlier. All of our samples were acceptable as shown in Figure 4C.

- All Probe set Mean: it is a measure of the average signal of all probe sets included in the analysis. It allows the identification of arrays too bright or too dark. As shown in Figure 4D, none of the samples was an outlier.

- All Probe Set RLE Mean: the signal from each probe set is compared with the average signal of that probe set in the study. This parameter is the average of those differences for all the probe sets. Generally, high values indicate that the signals in an array are very different from the rest of the signals of the study. In this kind of array, values usually range 0.27-0.61 for studies that include samples from various tissues, and 0.1-0.23 for technical replicates. Our values were consistent (Figure 4C and 4D).

Bioinformatic analysis

Gene expression results obtained from 32 RNA samples were analyzed. The chip used was RatGene1.1ST array plate (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). The goal of the analysis was to obtain sequences differentially expressed under our experimental conditions. The bioinformatic analysis contained the following steps:

- a) Quality control of the arrays.
- b) Pre-processing of data by the RMA method.
- c) Normalization of arrays to obtain the worklist.
- d) Use of bioinformatic tools to obtain differences in gene expression.
- e) Search for metabolic pathways and ontologic processes significantly expressed from a list of significant genes (obtained in step d).

All these steps are described in more detail below.

Analysis of outliers

The quality of the arrays was ensured with the following controls:

Array Outlier: indicates the percentage of transcripts whose levels in the array are inconsistent with the levels in the rest of arrays of the experiment. The software used, dChip¹², recommends to take with precaution those samples that reach a value > 5%, and eliminate those that reach a value > 15%. According to these criteria, sample 11SE562 must be handled with precaution and its behavior will be carefully studied in the following steps (Table 2).

Relative Log Expression (RLE): Expression Console software (Affymetrix) was used to obtain RLE values in which the expression value of each probe set of each sample was normalized by a reference array. This reference array is made from the median of all the arrays for each probe set. It is assumed that most of the expression values do not change with respect to the median and, accordingly, are around 0. All samples exhibited correct RLE values (Figure 5).

Pre-processing of data

The intensity values of each probe were processed and normalized by the Robust Multichip Average (RMA) method to obtain an individual intensity value for each set of probes. Subsequently, all expression values of each exon were averaged to obtain unique expression values per gene to get a list of 29214 probe sets.

First filtering of data

Data from GeneChips were filtered to discard those sequences with hybridization signals close to background. The number of sequences that passed the filtering was 10015.

Normalization of data

The array data saved in the *.cel files were subjected to a normalization step by quantiles using the Partek Genomics Suite software (v6.10).

Second filtering of data

Finally, the 10015 sequences were filtered to discard those probes that did not show any changes in expression in all samples, based on the standard deviation of the normalized intensity data. The value used as a limit of expression change among conditions allows the elimination of those sequences that do not vary in the comparison among any sample and therefore are not informative. This filter narrowed the sequences down to 6990.

Acknowledgements

This paper will be part of Candido Robles-Sanchez's doctorate, which is being completed as part of the "Biochemistry and Molecular Biology Program" at the University of Granada, Spain. This work was funded by the company Hero Spain, S. A. (grant #3545 managed by Fundación General Empresa-Universidad de Granada) and by CEIBiotic, University of Granada, Spain (grant CEI2013P-11).

Author contributions

AG, CGL and LF contributed to the study concept and design. JPD, CRS, VMC, FAM, and MJSL participated in the acquisition of data. JPD and AG did the statistical analysis. All authors took part in the analysis and interpretation of data, the drafting of the manuscript and the critical revision of the manuscript. AG, CGL and LF obtained funding. JPD and LF wrote the manuscript.

Competing interests

The authors disclose no conflicts.

References

- 1 Reaven, G. M. Role of insulin resistance in human disease. *Diabetes* **37**, 1595–1607 (1988).
- 2 Reaven, G. M. The metabolic syndrome or the insulin resistance syndrome? Different names, different concepts, and different goals. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* **33**, 283–303 (2004).
- 3 Lakka, H. M. *et al.* The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* **288**, 2709–2716 (2002).
- 4 Kahn, R. *et al.* The metabolic syndrome: time for a critical appraisal: joint statement from the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* **28**, 2289–2304 (2005).
- 5 Plaza-Díaz, J. *et al.* Effects of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 on hepatic steatosis in Zucker Rats. *PLOS ONE* **9**, e98401 (2014).
- 6 Guarner, F. & Schaafsma, G. J. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **39**, 237–238 (1998).
- 7 Fontana, L., Bermúdez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S. & Gil, A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br. J. Nutr.* **109**, S35–50 (2013).
- 8 Bermúdez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C. & Gil, A. Probiotic mechanism of action. *Ann. Nutr. Metab.* **61**, 160–174 (2012).
- 9 Plaza-Díaz, J. *et al.* Safety and immunomodulatory effects of three probiotic strains isolated from the feces of breast-fed infants in healthy adults: SETOPROB study. *PLOS ONE* **8**, e78111 (2013).
- 10 Plaza-Díaz, J. *et al.* *Adamdec1*, *Ednrb* and *Ptgs1/Cox1*, inflammation genes upregulated in the intestinal mucosa of obese rats, are downregulated by three probiotic strains. *Sci. Rep.* **7**: 1939 (2017).
- 11 Muñoz-Quezada, S. *et al.* Isolation, identification and characterisation of three novel probiotic strains (*Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036). *Int. J. Food Microbiol.* **128**, 10–18 (2015).
- 12 Li, C. & Wong, W.H. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: expression index computation and outlier detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**, 31–6 (2001).

Data citations

Gene Expression Omnibus GSE73848 (2016).

Figure legends

Figure 1. Workflow scheme. The number of rats from which high quality RNA was obtained is shown for each condition tested. Abbreviations: ZL, Zucker lean $Lepr^{+/fa}$ rats; ZO, Zucker $Lepr^{fa/fa}$ rats.

Figure 2. Microarray results obtained with the Rat Gene 1.1 ST Array Plate (Affymetrix®). These results were uploaded to the Gene Expression Omnibus (GEO) platform as "GSE73848 Expression data from intestinal mucosa of Zucker rats." Abbreviations: ZL, Zucker lean $Lepr^{+/fa}$ rats; ZO, Zucker $Lepr^{fa/fa}$ rats; Mixture, *L. paracasei* CNCM I-4034 plus *B. breve* CNCM I-4035 strains. n=4 rats per group.

Figure 3. Fragmentation of cDNAs. A, Bioanalyser. B, gel-shift assay.

Figure 4. Quality control assessment for microarrays of the RNA samples from intestinal mucosa. A, Hybridization controls. B, Labeling controls with transcripts from *Bacillus subtilis*. C and D, Array outliers. **Pos_vs_neg_auc** is a measure of the detection of the positive controls vs. false detection of the negative controls. It is a robust measure of the global quality of the data. Typical values range 0.8-0.9, being 1.0 the perfect value. In contrast, 0.5 indicates a lack of difference between positive and negative controls. Values < 0.8 indicate that the sample may be an outlier. **All Probe set Mean** is a measure of the average signal of all probe sets included in the analysis. It allows the identification of arrays too bright or too dark. **All Probe Set RLE Mean:** the signal from each probe set is compared with the average signal of that probe set in the study. This parameter is the average of those differences for all the probe sets. Generally, high values indicate that the signals in an array are very different from the rest of the signals of the study. In this kind of array, values usually range 0.27-0.61 for studies that include samples from various tissues, and 0.1-0.23 for technical replicates. Abbreviations: RLE, relative log expression.

Figure 5. Relative log expression signal graph. This reference array is made from the median of all the arrays for each probe set. It is assumed that most of the expression values do not change with respect to the median and, accordingly, are around 0.

RESULTADOS

Table 1. Data description of "Expression data from intestinal mucosa of Zucker rats"

GEO-ID	organism	tissue	Sample description	analysis
GSM1904446	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZL reference	Microarray
GSM1904447	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZL reference	Microarray
GSM1904448	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO reference	Microarray
GSM1904449	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO reference	Microarray
GSM1904450	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZL placebo	Microarray
GSM1904451	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZL placebo	Microarray
GSM1904452	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO placebo	Microarray
GSM1904453	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO placebo	Microarray
GSM1904454	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO <i>B. breve</i> CNCM I-4035 and <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034 rat 1	Microarray
GSM1904455	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO <i>B. breve</i> CNCM I-4035 and <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034 rat 2	Microarray
GSM1904456	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO <i>B. breve</i> CNCM I-4035 rat 1	Microarray
GSM1904457	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO plus <i>B. breve</i> CNCM I-4035 rat 2	Microarray
GSM1904458	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO plus <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034 rat 1	Microarray
GSM1904459	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO plus <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034 rat 2	Microarray
GSM1904460	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO plus <i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036 rat 1	Microarray
GSM1904461	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO plus <i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036 rat 2	Microarray
GSM1904462	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZL reference	Microarray
GSM1904463	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZL reference	Microarray
GSM1904464	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO reference	Microarray
GSM1904465	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO reference	Microarray
GSM1904466	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZL placebo	Microarray
GSM1904467	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZL placebo	Microarray
GSM1904468	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO placebo	Microarray

8

GSM1904469	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO placebo	Microarray
GSM1904470	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO <i>B. breve</i> CNCM I-4035 and <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034 rat 3	Microarray
GSM1904471	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO plus <i>B. breve</i> CNCM I-4035 and <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034 rat 4	Microarray
GSM1904472	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO plus <i>B. breve</i> CNCM I-4035 rat 3	Microarray
GSM1904473	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO plus <i>B. breve</i> CNCM I-4035 rat 4	Microarray
GSM1904474	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO plus <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034 rat 3	Microarray
GSM1904475	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO plus <i>L. paracasei</i> CNCM I-4034 rat 4	Microarray
GSM1904476	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO plus <i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036 rat 3	Microarray
GSM1904477	<i>Rattus norvegicus</i>	intestinal mucosa	ZO plus <i>L. rhamnosus</i> CNCM I-4036 rat 4	Microarray

Abbreviations: ZL, Zucker lean Lepr^{+/+} rats; ZO, Zucker Lepr^{+/+} rats. n=4 rats per group.

9

Table 2. Array quality control percentage

Sample	% Array outlier	Sample	% Array outlier
11SE560	3.305	11SE576	0.23
11SE561	0.271	11SE577	0.254
11SE562	6.853	11SE578	0.274
11SE563	0.192	11SE579	0.237
11SE564	0.394	11SE580	0.405
11SE565	0.329	11SE581	0.281
11SE566	0.291	11SE582	0.254
11SE567	0.339	11SE583	0.298
11SE568	0.312	11SE584	0.35
11SE569	0.668	11SE585	0.422
11SE570	0.312	11SE586	0.35
11SE571	0.35	11SE587	0.405
11SE572	0.302	11SE588	0.566
11SE573	0.298	11SE589	0.291
11SE574	0.288	11SE590	0.247
11SE575	0.247	11SE591	0.226

Percentage of transcripts whose levels in the array are inconsistent with the levels in the rest of arrays of the experiment.

DISCUSIÓN

Nuestro grupo de investigación ha descrito el aislamiento de tres cepas probióticas a partir de las heces de recién nacidos a término y alimentados de forma exclusiva con leche materna. Las cepas se seleccionaron en base a sus propiedades, tales como la adhesión a la mucosidad intestinal, la sensibilidad a antibióticos y la resistencia a las sales biliares y al pH muy ácido, y se identificaron como *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 (Muñoz-Quezada *et al.*, 2013). En trabajos previos hemos demostrado que son seguras tanto en ratones (Muñoz-Quezada *et al.*, 2013), como en humanos (Plaza-Díaz *et al.*, 2013).

En el presente trabajo investigamos si las tres cepas modulan la expresión de genes intestinales de ratas obesas Zucker-Lepr^{fa/fa}. Para ello utilizamos un *array* de DNA que contenía más de 27000 genes y recurrimos a técnicas de qRT-PCR, western blot e inmunofluorescencia para su validación. El análisis de los resultados nos permitió comprobar que hubo efectos debidos tanto a la administración de los probióticos como al fenotipo obeso, es decir, al comparar las ratas Zucker-Lepr^{fa/fa} de referencia (cuando aún eran delgadas) con las ratas Zucker-Lepr^{fa/fa} tras 30 días de administración de placebo.

Los principales hallazgos de esta tesis doctoral fueron:

1. la inducción de los genes *Adamdec1*, *Ednrb* y *Ptgs1/Cox1* en la mucosa intestinal de las ratas obesas Zucker en comparación con sus controles delgados; y
2. la represión de dos de esos genes, *Adamdec1* y *Ednrb*, en la mucosa intestinal de las ratas obesas Zucker tratadas con *L. paracasei* CNCM I-4034, *B. breve* CNCM I-4035 y *L. rhamnosus* CNCM I-4036 durante 30 días en comparación con ratas obesas que recibieron un placebo durante el mismo tiempo. La represión tuvo lugar a nivel de mRNA y proteína.

Los resultados del *array* mostraron cambios en la expresión de 40 genes para *L. paracasei* CNCM I-4034; 12 genes para *B. breve* CNCM I-4035; 24 genes para *L. rhamnosus* CNCM I-4036; y 3 genes para la mezcla de *L. paracasei* CNCM I-4034 y *B. breve* CNCM I-4035. De todos esos genes descartamos aquellos cuya expresión 1) no variara (tanto inducción como represión) $\geq 1,5$ veces en comparación con ratas Zucker-Lepr^{fa/fa} que recibieron placebo, y 2) no fuera modulada por al menos dos de nuestras

cepas de estudio. Con estos criterios resultaron candidatos *Adamdec1*, *Ednrb* y *Ptgs1/Cox1*.

ADAMDEC1 es miembro de la familia ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteinase*) y su expresión está disminuida en aproximadamente el 10% de los pacientes afectados de enfermedad de Crohn. Esta proteína se encuentra de forma casi exclusiva en macrófagos y células dendríticas de la lámina propia del intestino delgado y grueso. Aunque como proteasa su función principal es la de reparación tisular, se ha establecido que participa en la inmunidad. Así, se ha descrito que la inactivación de este gen en ratones *Adamdec1*^{-/-} los vuelve más susceptibles a la colitis química por sulfato de dextrano (SDS) o bacteriana por infección con *Citrobacter rodentium* o *Salmonella typhimurium*, tal como se evidencia por una mayor infiltración de neutrófilos, secreción de IL-6 y IL-1β, pérdida de peso y mortalidad (O'Shea *et al.*, 2016). En ausencia de *Adamdec1*, se encontró una mayor presencia de *Citrobacter rodentium* en el bazo, lo que apunta a un deterioro de la inmunidad de la mucosa que deriva en una bacteremia (aumento de bacterias presentes). Aunque en principio estos resultados parecen contradictorios a los nuestros, hay que tener en cuenta que en el modelo de ratón *Adamdec1*^{-/-} el gen ha sido inactivado, situación muy diferente a la de la rata Zucker. El trabajo de O'Shea *et al.* demuestra el papel de *Adamdec1* en la inmunidad. Sin embargo, un estado inflamatorio en el intestino, como el que se desarrolla en la obesidad, se caracteriza por un aumento en el número de macrófagos y células dendríticas. Nosotros encontramos una mayor expresión de marcadores de estos dos tipos celulares en la mucosa intestinal de las ratas obesas, lo que puede explicar la inducción observada de *Adamdec1*. La administración de probióticos disminuyó el número de macrófagos y células dendríticas, por tanto, atenuó la inflamación.

