

Probióticos

Su impacto en la
nutrición y la salud

Una visión desde
el Cono Sur

Juan Andrés De Paula

Gabriel Vinderola

Ricardo Weill



PROBIÓTICOS

SU IMPACTO EN LA NUTRICIÓN Y LA SALUD
UNA VISIÓN DESDE EL CONO SUR

PROBIÓTICOS

SU IMPACTO EN LA NUTRICIÓN Y LA SALUD
UNA VISIÓN DESDE EL CONO SUR

Juan Andrés De Paula
Gabriel Vinderola
Ricardo Weill

Tapa y contratapa: Blaunt

Diseño de interiores: Blaunt

Edición general: Alejandro Ferrari

Quedan rigurosamente prohibidas, sin la autorización escrita de los titulares del copyright, bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, y la distribución de ejemplares de ella mediante alquiler o préstamo públicos.

1ª edición, Asociación Civil Danone para la Nutrición, la Salud y la Calidad de Vida, 2018.

© de todas las ediciones

Asociación Civil Danone para la Nutrición,
la Salud y la Calidad de Vida
Moreno 877 - Piso 13 - C.A.B.A.
secretaria@institutodanoneconosur.org

Queda hecho el depósito que previene la Ley 11.723
Impreso en Argentina – Printed in Argentina

Tirada: 50 ejemplares.

Impreso en Latingráfica
Rocamora 4161
CABA
Argentina

PRÓLOGO

Cuando los primeros organismos animales hicieron su aparición en la tierra –hace más de 600 millones de años– las bacterias ya eran dueñas del mundo. Desde entonces, no solo hemos aprendido a convivir con ellas, sino que hemos experimentado lo que podría denominarse una co-evolución en un diálogo caracterizado por una interacción que ha sido tan constante como diversa.

Es necesario reconocer que solamente en muy pocos casos, estas interacciones revisten de un carácter patógeno. En la mayor parte de los procesos, bacterias y organismos animales nos ayudamos mutuamente. En el cuerpo humano la microbiota estable más importantes se encuentra en boca, tracto gastrointestinal, vagina y piel. Sin lugar a dudas, la microbiota intestinal es la más compleja, tanto por la cantidad de organismos que la componen como por la diversidad de funciones que posee como las interacciones con el sistema inmune. Basta mencionar que un animal axénico (sin bacterias en su intestino) por demás saludable, tienen una sobrevida muy frágil, aparecen enfermedades no solo infecciosas sino degenerativas y además requiere de un 30% más de alimento que un animal naturalmente colonizado por bacterias. Esa es una medida aproximada de la contribución nutricional aportada por el salvataje de nutrientes realizado por la microbiota intestinal. No debería sorprendernos, porque los humanos contamos con apenas 20 genes para codificar las enzimas necesarias para digerir carbohidratos, mientras que solamente los bacteroides cuentan con más de 260.

La microbiota intestinal crece y madura a partir del nacimiento (y existen indicios que algunos procesos comienzan en la vida intrauterina) hasta que alcanza su homeostasis alrededor de los tres años de edad. Los primeros microorganismos colonizadores son claves y de allí el papel de la exposición durante el parto, los prebióticos de la leche de madre que representan hasta el 8% del total de sus nutrientes) están compuestos por más de 200 oligosacáridos diferentes tienen como propósito fundamental el desarrollo de una microbiota estable y saludable. Es altamente probable que en el mismo objetivo opere el papel activo de la ruta entero-mamaria seleccionando cepas del entorno intestinal de la madre para conformar los 3 enterotipos predominantes. Aunque, escasas en variedad (no suelen ser más de 2 a 15 las especies cultivables en leche materna) la evidencia demuestra que son estables y características de cada mujer y que luego pueden ser “rescatadas” de la microbiota intestinal.

Hoy existe evidencia de la asociación entre la microbiota y varios posibles mecanismos fisiopatológicos en numerosas enfermedades crónicas: alérgicas, inflamatorias, obesidad, diabetes y el síndrome metabólico.

En un mundo donde es común uso de antibióticos, la dieta, las condiciones de crianza animal se han modificado tan sustancialmente que hay un impacto en la composición, función e interacción de nuestra microbiota intestinal y la salud. En este sentido, es válido preguntarnos si existe una microbiota saludable? Los alimentos y

compuestos bioactivos de la dieta que hoy consideramos saludables son promotores de una mayor diversidad en la composición de la microbiota intestinal, todos aportan sustratos que favorecen el desarrollo de diversas vías metabólicas hacia el interior de la propia microbiota. Es probable que esta riqueza en el dialogo molecular bacteriano pueda contribuir al mantenimiento de la salud.

Estas son algunas de las consideraciones que han impulsado al vertiginoso crecimiento de la ciencia detrás de los probióticos. Apenas hace menos de 20 años un comité de expertos reunido en Córdoba definió a los probióticos como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas ejercen un beneficio para el hospedador. La enorme contribución de esta comisión radicó en que puso un nombre y un territorio común que ayudo que las distintas disciplinas involucradas tuvieran un intercambio más rico y que se ha traducido en el cuerpo de conocimiento científico que hoy está disponible.

Pero, aún mucho antes de la definición surgida en Córdoba, los probióticos han acompañado la historia del hombre desde hace al menos 10.000 años. El viejo testamento atribuí la longevidad de Abraham al consumo de leche agria, gran parte de los alimentos fermentados en su denominación cultural como su diseminación reconocían un componente de salud, Metchnikof atribuí la longevidad de los pueblos balcánicos a la composición de la flora intestinal. No nos debería sorprender, porque los alimentos, en especial los lácteos fermentados son el segundo hábitat natural de las bacterias acidolácticas. Existen numerosas razones tecnológicas y estudios experimentales para pensar que los alimentos fermentados tienen una profunda transformación y las perspectivas del uso de probióticos es amplia.

Desde el Instituto Danone del Cono Sur hemos abordado siempre con una perspectiva regional temas centrales de la alimentación, la nutrición y la salud. Es por ello, que el IDCS ha convocado a más de 15 investigadores referentes de la Región y del mundo para organizar un Taller en las afueras de la ciudad de Buenos Aires, que es la semilla germinal de este libro.

Merece destacarse el papel de Gabriel Vinderola, Juan de Paula y Ricardo Weill quienes más allá de su responsabilidad editorial, han desempeñado un papel central en la armonización de los temas y de sus documentos. Como en otras ocasiones, me es grato agradecer el compromiso de Alejandro Ferrari en la revisión y compilación del libro

Aspiramos a que este documento contribuya a enriquecer el material de consulta, ser una guía en la investigación, mejorar la docencia, ayudar a la toma de decisiones clínicas y constituir una referencia en idioma español de una visión moderna y actualizada del complejo mundo de los probióticos así como un mojón más en el necesario proceso de avanzar hacia un marco regulatorio global en el contexto del CODEX.

Dr. Esteban Carmuega
Director Instituto Danone

ÍNDICE

PRÓLOGO	5
• CAPÍTULO 1	
ESTABLECIMIENTO Y DINÁMICA DEL MICROBIOMA INTESTINAL Y FECAL HUMANO DURANTE LOS PRIMEROS 1000 DÍAS DE VIDA	17
MIGUEL GUEIMONDE - ROCIO MARTIN - JAN KNOL - SEPPO SALMINEN	
I. INTRODUCCIÓN	19
II. EL DESARROLLO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	21
II.A. COLONIZACIÓN <i>IN UTERO</i>	21
II.B. MODO DE PARTO	22
II.C. TIPO DE ALIMENTACIÓN	23
II.D. EDAD GESTACIONAL	25
II.E. USO DE ANTIBIÓTICOS	25
II.F. IMPACTO DE LA COLONIZACIÓN	26
II.G. CONCLUSIONES	27
III. BIBLIOGRAFÍA CITADA	27
• CAPÍTULO 2	
EL USO DE PROBIÓTICOS DURANTE LOS PRIMEROS 1000 DÍAS DE VIDA	31
MARIA CARMEN COLLADO - KAOUTHER BEN AMOR - SEPPO SALMINEN - JAN KNOL - ROCIO MARTIN	
I. LA LECHE MATERNA HUMANA COMO REFERENCIA PARA EL DESARROLLO DE ESTRATEGIAS	

NUTRICIONALES EN LA VIDA TEMPRANA	33
I.A. LA MICROBIOTA DE LA LECHE HUMANA	34
I.B. OLIGOSACÁRIDOS DE LECHE HUMANA	35
II. LOS PROBIÓTICOS EN LOS PRIMEROS 1000 DÍAS	37
II.A. LOS PROBIÓTICOS DURANTE EL EMBARAZO	38
II.A.I. LOS PROBIÓTICOS Y LAS INFECCIONES GENITOURINARIAS	38
II.A.II. LOS PROBIÓTICOS Y LA COLONIZACIÓN POR <i>STREPTOCOCCUS</i> DEL GRUPO B	38
II.A.III. LOS PROBIÓTICOS Y LA DIABETES MELLITUS GESTACIONAL	39
II.B. LOS PROBIÓTICOS DURANTE LA INFANCIA	41
II.B.I. LOS PROBIÓTICOS Y LA PREVENCIÓN DE LA ALERGIA	41
II.B.II. LOS PROBIÓTICOS EN LA PREVENCIÓN DE LA ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE Y LA SEPSIS DE DEBUT TARDÍO	43
II.B.III. EL USO DE PROBIÓTICOS PARA MANEJAR Y PREVENIR EL CÓLICO INFANTIL	44
II.B.IV. LOS PROBIÓTICOS EN EL MANEJO DE LA DIARREA AGUDA, Y LA DIARREA ASOCIADA A ANTIBIÓTICOS, EN NIÑOS.	45
III. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	46
IV. BIBLIOGRAFÍA CITADA	47
• CAPÍTULO 3	
YOGURES CON PROBIÓTICOS; UNA VISIÓN TECNOLÓGICA	61
GABRIEL VINDEROLA	
I. ARGENTINA, CUNA DE UNA DEFINICIÓN DE PROBIÓTICOS CON CONSENSO INTERNACIONAL	63
II. ALIMENTOS UTILIZADOS COMO VEHÍCULOS DE PROBIÓTICOS	64
III. LECHE FERMENTADAS Y YOGURES CON PROBIÓTICOS	65
IV. ¿CÓMO SE ELABORA UN YOGUR CON PROBIÓTICOS?	69
V. RECuento DE CÉLULAS VIABLES DE PROBIÓTICOS EN YOGURES	71

