

Alimentos funcionales probióticos

Dras. María Pía Taranto, Marta Médici y Graciela Font de Valdez*

Laboratorio de Tecnología y Genética, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA/CONICET),

Chacabuco 145, T4000CNK, Tucumán, Argentina. E-mail: gfont@cerela.org.ar.

Palabras clave: Lactobacilos, probióticos, alimentos funcionales

La demanda del mercado nacional e internacional ha impulsado en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales probióticos, productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped. El concepto de alimentos funcionales (AF) tiene su origen en una mayor comprensión de las bases moleculares de la relación existente entre alimentación y salud y la posibilidad de contar con reguladores biológicos (donde las bacterias lácticas juegan un papel protagónico) que disminuyan el riesgo de contraer enfermedades.

Los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran disponibles comercialmente a través de laboratorios o industrias alimenticias a nivel internacional así como en colecciones de cultivos. Sin embargo, muchos de ellos con propiedades particulares, están protegidos mediante patentes o licencias. La colección de cultivo de CERELA cuenta con un banco de bacterias probióticas para diferentes estudios tales como producción de vitaminas, regulación lipídica, inmunomodulación, protección del tracto gastrointestinal, etc.

En esta revisión del tema se describen la disminución de intolerancia a la lactosa –uno de los efectos probióticos de las BAL mejor documentados- y otros potencialmente benéficos, por ejemplo, propiedades inmunomoduladoras, capacidad hipolipemiente, inhibición de patógenos intestinales, propiedad protectora de la mucosa gástrica, actividad antagónica contra rotavirus, prevención de reacciones alérgicas y disminución del riesgo de enterocolitis necrotizante neonatal. La investigación científico-tecnológica de estas propiedades permitirá optimizar los procesos de elaboración de alimentos funcionales que contengan este tipo de cultivo lácticos, así como conocer los mecanismos por los cuales estas bacterias ejercen su efecto benéfico en el huésped, lo que reforzará la confianza de la comunidad médica y el público en general en el uso de estos bio-reguladores que se encuentran a la vanguardia en el mercado internacional de alimentos.

Probiotic functional foods

Key words: Lactobacillus, Probiotics, Functional Foods

Functional foods are the food industry's response to the consumer's demand for foods that are both attractive and healthy, a market that has tremendously increased during last years. These kinds of products are branded foods, which claim, explicitly or implicitly, to improve health or well-being. Nowadays, much research is being done in the field concerning the molecular bases of the

relationship existing between nutrition and health, and the possibility of developing biological regulators containing probiotic lactic acid bacteria, which might be used to prevent the risk of disease.

Some lactic probiotic cultures are commercially available but many other strains with particular properties are either protected by a patent or licenced. Within the culture collection of CERELA there is a bank of probiotic cultures, which are being studied for different purposes, e.g., as vitamin producers, lipid bioregulator, immune stimulant, gastrointestinal bioprotectors, etc.

In this review some beneficial effects due to lactic acid bacteria like the reduction in lactose intolerance –one of the best-documented probiotic effect- the immuno-modulation properties, the cholesterol reduction, inhibition of intestinal pathogens, the protection of the gastric mucose, the antagonistic activity against rotavirus, or the prevention of allergic reactions are described. The scientific and technological research in the field will support in the future a better handling of these cultures and the development of novel products with well known beneficial properties and way of action in the host.



L.casei

La demanda del mercado nacional e internacional ha impulsado en los últimos años una nueva línea de alimentos funcionales probióticos, productos alimenticios que, además de su valor nutritivo intrínseco, ayudan a mantener el estado de salud general del organismo y a la vez pueden tener un efecto benéfico adicional, terapéutico o preventivo en el huésped. Según la FAO (2002) los probióticos se definen como: "*Microorganismos vivos que ejercen una acción benéfica sobre la salud del huésped al ser administrados en cantidades adecuadas*". El concepto de **alimentos funcionales** (AF) tiene su origen en una mayor comprensión de las bases moleculares de la relación existente entre alimentación y salud y la posibilidad de contar con reguladores biológicos (donde las bacterias lácticas juegan un papel protagónico) que disminuyan el riesgo de contraer enfermedades. Se definen también como "*alimentos susceptibles de producir un efecto benéfico sobre una o varias funciones específicas en el organismo, más allá de los efectos nutricionales habituales, de mejorar el estado de salud y de bienestar y/o de reducir el riesgo de una enfermedad*" (1).