La familia de la endotelina (ET) incluye tres péptidos de 21 aminoácidos cada uno (ET-1, ET-2, and ET-3), que actúan a través de la activación de receptores acoplados a proteínas G. Estos receptores parecen tener funciones relevantes en la hipertensión pulmonar y arterial, la aterosclerosis, los vasoespasmos cerebrales y las señales inflamatorias como el edema, la fiebre, el dolor y el reclutamiento de leucocitos (Zarpelon *et al.*, 2012). Ratones *knock-out* para el receptor B de la endotelina (*Ednrb*^{-/-}) desarrollan la enfermedad de Hirschsprung, una anomalía del sistema nervioso entérico caracterizada por una ausencia de células ganglionares a lo largo de una zona variable del intestino distal, lo que se traduce en la ausencia de peristalsis en el segmento

afectado y en dilatación del colon proximal (Yildiz *et al.*, 2015). La enfermedad se asocia con una inflamación severa de la mucosa intestinal. Yildiz *et al.* investigaron las propiedades de la barrera mucosa del colon proximal de los ratones *Ednrb*^{-/-} y encontraron que tanto el transporte pasivo como el activo (mediante los cuales partículas y microbios se movilizan a través de la mucosa, respectivamente) están disminuidos en comparación con los ratones controles (*wild-type*). Como en el caso de *Adamdec1*, es probable que *Ednrb* se indujera en la mucosa inflamada de las ratas obesas y las cepas de probióticos ejercieran un efecto antiinflamatorio a través de la disminución del número de macrófagos y células dendríticas. El contenido superior de IgA secretora que encontramos en las ratas obesas tratadas con probióticos en comparación con las que recibieron placebo apoya el mencionado efecto antiinflamatorio de nuestras cepas.

La administración de probióticos también produjo una disminución de los niveles de mRNA de un gen implicado en la síntesis de prostaglandinas, *Ptgs1/Cox1*. La ciclooxigenasa (COX)-1 es miembro de la familia de mieloperoxidasas y está presente en algunas células como los macrófagos y las hematopoiéticas, que regulan la respuesta inflamatoria (Saraswathi *et al.*, 2013). Se han identificado dos isoformas de COX: COX-2 es la forma inducible y COX-1 es constitutiva. Por esta razón no sorprende que el tratamiento con probióticos no afectara a los niveles proteicos de *Ptgs1/Cox1*.

Además de los descritos, nuestras cepas ejercieron otros efectos protectores: un aumento de la concentración de IgA secretora en el intestino y una disminución de la concentración LBP en el suero. Este último resultado se correlaciona con los menores niveles de LPS que también encontramos en el suero de las ratas obesas tratadas con nuestras cepas de estudio y que hemos publicado con anterioridad (Plaza-Diaz *et al.*, 2014). Por lo que se refiere a la IgA secretora, resultados similares se han descrito en sujetos sanos (Plaza-Diaz *et al.*, 2013).

La expresión de seis genes cambió cuando las ratas se volvieron obesas. Tres genes resultaron inducidos y otros tres inhibidos (*Adamdec1*, *Ednrb* y *Ptgs1/Cox1*). Dado que los niveles de proteínas codificadas por estos genes no se modificaron en las ratas delgadas (Zucker lean *Lepr*^{+/*fa*}) tras la administración del placebo durante 30 días pero sí lo hicieron (3, 5 y 2,5 veces, respectivamente) en las ratas obesas Zucker-*Lepr*^{*fa/fa*}, esto sugiere que la inducción se debió a la condición de obesidad.

Basándonos en los resultados obtenidos en esta tesis doctoral, así como en resultados previos de nuestro grupo de investigación, proponemos un mecanismo por el cual las cepas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 ejercen sus efectos beneficiosos (Figura 23):

La administración de las tres cepas de estudio durante un periodo de 30 días produce cambios en la composición de la microbiota intestinal de los animales (Plaza-Díaz *et al.*, 2013; Plaza-Díaz *et al.*, 2015), lo que da lugar a una mayor secreción de IgA (Plaza-Díaz *et al.*, 2013), y a una represión de los genes *Adamdec1* y *Ednrb*. Los efectos comentados resultarían en una menor translocación bacteriana en el intestino y, en consecuencia, en una menor concentración de LPS-LBP en el suero. Habría, por tanto, un menor impacto de LPS sobre el hígado, lo que mejoraría la esteatosis (Plaza-Díaz *et al.*, 2014); y sobre el tejido adiposo blanco. Estos dos órganos responderían disminuyendo la producción de IL-6 y TNF- α . De hecho, hemos descrito que la administración de estas cepas de probióticos reducen las concentraciones séricas de estas dos citoquinas en el mismo modelo de ratas Zucker (Plaza-Díaz *et al.*, 2014).

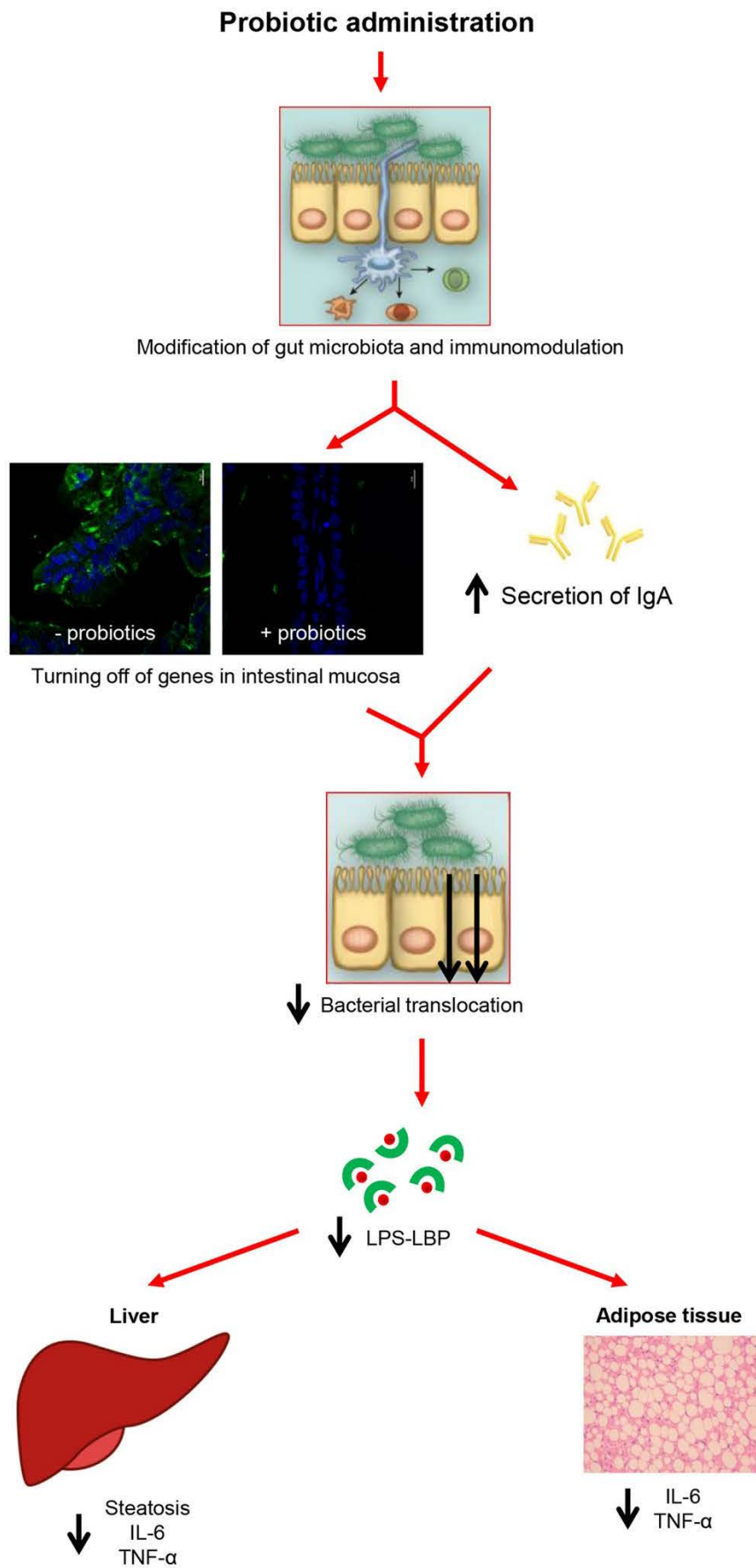


Figura 23 Posible mecanismo de acción de *L. paracasei* CNCM I-4034, *B. breve* CNCM I-4035 y *L. rhamnosus* CNCM I-4036. LPS: Lipopolisacárido. LBP: Proteína de unión al LPS

Existen multitud de trabajos que avalan este mecanismo. Sin ánimo de ser exhaustivos, a continuación se citan algunos para apoyar la secuencia de eventos:

- Son numerosos los estudios que describen cambios en la microbiota intestinal por efecto de probióticos (Brahe *et al.*, 2016). Por ejemplo, recientemente Wang *et al.* han descrito que el consumo de una dieta con un alto contenido en grasa (HFD) altera la microbiota intestinal de ratones y que la administración de probióticos la corrige de forma que los animales presentan una microbiota semejante a la de ratones alimentados con una dieta de contenido adecuado de grasa.
- Una mayor secreción de IgA atribuible a la administración de probióticos ha sido descrita por (Kemgang *et al.*, 2016).
- Además de los estudios de Dykstra *et al.* (2011) y de Ohtsuka *et al.* (2012) mencionados con anterioridad, se puede citar el de Tannock *et al.* (2014) como ejemplo de modulación génica por probióticos. Estos autores han descrito la inducción de tres genes relacionados con la apoptosis en el intestino delgado de ratones tratados con *L. rhamnosus* HN001.
- La menor translocación bacteriana podría deberse a una mayor integridad de la barrera intestinal. Balakumar *et al.* (2016) han descrito recientemente aumentos en la transcripción de ocludina y zonula ocludens-1 en ratones obesos por alimentación con HFD que además recibieron tratamiento con *L. rhamnosus* GG, *L. plantarum* MTCC5690 y *L. fermentum* MTCC5689. Del mismo modo, se ha demostrado que los sobrenadantes de cultivos de *Faecalibacterium prausnitzii* y *Escherichia coli* Nissle 1917 aumentan la profundidad de las criptas del yeyuno de ratas con mucositis inducida por 5-fluorouracilo (Wang *et al.*, 2017).
- Se han descrito dos cepas de *Lactobacillus* que disminuyen el LPS circulante en ratas alimentadas con HFD (Tian *et al.*, 2016).
- Son numerosos los trabajos que describen una atenuación de la esteatosis hepática por efecto de probióticos en ratones y ratas (Cani *et al.*, 2015), así como la modulación de la producción de citoquinas. De hecho, nuestro grupo ha descrito con anterioridad que estas cepas disminuyen las concentraciones de

citoquinas proinflamatorias en voluntarios sanos (Plaza-Diaz *et al.*, 2013), ratas obesas Zucker (Plaza-Diaz *et al.*, 2014), y en cultivos de células dendríticas (Bermúdez-Brito *et al.*, 2013).

CONCLUSIONES

1. La administración de las cepas probióticas *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 y *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 durante 30 días modificó la expresión de genes de la mucosa intestinal de ratas Zucker-Lepr^{fa/fa}. En concreto, la mezcla de *L. paracasei* CNCM I-4034 y *B. breve* CNCM I-4035 moduló la expresión de 162 genes; *B. breve* CNCM I-4035 moduló 211 genes; *L. paracasei* CNCM I-4034, 663 genes; y *L. rhamnosus* CNCM I-4036, 404 genes.
2. De los genes mencionados, en esta tesis nos hemos centrado en tres que están implicados en diversos procesos, entre ellos la inflamación, *Adamdec1*, *Ednrb* y *Ptgs1/Cox1*, basándonos en dos criterios: que su expresión fuera modificada por al menos dos de las cepas y que la variación en su expresión fuera $\geq 1,5$ veces en comparación con ratas que recibieron placebo. Las tres cepas de estudio disminuyeron la expresión intestinal de *Adamdec1* y *Ednrb* a nivel de mRNA y de proteínas, y la de *Ptgs1/Cox1* a nivel de mRNA.
3. La expresión de seis genes cambió cuando las ratas se volvieron obesas. Tres genes resultaron inducidos y otros tres, precisamente *Adamdec1*, *Ednrb* y *Ptgs1/Cox1*, inhibidos. Dado que los niveles de proteínas codificadas por estos genes no se modificaron en las ratas delgadas (Zucker lean Lepr^{+/fa}) tras la administración del placebo durante 30 días pero sí lo hicieron en las ratas obesas Zucker-Lepr^{fa/fa}, esto sugiere que la inducción se debió a la condición de obesidad.
4. Las tres cepas probióticas de estudio ejercieron efectos antiinflamatorios adicionales. En concreto, aumentaron la concentración de IgA secretora intestinal y disminuyeron la concentración de la proteína transportadora de lipopolisacárido bacteriano (LPS) en el suero.
5. Es necesario llevar a cabo estudios futuros para investigar el resto de genes cuya expresión se modificó por la condición de obesidad o por los probióticos, cuestión que no ha podido ser abordada en este trabajo de tesis.

BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

Abbot EL, Smith WD, Siou GP, Chiriboga C, Smith RJ, Wilson JA, Hirst BH, Kehoe MA. Pili mediate specific adhesion of *Streptococcus pyogenes* to human tonsil and skin. *Cell Microbiol* 2007; 9: 1822-1833.

Abreu MT, Arditi M. Innate immunity and toll-like receptors: clinical implications of basic science research. *J Pediatr* 2004; 144: 421-429.

Abreu MT, Fukata M, Arditi M. TLR signaling in the gut in health and disease. *J Immunol* 2005; 174: 4453-4460

Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001; 167: 1609-1616.

Acharya MR, Shah RK. Selection of human isolates of Bifidobacteria for their use as probiotics. *Appl Biochem Biotechnol* 2002; 102-103: 81-98.

Actis GC. The gut microbiome. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2014; 13: 217-223

Al Atya AK, Abriouel H, Kempf I, Jouy E, Auclair E, Vachée A, Drider D. Effects of Colistin and Bacteriocins Combinations on the In Vitro Growth of *Escherichia coli* Strains from Swine Origin. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2016; 8: 183-190.

Al Kassaa I, Hober D, Hamze M, Chihib NE, Drider D. Antiviral potential of lactic acid bacteria and their bacteriocins. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2014; 6: 177-185

Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66: 2001-2005.

Alberti K, Zimmet P & Consultation W. Definition diagnosis and classification of diabetes mellitus and its complications. Part 1: Diagnosis and classification of diabetes mellitus, provisional report of a WHO consultation. *Diabetic Med* 1998; 15: 539-553.

Alfaleh K, Anabrees J, Bassler D, Al-Kharfi T. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; (3): CD005496.

Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (11): CD003048.

Aller R, De Luis DA, Izaola O, Conde R, Gonzalez Sagrado M, Primo D, De La Fuente B, Gonzalez J. Effect of a probiotic on liver aminotransferases in nonalcoholic fatty liver disease patients: a double blind randomized clinical trial. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2011; 15: 1090-1095.

Alokail MS, Sabico S, Al-Saleh Y, Al-Daghri NM, Alkharfy KM, Vanhoutte PM, McTernan PG. Effects of probiotics in patients with diabetes mellitus type 2: study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Trials* 2013; 14: 195

Alvarez CS, Badia J, Bosch M, Giménez R, Baldomà L. Outer Membrane Vesicles and Soluble Factors Released by Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and Commensal ECOR63 Enhance Barrier Function by Regulating Expression of Tight Junction Proteins in Intestinal Epithelial Cells. *Front Microbiol* 2016; 7: 1981

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 1995; 59: 143-169.

Anderson JP, Mueller JL, Misaghi A, Anderson S, Sivagnanam M, Kolodner RD, Hoffman HM. Initial description of the human NLRP3 promoter. *Genes Immun* 2008; 9: 721-726.

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

Anderson RC, Ulluwishewa D, Young W, Ryan LJ, Henderson G, Meijerink M, Maier E, Wells JM, Roy NC. Human oral isolate *Lactobacillus fermentum* AGR1487 induces a pro-inflammatory response in germ-free rat colons. *Sci Rep* 2016; 6: 20318.