VI. CONCLUSIONES	73
VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	74

• CAPÍTULO 4

METODOLOGÍAS EN LA INVESTIGACIÓN DE LOS BENEFICIOS DE LOS PROBIÓTICOS	77
--	----

DIEGO HERNÁN GIUNTA

I. INTRODUCCIÓN	79
II. DISEÑOS	79
II.A. ESTUDIOS OBSERVACIONALES	79
II.B. COHORTE	80
II.C. CASOS Y CONTROLES	80
II.D. CORTE TRANSVERSAL	81
II.E. ESTUDIO ECOLÓGICO	81
II.F. REPORTE DE CASOS/SERIE DE CASOS	82
II.G. ESTUDIOS EXPERIMENTALES	82
II.H. ENSAYO CLÍNICO	82
II.I. ESTUDIO CUASIEXPERIMENTAL	84
III. POBLACIÓN	85
IV. INTERVENCIÓN	87
V. COMPARADOR	89
VI. EVENTOS DE INTERÉS	90
VII. SEGUIMIENTO	92
VIII. SEGURIDAD	92
IX. ASIGNACIÓN AL AZAR DE TRATAMIENTO	94
X. CIEGO	96

XI. ADHERENCIA	97
XII. ESTIMACIÓN DE TAMAÑO MUESTRAL	99
XIII. CONCLUSIÓN	101
XIV. BIBLIOGRAFÍA CITADA	102

• **CAPÍTULO 5**

EVIDENCIAS ACERCA DEL PAPEL DE LOS PROBIÓTICOS EN LA SALUD DIGESTIVA DESDE LA PERSPECTIVA DE LA CLÍNICA GASTROENTEROLÓGICA	109
--	-----

JUAN ANDRÉS DE PAULA

I. INTRODUCCIÓN	111
II. LA MICROBIOTA Y EL HUÉSPED	111
III. PROBIÓTICOS Y TRASTORNOS FUNCIONALES:	112
IV. PROBIÓTICOS Y SOBRECRECIMIENTO BACTERIANO DEL INTESTINO DELGADO	113
V. PROBIÓTICOS Y CÁNCER COLORRECTAL	113
VI. PROBIÓTICOS Y DIARREA INFECCIOSA	114
VII. PROBIÓTICOS Y OTRAS AFECCIONES GASTROINTESTINALES	115
VIII. CONCLUSIONES	115
IX. BIBLIOGRAFIA CITADA	116

• **CAPÍTULO 6**

ENFERMEDADES ALÉRGICAS, MICROBIOTA Y EMPLEO DE PROBIÓTICOS PARA SU TRATAMIENTO	119
--	-----

GUILLERMO H. DOCENA

I. GENERALIDADES SOBRE ENFERMEDADES ALÉRGICAS Y TRATAMIENTOS	121
--	-----

I.A. ENFERMEDADES ALÉRGICAS. DEFINICIONES Y CONCEPTOS GENERALES	121
I.B. PREVALENCIA, “HIPÓTESIS DE LA HIGIENE” Y MICROBIOTA	123
I.C. MECANISMOS DE TOLERANCIA	126
II. MICROBIOTA Y ENFERMEDADES ALÉRGICAS	127
III. TRATAMIENTOS BASADOS EN EL EMPLEO DE PROBIÓTICOS, ENSAYOS CLÍNICOS EN PACIENTES ALÉRGICOS	131
V. BIBLIOGRAFÍA CITADA	134

• CAPÍTULO 7

EVIDENCIA DE LA EFECTIVIDAD DE LOS PROBIÓTICOS EN PROGRAMAS SOCIALES	137
JULIO VILLENA - SUSANA ALVAREZ - GRACIELA FONT - SUSANA SALVA - MARÍA PÍA TARANTO	
I. INFECCIONES INTESTINALES Y RESPIRATORIAS EN NIÑOS	139
II. LOS MICROORGANISMOS BENEFICIOSOS COMO ALTERNATIVA PARA COMBATIR INFECCIONES	139
III. <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> CRL1505 Y SUS MECANISMOS DE ACCIÓN	140
IV. EFECTO DEL <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> CRL1505 EN LA SALUD DE LOS NIÑOS Y EL NACIMIENTO DEL PROGRAMA “YOGURITO”	143
IV. A. ESTUDIO CLÍNICO	143
IV. B. ETAPAS DE IMPLEMENTACIÓN	144
IV. C. RESULTADOS DEL ESTUDIO CLÍNICO	147
IV. D. CONCLUSIONES GENERALES	150
V. EL PROGRAMA SOCIAL “YOGURITO”: DESAFÍOS, APRENDIZAJES E IMPACTOS	150
VI. MODELO DE LA TRIPLE HÉLICE EN BENEFICIO DE LA SOCIEDAD: CONVIVENCIA ESTADO-SECTOR CIENTÍFICO-SECTOR PRODUCTIVO	152
VII. AGRADECIMIENTOS	153
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	153

• CAPÍTULO 8

EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DE LOS MECANISMOS INDUCIDOS POR PROBIÓTICOS EN LA MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE 157

CAROLINA MALDONADO GALDEANO - SILVIA INÉS CAZORLA - GABRIELA PERDIGÓN
JOSÉ MARÍA LEMME DUMIT

I. INTRODUCCIÓN: EL PAPEL DE LA MICROBIOTA EN LA RESPUESTA INMUNE	159
II. BACTERIAS PROBIÓTICAS COMO INMUNOMODULADORES	159
III. EFECTO DE LOS PROBIÓTICOS SOBRE LA BARRERA EPITELIAL	161
IV. EFECTO SOBRE LÁMINA PROPIA DEL INTESTINO DELGADO	165
V. MECANISMOS INDUCIDOS POR PROBIÓTICOS EN ETAPAS TEMPRANAS DE LA VIDA	170
VI. MECANISMOS INMUNES DIFERENCIALES ENTRE BACTERIAS COMENSALES Y PROBIÓTICAS	171
VII. CONCLUSIONES	172
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	172

• CAPÍTULO 9

PROBIÓTICOS Y NUTRICIÓN ANIMAL 179

ELOY ARGANARAZ MARTÍNEZ - JAIME BABOT - MARÍA CRISTINA APELLA - ADRIANA PÉREZ CHAIA

I. INTRODUCCIÓN	181
II. PRODUCCIÓN ANIMAL INTENSIVA	181
III. LA MICROBIOTA INTESTINAL DE ANIMALES DE GRANJA	183
III.A. MICROBIOTA DE AVES	184
III.B. MICROBIOTA DE PORCINOS	186
III.B. MICROBIOTA DE RUMIANTES	187
IV. FACTORES QUE AFECTAN A LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA PRODUCCIÓN INTENSIVA	189
V. USO DE ADITIVOS EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL	191

VI. MODO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS PARA ANIMALES	192
VII. USO DE PROBIÓTICOS EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL	194
VIII. PROTECCIÓN DEL MEDIOAMBIENTE	196
X. BIBLIOGRAFÍA CITADA	197

• CAPÍTULO 10

PROBIÓTICOS: BENEFICIOS BÁSICOS Y MECANISMOS COMUNES	203
MARY ELLEN SANDERS	
I. INTRODUCCIÓN	205
II. BENEFICIOS DE SALUD DE LOS PROBIÓTICOS	205
III. BENEFICIOS DE SALUD DE LOS PROBIÓTICOS EN INDIVIDUOS SANOS	208
IV. MANEJO DEL SESGO EN ESTUDIOS SOBRE PROBIÓTICOS	209
V. MECANISMOS COMPARTIDOS Y BENEFICIOS CENTRALES DE PROBIÓTICOS	210
VI. IMPLICANCIAS CIENTÍFICAS Y REGULATORIAS DE LOS MECANISMOS COMPARTIDOS ENTRE TAXONES PROBIÓTICOS	211
VII. EL FUTURO DE LOS PROBIÓTICOS	212
VIII. CONCLUSIONES	213
IX. AGRADECIMIENTOS	213
X. BIBLIOGRAFIA CITADA	213

• CAPÍTULO 11

ASOCIACIÓN INTERNACIONAL DE PROBIÓTICOS: UNA PERSPECTIVA GLOBAL	219
GEORGE PARASKEVAKOS	

I. INTRODUCCIÓN	221
I.A. PROBIÓTICOS; UN MERCADO QUE EXPERIMENTA UN CRECIMIENTO SIN PRECEDENTES	221
II. SEGMENTACIÓN DEL MERCADO Y DE LA CATEGORÍA DE PRODUCTO	224
III. SEGMENTACIÓN DEL MERCADO EN ÁREAS ESPECÍFICAS DEL MUNDO	225
IV. OBSERVACIONES Y PREDICCIONES PARA EL 2025	226
V. FACILITADORES DEL CRECIMIENTO	227
VI. ESTADO DEL ARTE CIENTÍFICO EN USOS NO CONVENCIONALES DE LOS PROBIÓTICOS; NUEVAS OPORTUNIDADES	229
VII. REGULACIONES EN EL CAMPO DE LOS PROBIÓTICOS; UN PAISAJE DIVERGENTE	230
VIII. LOS PROBIÓTICOS EN LAS DISTINTAS REGIONES DEL MUNDO	230
VIII.A. CANADÁ; LOS PROBIÓTICOS COMO PRODUCTOS DE SALUD NATURALES (PSN)	230
VIII.B. ESTADOS UNIDOS: LOS PROBIÓTICOS COMO SUPLEMENTOS DIETARIOS	233
VIII.C. EUROPA; SUPLEMENTOS ALIMENTARIOS	234
VIII.D. AUSTRALIA; MEDICINA COMPLEMENTARIA	234
IX. RESUMEN GENERAL	235
X. PERSPECTIVAS Y DESAFÍOS	236
XI. BIBLIOGRAFÍA CITADA	236