Los microorganismos comúnmente empleados como probióticos se encuentran disponibles comercialmente a través de laboratorios o industrias alimenticias a nivel internacional así como en colecciones de cultivos (ATCC, DSM, CRL [CERELA-CONICET]). Algunos ejemplos de estos microorganismos son los siguientes: *Lactobacillus acidophilus* NCFM (Rhone-Poulenc., Estados Unidos), *Lactobacillus reuteri* 106 (BioGaia, Estados Unidos), *Bifidobacterium longum* bb536 (Morinaga Milk Ind. apón), *Lactobacillus plantarum* 299 (ProViva, Finlandia), *Lactobacillus casei* YIT9018, *Shirota*, (Yakult, Japón) y *Lactobacillus johnsonii* LJ-1 (Nestlé, Suiza). *Lactobacillus casei* CRL 431 y *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 (CERELA, Argentina), *Lactobacillus reuteri* CRL 1098 (Patente en trámite nro p040103130, CERELA, Argentina) entre otros. Los probióticos lácticos están incluidos en diversos productos lácteos, actualmente en el mercado, como los denominados "bio-yogurts" (Nestle, st. Ivel, Danone, Onken, Vfit) leches fermentadas (Yakult: *L. casei* Shirota; Nestle's LC1Go: *L. johnsonii*; LG21 yogurt: *L. gasseri* OLL2716), quesos probióticos (Bioqueso Iloay Vita), leche BIO (Sancor/Cerela/Conicet), entre otros. Estos productos son comercializados con el eslogan: "Mejoran el balance de la flora intestinal". También se los encuentra en preparados en forma de tabletas y polvos que incluyen un solo microorganismo o una mezcla de ellos, como **Multibiota** (*L.*

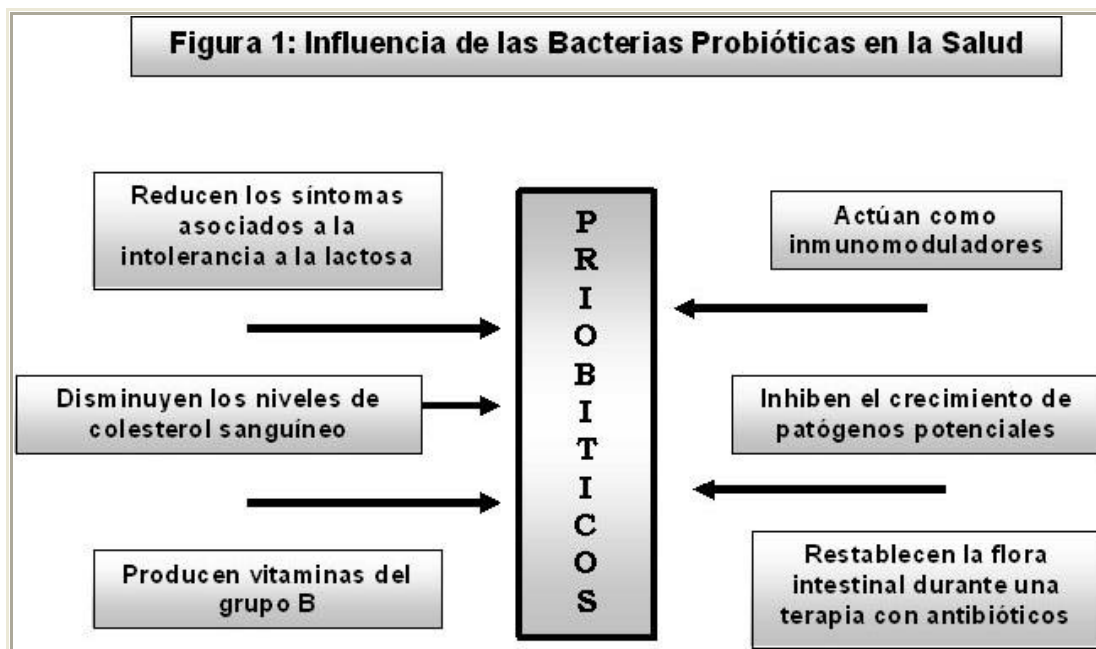
acidophilus, *Bifidobacterium bifidum* y *B. longum*) en Inglaterra y **Protexin** (*Streptococcus*, dos cepas de bifidobacterias y cuatro lactobacilos [2]).

El agregado de bacterias probióticas para la elaboración de AF depende por un lado, del sinergismo que debe establecerse entre estos cultivos y los iniciadores de la fermentación (fermentos, cultivos iniciadores) lo que permite obtener un producto fermentado con excelentes propiedades sensoriales (3) y por el otro lado, de los factores extrínsecos que afectan o condicionan la viabilidad de las cepas funcionales. Cabe mencionar que uno de los requisitos principales de este tipo de AF es que los microorganismos probióticos permanezcan **viabiles** y **activos** en el alimento y durante el pasaje gastrointestinal para garantizar así su potencial efecto benéfico en el huésped.