Arai T, Obuchi S, Eguchi K, Seto Y. In vitro investigation of molecules involved in *Lactobacillus gasseri* SBT2055 adhesion to host intestinal tract components. *J Appl Microbiol* 2016; 120: 1658-1667

Arbolea S, Binetti A, Salazar N, Fernández N, Solís G, Hernández-Barranco A, Margolles A, de Los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M. Establishment and development of intestinal microbiota in preterm neonates. *FEMS Microbiol Ecol* 2012; 79: 763-772.

Arbulu S, Jiménez JJ, Gútiérrez L, Campanero C, Del Campo R, Cintas LM, Herranz C, Hernández PE. Evaluation of bacteriocinogenic activity, safety traits and biotechnological potential of fecal lactic acid bacteria (LAB), isolated from Griffon Vultures (*Gyps fulvus* subsp. *fulvus*). *BMC Microbiol* 2016; 16: 228.

Arena MP, Silvain A, Normanno G, Grieco F, Drider D, Spano G, Fiocco D. Use of *Lactobacillus plantarum* Strains as a Bio-Control Strategy against Food-Borne Pathogenic Microorganisms. *Front Microbiol* 2016; 7: 464.

Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of *Lactobacilli* isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 1551-1558.

Asarat M, Apostolopoulos V, Vasiljevic T, Donkor O. Short-chain fatty acids produced by synbiotic mixtures in skim milk differentially regulate proliferation and cytokine production in peripheral blood mononuclear cells. *Int J Food Sci Nutr* 2015; 66: 755-765.

Asemi Z, Jazayeri S, Najafi M, Samimi M, Mofid V, Shidfar F, Shakeri H, Esmailzadeh A. Effect of daily consumption of probiotic yogurt on oxidative stress in pregnant women: a randomized controlled clinical trial. *Ann Nutr Metab* 2012; 60: 62-68.

Audisio MC, Benítez-Ahrendts MR. *Lactobacillus johnsonii* CRL1647, isolated from *Apis mellifera* L. bee-gut, exhibited a beneficial effect on honeybee colonies. *Benef Microbes* 2011; 2: 29-34.

Ayabe T, Satchell DP, Wilson CL, Parks WC, Selsted ME, Ouellette AJ. Secretion of microbicidal alpha-defensins by intestinal Paneth cells in response to bacteria. *Nat Immunol* 2000; 1: 113-118.

Ayeni FA, Sánchez B, Adeniyi BA, de Los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Ruas-Madiedo P. Evaluation of the functional potential of *Weissella* and *Lactobacillus* isolates obtained from Nigerian traditional fermented foods and cow's intestine. *Int J Food Microbiol* 2011; 147: 97-104.

Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307: 1915-1920

Backhed F., Ding H., Wang T., Hooper L.V., Koh G.Y., Nagy A., et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci* 2004; 101: 15718-15723.

Backhed F., Ley R.E., Sonnenburg J.L., Peterson D.A., Gordon J.I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307: 1915-1920.

Backhed F., Manchester J.K., Semenkovich C.F., Gordon J.I. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104: 979-984.

Bagheripoor-Fallah N, Mortazavian A, Hosseini H, Khoshgozaran-Abras S, Rad AH. Comparison of molecular techniques with other methods for identification and enumeration of probiotics in fermented milk products. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2015; 55: 396-413.

Bals R, Wilson JM. Cathelicidins--a family of multifunctional antimicrobial peptides. *Cell Mol Life Sci* 2003; 60: 711-720.

Balakumar M, Prabhu D, Sathishkumar C, Prabu P, Rokana N, Kumar R, Raghavan S, Soundarajan A, Grover S, Batish VK, Mohan V, Balasubramanyam M. Improvement in glucose tolerance and insulin sensitivity by probiotic strains of Indian gut origin in high-fat diet-fed C57BL/6J mice. *Eur J Nutr*. 2016 Oct 18. In press.

Bartlett JA, Fischer AJ, McCray PB Jr. Innate immune functions of the airway epithelium. *Contrib Microbiol* 2008; 15: 147-163.

Bauernfeind F, Ablasser A, Bartok E, Kim S, Schmid-Burgk J, Cavlar T, Hornung V. Inflammasomes: current understanding and open questions. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68: 765-783.

Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, Fernandes-Alnemri T, Wu J, Monks BG, Fitzgerald KA, Hornung V, Latz E. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* 2009; 183: 787-791.

Bauserman M, Michail S. The use of *Lactobacillus GG* in irritable bowel syndrome in children: a double-blind randomized control trial. *J Pediatr* 2005; 147: 197-201.

Beachey EH. Bacterial adherence: adhesinreceptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis* 1981; 143: 325-345.

Becker HM, Apladas A, Scharl M, Fried M, Rogler G. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 and commensal *E. coli* K12 differentially affect the inflammasome in intestinal epithelial cells. *Digestion* 2014; 89: 110-118.

Beerens H (1990) An elective and selective isolation medium for *Bifidobacterium* spp. *Lett Appl Microbiol* 1990; 11: 155-157.

Bell CG, Walley AJ, Froguel P. The genetics of human obesity. *Nat Rev Genet* 2005; 6: 221-234.

Ben Taheur F, Kouidhi B, Fdhila K, Elabed H, Ben Slama R, Mahdouani K, Bakhrouf A, Chaieb K. Anti-bacterial and anti-biofilm activity of probiotic bacteria against oral pathogens. *Microb Pathog* 2016; 97: 213-220.

Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* 2012; 61: 160-174.

Bernaola Aponte G, Bada Mancilla CA, Carreazo Pariasca NY, Rojas Galarza RA. Probiotics for treating persistent diarrhoea in children. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; (11): CD007401.

Bierbaum G, Sahl HG. Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol* 2009; 10: 2-18.

Biswas A, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi KS. Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity. *J Mol Med (Berl)* 2012; 9: 15-24.

Blum HE. The human microbiome. *Adv Med Sci* 2017; 62: 414-420.

Borchers AT, Selmi C, Meyers FJ, Keen CL, Gershwin ME. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol* 2009; 44: 26-46.

Bosch M, Rodriguez M, Garcia F, Fernández E, Fuentes MC, Cuñé J. Probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* CECT 7315 and CECT 7316 isolated from faeces of healthy children. *Lett Appl Microbiol* 2012; 54: 240-246.

Boyle RJ, Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, Murrell DF, Tang ML. Probiotics for the treatment of eczema: a systematic review. *Clin Exp Allergy* 2009; 39: 1117-1127.

Braga TD, da Silva GA, de Lira PI, de Carvalho Lima M. Efficacy of *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus casei* oral supplementation on necrotizing enterocolitis in very-low-birth-weight preterm infants: a double-blind, randomized, controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2011;93: 81-86

Brahe LK, Astrup A, Larsen LH. Can We Prevent Obesity-Related Metabolic Diseases by Dietary Modulation of the Gut Microbiota? *Adv Nutr* 2016; 7: 90-101.

Bron PA, Kleerebezem M, Brummer RJ, Cani PD, Mercenier A, MacDonald TT, Garcia-Ródenas CL, Wells JM. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *Br J Nutr* 2017; 117: 93-107.

Brufau MT, Campo-Sabariz J, Carné S, Ferrer R, Martín-Venegas R. Salmosan, a β -galactomannan-rich product, in combination with *Lactobacillus plantarum* contributes to restore intestinal epithelial barrier function by modulation of cytokine production. *J Nutr Biochem* 2017; 41: 20-24.

Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 8344-8351.

Butel MJ. Probiotics, gut microbiota and health. *Med Mal Infect* 2014; 44: 1-8.

Caballero-Franco C, Keller K, De Simone C, Chadee K. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2007; 292: G315-G322.

Calvani R, Miccheli A, Capuani G, Tomassini Miccheli A, Puccetti C, Delfini M, Iaconelli A, Nanni G, Mingrone G. Gut microbiome-derived metabolites characterize a peculiar obese urinary metabotype. *Int J Obes* 2010; 34: 1095-1098.

Candela M, Bergmann S, Vici M, Vitali B, Turrone S, Eikmanns BJ, Hammerschmidt S, Brigidi P. Binding of human plasminogen to *Bifidobacterium*. *J Bacteriol* 2007; 189: 5929-5936.

Candela M, Biagi E, Centanni M, Turrone S, Vici M, Musiani F, Vitali B, Bergmann S, Hammerschmidt S, Brigidi P. *Bifidobacterium* enolase, a cell surface receptor for human plasminogen involved in the interaction with the host. *Microbiology* 2009; 155: 3294-3303.

Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M, Brigidi P. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol* 2008; 125: 286-292.

Cañete R, Aguilera CM, Gil-Campos M, Gil A. Development of insulin resistance and its relation to diet in the obese child. *Eur J Nutr* 2007; 46: 181-187.

Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007a; 56: 1761-1772.

Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, Waget A, Neyrinck AM, Delzenne NM, et al. Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008a; 57: 1470-1481.

Cani PD, Delzenne NM, Amar J, Burcelin R. Role of gut microflora in the development of obesity and insulin resistance following high-fat diet feeding *Pathol Biol (Paris)* 2008b; 56: 305-309 .

Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, Knauf C, Burcelin RG, Tuohy KM, et al. Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 2007b; 50: 2374-2383.

Cantarel BL, Lombard V, Henrissat B. Complex carbohydrate utilization by the healthy human microbiome. *PLoS One* 2012; 7: e28742.

Carasi P, Ambrosio NM, De Antoni GL, Bressollier P, Urdaci MC, Serradell Mde L. Adhesion properties of potentially probiotic *Lactobacillus kefir* to gastrointestinal mucus. *J Dairy Res* 2014; 81: 16-23.

Carvalho FA, Aitken JD, Vijay-Kumar M, Gewirtz AT. Toll-like receptor-gut microbiota interactions: perturb at your own risk! *Annu Rev Physiol* 2012; 74: 177-198.

Castillo NA, Perdigon G, De Moreno de Le Blanc A. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol* 2011; 11: 177-189.

Cencič A and Langerholc T. Functional cell models of the gut and their applications in food microbiology – A review. *Int J Food Microbiol* 2010; 141: S4-S14.

Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 1998; 84: 759-768.

Chauvière G, Coconnier MH, Kernéis S, Fourniat J, Servin AL. Adhesion of human *Lactobacillus acidophilus* strain LB to human enterocyte-like Caco-2 cells. *J Gen Microbiol* 1992; 138: 1689-1696.

Chen G, Shaw MH, Kim YG, Nuñez G. NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 365-398

Chenoll E, Casinos B, Bataller E, Astals P, Echevarría J, Iglesias JR, Balbarie P, Ramón D, Genovés S. Novel probiotic *Bifidobacterium bifidum* CECT 7366 strain active against the pathogenic bacterium *Helicobacter pylori*. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 1335-1343.

Chiu Y, Tsai J, Lin S, Chotirosvakin C, Lin M. Characterisation of bifidobacteria with immunomodulatory properties isolated from human breast milk. *Journal of Functional Foods* 2014; 7: 700-708.

Cho JJ, Lee NK, Hahm YT. Characterization of *Lactobacillus* spp. isolated from the feces of breast-feeding piglets. *J Biosci Bioeng* 2009; 108: 194-198.

Chu H, Kang S, Ha S, Cho K, Park SM, Han KH, Kang SK, Lee H, Han SH, Yun CH, Choi Y. *Lactobacillus acidophilus* expressing recombinant K99 adhesive fimbriae has an inhibitory effect on adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbiol Immunol* 2005; 49: 941-948.

Chu W, Lu F, Zhu W, Kang C. Isolation and characterization of new potential probiotic bacteria based on quorum-sensing system. *J Appl Microbiol* 2011; 110: 202-208.

Čitar M, Hacin B, Tompa G, Štampelj M, Rogelj I, Dolinšek J, Narat M, Matijašić BB. Human intestinal mucosa-associated *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with probiotic properties modulate IL-10, IL-6 and IL-12 gene expression in THP-1 cells. *Benef Microbes* 2015; 6: 325-336.

Claesson MJ, Cusack S, O'Sullivan O, Greene-Diniz R, de Weerd H, Flannery E, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 4586–4591.

Claesson MJ, Jeffery IB, Conde S, Power SE, O'Connor EM, Cusack S, et al. Gut microbiota composition correlates with diet and health in the elderly. *Nature* 2012; 488: 178–184.

Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 2012; 148: 1258-1270.

Coconnier MH, Bernet MF, Chauvière G, Servin AL. Adhering heat-killed human *Lactobacillus acidophilus*, strain LB, inhibits the process of pathogenicity of diarrhoeagenic bacteria in cultured human intestinal cells. *J Diarrhoeal Dis Res* 1993; 11: 235-242.

Coconnier MH, Klaenhammer TR, Kernéis S, Bernet MF, Servin AL. Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58: 2034-2039.

Collado MC, Gueimonde M, Hernández M, Sanz Y, Salminen S. Adhesion of selected *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *J Food Prot* 2005; 68: 2672-2678.

Collado MC, Gueimonde M, Salminen S. Probiotics in adhesion of pathogens: mechanisms of action; in Watson RR, Preedy VR (eds): *Bioactive Foods in Promoting Health: probiotics and prebiotic*, Chennai, Academic Press, Elsevier 2010; 1: 160-162.

Collado MC, Gueimonde M, Sanz Y, Salminen S. Adhesion properties and competitive pathogen exclusion ability of bifidobacteria with acquired acid resistance. *J Food Prot* 2006; 69: 1675-1679.

Collado MC, Meriluoto J, Salminen S. Role of commercial probiotic strains against human pathogen adhesion to intestinal mucus. *Lett Appl Microbiol* 2007; 45: 454-460.

Collins JK, Thornton G, Sullivan GO. Selection of probiotic strains for human application. *Int Dairy J* 1998; 8: 487–490.

Coman MM, Verdenelli MC, Cecchini C, Silvi S, Orpianesi C, Boyko N, Cresci A. In vitro evaluation of antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501(®) , *Lactobacillus paracasei* IMC 502(®) and SYN BIO(®) against pathogens. *J Appl Microbiol* 2014; 117: 518-527.

Da Silva S, Robbe-Masselot C, Ait-Belgnaoui A, Mancuso A, Mercade-Loubière M, Salvador-Cartier C, Gillet M, Ferrier L, Loubière P, Dague E, Theodorou V, Mercier-Bonin M. Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014; 307: G420-G429.

Daliri EB, Wei S, Oh DH, Lee BH. The human microbiome and metabolomics: Current concepts and applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2017; 57: 3565-3576

Darbaky Y, Evrard B, Patrier S, Falenta J, Garcin S, Tridon A, Dapoigny M, Silberberg C, Niveliez A, Diop L. Oral probiotic treatment of *Lactobacillus rhamnosus* Lcr35(®) prevents visceral hypersensitivity to a colonic inflammation and an acute psychological stress. *J Appl Microbiol* 2017; 122: 188-200.

Das D, Goyal A. Characterization of a noncytotoxic bacteriocin from probiotic *Lactobacillus plantarum* DM5 with potential as a food preservative. *Food Funct* 2014; 5: 2453-2462.

Dave RI and Shah NP. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and bifidobacteria. *J Dairy Sci* 1995; 79: 1529-1536.

David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014; 505: 559-563.