• CAPÍTULO 12

ACORTANDO LA BRECHA EN LA REGLAMENTACIÓN SOBRE PROBIÓTICOS EN EL CONO SUR: ESCENARIO EN ARGENTINA	239
SUSANA FATTORI - ELIANA CORIA - ANDREA MOSER	
I. INTRODUCCIÓN	241
II. NORMATIVA ALIMENTARIA EN ARGENTINA	241
III. REGULACIÓN SOBRE PROBIÓTICOS EN PARTICULAR	242
IV. ANTECEDENTES QUE LLENARON EL VACÍO REGULATORIO EN ARGENTINA	243

V. LOGROS DEL TRABAJO EN ARGENTINA	244
VI. ESCENARIO ACTUAL DE LA REGULACIÓN SOBRE PROBIÓTICOS	245
VII. SITUACIÓN REGIONAL	246
VII.A. MERCADO COMÚN DEL SUR (MERCOSUR)	246
VII.B. BRASIL	246
VII.C. CHILE	248
VII.D. COLOMBIA	248
VII.E. ECUADOR	249
VII.F. SECRETARÍA DE INTEGRACIÓN ECONÓMICA CENTROAMERICANA (SIECA)	250
VIII. SITUACIÓN INTERNACIONAL	251
VIII.A. CANADÁ	251
VIII.B. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	251
VIII.C. EUROPA	252
VIII.D. AUSTRALIA Y NUEVA ZELANDA	252
VIII.E. JAPÓN	253
IX. CONCLUSIONES	254
X. BIBLIOGRAFÍA CITADA	254

EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DE LOS MECANISMOS INDUCIDOS POR PROBIÓTICOS EN LA MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE

Carolina Maldonado Galdeano

- *Laboratorio de Inmunología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA- CONICET), Tucumán, Argentina.*
- *Cátedra de Inmunología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán.*

Silvia Inés Cazorla

- *Laboratorio de Inmunología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA- CONICET), Tucumán, Argentina.*
- *Cátedra de Inmunología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán.*

Gabriela Perdigón

perdigon@cerela.org.ar

- *Laboratorio de Inmunología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET).*

José María Lemme Dumit

- *Laboratorio de Inmunología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA- CONICET), Tucumán, Argentina.*

RESUMEN

El tracto gastrointestinal es uno de los ecosistemas microbiológicamente más activos, pues contiene una gran masa de bacterias, levaduras y otros microorganismos. Esta comunidad diversa y dinámica tiene funciones específicas, que son claves en el mantenimiento de una buena salud. El papel primordial de esta microbiota, es mantener la homeostasis de la mucosa intestinal y promover la maduración del sistema inmune.

Algunas de las bacterias que constituyen la microbiota y otras que forman parte de los alimentos (yogur, leches cultivadas, quesos, y muchos otros alimentos no lácteos), tienen la capacidad de actuar de manera beneficiosa sobre la salud. Estos microorganismos reciben el

nombre de probióticos y ha llevado a numerosos científicos a analizar el efecto de éstos tanto en huésped sano como en grupos de riesgo.

Al presente existe una vasta evidencia científica experimental que demuestra el efecto benéfico de probióticos, y se describen los posibles mecanismos que intervienen en dichos efectos. Todos estos estudios dan sustento científico para el empleo de probióticos en humano. Si bien resulta crucial complementar estas evidencias con la experimentación clínica dirigida a demostrar mecanismos, beneficios y seguridad en el humano, todo parece indicar que el consumo de alimentos adicionales con probióticos podrían ser altamente beneficiosos en el hombre. Sin embargo, es necesario continuar con la validación clínica en diferentes patologías concretas, que aseguren la inocuidad de los mismos.

I. INTRODUCCIÓN: EL PAPEL DE LA MICROBIOTA EN LA RESPUESTA INMUNE

El tracto gastrointestinal es uno de los ecosistemas más activos microbiológicamente, conteniendo una gran masa de bacterias, levaduras y otros microorganismos. La actividad biológica que desarrolla es muy grande, siendo responsable de la biosíntesis de enzimas (sucrasa, lactasa, glicosil-transferasas específicas), factores de proliferación y diferenciación celular y es, además, crucial para la maduración del sistema inmune asociado a mucosa intestinal.

La microbiota intestinal está en un continuo diálogo con las células del sistema inmune, lo cual es esencial para iniciar y prevenir una respuesta inmune y/o una inflamación intestinal. El papel primordial de la microbiota, es mantener la homeostasis de la mucosa intestinal contra los antígenos de la luz intestinal. A través del llamado "efecto barrera", permite que las bacterias comensales penetren a la lámina propia del intestino, constituyendo al mismo tiempo una barrera para los microorganismos patógenos. La microbiota intestinal es fundamental para la maduración y actividad del sistema inmune [1] y para los mecanismos de tolerancia oral, a través células reguladoras de la inmunidad (Treg) [2-8].

El sistema inmune asociado a mucosas está altamente capacitado para responder a diversos estímulos y auto-regularse, evitando así efectos adversos que modifiquen la homeostasis intestinal. Entender como los microorganismos comensales pueden dirigir al sistema inmune hacia la activación o tolerancia es uno de los grandes desafíos de la Inmunología y la Biología.

La microbiota intestinal cumple numerosas funciones. Para mencionar algunas de ellas: a) funciones intestinales (digestión y adsorción de alimentos, síntesis de vitaminas, motilidad intestinal, mantenimiento de la permeabilidad intestinal); b) formación de vasos sanguíneos y vascularización; c) participación activa en el metabolismo energético; d) homeostasis ósea, osteoclastogénesis y masa ósea; e) interviene en aspectos del comportamiento tales como ansiedad, percepción del dolor, es decir contribuye altamente a la fisiología del huésped, f) maduración del sistema inmune [1, 9-15]. Por otra parte, la colonización bacteriana estimula la producción de sustancias antimicrobianas que regulan la población de las bacterias comensales [16] y favorece la expansión de los centros germinales favoreciendo de esta manera la maduración de todas las células inmunes asociadas [17].

II. BACTERIAS PROBIÓTICAS COMO INMUNOMODULADORES

En el ecosistema intestinal, además de las bacterias que constituyen la microbiota, hay numerosos antígenos microbianos que se encuentran en el lumen y que están presentes en numerosos alimentos (yogur, leches cultivadas, quesos, y muchos otros alimentos no lácteos). Fue el Premio Nobel de Medicina en 1908, Metchnikoff, quien, a principios del siglo pasado, en su libro "la prolongación de la vida" [18] indicó que los

microbios presentes en los alimentos podrían contribuir a una buena salud. Sin embargo, no fue sino hasta las tres últimas décadas, en que se comenzó a considerar el papel biológico de estas bacterias no patógenas, llamadas probióticas, dentro de las cuales se destacan las bacterias y, en menor medida, levaduras. Los microorganismos probióticos han sido definidos por Fuller [19] como “suplemento microbiano vivo que afecta benéficamente al consumidor mejorando el balance intestinal”. Actualmente la FAO/WHO (singlas en inglés para la *Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization*) (2001) los definen como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico sobre el huésped”.

Dentro de estos microorganismos probióticos, las bacterias lácticas son el grupo microbiano más utilizado para el desarrollo de cultivos probióticos. Sin embargo, solo algunas bacterias lácticas cumplen con las características necesarias para considerarse probióticos y formar parte de los llamados alimentos funcionales. Éstos se consumen como parte de una dieta normal y más allá de la nutrición básica, ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades. Los alimentos funcionales contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra y/o cultivos vivos de microorganismos probióticos [20]

Las bacterias probióticas administrados oralmente influyen el comportamiento del Sistema Inmune Mucoso (SIM), enviando señales a las células inmunes, lo que les permite modular la actividad inmune. Puesto que estas bacterias pueden ingresar viables, surge la pregunta ¿cómo influyen estos microorganismos que ingresan al tracto intestinal en forma transitoria a este complejo ecosistema? Para que un microorganismo sea considerado probiótico debe cumplir con determinados requerimientos: i) permanecer viables en el tracto intestinal resistiendo el medio ácido del estómago y las enzimas intestinales; ii) adherirse a la célula epitelial intestinal; iii) no presentar resistencia a antibióticos, y en caso de que la presente, que no sea transferible; iv) no inducir hemólisis; v) no producir toxinas y vi) no inducir translocación de bacterias comensales más allá del nódulo mesentérico [21]. Es decir revisten el carácter de ser bacterias GRAS, siglas en inglés para “*Generally Regarded As Safe*”) de acuerdo a FDA (<http://www.cerela.org.ar/ciencia/probioticos.htm>), y/o el carácter QPS (siglas en inglés para *Qualified Presumption of Safety*), de acuerdo a la autoridades europea sobre seguridad alimentaria (EFSA)

Numerosa evidencia científica demuestra que los probióticos pueden activar el sistema inmune [22-24] o actuar como antiinflamatorio [25-28]. Es decir, los probióticos tienen actividad inmunoreguladora. Estos microorganismos viables ingeridos, podrían permanecer intactos e interactuar con la microbiota residente enviando señales a las células inmunes asociadas a la lámina propia del intestino. Sin embargo, muchas veces la falta de conocimiento sobre cómo estas bacterias estimulan el sistema inmune, limita su empleo en la prevención de enfermedades y sólo se consideran las propiedades nutricionales de los alimentos que las contienen.

Para explicar cómo los probióticos inducen la activación del SIM es necesario

comprender el funcionamiento de este sistema inmune, el cual, a su vez, estará influenciado por las bacterias comensales. Los conocimientos inmunológicos básicos nos orientarán sobre el fenotipo celular que debería estimularse, qué marcadores o receptores deben expresarse, o qué mediadores biológicos (citoquinas) deberían inducirse para evitar efectos adversos (respuesta inflamatoria), para inducir activación y regulación de la respuesta inducida, todo ello sin alterar el proceso de tolerancia oral.

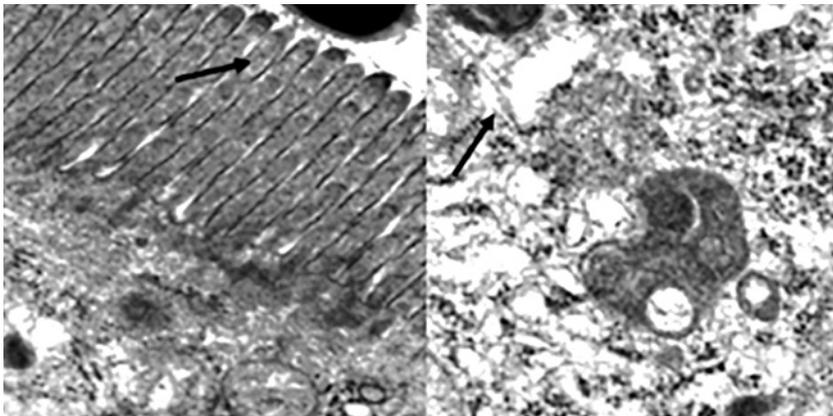
III. EFECTO DE LOS PROBIÓTICOS SOBRE LA BARRERA EPITELIAL

Una bacteria probiótica, ya desde su ingreso por vía oral, va a sufrir una serie de modificaciones de acuerdo al medio con el que interactúa: acidez gástrica, actividad de enzimas, peristaltismo intestinal, el mucus que recubre el epitelio, la IgA presente en el lumen y las sustancias antimicrobianas producidas por las células de Paneth.

Cabe entonces preguntarse: ¿cómo este antígeno (bacteria probiótica) carente de factores de virulencia puede sortear todas estas barreras inespecíficas de la defensa del huésped y activar/regular al SIM?. Más aun, ¿su efecto puede llegar a inducir una respuesta adaptativa, o solo está circunscrito a la respuesta innata? Esto equivale a decir ¿cuál es el alcance del estímulo inducido por estos probióticos?

Por definición, los probióticos deben ser capaces de interactuar con la célula epitelial intestinal (CEI) y mantenerse viables, los que les da la posibilidad de permanecer en el tracto intestinal y multiplicarse. En el laboratorio demostramos por microscopía electrónica de transmisión, que ciertos lactobacilos probióticos pueden interactuar con la célula epitelial intestinal [29] (ver **Figura 1**).

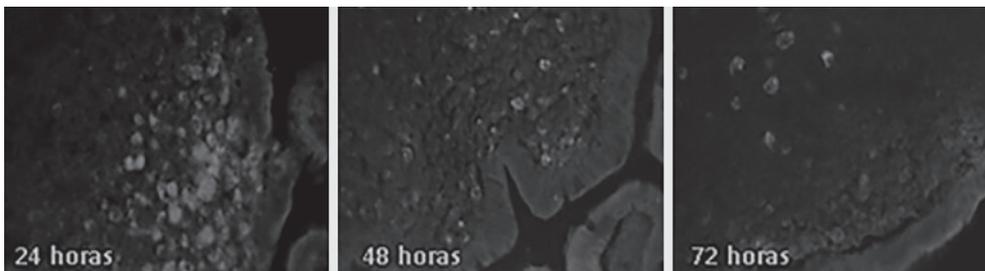
Figura 1. Interacción de probióticos con las células epiteliales de intestino.



Microfotografías de microscopía electrónica de transmisión. Se observa la interacción de un probiótico (flechas negras) con la CEI (A y B), y la consiguiente activación de esta, evidenciada por el aumento de mitocondrias y cuerpos multivesciculares (flechas blancas en B) 33300x.

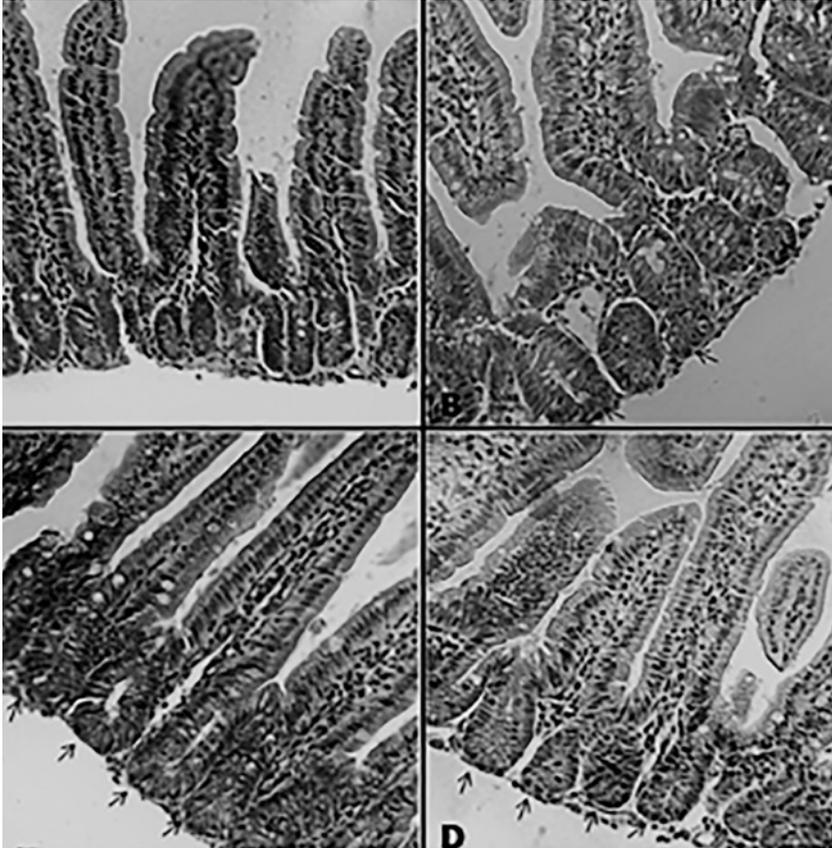
Como consecuencia de la interacción con el probiótico, la CEI se activa y produce IL -6, IL-10 y TGF- β en niveles superiores a los inducidos por a la microbiota comensal. Ahora bien, ¿cuánto tiempo pueden las bacterias probióticas permanecer en el intestino? Demostramos que el tránsito a lo largo del intestino para cualquier bacteria o antígeno particulado no es mayor de 72 horas, por lo que es posible que la administración continua garantice una masa probiótica activa (ver **Figura 2**). También demostramos que las bacterias probióticas o sus leches fermentadas con dichos microorganismos inducen un aumento de las células caliciformes y sobre las células de Paneth incrementando la producción de sustancias antimicrobianas [30] (ver **Figura 3**).

Figura 2. Tiempo de permanencia de probióticos en intestino.



Microscopia de fluorescencia. Los fragmentos bacterianos en placa de Peyer persisten hasta las 72 hs como cualquier antígeno particulado.

Figura 3. Efecto de los probiótico sobre las células de Paneth.

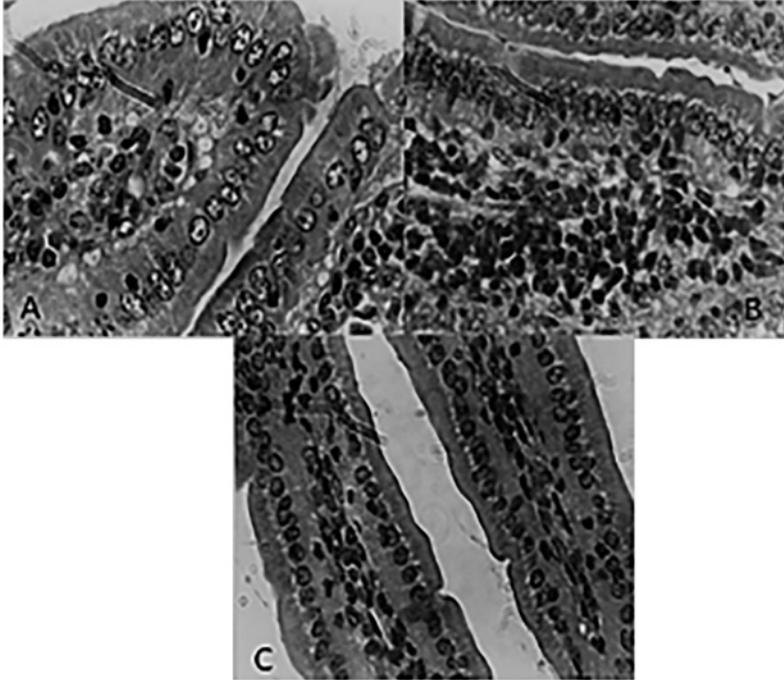


Tinción con hematoxilina eosina, sobre cortes histológico de intestino delgado de ratones que recibieron una dieta convencional (A); la suplementación con: *L. fermentum* (B); *L. casei* CRL 431 (C); *L. paracasei* CNCM I-1518 (D). Las flechas muestran las células de Paneth en la base de las criptas de Lieberkuhn.

El aumento de las sustancias antimicrobianas (SAM) en los fluidos intestinales de ratones alimentados con los lactobacilos probióticos *L. casei* CRL 431 y *L. paracasei* CNCM I-1518 puso en evidencia que la producción de péptidos antimicrobianos (PAM) por las células de Paneth constituiría otro mecanismo de la activación de la respuesta inmune innata ejercida por los probióticos frente a microorganismos patógenos y el mantenimiento de la microbiota intestinal [30]. Acorde a estos resultados, observamos que frente a una infección experimental con el patógeno *Salmonella thyphimurium*, el número de bacterias patógenas internalizadas era significativamente menor en los animales que habían recibido el probiótico. Más aún ratones infectados que recibieron el probiótico, presentaban una arquitectura del órgano similar a la observada en ratones controles no infectados. Por el contrario, en ratones infectados con *Salmonella* observamos una alteración de la histología de las vellosidades

intestinales, con una infiltración de polimorfonucleares a los 7 días post-desafío con el patógeno (ver **Figura 4**).

Figura 4. Protección frente a la infección por *Salmonella Typhimurium*.