De Keersmaecker SC, Verhoeven TL, Desair J, Marchal K, Vanderleyden J, Nagy I. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. *FEMS Microbiol Lett* 2006; 259: 89-96.

de los Reyes-Gavilán CG, Suárez A, Fernández-García M, Margolles A, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. Adhesion of bile-adapted Bifidobacterium strains to the HT29-MTX cell line is modified after sequential gastrointestinal challenge simulated in vitro using human gastric and duodenal juices. *Res Microbiol* 2011; 162: 514-519.

de Souza de Azevedo PO, Converti A, Domínguez JM, de Souza Oliveira RP. Stimulating Effects of Sucrose and Inulin on Growth, Lactate, and Bacteriocin Productions by *Pediococcus pentosaceus*. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2017 May 30.

de Wit NJ, Bosch-Vermeulen H, de Groot PJ, Hooiveld GJ, Bromhaar MM, Jansen J, Müller M, van der Meer R. The role of the small intestine in the development of dietary fat-induced obesity and insulin resistance in C57BL/6J mice. *BMC Med Genomics* 2008; 1: 14.

del Carmen S, Martín Rosique R, Saraiva T, Zurita-Turk M, Miyoshi A, Azevedo V, de Moreno de LeBlanc A, Langella P, Bermúdez-Humarán LG, LeBlanc JG. Protective effects of lactococci strains delivering either IL-10 protein or cDNA in a TNBS-induced chronic colitis model. *J Clin Gastroenterol* 2014; 48: S12-S17.

Dethlefsen L, Relman DA. Incomplete recovery and individualized responses of the human distal gut microbiota to repeated antibiotic perturbation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108: 4554-4561.

Dicks LM, Botes M. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Benef Microbes* 2010; 1: 11-29.

Dion F, Dumayne C, Henley N, Beauchemin S, Arias EB, Leblond FA, Lesage S, Lefrançois S, Cartee GD, Pichette V. Mechanism of insulin resistance in a rat model of kidney disease and the risk of developing type 2 diabetes. *PLoS One* 2017; 12: e0176650.

Dogi C, García G, De Moreno de LeBlanc A, Greco C, Cavaglieri L. *Lactobacillus rhamnosus* RC007 intended for feed additive: immune-stimulatory properties and ameliorating effects on TNBS-induced colitis. *Benef Microbes*. 2016; 7: 539-547.

Doherty GA, Bennett GC, Cheifetz AS, Moss AC. Meta-analysis: targeting the intestinal microbiota in prophylaxis for post-operative Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 31: 802-809.

Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Microbiol* 2016; 14: 20-32.

Dos Reis SA, da Conceição LL, Siqueira NP, Rosa DD, da Silva LL, Peluzio MD. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. *Nutr Res* 2017; 37: 1-19.

Downes FP and Ito K. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods* 2001, 4th ed.: 601-648. American Public Health Association (APHA). Washington, D.C. USA.

Du L, He X, Zhang H, Liu F, Ju X, Yuan J. First two domains at the lp₁₆₄₃ protein N terminus inhibit pathogen adhesion to porcine mucus in vitro. *J Food Prot.* 2015; 78: 370-375.

Dugoua JJ, Machado M, Zhu X, Chen X, Koren G, Einarson TR. Probiotic safety in pregnancy: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, and *Saccharomyces* spp. *J Obstet Gynaecol Can* 2009; 31: 542-552.

Dunne C, O'Mahony L, Murphy L, Thornton G, Morrissey D, O'Halloran S, Feeney M, Flynn S, Fitzgerald G, Daly C, Kiely B, O'Sullivan GC, Shanahan F, Collins JK. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 386-392.

Dykstra NS, Hyde L, MacKenzie A, Mack DR. *Lactobacillus plantarum* 299v Prevents Caspase-Dependent Apoptosis In Vitro. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2011; 3: 21-26.

Enck P, Zimmermann K, Menke G, Müller-Lissner S, Martens U, Klosterhalfen S. A mixture of *Escherichia coli* (DSM 17252) and *Enterococcus faecalis* (DSM 16440) for treatment of the irritable bowel syndrome--a randomized controlled trial with primary care physicians. *Neurogastroenterol Motil* 2008; 20: 1103-1109

Ettinger G, MacDonald K, Reid G, Burton JP. The influence of the human microbiome and probiotics on cardiovascular health. *Gut Microbes* 2014; 5: 719-728.

Fagarasan S, Honjo T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nat Rev Immunol* 2003; 3: 63-72.

FAO/WHO Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Health Agricultural Organisation of the United Nations — World Health Organisation. Working group report. London, Ontario, Canada. www.fao.org 2002.

Fernandez E, Valenti V, Rockel C, Hermann C, Pot B, Boneca IG, Grangette C. Anti-inflammatory capacity of selected lactobacilli in experimental colitis is driven by NOD2-mediated recognition of a specific peptidoglycan-derived muropeptide. *Gut* 2011; 60: 1050-1059.

Ferreira CL, Grześkowiak L, Collado MC, Salminen S. In vitro evaluation of *Lactobacillus gasseri* strains of infant origin on adhesion and aggregation of specific pathogens. *J Food Prot* 2011; 74: 1482-1487.

Ferreira Dos Santos T, Alves Melo T, Almeida ME, Passos Rezende R, Romano CC. Immunomodulatory Effects of *Lactobacillus plantarum* Lp62 on Intestinal Epithelial and Mononuclear Cells. *Biomed Res Int* 2016; 2016: 8404156

Finamore A, Roselli M, Imbinto A, Seeboth J, Oswald IP, Mengheri E. *Lactobacillus amylovorus* inhibits the TLR4 inflammatory signaling triggered by enterotoxigenic *Escherichia coli* via modulation of the negative regulators and involvement of TLR2 in intestinal Caco-2 cells and pig explants. *PLoS One* 2014; 9: e94891

Fong FL, Shah NP, Kirjavainen P, El-Nezami H. Mechanism of Action of Probiotic Bacteria on Intestinal and Systemic Immunities and Antigen-Presenting Cells. *Int Rev Immunol* 2016; 35: 179-188.

Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Diaz J, Muñoz-Quezada S, Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br J Nutr* 2013, 109: S35-S50.

Fujiwara S, Hashiba H, Hirota T, Forstner JF. Inhibition of the binding of enterotoxigenic *Escherichia coli* Pb176 to human intestinal epithelial cell line HCT-8 by an extracellular protein fraction containing BIF of *Bifidobacterium longum* SBT2928: suggestive evidence of blocking of the binding receptor gangliotetraosylceramide on the cell surface. *Int J Food Microbiol* 2001; 67: 97-106.

Furrie E, Macfarlane S, Kennedy A, Cummings JH, Walsh SV, O'neil DA, Macfarlane GT. Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* 2005; 54: 242-249.

Gallo RL and Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 503–516.

Ganz T. Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:710–720.

García G, Dogi C, de Moreno de LeBlanc A, Greco C, Cavaglieri L. Gut-borne *Saccharomyces cerevisiae*, a promising candidate for the formulation of feed additives, modulates immune system and gut microbiota. *Benef Microbes* 2016; 7: 659-668.

Garriga M, Rubio R, Aymerich T, Ruas-Madiedo P. Potentially probiotic and bioprotective lactic acid bacteria starter cultures antagonise the *Listeria monocytogenes* adhesion to HT29 colonocyte-like cells. *Benef Microbes* 2015; 6: 337-343.

Gastaldelli A, Natali A, Vettor R, Corradini SG. Insulin resistance, adipose depots and gut: interactions and pathological implications. *Dig Liver Dis* 2010; 42: 310-319.

Gaudier E, Michel C, Segain JP, Cherbut C, Hoebler C. The VSL# 3 probiotic mixture modifies microflora but does not heal chronic dextran-sodium sulfate-induced colitis or reinforce the mucus barrier in mice. *J Nutr.* 2005; 135: 2753-2761.

Gawrońska A, Dziechciarz P, Horvath A, Szajewska H. A randomized double-blind placebo-controlled trial of *Lactobacillus GG* for abdominal pain disorders in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 177-84.

Genovese KJ, Anderson RC, Harvey RB, Nisbet DJ. Competitive exclusion treatment reduces the mortality and fecal shedding associated with enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in nursery-raised neonatal pigs. *Can J Vet Res* 2000; 64: 204-207.

Georgieva RN, Iliev IN, Chipeva VA, Dimitonova SP, Samelis J, Danova ST. Identification and in vitro characterisation of *Lactobacillus plantarum* strains from artisanal Bulgarian white brined cheeses. *J Basic Microbiol* 2008; 48: 234-244.

Giahi L, Aumueller E, Elmadfa I, Haslberger AG. Regulation of TLR4, p38 MAPkinase, IκB and miRNAs by inactivated strains of lactobacilli in human dendritic cells. *Benef Microbes* 2012; 3: 91-98.

Gibson GR and Wang X. Regulatory effects of bifidobacteria on the growth of other colonic bacteria. *J Appl Bacteriol* 1994; 77: 412–420.

Gil-Campos M, Cañete R, Gil A. Hormones regulating lipid metabolism and plasma lipids in childhood obesity. *Int J Obes* 2004b; 28: S75-S80.

Gómez-Llorente C, Muñoz S, Gil A. Role of Toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Proc Nutr Soc* 2010; 69: 381–389.

Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, Aguilera M, Muñoz-Quezada S, Bermudez-Brito M, Peso-Echarri P, Martinez-Silla R, Vasallo-Morillas MI, Campaña-Martin L, Vives-Piñera I, Ballesta-Martinez MJ, Gil A. Three main factors define changes in fecal microbiota associated with feeding modality in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2013; 57: 461-466.

González-Rodríguez I, Sánchez B, Ruiz L, Turroni F, Ventura M, Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A. Role of extracellular transaldolase from *Bifidobacterium bifidum* in mucin adhesion and aggregation. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78: 3992-3998.

Good M, Sodhi CP, Ozolek JA, Buck RH, Goehring KC, Thomas DL, Vikram A, Bibby K, Morowitz MJ, Firek B, Lu P, Hackam DJ. *Lactobacillus rhamnosus* HN001 decreases the severity of necrotizing enterocolitis in neonatal mice and preterm piglets: evidence in mice for a role of TLR9. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014; 306: G1021-G1032.

Gopal PK, Prasad J, Smart J, Gill HS. In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int J Food Microbiol* 2001; 67: 207-216.

Greenberg B. Salmonella suppression by known populations of bacteria in flies. *J Bacteriol* 1969; 99: 629–635.

Greene JD and Klaenhammer TR. Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 4487–4494.

Guarner F and Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361: 512-519.

Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 39: 237-238.

Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. Breast milk: a source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology* 2007; 92: 64-66.

Guglielmetti S, Tamagnini I, Mora D, Minuzzo M, Scarafoni A, Arioli S, Hellman J, Karp M, Parini C. Implication of an outer surface lipoprotein in adhesion of *Bifidobacterium bifidum* to Caco-2 cells. *Appl Environ Microbiol*. 2008; 74: 4695-4702.

Guglielmetti S, Zanoni I, Balzaretto S, Miriani M, Taverniti V, De Noni I, Presti I, Stuknyte M, Scarafoni A, Arioli S, Iametti S, Bonomi F, Mora D, Karp M, Granucci F. Murein lytic enzyme TgaA of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 modulates dendritic cell maturation through its cysteine- and histidine-dependent amidohydrolase/peptidase (CHAP) amidase domain. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80: 5170-5177.

Guo S, Gillingham T, Guo Y, Meng D, Zhu W, Walker WA, Ganguli K. Secretions of *Bifidobacterium Infantis* and *Lactobacillus Acidophilus* Protect Intestinal Epithelial Barrier Function. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2016 Jun 17.

Hakansson A and Molin G. Gut microbiota and inflammation. *Nutrients* 2011; 3: 637–682.

Haller D, Colbus H, Gänzle MG, Scherenbacher P, Bode C, Hammes WP. Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: a comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Syst Appl Microbiol* 2001; 24: 218-226.

Hamad EM, Sato M, Uzu K, Yoshida T, Higashi S, Kawakami H, Kadooka Y, Matsuyama H, Abd El-Gawad IA, Imaizumi K. Milk fermented by *Lactobacillus gasserii* SBT2055 influences adipocyte size via inhibition of dietary fat absorption in Zucker rats. *Br J Nutr* 2009; 101: 716-724.

Hartemink R and Rombouts FM. Comparison of media for the detection of bifidobacteria, lactobacilli and total anaerobes from faecal samples. *J Microbiol Meth* 1999; 36: 181-192.

Hartemink R, Kok BJ, Weenk GH, Rombouts FM. Raffinose *Bifidobacterium* (RB) agar, a new selective medium for bifidobacteria. *J Microbiol Meth* 1996; 27: 33-43.

Haslam DW, James WPT. Obesity. *Lancet* 2005; 366: 1197-1209.

Hassan M, Kjos M, Nes IF, Diep DB, Lotfipour F. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *J Appl Microbiol* 2012; 113: 723-736.

He B, Xu W, Santini PA, Polydorides AD, Chiu A, Estrella J, Shan M, Chadburn A, Villanacci V, Plebani A, et al. Intestinal bacteria trigger T cell-independent immunoglobulin A(2) class switching by inducing epithelial-cell secretion of the cytokine APRIL. *Immunity* 2007; 26: 812–826.

Hecht AL, Casterline BW, Earley ZM, Goo YA, Goodlett DR, Bubeck Wardenburg J. Strain competition restricts colonization of an enteric pathogen and prevents colitis. *EMBO Rep* 2016; 17: 1281-1291.

Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000; 408: 740-745.

Hering NA, Richter JF, Fromm A, Wieser A, Hartmann S, Günzel D, Bücker R, Fromm M, Schulzke JD, Troeger H. TcpC protein from *E. coli* Nissle improves epithelial barrier function involving PKC ζ and ERK1/2 signaling in HT-29/B6 cells. *Mucosal Immunol* 2014; 7: 369-378.

Hevia A, Delgado S, Sánchez B, Margolles A. Molecular Players Involved in the Interaction Between Beneficial Bacteria and the Immune System. *Front Microbiol* 2015; 6: 1285.

Hidalgo-Cantabrana C, Sánchez B, Álvarez-Martín P, López P, Martínez-Álvarez N, Delley M, Martí M, Varela E, Suárez A, Antolín M, Guarner F, Berger B, Ruas-Madiedo P, Margolles A. A single mutation in the gene responsible for the mucoid phenotype of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* confers surface and functional characteristics. *Appl Environ Microbiol* 2015; 81: 7960-7968.

Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11: 506-514.

Hill JE, Baiano JC, Barnes AC. Isolation of a novel strain of *Bacillus pumilus* from penaeid shrimp that is inhibitory against marine pathogens. *J Fish Dis* 2009; 32: 1007-1016.

Hirahara K, Nakayama T. CD4⁺ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol* 2016; 28: 163-171.

Hirano J, Yoshida T, Sugiyama T, Koide N, Mori I, Yokochi T. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. *Microbiol Immunol* 2003; 47: 405-409.

Hirn J, Nurmi E, Johansson T, Nuotio L. Long-term experience with competitive exclusion and salmonellas in Finland. *Int J Food Microbiol* 1992; 15: 281-285.

Hirota SA, Ng J, Lueng A, Khajah M, Parhar K, Li Y, Lam V, Potentier MS, Ng K, Bawa M, McCafferty DM, Rioux KP, Ghosh S, Xavier RJ, Colgan SP, Tschopp J, Muruve D, MacDonald JA, Beck PL. NLRP3 inflammasome plays a key role in the regulation of intestinal homeostasis. *Inflamm Bowel Dis* 2011; 17: 1359-1372.

Hollister EB, Gao C, Versalovic J. Compositional and functional features of the gastrointestinal microbiome and their effects on human health. *Gastroenterology* 2014; 146: 1449-1458.

Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JH. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol.* 1998; 41: 85-101.

Hooper LV, Midtvedt T, Gordon JI. How host-microbial interactions shape the nutrient environment of the mammalian intestine. *Annu Rev Nutr* 2002; 22: 283-307.

Hooper LV, Stappenbeck TS, Hong CV, Gordon JI. Angiogenins: a new class of microbicidal proteins involved in innate immunity. *Nat Immunol* 2003; 4: 269-273.

Hooper LV, Wong MH, Thelin A, Hansson L, Falk PG, Gordon JI. Molecular analysis of commensal host-microbial relationships in the intestine. *Science* 2001; 291: 881-884.