Tinción con hematoxilina-eosina sobre cortes de intestino delgado de ratones (A) controles sin infectar; (B) infectado con Salmonella Typhimurium y (C) alimentado con el probiótico durante 7 días y desafiado con Salmonella.

Otro punto importante que debe ser considerado es la de especificidad de especie. Al respecto, hemos observado que el uso de bacterias homólogas no garantizaría un mayor efecto [31]. Aún cuando algunos autores indican que para el uso de microorganismos probióticos debe tenerse en cuenta la especificidad de especie (microorganismo/huésped).

Cualquiera sea la forma en que una bacteria probiótica como tal o sus fragmentos (pared celular, citoplasma o metabolitos) lleguen al intestino, tendrá que sobrepasar las barreras inespecíficas, para luego interactuar con la CEI. Su activación induce la producción de IL-6, y diversos factores que incrementan la respuesta de las células inmunes asociadas a lámina propia de intestino. Está descripto que en la estimulación inmune por antígenos bacterianos (patógenos y no patógenos), la red de señales que se desencadenan pueden ser: a) por la activación directa de la CEI ejercida por la bacteria probiótica o por sus estructuras de pared, que se adhieren a la CEI a través de los receptores Tipo Toll [32]. La activación de la CEI induce la producción de diferentes

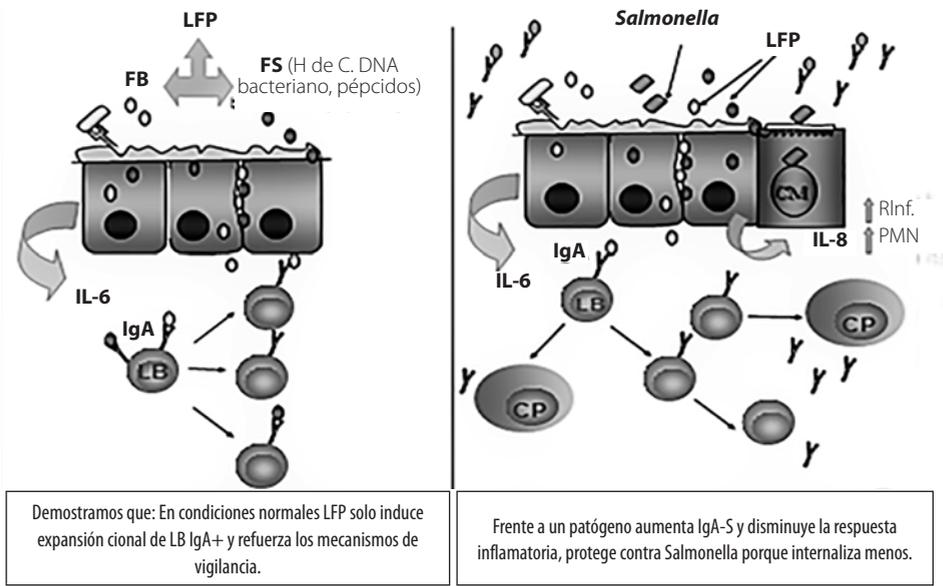
citoquinas: IL-6, IL-1, IL10 y otros factores que serán la señal que recibirán las células inmunes asociadas a la lámina propia del intestino.

IV. EFECTO SOBRE LÁMINA PROPIA DEL INTESTINO DELGADO

Las señales inducidas por probióticos sobre las CEIs activan a las células inmunes de la mucosa intestinal, estimulando la producción de citoquinas que coadyuvarán en la activación del SIM. La posibilidad de que las bacterias probióticas puedan activar directamente a las células inmunes de la lámina propia es factible debido a la presencia de células M en las vellosidades intestinales [33], las cuales constituyen una vía importante de transporte transcelular desde la luz del intestino hasta la célula presentadora de antígenos subyacente. Adicionalmente, la célula dendrítica (CD) expresa proteínas que le permiten interactuar con las uniones estrechas presentes entre las células epiteliales (en inglés, denominadas *tight junctions*), permitiendo tomar antígenos del lumen intestinal [34, 35]. La interacción de la bacteria completa, o de sus fragmentos celulares (principalmente la pared celular) con las células de la respuesta inmune innata (macrófagos y CD) hacen que éstas se activen, aumentando la expresión de receptores tipo Toll (TLRs), CD206 (receptor para manosa) y la producción de citoquinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , entre otras. Es precisamente el TNF- α la citoquina que estaría más involucrada en la iniciación del diálogo entre la CEI y las células inmunes, por lo que la CEI juega un papel clave en la inducción de señales. El tipo de respuesta inducida (innata, inflamatoria o adaptativa) dependerá del estímulo, intensidad y duración del mismo, como así también de la expresión de marcadores inmunes en macrófagos y CD que posibiliten la presentación antigénica para dar una posterior respuesta inmune adaptativa. Esta etapa no invalida la interacción directa del antígeno con las células inmunes, posibilitando los dos tipos de señales en forma simultánea.

La pregunta que surge ahora es cómo debería ser el estímulo para evitar una respuesta inflamatoria exagerada y favorecer la activación y la regulación por citoquinas supresoras (IL-10), o del factor transformante de crecimiento beta (TGF β). Sabemos que los patógenos inducen mecanismos de agresión al huésped, por lo que la respuesta que provocan es la inflamatoria. Con la administración de bacterias probióticas se busca activar al SIM para mantener un mejor estado de vigilancia inmunológica, sin alterar la homeostasis intestinal, preservando la tolerancia oral por mecanismos de regulación inmune. ¿Para lograr ese delicado equilibrio, es la respuesta inmune innata la que debería ser favorecida, con activación de la CEI, macrófagos, CD e IgA-secretoria (IgA-S) para reforzar la barrera intestinal? se ha demostrado que precisamente es la respuesta inmune innata la que se encuentra favorecida con la administración de los probióticos [23, 30, 36-38] (ver **Figura 5**).

Figura 5. Modelo propuesto como mecanismo de vigilancia inmune inducida por probióticos.



Efecto de una Leche Fermentada Probiótica (LFP) en la producción de IgA secretoria en animales adultos de 4 semanas.

El fortalecimiento de la barrera epitelial intestinal está bien documentado mostrando una mayor expresión de las moléculas que forman las uniones estrechas [39-41]. Por otra parte, la estimulación de las CEIs y las células de la respuesta inmune innata, facilitan la producción de IL-6 que induce la expansión clonal de los linfocitos B, favoreciendo así el aumento de células IgA+ en lámina propia y la producción de IgA-S total. El papel biológico de la IgA-S en la protección de mucosas es indiscutido [42, 43].

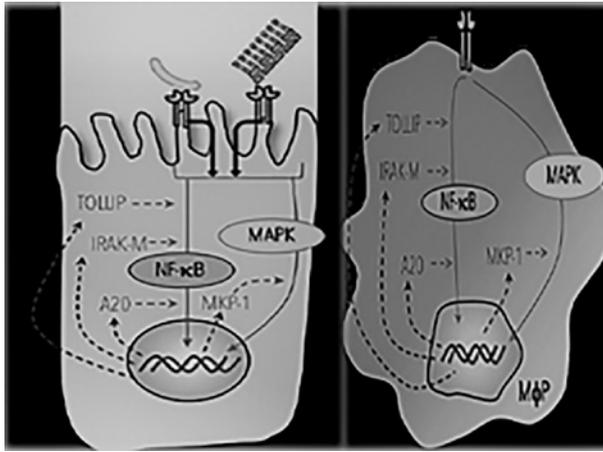
Se conoce que las células activadas de la respuesta inmune innata pueden adquirir marcadores de superficie (moléculas de adhesión) involucradas en el tráfico leucocitario que les permita migrar para llegar a los sitios mucosos distantes. En el laboratorio demostramos que los probióticos incrementan las células productoras de IgA en intestino y favorecen el ciclo de la IgA a sitios distantes del mismo, aumentando las células IgA+ en bronquios y glándulas mamarias [22, 23] (Maldonado Galdeano et al., 2015, de Moreno de Le Blanc et al., 2005). La población de linfocitos Th (T helper), especialmente CD4+ de lámina propia del intestino delgado también mostraron incrementos luego de la administración de probióticos [44]. Si bien los componentes principales de la pared celular de lactobacilos, ácido lipoteicoico (LTA) y el Muramil Dipéptido (MDP), son antigénicos y estimulan activamente la población Th1 y Th2, no necesariamente inducen siempre una respuesta Th2 [45-47]. Está descrito que altas dosis de peptidoglicano son tóxicas a nivel hepático y renal [48]. Estos

hechos darían otra razón para un análisis más profundo de las estructuras de los probióticos que están involucrados en la estimulación inmune deseada y además podría clarificar porque el efecto probiótico es siempre cepa y dosis dependiente.

A nivel de la mucosa respiratoria debe promoverse el balance hacia una respuesta Th1, para justificar la efectividad de los probióticos en algunas alergias [49]. Nosotros demostramos en un modelo experimental de alergia respiratoria en ratones que es posible estimular la población Th1 por el consumo de una leche fermentada probiótica [50, 51]. En procesos alérgicos la respuesta Th2 no sería aconsejable, sin embargo, sabemos que los probióticos favorecen ambas respuestas, Th1 y Th2, con buena producción de anticuerpos contra antígenos vacunales [52, 53]. Resultados similares se observaron en grupos subnutridos [54].

¿Cómo mantener la homeostasis intestinal inmune después de la activación probiótica?. Esta pregunta surge porque los macrófagos y las CD podrían generar una respuesta Th2 con producción de anticuerpos contra sus propios epitopes o contra antígenos alimentarios. Una respuesta a esa pregunta es que la bacteria o sus fragmentos, al tomar contacto con las células inmunes mediante receptores Toll o CD206 producen la activación de estas células y de los factores transcripcionales, que llevan a la síntesis y producción de citoquinas. Parte de sus fragmentos se unen al HLA-II de la CEI y de ese modo quedan expuestos para posteriormente ser reconocidos por el receptor del linfocito T (TCR) y generar una respuesta adaptativa. Sin embargo, aun cuando esto ocurra, no debemos olvidar que el proceso de presentación antigénica sólo es posible en sitios inductores de la respuesta inmune, placa de Peyer o nódulos linfáticos, por lo que la presentación antigénica a nivel de lámina propia no es probable, y de hecho es donde ocurre el mayor efecto probiótico ya que las partículas probióticas que ingresan a placa de Peyer y son captadas por los macrófagos, son depuradas como cualquier antígeno particulado inocuo. Este aspecto lo hemos demostrado en el laboratorio [32, 55]. Por otra parte, también demostramos que las CEIs y de la respuesta inmune innata activan proteínas reguladoras de los factores transcripcionales evitando así la producción exacerbada de citoquinas proinflamatoria y la respuesta inflamatoria [56] (ver **Figura 6**).