Hooper LV. Do symbiotic bacteria subvert host immunity? *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7: 367-374

Hossain P, Katar B, El Vahas M. Obesity and diabetes in the developing world. A growing challenge. *N Eng J Med* 2007; 356: 213-215.

Hotamisligil G.S. Inflammation and metabolic disorders. *Nature* 2006; 444: 860-867.

Hsieh CY, Osaka T, Moriyama E, Date Y, Kikuchi J, Tsuneda S. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiol Rep.* 2015; 3: e12327.

Huang FC, Huang SC. The different effects of probiotics treatment on *Salmonella*-induced interleukin-8 response in intestinal epithelia cells via PI3K/Akt and NOD2 expression. *Benef Microbes* 2016; 7: 739-748.

Hufnagel C, Eiden S, Nuesslein-Hildesheim B, Zhang Y, Leibel R, Schmidt I. Mutation in the leptin receptor (*Lep^{rfa}*) causes fat-storage-independent hyperleptinaemia in neonatal rats. *Pflugers Arch* 1999; 438: 570-572.

Hummel S, Veltman K, Cichon C, Sonnenborn U, Schmidt MA. Differential targeting of the E-Cadherin/ β -Catenin complex by gram-positive probiotic lactobacilli improves epithelial barrier function. *Appl Environ Microbiol* 2012; 78: 1140-1147.

Hynönen U, Westerlund-Wikström B, Palva A, Korhonen TK. Identification by flagellum display of an epithelial cell- and fibronectin-binding function in the SlpA surface protein of *Lactobacillus brevis*. *J Bacteriol* 2002; 184: 3360-3367.

Immunobiotic *Lactobacillus* strains reduce small intestinal injury induced by intraepithelial lymphocytes after Toll-like receptor 3 activation. *Inflamm Res* 2016; 65: 771-783

Ishibashi N, Seto H, Koga S, Zendo T, Sonomoto K. Identification of Lactococcus-Specific Bacteriocins Produced by Lactococcal Isolates, and the Discovery of a Novel Bacteriocin, Lactococcin Z. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2015; 7: 222-231.

Izquierdo E, Medina M, Ennahar S, Marchioni E, Sanz Y. Resistance to simulated gastrointestinal conditions and adhesion to mucus as probiotic criteria for *Bifidobacterium longum* strains. *Curr Microbiol* 2008; 56: 613-618.

Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Reddy DN. Role of the normal gut microbiota. *World Journal of Gastroenterology: WJG* 2015; 21: 8787-8803.

Jankowska A, Laubitz D, Antushevich H, Zabielski R, Grzesiuk E. Competition of *Lactobacillus paracasei* with *Salmonella enterica* for adhesion to Caco-2 cells. *J Biomed Biotechnol* 2008; 2008: 357964.

Jensen JM, Proksch E. The skin's barrier. *G Ital Dermatol Venereol* 2009; 144: 689-700.

Jeong YJ, Moon GS. Antilisterial Bacteriocin from *Lactobacillus rhamnosus* CJNU 0519 Presenting a Narrow Antimicrobial Spectrum. *Korean J Food Sci Anim Resour* 2015; 35: 137-142.

Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* 2010; 156: 3216–3223.

Jiang Y, Yang G, Meng F, Yang W, Hu J, Ye L, Shi C, Wang C. Immunological mechanisms involved in probiotic-mediated protection against *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Benef Microbes* 2016; 7: 397-407.

Jiménez E, Fernández L, Maldonado A, Martín R, Olivares M, Xaus J, Rodríguez JM. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 4650-4655.

Johansson ME, Phillipson M, Petersson J, Velcich A, Holm L, Hansson GC. The inner of the two Muc2 mucin-dependent mucus layers in colon is devoid of bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 15064–15069.

Johnston BC, Goldenberg JZ, Vandvik PO, Sun X, Guyatt GH. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; (11): CD004827.

Joint WHO/FAO Expert Consultation. Diet, Nutrition and the Prevention of Chronic Diseases. WHO Technical Report Series 2002; n° 916.

Jung TH, Park JH, Jeon WM, Han KS. Butyrate modulates bacterial adherence on LS174T human colorectal cells by stimulating mucin secretion and MAPK signaling pathway. *Nutr Res Pract* 2015; 9: 343-349.

Juntunen M, Kirjavainen PV, Ouwehand AC, Salminen SJ, Isolauri E. Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001; 8: 293-296.

Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, Ogawa A, Ikuyama K, Akai Y, Okano M, Kagoshima M, Tsuchida T. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (*Lactobacillus gasseri* SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64: 636-643.

Kagan BL, Selsted ME, Ganz T, Lehrer RI. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 210-214.

- Kamada N, Nunez G. Regulation of the immune system by the resident intestinal bacteria. *Gastroenterology* 2014; 146: 1477–1488.
- Kanai T, Mikami Y, Hayashi A. A breakthrough in probiotics: *Clostridium butyricum* regulates gut homeostasis and anti-inflammatory response in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol* 2015; 50: 928-939.
- Kasiske BL, O'Donnell MP, Keane WF. The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury. *Hypertension* 1992; 19: I110-I115.
- Kawai T and Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol* 2010; 11: 373–384.
- Kearney PM, Whelton M, Reynolds K, Muntner P, Whelton PK, He J. Global burden of hypertension: analysis of worldwide data. *Lancet* 2005; 365: 217-223.
- Kemgang TS, Kapila S, Shanmugam VP, Reddi S, Kapila R. Fermented milk with probiotic *Lactobacillus rhamnosus* S1K3 (MTCC5957) protects mice from salmonella by enhancing immune and nonimmune protection mechanisms at intestinal mucosal level. *J Nutr Biochem* 2016; 30: 62-73.
- Kersten S., Mandard S., Tan N.S., Escher P., Metzger D., Chambon P., et al. Characterization of the fasting-induced adipose factor FIAF, a novel peroxisome proliferator-activated receptor target gene. *J Biol Chem* 2000; 275: 28488-28493.
- Kim SH, Jeung W, Choi ID, Jeong JW, Lee DE, Huh CS, Kim GB, Hong SS, Shim JJ, Lee JL, Sim JH, Ahn YT. Lactic Acid Bacteria Improves Peyer's Patch Cell-Mediated Immunoglobulin A and Tight-Junction Expression in a Destructed Gut Microbial Environment. *J Microbiol Biotechnol* 2016; 26: 1035-1045.
- Kim Y, Kim SH, Whang KY, Kim YJ, Oh S. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells. *J Microbiol Biotechnol* 2008; 18: 1278-1285.
- Kim YS, Ho SB. Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 2010; 12: 319–330.
- Knight DA, Holgate ST. The airway epithelium: structural and functional properties in health and disease. *Respirology* 2003; 8: 432-446.
- Koprivnjak T, Peschel A, Gelb MH, Liang NS, Weiss JP. Role of charge properties of bacterial envelope in bactericidal action of human group IIA phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 2002; 277: 47636-47644.
- Kühbacher T, Ott SJ, Helwig U, Mimura T, Rizzello F, Kleessen B, Gionchetti P, Blaut M, Campieri M, Fölsch UR, Kamm MA, Schreiber S. Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis. *Gut* 2006; 55: 833-841.
- Kuitunen M, Kukkonen K, Savilahti E. Pro- and prebiotic supplementation induces a transient reduction in hemoglobin concentration in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49: 626-630.

Kumar M, Kisson-Singh V, Coria AL, Moreau F, Chadee K. Probiotic mixture VSL#3 reduces colonic inflammation and improves intestinal barrier function in Muc2 mucin-deficient mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2017; 312: G34-G45.

Langa S, Martín-Cabrejas I, Montiel R, Landete JM, Medina M, Arqués JL. Short communication: Combined antimicrobial activity of reuterin and diacetyl against foodborne pathogens. *J Dairy Sci* 2014; 97: 6116-6121.

Laparra JM and Sanz Y. Comparison of in vitro models to study bacterial adhesion to the intestinal epithelium. *Lett Appl Microbiol* 2009; 49: 695-701.

Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker CJ: Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol* 2010; 8: 171–184

Leblanc JG, Milani C, de Giori GS, Sesma F, van Sinderen D, Ventura M. Bacteria as vitamin suppliers to their host: a gut microbiota perspective. *Curr. Opin. Biotechnol* 2013; 24: 160–168.

Leblond-Bourget N, Philippe H, Mangin I, Decaris B. 16S rRNA and 16S to 23S internal transcribed spacer sequence analyses reveal inter- and intraspecific *Bifidobacterium* phylogeny. *Int J Syst Bacteriol* 1996; 46: 102-111.

Lee J, Mo JH, Katakura K, Alkalay I, Rucker AN, Liu YT, Lee HK, Shen C, Cojocaru G, Shenouda S, Kagnoff M, Eckmann L, Ben-Neriah Y, Raz E. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol* 2006; 8: 1327-1236.

Lee J, Seto D, Bielory L. Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis *J Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 116-121.

Lee K, Paek K, Lee HY, Park JH, Lee Y. Antiobesity effect of trans-10,cis-12-conjugated linoleic acid-producing *Lactobacillus plantarum* PL62 on diet-induced obese mice. *J Appl Microbiol* 2007; 103: 1140-1146.

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

Ley R.E., Backhed F., Turnbaugh P., Lozupone CA, Knight R.D., Gordon J.I. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005b; 102: 11070-11075.

Ley R.E., Turnbaugh P.J., Klein S., Gordon J.I. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444: 1022-1023.

Li P, Gu Q. Complete genome sequence of *Lactobacillus plantarum* LZ95, a potential probiotic strain producing bacteriocins and B-group vitamin riboflavin. *J Biotechnol* 2016; 229: 1-2.

Li Z., Yang S., Lin H., Huang J., Watkins P.A., Moser A.B., et al. Probiotics and antibodies to TNF inhibit inflammatory activity and improve nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2003; 37: 343-350.

Liévin V, Peiffer I, Hudault S, Rochat F, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. Bifidobacterium strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut* 2000; 47: 646-652.

Lim SM and Im DS. Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. *J Microbiol Biotechnol* 2009; 19: 178-186.

Lin CH, Lin CC, Shibu MA, Liu CS, Kuo CH, Tsai FJ, Tsai CH, Hsieh CH, Chen YH, Huang CY. Oral *Lactobacillus reuteri* GMN-32 treatment reduces blood glucose concentrations and promotes cardiac function in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Br J Nutr* 2014; 111: 598-605.

Lin PP, Hsieh YM, Tsai CC. Antagonistic activity of *Lactobacillus acidophilus* RY2 isolated from healthy infancy feces on the growth and adhesion characteristics of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Anaerobe* 2009; 15: 122-126.

Liong MT. Probiotics: Biology, Genetics and Health aspects. *Microbiol Monographs*. 2011

Liu HY, Roos S, Jonsson H, Ahl D, Dicksved J, Lindberg JE, Lundh T. Effects of *Lactobacillus johnsonii* and *Lactobacillus reuteri* on gut barrier function and heat shock proteins in intestinal porcine epithelial cells. *Physiol Rep*. 2015; 3 pii: e12355.

Liu JE, Zhang Y, Zhang J, Dong PL, Chen M, Duan ZP. Probiotic yogurt effects on intestinal flora of patients with chronic liver disease. *Nurs Res* 2010; 59: 426-432.

Liu L, Li P. Complete genome sequence of *Lactobacillus paraplantarum* L-ZS9, a probiotic starter producing class II bacteriocins. *J Biotechnol* 2016; 222: 15-16.

Liu ZH, Kang L, Wang JP. Basic and clinical research on the regulation of the intestinal barrier by *Lactobacillus* and its active protein components: a review with experience of one center. *Mol Biol Rep* 2014; 41: 8037-8046

Lobstein T, Frelut ML. Prevalence of overweight among children in Europe. *Obes Rev* 2003; 4: 195-200.

Lopitz-Otsoa F, Rementería A, Elguezabal N, Garaizar J. Kefir: a symbiotic yeasts-bacteria community with alleged healthy capabilities. *Rev Iberoam Micol* 2006; 23: 67-74.

Lutz TA, Woods SC. Overview of animal models of obesity. *Curr Protoc Pharmacol*. 2012; 5: Unit5.61.

Ma X, Hua J, Li Z. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J Hepatol*. 2008; 49: 821-830.

Ma X, Wang G, Li D, Hao Y. Microcin V Production in *Lactobacillus plantarum* LB-B1 Using Heterologous Leader Peptide from Pediocin PA-1. *Curr Microbiol* 2016; 72: 357-362.

Ma YY, Li L, Yu CH, Shen Z, Chen LH, Li YM. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 6911-6918

MacFaddin JD. Media for isolation-cultivation-identification- maintenance of medical bacteria, vol. 1, pp. 275-284. Williams & Wilkins. Baltimore, MD. 1985.

Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc* 2003; 62: 67-72.

Mack DR, Ahrne S, Hyde L, Wei S, Hollingsworth MA. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. *Gut* 2003; 52: 827-833.

Mackie RI, Sghir A, Gaskins HR. Developmental microbial ecology of neonatal gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr* 1999; 69: 1035-1045.

Macouzet M, Lee BH, Robert N. Production of conjugated linoleic acid by probiotic *Lactobacillus acidophilus* La-5. *J Appl Microbiol* 2009; 106: 1886-1891.

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

Makras L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudi D, Adriany T, Zoumpopoulou G, Tsakalidou E, Servin A, De Vuyst L. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar Typhimurium reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res Microbiol* 2006; 157: 241-247.

Mañes-Lázaro R, Van Diemen PM, Pin C, Mayer MJ, Stevens MP, Narbad A. Administration of *Lactobacillus johnsonii* FI9785 to chickens affects colonization by *Campylobacter jejuni* and the intestinal microbiota. *Br Poult Sci* 2017; 58: 373-381.

Mao X, Gu C, Hu H, Tang J, Chen D, Yu B, He J, Yu J, Luo J, Tian G. Dietary *Lactobacillus rhamnosus* GG Supplementation Improves the Mucosal Barrier Function in the Intestine of Weaned Piglets Challenged by Porcine Rotavirus. *PLoS One* 2016; 11 :e0146312.

Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 905215.

Markowicz C, Olejnik-Schmidt A, Borkowska M, Schmidt MT. SpaCBA sequence instability and its relationship to the adhesion efficiency of *Lactobacillus casei* group isolates to Caco-2 cells. *Acta Biochim Pol* 2014; 61: 341-347.

Martín R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, Rodríguez JM. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial

population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75: 965-969.

Martín R, Jiménez E, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, a potential probiotic strain isolated from infant feces and breast milk of a mother-child pair. *Int J Food Microbiol* 2006; 112: 35-43.

Martin R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Olivares M, Boza J, Jiménez J, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacterio therapy and probiotics. *Trends Food Sci. Technol* 2004; 15: 121-127.

Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 2003; 143: 754-758.

Martín R, Laval L, Chain F, Miquel S, Natividad J, Cherbuy C, Sokol H, Verdu EF, van Hylckama Vlieg J, Bermudez-Humaran LG, Smokvina T, Langella P. *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* CNCM-I2494 Restores Gut Barrier Permeability in Chronically Low-Grade Inflamed Mice. *Front Microbiol* 2016; 7: 608.

Martinez FA, Balciunas EM, Converti A, Cotter PD, de Souza Oliveira RP. Bacteriocin production by *Bifidobacterium* spp. A review. *Biotechnol Adv* 2013; 31: 482-488.

Martinez FA, Domínguez JM, Converti A, Oliveira RP. Production of bacteriocin-like inhibitory substance by *Bifidobacterium lactis* in skim milk supplemented with additives. *J Dairy Res* 2015; 82: 350-355.

Martinon F, Mayor A, Tschopp J. The inflammasomes: guardians of the body. *Annu Rev Immunol* 2009; 27: 229-265.

Masco L, Crockaert C, Van Hoorde K, Swings J, Huys G. In vitro assessment of the gastrointestinal transit tolerance of taxonomic reference strains from human origin and probiotic product isolates of *Bifidobacterium*. *J Dairy Sci* 2007; 90: 3572-3578.