Figura 6. Mecanismos moleculares inducidos por probióticos en CEI y MQ.



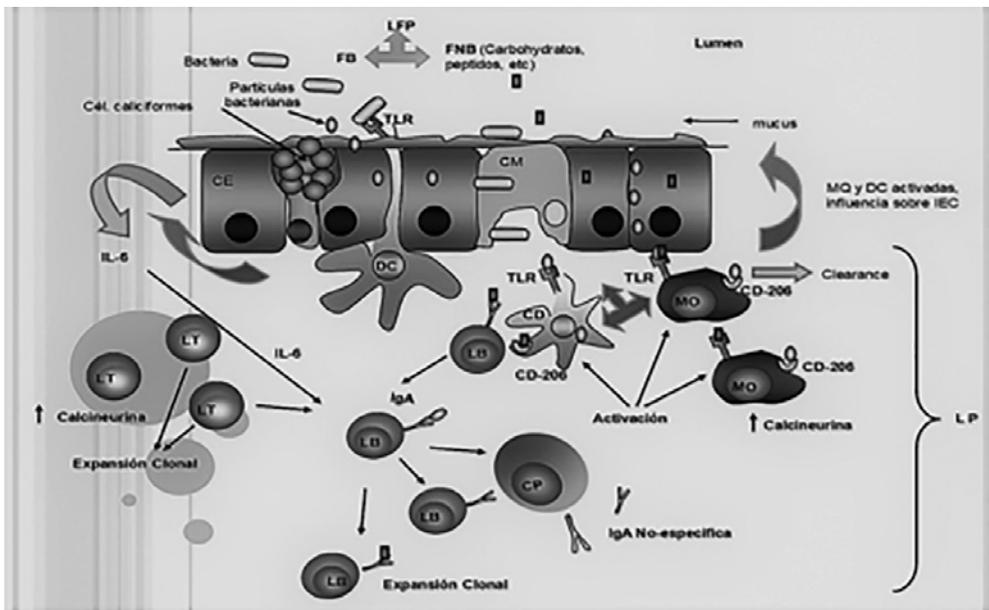
Los probióticos interactúan con la CEI y con MQ activando diferentes vías de señalización como NF-κB y MAPK, induciendo la liberación de citoquinas. Al mismo tiempo inducen la expresión de proteínas reguladoras (TOLLIP, IRAK-M, A20, MKP-1) que permiten mantener la homeostasis regulando la activación inmune.

Las evidencias experimentales de nuestro grupo y de otros investigadores, sobre un número importante de bacterias lácticas de diferentes géneros, principalmente *Lactobacillus*, demuestran que: a) la respuesta innata (RI) es la principal respuesta inducida por los microorganismos probióticos, b) que estos microorganismos estimulan el sistema inmune tanto a nivel intestinal con incremento en el número de células IgA+, como también en bronquios y glándula mamaria, c) la activación de la respuesta inmune innata induce la liberación de citoquinas activadoras y supresoras (efecto inmunomodulador), d) demostramos la importancia de la viabilidad para el mantenimiento de la respuesta inmune inducida [29], e) la administración prolongada no afecta el ecosistema intestinal [57]. Diversas referencias bibliográficas indican que el consumo prolongado de probióticos puede modificar la microbiota intestinal, sin embargo los probióticos no colonizan intestino, además son degradados por sustancias antimicrobianas producidas por las células de Paneth [30]. La microbiota intestinal es estable; solo en determinadas situaciones como el tratamiento prolongado con antibióticos, o en procesos de malnutrición (obesidad, desnutrición), o por algunas drogas antiinflamatorias, puede producirse una alteración de su composición [58]. Los probióticos al ser consumidos regularmente podrían inducir tolerancia oral con aumento de Treg, sin embargo, está demostrado que el consumo prolongado no induce tolerancia oral ya que actúan como inmunomoduladores manteniendo la vigilancia inmunológica como lo demostramos frente a la infección experimental con *Salmonella* [59].

Considerando que los lactobacilos probióticos promueven la RI innata y además la activación de la misma puede llevar a un aumento de la respuesta inflamatoria

intestinal ¿cuál es el efecto positivo que tienen los probióticos a nivel de intestino? Demostramos que la respuesta inmune inducida por los probióticos no conlleva a daño tisular, sino que solo produce un ligero aumento de celularidad en lámina propia [59] y que la interacción de estos con los TLRs induce un aumento en la expresión de proteínas reguladoras de los factores transcripcionales que llevan a la producción de citoquinas inflamatorias con incrementos de la población Treg [56, 60]. Todos los datos obtenidos al presente en modelos animales nos permiten concluir que el consumo de probióticos no afecta la homeostasis del sistema inmune intestinal y son inocuos, aportando así, las bases científicas necesarias para su ensayo en humanos (ver **Figura 7**).

Figura 7. Mecanismos inmunológicos inducidos por los probióticos en la mucosa intestinal.



Si bien contamos con las bases científicas (realizada en modelos experimentales) para el consumo de probióticos en algunas patologías, es importante considerar el sitio mucoso donde estos van a impactar (vagina, piel, cavidad oral, tracto respiratorio) y la microbiota que allí se encuentra [61-63]. Existen además, referencias bibliográficas que promueven el empleo de probióticos o leches probióticas en obesidad debido a su efecto positivo sobre el síndrome metabólico observado en esa patología [26, 64, 65].

La evidencia científica experimental mostrada debe ser validada en humanos. La validación clínica es de fundamental importancia por diferentes razones: a) porque son productos naturales que ingresan con la dieta (no son productos farmacológicos),

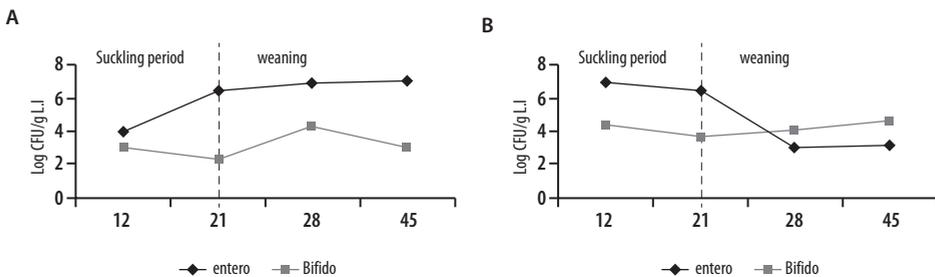
por lo que es necesario demostrar su efecto en la patología deseada, b) aún cuando fueran efectivos la condición del huésped es muy importante como así también la complejidad de la etiología y el estadio en que se encuentra la patología, como en cáncer por ejemplo [27, 66].

V. MECANISMOS INDUCIDOS POR PROBIÓTICOS EN ETAPAS TEMPRANAS DE LA VIDA

Los resultados precedentes avalan el empleo de la administración de probióticos en adultos jóvenes para el fortalecimiento de la respuesta inmune. Sin embargo, existen dudas al momento de ser administrados en etapas tempranas de la vida.

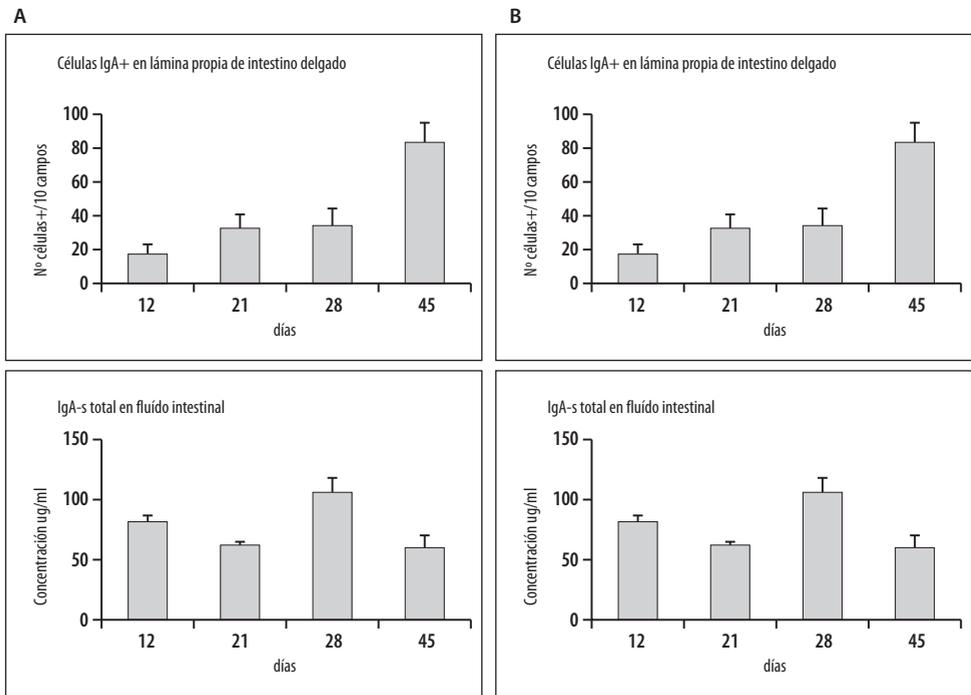
Se ha discutido, y sigue siendo tema de discusión, si es conveniente la administración temprana de probióticos en lactantes menores de 3 meses. Nuestra opinión, fundamentada en ensayos realizados en modelos animales [57] muestran que el efecto de una leche fermentada que contiene una bacteria probiótica es evidente sobre la población de enterobacterias y bifidobacteria. Esta última población, se ve favorecida con la administración de probióticos. Se sabe que las bifidobacterias favorecen la expresión de las células Treg, población de importancia en los primeros meses de vida para permitir la colonización completa del intestino (ver **Figura 8**). En cuanto a la maduración inmune la administración temprana de probióticos no acelera la misma. Su efecto es evidente cuando la colonización bacteriana se completa (ver **Figura 9**).