Mattar AF, Teitelbaum DH, Drongowski RA, Yongyi F, Harmon CM, Coran AG. Probiotics up-regulate MUC-2 mucin gene expression in a Caco-2 cell-culture model. *Pediatr Surg Int* 2002; 18: 586-590.

Matto J, Alakomi HL, Vaari A, Virkajarvi I, Saarela M. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. *Int Dairy J* 2005; 16, 1029-1037.

McClintock MK, Kaznessis YN, Hackel BJ. Enterocin A mutants identified by saturation mutagenesis enhance potency towards vancomycin-resistant Enterococci. *Biotechnol Bioeng* 2016; 113: 414-423.

McFarland LV and Dublin S. Meta-analysis of probiotics for the treatment of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2650-2661.

Meng H, Ba Z, Lee Y, Peng J, Lin J, Fleming JA, Furumoto EJ, Roberts RF, Kris-Etherton PM, Rogers CJ. Consumption of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in yogurt reduced expression of TLR-2 on peripheral blood-derived monocytes and pro-inflammatory cytokine secretion in young adults. *Eur J Nutr* 2017; 56: 649-661.

Meylan E, Tschopp J, Karin M. Intracellular pattern recognition receptors in the host response. *Nature* 2006; 442: 39-44.

Mills S, Stanton C, Fitzgerald GF, Ross RP. Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. *Microb Cell Fact* 2011;10: S19.

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

Mogna L, Deidda F, Nicola S, Amoruso A, Del Piano M, Mogna G. In Vitro Inhibition of *Klebsiella pneumoniae* by *Lactobacillus delbrueckii* Subsp. *delbrueckii* LDD01 (DSM 22106): An Innovative Strategy to Possibly Counteract Such Infections in Humans? *J Clin Gastroenterol*. 2016 Nov/Dec; 50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015:S136-S139.

Mohamadshahi M, Veissi M, Haidari F, Javid AZ, Mohammadi F, Shirbeigi E. Effects of probiotic yogurt consumption on lipid profile in type 2 diabetic patients: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Research in Medical Sciences: The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences* 2014; 19: 531-536.

Moratalla A, Gómez-Hurtado I, Moya-Pérez Á, Zapater P, Peiró G, González-Navajas JM, Gómez Del Pulgar EM, Such J, Sanz Y, Francés R. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 promotes a TLR2-dependent anti-inflammatory response in intestinal lymphocytes from mice with cirrhosis. *Eur J Nutr* 2016; 55: 197-206.

Mountzouris KC, McCartney AL, Gibson GR. Intestinal microflora of human infants and current trends for its nutritional modulation. *Br J Nutr* 2002; 87: 405-420.

Mujagic Z, de Vos P, Boekschoten MV, Govers C, Pieters HH, de Wit NJ, Bron PA, Masclee AA, Troost FJ. The effects of *Lactobacillus plantarum* on small intestinal barrier function and mucosal gene transcription; a randomized double-blind placebo controlled trial. *Sci Rep* 2017; 7: 40128.

Mukai T, Asasaka T, Sato E, Mori K, Matsumoto M, Ohori H. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002; 32: 105-110.

Mukdsi MC, Argañaraz Martínez E, Chaia AP, Medina RB. Feruloyl esterase activity is influenced by bile, probiotic intestinal adhesion and milk fat. *Benef Microbes* 2016; 7: 597-607.

Mukherjee S, Ramesh A. Bacteriocin-producing strains of *Lactobacillus plantarum* inhibit adhesion of *Staphylococcus aureus* to extracellular matrix: quantitative insight and implications in antibacterial therapy. *J Med Microbiol* 2015; 64: 1514-1526.

Müller CA, Autenrieth IB, Peschel A. Innate defenses of the intestinal epithelial barrier. *Cell Mol Life Sci* 2005; 62: 1297–1307.

Munoa FJ and Pares R. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* species. *Appl Env Microbiol* 1988; 54: 1715-1718.

Muñoz JA, Chenoll E, Casinos B, Bataller E, Ramón D, Genovés S, Montava R, Ribes JM, Buesa J, Fàbrega J, Rivero M. Novel probiotic *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 strain active against rotavirus infections. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 8775-8783.

Muñoz-Quezada S, Bermudez-Brito M, Chenoll E, Genovés S, Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, Matencio E, Bernal MJ, Romero F, Ramón D, Gil A. Competitive inhibition of three novel bacteria isolated from faeces of breast milk-fed infants against selected enteropathogens. *Br J Nutr* 2013; 109: S63-S69.

Musso G, Gambino R, Cassader M. Gut microbiota as a regulator of energy homeostasis and ectopic fat deposition: mechanisms and implications for metabolic disorders. *Curr Opin Lipidol* 2010; 21:76-83.

Musso G, Gambino R, Cassader M. Obesity, diabetes, and gut microbiota: the hygiene hypothesis expanded?. *Diabetes Care* 2010; 33: 2277-2284.

Nakamura S, Kuda T, An C, Kanno T, Takahashi H, Kimura B. Inhibitory effects of *Leuconostoc mesenteroides* 1RM3 isolated from narezushi, a fermented fish with rice, on *Listeria monocytogenes* infection to Caco-2 cells and A/J mice. *Anaerobe* 2012; 18: 19-24.

Nami Y, Haghshenas B, Haghshenas M, Yari Khosroushahi A. Antimicrobial activity and the presence of virulence factors and bacteriocin structural genes in *Enterococcus faecium* CM33 isolated from ewe colostrum. *Front Microbiol* 2015; 6: 782

Navar D, Saulis D, Corll C, Svec F, Porter JR. Dehydroepiandrosterone (DHEA) blocks the increase in food intake caused by neuropeptide Y (NPY) in the Zucker rat. *Nutr Neurosci* 2006; 9: 225-232.

Nébot-Vivinus M, Harkat C, Bziouche H, Cartier C, Plichon-Dainese R, Moussa L, Eutamene H, Pishvaie D, Holowacz S, Seyrig C, Piche T, Theodorou V. Multispecies probiotic protects gut barrier function in experimental models. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 6832-6843.

Nebra Y, Blanch AR. A new selective medium for *Bifidobacterium* spp. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65: 5173-5176.

Neeser JR, Granato D, Rouvet M, Servin A, Teneberg S, Karlsson KA. *Lactobacillus johnsonii* La1 shares carbohydrate-binding specificities with several enteropathogenic bacteria. *Glycobiology* 2000; 10: 1193-1199.

Neutra MR and Forstner JF. Gastrointestinal mucus: synthesis, secretion and function; in Johnson LR (ed): Physiology of the Gastrointestinal Tract, ed 2. New York, Raven 1987.

Nielsen DS, Cho GS, Hanak A, Huch M, Franz CM, Arneborg N. The effect of bacteriocin-producing *Lactobacillus plantarum* strains on the intracellular pH of sessile and planktonic *Listeria monocytogenes* single cells. *Int J Food Microbiol* 2010; 141: S53-S59.

Nishiyama K, Kawanabe A, Miyauchi H, Abe F, Tsubokawa D, Ishihara K, Yamamoto Y, Mukai T. Evaluation of bifidobacterial adhesion to acidic sugar chains of porcine colonic mucins. *Biosci Biotechnol Biochem* 2014; 78: 1444-1451.

Novotny Núñez I, Maldonado Galdeano C, de Moreno de LeBlanc A, Perdígón G. *Lactobacillus casei* CRL 431 administration decreases inflammatory cytokines in a diet-induced obese mouse model. *Nutrition* 2015; 31: 1000-1007.

O'hara AM and Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006; 7: 688-693.

Oelschlaeger TA. Mechanisms of probiotic actions – a review. *Int J Med Microbiol* 2010; 300: 57–62.

Ogushi K, Wada A, Niidome T, Mori N, Oishi K, Nagatake T, Takahashi A, Asakura H, Makino S, Hojo H, Nakahara Y, Ohsaki M, Hatakeyama T, Aoyagi H, Kurazono H, Moss J, Hirayama T. *Salmonella enteritidis* FliC (flagella filament protein) induces human beta-defensin-2 mRNA production by Caco-2 cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 30521-20526.

Ohland CL and Macnaughton WK Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2010; 298: G807–G819.

Ohtsuka Y, Ikegami T, Izumi H, Namura M, Ikeda T, Ikuse T, Baba Y, Kudo T, Suzuki R, Shimizu T. Effects of *Bifidobacterium breve* on inflammatory gene expression in neonatal and weaning rat intestine. *Pediatr Res* 2012; 71: 46-53.

Olivares M, Díaz-Ropero MA, Gómez N, Lara-Villoslada F, Sierra S, Maldonado JA, Martín R, López-Huertas E, Rodríguez JM, Xaus J. Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, enhances the intestinal function of healthy adults. *Int J Food Microbiol* 2006; 107: 104-111.

O'Neil DA, Porter EM, Elewaut D, Anderson GM, Eckmann L, Ganz T, Kagnoff MF. Expression and regulation of the human beta-defensins hBD-1 and hBD-2 in intestinal epithelium. *J Immunol*. 1999; 163: 6718-6724.

Orlando A, Linsalata M, Notarnicola M, Tutino V, Russo F. *Lactobacillus GG* restoration of the gliadin induced epithelial barrier disruption: the role of cellular polyamines. *BMC Microbiol* 2014; 14: 19.

O'Shea EF, Cotter PD, Stanton C, Ross RP, Hill C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. *Int J Food Microbiol* 2012; 152: 189-205.

O'Shea NR, Chew TS, Dunne J, Marnane R, Nedjat-Shokouhi B, Smith PJ, Bloom SL, Smith AM, Segal AW. Critical Role of the Disintegrin Metalloprotease ADAM-like Decysin-1 [ADAMDEC1] for Intestinal Immunity and Inflammation. *J Crohns Colitis* 2016; 10: 1417-1427.

Otte JM and Podolsky DK. Functional modulation of enterocytes by gram-positive and gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2004; 286: G613–G626.

Ouwehand AC. Antimicrobial components from lactic acid bacteria; in Salminen S, von Wright A (eds): *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*. New York, Dekker, 1998; pp 139–159.

Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* 2002; 82: 279–289.

Ouwehand AC, Salminen S, Tölkö S, Roberts P, Ovaska J, Salminen E. Resected human colonic tissue: new model for characterizing adhesion of lactic acid bacteria. *Clin Diagn Lab Immunol* 2002; 9: 184-186.

Owaga E, Hsieh RH, Mugendi B, Masuku S, Shih CK, Chang JS. Th17 Cells as Potential Probiotic Therapeutic Targets in Inflammatory Bowel Diseases. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 20841-20858.

Pandey KR, Naik SR, Vakil BV. Probiotics, prebiotics and synbiotics- a review. *Journal of Food Science and Technology* 2015; 52: 7577-7587.

Parassol N, Freitas M, Thoreux K, Dalmaso G, Bourdet-Sicard R, Rampal P. *Lactobacillus casei* DN-114 001 inhibits the increase in paracellular permeability of enteropathogenic *Escherichia coli*-infected T84 cells. *Res Microbiol* 2005; 156: 256-262.

Park JS, Joe I, Rhee PD, Jeong CS, Jeong G. A lactic acid bacterium isolated from kimchi ameliorates intestinal inflammation in DSS-induced colitis. *J Microbiol* 2017; 55: 304-310.

Patrignani F, Lanciotti R, Mathara JM, Guerzoni ME, Holzapfel WH. Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. *Int J Food Microbiol* 2006; 107: 1-11.

Perdigón G, Maldonado Galdeano C, Valdez JC, Medici M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56: S21-S26.

Perez-Cano FJ, Dong K, Yaqoob P. In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two

probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology* 2010; 215: 996-1004.

Pérez-Sánchez T, Balcázar JL, García Y, Halaihel N, Vendrell D, de Blas I, Merrifield DL, Ruiz-Zarzuela I. Identification and characterization of lactic acid bacteria isolated from rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), with inhibitory activity against *Lactococcus garvieae*. *J Fish Dis.* 2011; 34: 499-507.

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

Petrova MI, Imholz NC, Verhoeven TL, Balzarini J, Van Damme EJ, Schols D, Vanderleyden J, Lebeer S. Lectin-Like Molecules of *Lactobacillus rhamnosus* GG Inhibit Pathogenic *Escherichia coli* and *Salmonella* Biofilm Formation. *PLoS One* 2016; 11: e0161337.

Pilchová T, Pilet MF, Cappelletti JM, Pazlarová J, Tresse O. Protective Effect of *Carnobacterium* spp. against *Listeria monocytogenes* during Host Cell Invasion Using In vitro HT29 Model. *Front Cell Infect Microbiol* 2016; 6: 88.

Pillai A and Nelson R. Probiotics for treatment of *Clostridium difficile*-associated colitis in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; 23: CD004611.

Plantinga TS, van Maren WW, van Bergenhenegouwen J, Hameetman M, Nierkens S, Jacobs C, de Jong DJ, Joosten LA, van't Land B, Garssen J, Adema GJ, Netea MG. Differential Toll-like receptor recognition and induction of cytokine profile by *Bifidobacterium breve* and *Lactobacillus* strains of probiotics. *Clin Vaccine Immunol* 2011; 18: 621-628.

Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Abadia-Molina F, Saez-Lara MJ, Campaña-Martin L, Muñoz-Quezada S, Romero F, Gil A, Fontana L. Effects of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 on hepatic steatosis in Zucker rats. *PLoS One* 2014; 9: e98401.

Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Campaña-Martin L, Matencio E, Ortuño I, Martínez-Silla R, Gomez-Gallego C, Periago MJ, Ros G, Chenoll E, Genovés S, Casinos B, Silva A, Corella D, Portolés O, Romero F, Ramón D, Perez de la Cruz A, Gil A, Fontana L. Safety and immunomodulatory effects of three probiotic strains isolated from the feces of breast-fed infants in healthy adults: SETOPROB study. *PLoS One* 2013; 8: e78111.

Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Fontana L, Gil A. Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 15632-15649.

Plaza-Diaz J, Gil A (2013) Fibra y microbiota intestinal. I Jornada Universitaria UCM-CLAS sobre fibra dietética. pp. 12-21. ISBN: 978-84-695-6335-9.

Prado Acosta M, Ruzal SM, Cordo SM. S-layer proteins from *Lactobacillus* sp. inhibit bacterial infection by blockage of DC-SIGN cell receptor. *Int J Biol Macromol* 2016; 92: 998-1005.

Quilodrán-Vega SR, Villena J, Valdebenito J, Salas MJ, Parra C, Ruiz A, Kitazawa H, García A. Isolation of lactic acid bacteria from swine milk and characterization of potential probiotic strains with antagonistic effects against swine-associated gastrointestinal pathogens. *Can J Microbiol* 2016; 62: 514-524.

Ramakrishna BS. Role of the gut microbiota in human nutrition and metabolism. *J Gastroenterol Hepatol* 2013; 28: 9-17.

Rappé MS, Giovannoni SJ. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol* 2003; 57: 369-394.

Razmpoosh E, Javadi M, Ejtahed HS, Mirmiran P. Probiotics as beneficial agents in the management of diabetes mellitus: a systematic review. *Diabetes Metab Res Rev* 2016; 32: 143-168.

Reaven GM. The insulin resistance syndrome: definition and dietary approaches to treatment. *Annu Rev Nutr* 2005; 25: 391-406.

Reid G. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2016; 30: 17-25.

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

Ribeiro Cde M, Zorgi NE, Meireles LR, Garcia JL, Andrade Junior HF. CD19 LYMPHOCYTE PROLIFERATION INDUCED BY *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IN C57BL/6 MICE EXPERIMENTALLY INFECTED WITH *Toxoplasma gondii*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2016; 58: 26.