Figura 8. Efecto de LFP en etapas temprana de la vida sobre enterobacteria y bifidobacteria.



La figura muestra el cambio en la cantidad de bacterias intestinales en función del tiempo. A) Animales que no reciben LFP durante lactancia y al destete; B) Animales con LFP durante lactancia y al destete.

Figura 9. Efecto de la administración temprana de LFP sobre células IgA+ e IgA- S total.



En la figura se muestra el efecto sobre: A) Animales control que no reciben LFP; B) Animales que reciben LFP durante lactancia y destete (21d) Las diferencias observadas a los 45 días no son significativas. El incremento en IgA e IgA-S inducido por la administración probiótica se manifiesta en este modelo de ratón posterior a los 45d.

VI. MECANISMOS INMUNES DIFERENCIALES ENTRE BACTERIAS COMENSALES Y PROBIÓTICAS

De acuerdo con lo expuesto, algunas de las principales diferencias entre comensales y bacterias probióticas están resumidas en la **Tabla 1**.

Comensales	Probióticos
No interactúan con CEI, solo lo hacen por metabolitos.	Interactúan con CEI.
No internalizan a CEI.	No internalizan a CEI. Sí lo hacen sus fragmentos.
Activan la CEI para producir \uparrow IL10, \uparrow TGF- β \downarrow IL-6	Activan CEI para producir \uparrow IL10, \uparrow IL-6
Mantienen la barrera epitelial.	Refuerzan la barrera epitelial por \uparrow de Cel. Caliciformes con producción de mucus.

No produce translocación de la microbiota.	No produce translocación de la microbiota.
Mantiene homeostasis intestinal por producción de sustancias antimicrobianas (PAM).	Mantiene homeostasis intestinal por ↑ producción de PAM que degradan pprobióticos y patógenos para evitas su internalización.
Activa MQ, CD, LB y LT de lámina propia, induciendo su maduración. La CD queda como plasmocitoide.	Activa MQ, CD, LB y LT de lámina propia. ↑ maduración. Expresión de marcadores específicos F4-80, CD-103*. LB → IgA* LT → TH1
Producen proteínas reguladoras de la via NFK-B y MAP kinasas.	Producen proteínas reguladoras de la via NFK-B y MAP kinasas (TOLLIP, IRAK-M, A20, MKP-1).

VII. CONCLUSIONES

En función de la evidencia científica presentada, podemos concluir que el empleo de probióticos en humanos seria inocuo ofreciendo un beneficio adicional sobre la modulación del sistema inmune. El consumo de leches fermentadas probióticas puede ser muy efectivo en grupos de riesgo como pacientes subnutridos no solo por sus propiedades nutricionales sino por su capacidad adyuvante sobre la inmunidad del huésped.

VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- [1] Bäckhed F., Roswall J., Peng Y., Feng Q., Jia H., Kovatcheva-Datchary P, et al. (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life . *Cell Host and Microbe*, 17(5), pp. 690-703. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004.
- [2] Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat Immunol*. May;6(5):507-14. Epub 2005 Apr 10. Erratum in: *Nat Immunol*. 2015 Mar;16(3):326.
- [3] Ivanov II, Frutos R de L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin B, Sartor RB, et al (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe*. 2008 Oct 16;4(4):337-49. doi: 10.1016/j.chom.2008.09.009.
- [4] Okada Y, Tsuzuki Y, Hokari R, Komoto S, Kurihara C, Kawaguchi A, et al. (2009). Anti-inflammatory effects of the genus *Bifidobacterium* on macrophages by modification of phospho-I kappaB and SOCS gene expression. *Int J Exp Pathol*. Apr;90(2):131 -40. doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00632.x.

[5] Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. Jun 8;336(6086):1268-73. doi: 10.1126/science.1223490. Epub 2012 Jun 6. Review.

[6] Hooper LV, Macpherson AJ. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*. Mar;10(3):159-69. doi: 10.1038/nri2710.

[7] Oliveira RP, Santiago AF, Ficker SM, Gomes-Santos AC, Faria AMC. (2015). Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long -lasting effects. *J Immunol Methods*. Jun;421:36-43. doi: 10.1016/j.jim.2015.02.005. Epub 2015 Feb 20.

[8] Macpherson AJ, de Aguero MG, Ganai-Vonarburg SC. (2017). How nutrition and the maternal microbiota shape the neonatal immune system. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 17(8), pp. 508-517. doi: 10.1038/nri.2017.58.

[9] Gaboriau-Routhiau V, Lécuyer E, Cerf-Bensussan N. (2011). Role of microbiota in postnatal maturation of intestinal T-cell responses. *Curr Opin Gastroenterol*. Oct;27(6):502-8. doi:10.1097/MOG.0b013e32834bb82b. Review.

[10] Chinen T, Rudensky AY. (2012). The effects of commensal microbiota on immune cell subsets and inflammatory responses. *Immunol Rev*. 2012 Jan;245(1):45-55. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01083. Review.

[11] Shulzhenko N, Morgun A, Hsiao W, Battle M, Yao M, Gavrillova O, et al. (2014). Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut. *Nature Medicine*, 17(12), pp. 1585-1593. doi: 10.1038/nm.2505.

[12] Kelly JR, Minuto C, Cryan JF, Clarke G, Dinan TG. (2017). Cross Talk: The Microbiota and Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 11, p. 490. doi: 10.3389/fnins.2017.00490.

[13] Sommer F, Bäckhed F. (2016). Know your neighbor: Microbiota and host epithelial cells interact locally to control intestinal function and physiology. *BioEssays*, 38(5), pp. 455- 464.

[14] Andriessen EM, Wilson AM, Mawambo G, Dejda A, Miloudi K, Sennlaub F, et al. (2016). Gut microbiota influences pathological angiogenesis in obesity-driven choroidal neovascularization. *EMBO Mol Med*. 1;8(12):1366-1379. doi: 10.15252/emmm.201606531.

[15] Khandagale A, Reinhardt C. (2018). Gut microbiota - architects of small intestinal capillaries. *Front Biosci (Landmark Ed)*. Jan 1;23:752-766.

[16] Salzman NH. (2010). Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: détente at mucosal surfaces. *Gut Microbes*. 1(6):401-6. doi: 10.4161/gmic.1.6.14076. Review.

[17] Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415), pp. 231-41. doi: 10.1038/nature11551.

- [18] Argüelles JC. (2008). Los microbios y el premio Nobel de medicina en 1908. *Anales de Biología* 30: 65-71. RESEÑA HISTÓRICA.
- [19] Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* May;66(5):365-78.
- [20] Ashwell M. (2001). Functional foods: a simple scheme for establishing the scientific validity for all claims. *Public Health Nutr.* Jun;4(3):859-62.
- [21] Arioli S, Elli M, Ricci G, Mora D. (2013). Assessment of the susceptibility of lactic acid bacteria to biocides. *Int J Food Microbiol* 163:1-5. 10.1016/j.jfoodmicro.2013.02.002.
- [22] de Moreno de LeBlanc A, Galdeano CM, Chaves S, Perdígón G. (2005). Oral administration of *L. casei* CRL 431 increases immunity in bronchus and mammary glands. *European Journal of Inflammation.* Vol 3, n1, 25-30. SAGE Public.
- [23] Maldonado Galdeano C, Lemme-Dumit J, Thieblemont N, Carmuega E, Weill R, Perdígón G. (2015). Stimulation of Innate Immune Cells Induced by Probiotics: Participation of Toll-Like Receptors. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 6(1), pp. 1- 9. doi: 10.4172/2155-9899.1000283.
- [24] Castillo NA, de Moreno de Leblanc A., Galdeano CM, Perdígón G. (2013). Comparative study of the protective capacity against *Salmonella* infection between probiotic and nonprobiotic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 114(3), pp. 861 - 876. doi: 10.1111/jam.12074.
- [25] Ekmekciu I, von Klitzing E, Fiebiger U, Neumann C, Bacher P, Scheffold A, et al. (2017). The Probiotic Compound VSL#3 Modulates Mucosal, Peripheral, and Systemic Immunity Following Murine Broad-Spectrum Antibiotic Treatment, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, p. 167. doi: 10.3389/fcimb.2017.00167.
- [26] Novotny Núñez I, Maldonado Galdeano C, de Moreno de LeBlanc A, Perdígón G. (2015). *Lactobacillus casei* CRL 431 administration decreases inflammatory cytokines in a diet- induced obese mouse model. *Nutrition.* Jul-Aug;31(7-8):1000-7. doi: 10.1016/j.nut.2015.02.006. Epub 2015 Feb 24.
- [27] Aragón F, Carino S, Perdígón G, de Moreno de LeBlanc A. (2015). Inhibition of Growth and Metastasis of Breast Cancer in Mice by Milk Fermented with *Lactobacillus casei* CRL 431. *J Immunother.* 38(5):185-96. doi: 10.1097/CJI.0000000000000079.
- [28] Celiberto LS, Graef FA, Healey GR, Bosman ES, Jacobson K, Sly LM, et al. (2018). Inflammatory bowel disease and immunonutrition: novel therapeutic approaches through modulation of diet and the gut microbiome. *Immunology.* Apr 25. doi: 10.1111/imm.12939. [Epub ahead of print] Review.
- [29] Maldonado Galdeano C and Perdígón G. (2004). Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *The society for Applied Microbiology Ed.* ISSN: 1365-2672. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 673–681

- [30] Cazorla SI, Maldonado-Galdeano C, Weill R, De Paula J, Perdigón G. (2018). Oral administration of probiotics increases Paneth Cells and intestinal antimicrobial activity. *Front. Microbiol.* 9:736. doi: 10.3389/fmicb.2018.00736
- [31] Dogi CA, Perdigón G. (2006). Importance of the host specificity in the selection of probiotic bacteria. *J Dairy Res.*73(3):357-66.
- [32] Lemme-Dumit JM, Polti MA, Perdigón G, Galdeano CM. (2018). Probiotic bacteria cell walls stimulate the activity of the intestinal epithelial cells and macrophage functionality. *Benef Microbes.* Jan 29;9(1):153-164. doi: 10.3920/BM2016.0220.
- [33] Jang MH, Kweon MN, Iwatani K, Yamamoto M, Terahara K, Sasakawa C, et al. (2004). Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20;101(16):6110-5.
- [34] Rescigno MJ. (2008). Intestinal epithelial cells control dendritic cell function. *Pediatr Gastroenterol Nutr.* Apr;46 Suppl 1:E17-9. doi: 10.1097/01.mpg.0000313831.09089.36. Review.
- [35] Kunisawa J, Kiyono H. (2013). Immune regulation and monitoring at the epithelial surface of the intestine. *Drug Discov Today.* Jan;18(1-2):87-92. doi: 10.1016/j.drudis.2012.08.001. Epub 2012 Aug 9. Review.
- [36] Maldonado Galdeano C, Dogi C, Perdigón G. (2013). Difference in the Signals Induced by Commensal or Probiotic Bacteria to the Gut Epithelial and Immune Cells. Capítulo de libro en: *Probiotics: Immunobiotics and Immunogenics*. Ed.: Haruki Kitazawa, Julio Villena and Susana Alvarez. Editorial: CRC Press. New York. Pp 36-53.
- [37] Asgari F, Falak R, Teimourian S, Pourakbari B, Ebrahimnezhad S, Shekarabi M. (2018). Effects of Oral Probiotic Feeding on Toll-Like Receptor Gene Expression of the Chicken's Cecal Tonsil. *Rep Biochem Mol Biol.* 6(2):151-157.
- [38] Habil N, Abate W, Beal J, Foey AD. (2014). Heat-killed probiotic bacteria differentially regulate colonic epithelial cell production of human b-defensin- 2: dependence on inflammatory cytokines. *Benef. Microbes* 5, 483–495. doi: 10.3920/BM2013.0061.
- [39] Liu Z, Tian Y, Jiang Y, Chen S, Liu T, Moyer MP, Qin H, et al. (2018). Protective Effects of Let-7b on the expression of occludin by Targeting P38 MAPK in preventing intestinal barrier dysfunction. *Cell Physiol Biochem.* 45(1):343-355. doi: 10.1159/000486815
- [40] Du W, Xu H, Mei X, Cao X, Gong L, Wu Y, et al. (2018). Probiotic *Bacillus* enhance the intestinal epithelial cell barrier and immune function of piglets. *Benef Microbes.* 13:1-12. doi: 10.3920/BM2017.0142.
- [41] Karimi S, Jonsson H, Lundh T, Roos S. (2018). *Lactobacillus reuteri* strains protect epithelial barrier integrity of IPEC-J2 monolayers from the detrimental effect of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Physiol Rep.* 6(2). doi: 10.14814/phy2.13514.

- [42] Gutzeit C, Magri G, Cerutti A. (2014). Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol Rev.* 260(1):76-85. doi: 10.1111/imr.12189.
- [43] Cerutti A, Rescigno M. (2008). The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity.* 28(6):740-50. doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.001.
- [44] Perdigón G, Vintiñi E, Alvarez S, Medina M, Medici M. (1999). Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci.* 82(6):1108-14.
- [45] Ahn KB, Jeon JH, Baik JE, Park OJ, Kang SS, Yun CH, Park JH, Han SH. (2014). Muramyl dipeptide potentiates staphylococcal lipoteichoic acid induction of cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Microbes Infect.* 16(2):153-60. doi: 10.1016/j.micinf.2013.10.018. *Infect Immun.* 55(3):674-9.
- [46] Bougarn S, Cunha P, Harmache A, Fromageau A, Gilbert FB, Rainard P. (2010). Muramyl dipeptide synergizes with *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid to recruit neutrophils in the mammary gland and to stimulate mammary epithelial cells. *Clin Vaccine Immunol.* 17(11):1797-809. doi: 10.1128/CI.00268-10.
- [47] Kim HJ, Yang JS, Woo SS, Kim SK, Yun CH, Kim KK et al. (2007). Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol.* 81(4):983-9.
- [48] Allen JB, Wilder RL. (1987). Variable severity and Ia antigen expression in streptococcal-cell-wall-induced hepatic granulomas in rats.
- [49] Fong FL, Shah NP, Kirjavainen P, El-Nezami H. (2016). Mechanism of action of probiotic bacteria on intestinal and systemic immunities and antigen-presenting cells. *Int Rev Immunol.* 3;35(3):179-88. doi: 10.3109/08830185.2015.1096937.
- [50] Maldonado Galdeano C, Vélez EM, Lemme Dumit JM, Perdigón G. (2016). Sistema Inmune de las Mucosas. Influencia bacteriana en la activación y homeostasis intestinal. Capítulo de libro en: "Probióticos, prebióticos y salud: Evidencia científica." Ed. Guillermo Álvarez Calatayud, Ascensión Marcos, Abelardo Margolles. Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos. Ergon Creación, S.A. páginas: 133-138.
- [51] Velez EM, Maldonado Galdeano C, Carmuega E, Weill R, Bibas Bonet ME, Perdigón G. (2015). Probiotic fermented milk consumption modulates the allergic process induced by ovalbumin in mice. *Br J Nutr.* 114(4):566-76. doi: 10.1017/S0007114515001981.
- [52] Díaz AM, Almozni B, Molina MA, Sparo MD, Manghi MA, Canellada AM, Castro MS. (2018). Potentiation of the humoral immune response elicited by a commercial vaccine against bovine respiratory disease by *Enterococcus faecalis* CECT7121. *Benef Microbes.* 10:1-10. doi: 10.3920/BM2017.0081.

- [53] Beirão BCB, Ingberman M, Fávoro C Jr, Mesa D, Bittencourt LC, Fascina VB, Caron LF. (2018). Effect of an *Enterococcus faecium* probiotic on specific IgA following live *Salmonella Enteritidis* vaccination of layer chickens. *Avian Pathol.*47(3):325-333. doi: 10.1080/03079457.2018.1450487.
- [54] Maldonado Galdeano C, Novotny Núñez I, de Moreno de LeBlanc A, Carmuega E, Weill R, Perdigón G. 2011. Impact of a probiotic fermented milk in the gut ecosystem and in the systemic immunity using a non-severe protein-energy-malnutrition model in mice. *BMC Gastroenterol.* 26;11:64. doi: 10.1186/1471-230X-11-64
- [55] Maldonado Galdeano C and Perdigón G. (2006). The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through the innate immunity. *American Society for Microbiology Ed.* ISSN: 1556-6811. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13 (2): 219-226.
- [56] Lemme Dumit José María, Saavedra Lucila, Hebert, Elvira, Perdigón G, Maldonado Galdeano C. Modulation of signaling pathways by probiotics in the gut mucosa. *International Congress of Mucosal Immunity. (ICMI).* Washington. Estados Unidos. 19-22 de Julio 2017.
- [57] de Moreno de LeBlanc A, Dogi C, Maldonado Galdeano C, Carmuega E, Weill R, Perdigón G. (2008). Effect of the administration of fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114001 on intestinal microflora and immune cells associated to the gut of neonate mice. *BMC Immunology*: 27(9)
- [58] Lopetuso LR, Napoli M, Rizzatti G, Gasbarrini A. (2018). The intriguing role of Rifaximin in gut barrier chronic inflammation and in the treatment of Crohn's disease. *Expert Opin Investig Drugs.* doi: 10.1080/13543784.2018.1483333.
- [59] Castillo NA, Perdigón G, de Moreno de Leblanc A. (2011). 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.* 3;11:177. doi: 10.1186/1471-2180-11-177.
- [60] Lorea Baroja M, Kirjavainen PV, Hekmat S, Reid G. (2007). Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clin Exp Immunol.* 149(3):470-9.
- [61] Barbieri N, Herrera M, Salva S, Villena J, Alvarez S. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 nasal administration improves recovery of T-cell mediated immunity against pneumococcal infection in malnourished mice. *Benef Microbes.* 30;8(3):393-405. doi: 10.3920/BM2016.0152.
- [62] Parma M, Stella Vanni V, Bertini M, Candiani M. (2014). Probiotics in the prevention of recurrences of bacterial vaginosis. *Altern Ther Health Med.* 20 Suppl 1:52-7.
- [63] Leccese Terraf MC, Juárez Tomás MS, Rault L, Le Loir Y, Even S, Nader-Macías MEF. (2017). In vitro effect of vaginal lactobacilli on the growth and adhesion abilities of uropathogenic *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* 199(5):767-774. doi: 10.1007/s00203-016-1336-z.

- [64] Kang Y, Cai Y. (2018). The development of probiotics therapy to obesity: a therapy that has gained considerable momentum. *Hormones (Athens)*. doi: 10.1007/s42000-018-0003-y.
- Karimi S, Jonsson H, Lundh T, Roos S. (2018). Lactobacillus reuteri strains protect epithelial barrier integrity of IPEC-J2 monolayers from the detrimental effect of enterotoxigenic Escherichia coli. *Physiol Rep*. 6(2). doi: 10.14814/phy2.13514.
- [65] Ji Y, Park S, Park H, Hwang E, Shin H, Pot B, Holzapfel WH. (2018). Modulation of Active Gut Microbiota by Lactobacillus rhamnosus GG in a Diet Induced Obesity Murine Model. *Front Microbiol*. 10;9:710. doi: 10.3389/fmicb.2018.00710.
- [66] Aragón F, Carino S, Perdigón G, de Moreno de LeBlanc A. (2014). The administration of milk fermented by the probiotic Lactobacillus casei CRL 431 exerts an immunomodulatory effect against a breast tumour in a mouse model. *Immunobiology*. 219(6):457-64.