Richards GP, Watson MA, Needleman DS, Uknalis J, Boyd EF, Fay JP. Mechanisms for *Pseudoalteromonas piscicida*-Induced Killing of *Vibriosis* and Other Bacterial Pathogens. *Appl Environ Microbiol* 2017; 83: e00175-17.

Ripert G, Racedo SM, Elie AM, Jacquot C, Bressollier P, Urdaci MC. Secreted Compounds of the Probiotic *Bacillus clausii* Strain O/C Inhibit the Cytotoxic Effects Induced by *Clostridium difficile* and *Bacillus cereus* Toxins. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 3445-3454.

Rivera-Espinoza Y and Gallardo-Navarro Y. Non-dairy probiotic products. *Food microbiology* 2010; 27: 1-11.

Rogosa M, Mitchell JA, Wiseman RF. A selective medium for the isolation and enumeration of oral and fecal lactobacilli. *J Bacteriol* 1951; 62: 132-133.

Rokana N, Singh R, Mallappa RH, Batish VK, Grover S. Modulation of intestinal barrier function to ameliorate *Salmonella* infection in mice by oral administration of fermented milks produced with *Lactobacillus plantarum* MTCC 5690 - a probiotic strain of Indian gut origin. *J Med Microbiol* 2016; 65: 1482-1493.

Rolfe RD. Population dynamics of the intestinal tract; in Blankenship LC (ed): Colonization Control of Human Bacterial Enteropathogens in Poultry. San Diego, Academic Press 1991; pp 59–75.

Rolny IS, Tiscornia I, Racedo SM, Pérez PF, Bollati-Fogolín M. *Lactobacillus delbrueckii* subsp *lactis* CIDCA 133 modulates response of human epithelial and dendritic cells infected with *Bacillus cereus*. *Benef Microbes* 2016; 7: 749-760.

Romagnani S. Th1/Th2 cells. *Inflamm Bowel Dis* 1999; 5: 285-294.

Romanin D, Serradell M, González Maciel D, Lausada N, Garrote GL, Rumbo M. Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *Int J Food Microbiol* 2010; 140: 102-108.

Rondon MR, Goodman RM, Handelsman J. The Earth's bounty: assessing and accessing soil microbial diversity. *Trends Biotechnol* 1999; 17: 403-409.

Rossi O, van Berkel LA, Chain F, Tanweer Khan M, Taverne N, Sokol H, Duncan SH, Flint HJ, Harmsen HJ, Langella P, Samsom JN, Wells JM. *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses. *Sci Rep* 2016; 6: 18507.

Ruíz FO, Pascual L, Giordano W, Barberis L. Bacteriocins and other bioactive substances of probiotic lactobacilli as biological weapons against *Neisseria gonorrhoeae*. *Pathog Dis* 2015; 73.

Russell JB and Diez-Gonzalez F. The effects of fermentation acids on bacterial growth. *Adv Microb Physiol* 1998; 39: 205–234.

Ryan KA, Jayaraman T, Daly P, Canchaya C, Curran S, Fang F, Quigley EM, O'Toole PW. Isolation of lactobacilli with probiotic properties from the human stomach. *Lett Appl Microbiol* 2008; 47: 269-274.

Ryu SH, Park JH, Choi SY, Jeon HY, Park JI, Kim JY, Ham SH, Choi YK. The Probiotic *Lactobacillus* Prevents *Citrobacter rodentium*-Induced Murine Colitis in a TLR2-Dependent Manner. *J Microbiol Biotechnol* 2016; 26: 1333-1340.

Saiki A, Ishida Y, Segawa S, Hirota R, Nakamura T, Kuroda A. A *Lactobacillus* mutant capable of accumulating long-chain polyphosphates that enhance intestinal barrier function. *Biosci Biotechnol Biochem* 2016; 80: 955-961.

Sakai F, Hosoya T, Ono-Ohmachi A, Ukibe K, Ogawa A, Moriya T, Kadooka Y, Shiozaki T, Nakagawa H, Nakayama Y, Miyazaki T. *Lactobacillus gasseri* SBT2055 induces TGF- β expression in dendritic cells and activates TLR2 signal to produce IgA in the small intestine. *PLoS One* 2014 ;9: e105370.

Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: a hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. *Semin Immunol* 2007; 19: 70–83

Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, Hammer RE, Williams SC, Crowley J, Yanagisawa M, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 16767–16772.

Sánchez B, Urdaci MC, Margolles A. Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions. *Microbiology* 2010; 156: 3232–3242.

Sánchez E, Nieto JC, Boullosa A, Vidal S, Sancho FJ, Rossi G, Sancho-Bru P, Oms R, Mirelis B, Juárez C, Guarner C, Soriano G. VSL#3 probiotic treatment decreases bacterial translocation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Liver Int* 2015; 35: 735-745.

Sanchez M, Darimont C, Drapeau V, Emady-Azar S, Lepage M, Rezzonico E, Ngom-Bru C, Berger B, Philippe L, Ammon-Zuffrey C, Leone P, Chevrier G, St-Amand E, Murette A, Doré J, Tremblay A. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC1.3724 supplementation on weight loss and maintenance in obese men and women. *Br J Nutr* 2014; 111: 1507-1519.

Sanford JA, Gallo RL. Functions of the skin microbiota in health and disease. *Semin Immunol* 2013; 25: 370-377.

Sang LX, Chang B, Zhang WL, Wu XM, Li XH, Jiang M. Remission induction and maintenance effect of probiotics on ulcerative colitis: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 1908-1915.

Sanz Y. Ecological and functional implications of the acid adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. *Int dairy J* 2006; 17: 1284-1289.

Saraswathi V, Ramnanan CJ, Wilks AW, Desouza CV, Eller AA, Murali G, Ramalingam R, Milne GL, Coate KC, Edgerton DS. Impact of hematopoietic cyclooxygenase-1 deficiency on obesity-linked adipose tissue inflammation and metabolic disorders in mice. *Metabolism* 2013; 62: 1673-85.

Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006; 3: 390–407.

Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008; 134: 577–594.

Scarpellini E, Campanale M, Leone D, Purchiaroni F, Vitale G, Lauritano EC, Gasbarrini A. Gut microbiota and obesity. *Intern Emerg Med* 2010; 5: S53-S56.

Schiffrin EJ, Blum S. Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56: S60–S64.

Schiffrin EJ, Brassart D, Servin AL, Rochat F, Donnet-Hughes A. Immune modulation of blood leukocytes in humans by lactic acid bacteria: criteria for strain selection. *Am J Clin Nutr* 1997; 66: 515S-520S.

Serino M, Luche E, Chabo C, Amar J, Burcelin R. Intestinal microflora and metabolic diseases. *Diabetes Metab* 2009; 35: 262-272.

Serra-Majem L, Ribas Barba L, Aranceta Bartrina J, et al. Obesidad infantil y juvenil en España. Resultados del estudio enKid (1998-2000). *Med Clin* 2003; 121: 725-732.

Servin AL: Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. *FEMS Microbiol Rev* 2004; 28: 405–440.

Sgouras D, Maragkoudakis P, Petraki K, Martinez-Gonzalez B, Eriotou E, Michopoulos S, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E, Mentis A. In vitro and in vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* strain Shirota. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 518-526.

Shanahan F. Physiological basis for novel drug therapies used to treat the inflammatory bowel diseases I. Pathophysiological basis and prospects for probiotic therapy in inflammatory bowel disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2005; 288: G417-G421.

Sharafedinov K.K., Plotnikova O.A., Alexeeva R.I., Sentsova T.B., Songisepp E., Stsepetova J., Smidt I, Mikelsaar M. Hypocaloric diet supplemented with probiotic cheese improves body mass index and blood pressure indices of obese hypertensive patients—A randomized double-blind placebo-controlled pilot study. *Nutr J* 2013; 12: 138.

Sharma B, Srivastava S, Singh N, Sachdev V, Kapur S, Saraya A. Role of probiotics on gut permeability and endotoxemia in patients with acute pancreatitis: a double-blind randomized controlled trial. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: 442-448.

Sharma R, Kapila R, Kapasiya M, Saliganti V, Dass G, Kapila S. Dietary supplementation of milk fermented with probiotic *Lactobacillus fermentum* enhances systemic immune response and antioxidant capacity in aging mice. *Nutr Res* 2014; 34: 968-981.

Shi CZ, Chen HQ, Liang Y, Xia Y, Yang YZ, Yang J, Zhang JD, Wang SH, Liu J, Qin HL. Combined probiotic bacteria promotes intestinal epithelial barrier function in interleukin-10-gene-deficient mice. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 4636-4647.

Shida K, Kiyoshima-Shibata J, Kaji R, Nagaoka M, Nanno M. Peptidoglycan from lactobacilli inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through Toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. *Immunology* 2009; 128: e858-69.

Shobharani P, Padmaja RJ, Halami PM. Diversity in the antibacterial potential of probiotic cultures *Bacillus licheniformis* MCC2514 and *Bacillus licheniformis* MCC2512. *Res Microbiol* 2015; 166: 546-554.

Shokri D, Khorasgani MR, Mohkam M, Fatemi SM, Ghasemi Y, Taheri-Kafrani A. The Inhibition Effect of Lactobacilli Against Growth and Biofilm Formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2017 Mar 14.

Silvi S, Rumney CJ, Rowland IR. An assessment of three selective media for bifidobacteria in faeces. *J Appl Bacteriol* 1996; 81: 561-564.

Simeoli R, Mattace Raso G, Lama A, Pirozzi C, Santoro A, Di Guida F, Sanges M, Aksoy E, Calignano A, D'Arienzo A, Meli R. Preventive and therapeutic effects of *Lactobacillus paracasei* B21060-based synbiotic treatment on gut inflammation and barrier integrity in colitic mice. *J Nutr* 2015; 145: 1202-1210.

Solís G, de Los Reyes-Gavilan CG, Fernández N, Margolles A, Gueimonde M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe* 2010; 16: 307-310.

Song DF, Zhu MY, Gu Q. Purification and characterization of Plantaricin ZJ5, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ZJ5. *PLoS One* 2014; 9: e105549.

Song J, Xiao K, Ke YL, Jiao LF, Hu CH, Diao QY, Shi B, Zou XT. Effect of a probiotic mixture on intestinal microflora, morphology, and barrier integrity of broilers subjected to heat stress. *Poult Sci* 2014; 93: 581-588.

Sonnenberg GF, Artis D. Innate lymphoid cell interactions with microbiota: implications for intestinal health and disease. *Immunity* 2012; 37: 601-610.

Srutkova D, Schwarzer M, Hudcovic T, Zakostelska Z, Drab V, Spanova A, Rittich B, Kozakova H, Schabussova I. *Bifidobacterium longum* CCM 7952 Promotes Epithelial Barrier Function and Prevents Acute DSS-Induced Colitis in Strictly Strain-Specific Manner. *PLoS One* 2015; 10: e0134050.

Srůtková D, Spanova A, Spano M, Dráb V, Schwarzer M, Kozaková H, Rittich B. Efficiency of PCR-based methods in discriminating *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* and *Bifidobacterium longum* ssp. *infantis* strains of human origin. *J Microbiol Methods* 2011; 87: 10-16.

Stappenbeck TS, Hooper LV, Gordon JI. Developmental regulation of intestinal angiogenesis by indigenous microbes via Paneth cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15451-15455.

Stetinova V, Smetanova L, Kvetina J, Svoboda Z, Zidek Z, Tlaskalova-Hogenova H. Caco-2 cell monolayer integrity and effect of probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 components. *Neuro Endocrinol Lett* 2010; 31: 51-56.

Strisciuglio C, Miele E, Giugliano FP, Vitale S, Androozzi M, Vitale A, Catania MR, Staiano A, Troncone R, Gianfrani C. Bifidobacteria Enhance Antigen Sampling and Processing by Dendritic Cells in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2015; 21: 1491-1498.

Sun Z, Kong J, Hu S, Kong W, Lu W, Liu W. Characterization of a S-layer protein from *Lactobacillus crispatus* K313 and the domains responsible for binding to cell wall and adherence to collagen. *Appl Microbiol Biotechnol* 2013; 97: 1941-1952.

Sun Z, Liu W, Gao W, Yang M, Zhang J, Wu L, Wang J, Menghe B, Sun T, Zhang H. Identification and characterization of the dominant lactic acid bacteria from kurut: the naturally fermented yak milk in Qinghai, China. *J Gen Appl Microbiol* 2010; 56: 1-10.

Swetwivathana A, Visessanguan W. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. *Meat Sci* 2015; 109: 101-105.

Swidsinski A, Loening-Baucke V, Lochs H, Hale LP. Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1131–1140.

Tada A, Zelaya H, Clua P, Salva S, Alvarez S, Kitazawa H, Villena J. Immunobiotic *Lactobacillus* strains reduce small intestinal injury induced by intraepithelial lymphocytes after Toll-like receptor 3 activation. *Inflamm Res* 2016; 65: 771-783.

Takahashi A, Wada A, Ogushi K, Maeda K, Kawahara T, Mawatari K, Kurazono H, Moss J, Hirayama T, Nakaya Y. Production of beta-defensin-2 by human colonic epithelial cells induced by *Salmonella enteritidis* flagella filament structural protein. *FEBS Lett* 2001; 508: 484-488.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* 2010; 140: 805–820.

Tanaka K, Fujiya M, Konishi H, Ueno N, Kashima S, Sasajima J, Moriichi K, Ikuta K, Tanabe H, Kohgo Y. Probiotic-derived polyphosphate improves the intestinal barrier function through the caveolin-dependent endocytic pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 467: 541-548.

Tannock GW, Taylor C, Lawley B, Loach D, Gould M, Dunn AC, McLellan AD, Black MA, McNoe L, Dekker J, Gopal P, Collett MA. Altered transcription of murine genes induced in the small bowel by administration of probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *Appl Environ Microbiol* 2014; 80: 2851-2859.

Thaiss CA, Levy M, Itav S, Elinav E. Integration of Innate Immune Signaling. *Trends Immunol* 2016; 37: 84-101.

Thakur BK, Saha P, Banik G, Saha DR, Grover S, Batish VK, Das S. Live and heat-killed probiotic *Lactobacillus casei* Lbs2 protects from experimental colitis through Toll-like receptor 2-dependent induction of T-regulatory response. *Int Immunopharmacol* 2016; 36: 39-50.

Thomas CM, Hong T, van Pijkeren JP, Hemarajata P, Trinh DV, Hu W, Britton RA, Kalkum M, Versalovic J. Histamine derived from probiotic *Lactobacillus reuteri* suppresses TNF via modulation of PKA and ERK signaling. *PLoS One* 2012; 7: e31951

Tian Z, Liu X, Dai R, Xiao Y, Wang X, Bi D, Shi D. *Enterococcus faecium* HDRsEf1 Protects the Intestinal Epithelium and Attenuates ETEC-Induced IL-8 Secretion in Enterocytes. *Mediators Inflamm.* 2016; 2016: 7474306.

Tien MT, Girardin SE, Regnault B, Le Bourhis L, Dillies MA, Coppée JY, Bourdet-Sicard R, Sansonetti PJ, Pédrón T. Anti-inflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella*-infected human intestinal epithelial cells. *J Immunol* 2006; 176: 1228-1237.

Tilg H. Obesity, metabolic syndrome, and microbiota: multiple interactions. *J Clin Gastroenterol* 2010; 44: S16-18.

Todoriki K, Mukai T, Sato S, Toba T. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by *Lactobacillus* strains. *J Appl Microbiol* 2001; 91: 154-159.

Todorov SD, Perin LM, Carneiro BM, Rahal P, Holzappel W, Nero LA. Safety of *Lactobacillus plantarum* ST8Sh and Its Bacteriocin. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2017 Feb 23.

Tomaro-Duchesneau C, Saha S, Malhotra M, Jones ML, Labbé A, Rodes L, Kahouli I, Prakash S. Effect of orally administered *L. fermentum* NCIMB 5221 on markers of metabolic syndrome: an in vivo analysis using ZDF rats. *Appl Microbiol Biotechnol* 2014; 98: 115-126.

Tonucci LB, Olbrich Dos Santos KM, Licursi de Oliveira L, Rocha Ribeiro SM, Duarte Martino HS. Clinical application of probiotics in type 2 diabetes mellitus: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clin Nutr* 2017; 36: 85-92.

Töttemeyer S, Foster N, Kaiser P, Maskell DJ, Bryant CE. Toll-like receptor expression in C3H/HeN and C3H/HeJ mice during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 2003; 71: 6653-6657.

Tsai CC, Lin PP, Hsieh YM. Three *Lactobacillus* strains from healthy infant stool inhibit enterotoxigenic *Escherichia coli* grown in vitro. *Anaerobe* 2008; 14: 61-67.

Tuddenham S, Sears CL. The intestinal microbiome and health. *Curr Opin Infect Dis* 2015; 28: 464-470.

Tuomola EM, Ouwehand AC, Salminen S. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. *FEMS Immunol Med Microbiol* 1999; 26: 137-142.

Turnbaugh P.J., Ley R.E., Hamady M., Fraser-Liggett C.M., Knight R., Gordon J.I. The human microbiome project. *Nature* 2007a; 449: 804-810.

Turnbaugh P.J., Ley R.E., Mahowald M.A., Magrini V., Mardis E.R., Gordon J.I. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444: 1027-1031.

Tytgat HL, Douillard FP, Reunanen J, Rasinkangas P, Hendrickx AP, Laine PK, Paulin L, Satokari R, de Vos WM. *Lactobacillus rhamnosus* GG Outcompetes *Enterococcus faecium* via Mucus-Binding Pili: Evidence for a Novel and Heterospecific Probiotic Mechanism. *Appl Environ Microbiol* 2016; 82: 5756-5762.

Ugarte MB, Guglielmotti D, Giraffa G, Reinheimer J, Hynes E. Nonstarter lactobacilli isolated from soft and semihard Argentinean cheeses: genetic characterization and resistance to biological barriers. *J Food Prot* 2006; 69: 2983-2991.

Umu ÖC, Bäuerl C, Oostindjer M, Pope PB, Hernández PE, Pérez-Martínez G, Diep DB. The Potential of Class II Bacteriocins to Modify Gut Microbiota to Improve Host Health. *PLoS One* 2016; 11: e0164036.

Uraipan S, Hongpattarakere T. Antagonistic Characteristics Against Food-borne Pathogenic Bacteria of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria Isolated from Feces of Healthy Thai Infants. *Jundishapur J Microbiol* 2015; 8: e18264.

Vahedi Shahandashti R, Kasra Kermanshahi R, Ghadam P. The inhibitory effect of bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 on planktonic cells and biofilms of *Serratia marcescens*. *Turk J Med Sci* 2016; 46: 1188-1196.

Valle M, Gascón F, Martos R, et al. Metabolic cardiovascular syndrome in obese prepubertal children: the role of high fasting insulin levels. *Metabolism* 2002; 51: 423-428.

van Beek AA, Sovran B, Hugenholtz F, Meijer B, Hoogerland JA, Mihailova V, van der Ploeg C, Belzer C, Boekschoten MV, Hoeijmakers JH, Vermeij WP, de Vos P, Wells JM, Leenen PJ, Nicoletti C, Hendriks RW, Savelkoul HF. Supplementation with *Lactobacillus plantarum* WCFS1 Prevents Decline of Mucus Barrier in Colon of Accelerated Aging *Ercc1- Δ 7* Mice. *Front Immunol* 2016; 7: 408.

Van Tassell ML, Miller MJ. *Lactobacillus* adhesion to mucus. *Nutrients* 2011; 3: 613–636.

Vandamme P, Pot B, Gillis M, de Vos P, Kersters K, Swings J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* 1996; 60: 407-438.

Vélez MP, De Keersmaecker SC, Vanderleyden J. Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiol Lett* 2007; 276: 140–148.

Vilahur G, López-Bernal S, Camino S, Mendieta G, Padró T, Badimon L. *Lactobacillus plantarum* CECT 7315/7316 intake modulates the acute and chronic innate inflammatory response. *Eur J Nutr* 2015; 54: 1161-1171.

Villena J, Aso H, Kitazawa H. Regulation of toll-like receptors-mediated inflammation by immunobiotics in bovine intestinal epitheliocytes: role of signaling pathways and negative regulators. *Front Immunol* 2014; 5: 421.

Vinderola G, Matar C, Perdígón G. Role of the epithelial cells in the immune effects mediated by Gram-positive probiotic bacteria. Involvement of Toll-like receptors. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005; 12: 1075–1084.

Vizoso Pinto MG, Franz CM, Schillinger U, Holzapfel WH. *Lactobacillus* spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. *Int J Food Microbiol* 2006; 109: 205-214.

Vizioso Pinto MG, Rodriguez Gómez M, Seifert S, Watzl B, Holzapfel WH, Franz CM. Lactobacilli stimulate the innate immune response and modulate the TLR expression of HT29 intestinal epithelial cells in vitro. *Int J Food Microbiol* 2009; 133: 86-93.

Vliagoftis H, Kouranos VD, Betsi GI, Falagas ME. Probiotics for the treatment of allergic rhinitis and asthma: systematic review of randomized controlled trials. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2008; 101: 570-579.

Voltan S, Castagliuolo I, Elli M, et al. (2007) Aggregating phenotype in *Lactobacillus crispatus* determines intestinal colonization and TLR2 and TLR4 modulation in murine colonic mucosa. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1138–1148.

Vreugdenhil AC, Rousseau CH, Hartung T, Greve JW, van 't Veer C, Buurman WA. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein mediates LPS detoxification by chylomicrons. *J Immunol* 2003; 170: 1399-1405.

Wachi S, Kanmani P, Tomosada Y, Kobayashi H, Yuri T, Egusa S, Shimazu T, Suda Y, Aso H, Sugawara M, Saito T, Mishima T, Villena J, Kitazawa H. *Lactobacillus delbrueckii* TUA4408L and its extracellular polysaccharides attenuate enterotoxigenic *Escherichia coli*-induced inflammatory response in porcine intestinal epitheliocytes via Toll-like receptor-2 and 4. *Mol Nutr Food Res* 2014; 58: 2080-2093.

Wan LY, Chen ZJ, Shah NP, El-Nezami H. Modulation of Intestinal Epithelial Defense Responses by Probiotic Bacteria. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2016; 56: 2628-2641.

Wang Y, Lobstein T. Worldwide trends in childhood overweight and obesity. *Int J Pediatr Obes* 2006; 1: 11-25.

Wang Z, Wang L, Chen Z, Ma X, Yang X, Zhang J, Jiang Z. In Vitro Evaluation of Swine-Derived *Lactobacillus reuteri*: Probiotic Properties and Effects on Intestinal Porcine Epithelial Cells Challenged with Enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J Microbiol Biotechnol* 2016; 26: 1018-1025.

Tian P, Li B, He C, Song W, Hou A, Tian S, Meng X, Li K, Shan Y. Antidiabetic (type 2) effects of *Lactobacillus* G15 and Q14 in rats through regulation of intestinal permeability and microbiota. *Food Funct* 2016; 7: 3789-3797.

Wasim M, Awan FR, Najam SS, Khan AR, Khan HN. Role of Leptin Deficiency, Inefficiency, and Leptin Receptors in Obesity. *Biochem Genet* 2016; 54: 565-572.

Wawrocki S, Druszczyńska M, Kowalewicz-Kulbat M, Rudnicka W. Interleukin 18 (IL-18) as a target for immune intervention. *Acta Biochim Pol* 2016; 63: 59-63.

Weiss DS, Raupach B, Takeda K, Akira S, Zychlinsky A. Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J Immunol* 2004; 172: 4463-4469.

Weiss R, Dufour S, Taksali S, et al. Prediabetes in obese youth: a syndrome of impaired glucose tolerance, severe insulin resistance, and altered myocellular and abdominal fat partitioning. *The Lancet* 2003; 362: 951-957.

Wells JM. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb Cell Fact* 2011; 10: S17.

West PA, Hewitt JH, Murphy OM. Influence of methods of collection and storage on the bacteriology of human milk. *J Appl Bacteriol* 1979; 46: 269-277.

Westerlund B and Korhonen TK. Bacterial proteins binding to the mammalian extracellular matrix. *Mol Microbiol* 1993; 9: 687-694.

White BD, Martin RJ. Evidence for a central mechanism of obesity in the Zucker rat: role of neuropeptide Y and leptin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1997; 214: 222-232.

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: the unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 6578-83.

Wickramasinghe S, Pacheco AR, Lemay DG, Mills DA. Bifidobacteria grown on human milk oligosaccharides downregulate the expression of inflammation-related genes in Caco-2 cells. *BMC Microbiol* 2015; 15: 172

Winker S and Woese CR. A definition of the domains Archaea, Bacteria and Eucarya in terms of small subunit ribosomal RNA characteristics. *Syst Appl Microbiol* 1991; 14: 305-310.

Woese CR. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 1987; 51: 221-271.

Won TJ, Kim B, Lim YT, Song DS, Park SY, Park ES, Lee DI, Hwang KW. Oral administration of *Lactobacillus* strains from Kimchi inhibits atopic dermatitis in NC/Nga mice. *J Appl Microbiol* 2011; 110: 1195-1202.

Wong VW, Won GL, Chim AM, Chu WC, Yeung DK, Li KC, Chan HL. Treatment of nonalcoholic steatohepatitis with probiotics. A proof-of-concept study. *Ann Hepatol* 2013; 12: 256-262.

Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011; 334: 105-108.

Wu Y, Zhu C, Chen Z, Chen Z, Zhang W, Ma X, Wang L, Yang X, Jiang Z. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* on epithelial barrier disruption caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in intestinal porcine epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2016; 172: 55-63.

Xie J, Nie S, Yu Q, Yin J, Xiong T, Gong D, Xie M. *Lactobacillus plantarum* NCU116 Attenuates Cyclophosphamide-Induced Immunosuppression and Regulates Th17/Treg Cell Immune Responses in Mice. *J Agric Food Chem* 2016; 64: 1291-1297.

Ya T, Zhang Q, Chu F, Merritt J, Bilige M, Sun T, Du R, Zhang H. Immunological evaluation of *Lactobacillus casei* Zhang: a newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China. *BMC Immunol* 2008; 9: 68.

Yach D, Stuckler D, Brownell KD. Epidemiologic and economic consequences of the global epidemics of obesity and diabetes. *Nature Med* 2006; 12: 62-66.

Yadav AK, Tyagi A, Kumar A, Saklani AC, Grover S, Batish VK. Adhesion of indigenous *Lactobacillus plantarum* to gut extracellular matrix and its physicochemical characterization. *Arch Microbiol* 2015; 197: 155-164.

Yadav H., Jain S., Sinha P.R. Oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Dairy Res* 2008; 75:189-195.

Yan F, Cao H, Cover TL, Whitehead R, Washington MK, Polk DB. Soluble proteins produced by probiotic bacteria regulate intestinal epithelial cell survival and growth. *Gastroenterology* 2007; 132: 562-575.

Yan F, Polk DB. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002; 277: 50959–50965.

Yang KM, Jiang ZY, Zheng CT, Wang L, Yang XF. Effect of *Lactobacillus plantarum* on diarrhea and intestinal barrier function of young piglets challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* K88. *J Anim Sci* 2014; 92: 1496-1503.

Yao B, Wang S, Xiao P, Wang Q, Zhang Y. MAPK Signaling Pathways in Eye Wounds: Multifunction and Cooperation. *Exp Cell Res* 2017 Jun 29. pii: S0014-4827(17)30354-3.

Yildiz HM, Carlson TL, Goldstein AM, Carrier RL. Mucus Barriers to Microparticles and Microbes are Altered in Hirschsprung's Disease. *Macromol Biosci* 2015; 15 : 712-8.

Yildirim Z, Winters DK, Johnson MG. Purification, amino acid sequence and mode of action of bifidocin B produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J Appl Microbiol* 1999; 86: 45–54.

Yu J, Wang WH, Menghe BL, Jiri MT, Wang HM, Liu WJ, Bao QH, Lu Q, Zhang JC, Wang F, Xu HY, Sun TS, Zhang HP. Diversity of lactic acid bacteria associated with traditional fermented dairy products in Mongolia. *J Dairy Sci* 2011; 94: 3229-3241.

Yu Q, Yuan L, Deng J, Yang Q. *Lactobacillus* protects the integrity of intestinal epithelial barrier damaged by pathogenic bacteria. *Front Cell Infect Microbiol* 2015; 5: 26.

Zago M, Fornasari ME, Carminati D, Burns P, Suárez V, Vinderola G, Reinheimer J, Giraffa G. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. *Food Microbiol* 2011; 28: 1033-1040.

Zárate G, Palacios JM, Villena J, Zúñiga-Hansen ME. Inhibition of enteropathogens adhesion to human enterocyte-like HT-29 cells by a dairy strain of *Propionibacterium acidipropionici*. *Benef Microbes* 2016; 7: 431-441.

Zarpelon AC, Pinto LG, Cunha TM, Vieira SM, Carregaro V, Souza GR, Silva JS, Ferreira SH, Cunha FQ, Verri WA Jr. Endothelin-1 induces neutrophil recruitment in adaptive inflammation via TNF α and CXCL1/CXCR2 in mice. *Can J Physiol Pharmacol* 2012; 90: 187-99.

Zavaglia AG, Kociubinski G, Pérez P, De Antoni G. Isolation and characterization of Bifidobacterium strains for probiotic formulation. *J Food Prot* 1998; 61: 865-873.

Zeuthen LH, Fink LN, Frokiaer H. Toll-like receptor 2 and nucleotide-binding oligomerization domain-2 play divergent roles in the recognition of gut derived lactobacilli and bifidobacteria in dendritic cells. *Immunology* 2008; 124: 489-502.

Zhang L, Zhang L, Zhan X, Zeng X, Zhou L, Cao G, Chen A, Yang C. Effects of dietary supplementation of probiotic, *Clostridium butyricum*, on growth performance, immune response, intestinal barrier function, and digestive enzyme activity in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *J Anim Sci Biotechnol* 2016; 7: 3.

Zhang MM, Cheng JQ, Lu YR, Yi ZH, Yang P, Wu XT. Use of pre-, pro- and synbiotics in patients with acute pancreatitis: a meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 3970-3978.

Zhang Z, Tao X, Shah NP, Wei H. Antagonistics against pathogenic *Bacillus cereus* in milk fermentation by *Lactobacillus plantarum* ZDY2013 and its anti-adhesion effect on Caco-2 cells against pathogens. *J Dairy Sci* 2016; 99: 2666-2674.

Zhao W, Dao C, Karim M, Gomez-Chiarri M, Rowley D, Nelson DR. Contributions of tropodithietic acid and biofilm formation to the probiotic activity of *Phaeobacter inhibens*. *BMC Microbiol* 2016; 16: 1.

Zhu D, Sun Y, Huo GC, Yang L, Liu F, Li A, Meng XC. Complete genome sequence of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* KLDS 2.0603, a probiotic strain with digestive tract resistance and adhesion to the intestinal epithelial cells. *J Biotechnol* 2016; 220: 49-50.

Zoetendal EG, Raes J, van den Bogert B, Arumugam M, Booijink CC, Troost FJ, Bork P, Wels M, de Vos WM, Kleerebezem M. The human small intestinal microbiota is driven by rapid uptake and conversion of simple carbohydrates. *ISME J* 2012; 6: 1415-1426.

Zommiti M, Almohammed H, Ferchichi M. Purification and Characterization of a Novel Anti-Campylobacter Bacteriocin Produced by *Lactobacillus curvatus* DN317. *Probiotics Antimicrob Proteins* 2016; 8: 191-201.

Zyrek AA, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U, Schmidt MA. Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol* 2007; 9: 804-816.