Dentro de los factores extrínsecos más importantes que afectan la viabilidad y sobrevivencia de las células se encuentran: el pH (condiciones de acidez derivadas del proceso de fermentación), el oxígeno disuelto (especialmente para bifidobacterias), las interacciones antagónicas entre especies, la composición química del medio de cultivo, la concentración final de azúcares (aumento de la presión osmótica), las prácticas de inoculación (es importante conocer el momento adecuado para el agregado del cultivo probiótico), la temperatura y duración de la fermentación, y las condiciones de almacenamiento del producto, etc (4, 5).

En este contexto, el Queso Fresco Probiótico (Bioqueso Iloay Vita) es un vehículo adecuado para cultivos probióticos. Contiene *S. thermophilus* y *Lactococcus lactis* (fermento láctico) y *B. bifidum*, *L. acidophilus* y *L. paracasei* (bacterias probióticas). El mismo garantiza una adecuada viabilidad de las bacterias durante su período de conservación hasta el consumo, y la matriz de caseína protege a las células de la acción de los jugos digestivos (6).

Algunos efectos probióticos atribuidos a las bacterias lácticas están muy documentados, y se conoce su mecanismo de acción (como por ejemplo: la disminución de la intolerancia a lactosa) mientras que otros, como las propiedades antitumorales o el efecto hipocolesterolémico, requieren mayores estudios *in vitro* y en modelos experimentales para poder confirmar el modo de acción. A continuación se realiza una concisa reseña de estos aspectos (Figura 1).



Intolerancia a la lactosa

Uno de los efectos probióticos más consistentes y reproducibles es la disminución de los síntomas asociados con la mala absorción de lactosa. La intolerancia congénita a lactosa es causada por una deficiencia en la enzima b-galactosidasa (b-gal) a nivel intestinal, resultando así en la imposibilidad de

digerir este disacárido. Los individuos que la padecen desarrollan diarrea, flatulencia, dolor abdominal e incluso fiebre luego del consumo de leche, aunque los síntomas varían con el grado de intolerancia. Estudios en humanos demostraron que la lactosa en el yogur (producto fermentado) es asimilada más fácilmente que la misma cantidad presente en la leche (7). Estos resultados se deben a un aumento de la actividad β gal luego de la ingesta de yogur, cuyo origen es microbiano y no de mucosa (8). Algunos estudios demostraron que si bien las bacterias lácticas (BAL) presentes en el yogur no necesitan estar viables para favorecer la asimilación de lactosa, es importante que las células permanezcan intactas durante el pasaje gastrointestinal para proteger a la enzima β gal (9). Este efecto probiótico comprende la disminución de la concentración de lactosa en el producto fermentado (debido al crecimiento y metabolismo microbiano) y al suministro de la enzima β -gal en el lumen intestinal.

Efecto Inmunomodulador

Las propiedades benéficas de las cepas probióticas en el intestino justifican su inclusión en los productos lácteos fermentados, especialmente aquellas relacionadas con el sistema inmune. Al respecto, es deseable que las BAL en los AF sean capaces no sólo de inducir una inmunoestimulación a nivel de mucosas, sino también de garantizar la ausencia de efectos colaterales tales como la translocación microbiana (pasaje a través de la mucosa intestinal hacia órganos extraintestinales como hígado y bazo) y la alteración de la permeabilidad intestinal debido a una respuesta inflamatoria exacerbada. Por este motivo es imprescindible evaluar la habilidad de la cepa probiótica para interactuar con el intestino y con las células inmunes asociadas a éste (10, 11).

Por ejemplo, la mezcla de bacterias utilizadas para la elaboración del Queso Fresco Probiótico fueron capaces de interactuar con los sitios de inducción más importantes del intestino delgado (placas de Peyer) e intestino grueso (nódulos linfoides mesentéricos) y mantener la relación de Linfocitos T CD4+/CD8+, sin producir efectos secundarios o colaterales tales como el incremento de la respuesta inflamatoria mediada por la actividad citotóxica de LT CD8+ (6, 12, 13). De esta manera se logra aumentar la resistencia inespecífica del huésped y facilitar la exclusión de patógenos del intestino (14).

Efecto hipocolesterolémico

Un efecto probiótico importante, de posible aplicación en el área médico-nutricional, es la capacidad de algunas cepas BAL de reducir el colesterol sérico. Este compuesto es precursor de ácidos biliares y hormonas esteroides y un componente importante de la membrana celular de los organismos eucariotas superiores.

En el hombre, dos tercios del colesterol plasmático total están esterificados y el resto circula en la membrana de los glóbulos rojos. Un 60-70% es vehiculizado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL), el 20-30% por las de alta densidad (HDL) y el 5-10% restante por las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL). Aún cuando el colesterol es imprescindible para la vida, su exceso es un factor de riesgo en el desarrollo de la aterosclerosis y otras enfermedades coronarias. Datos estadísticos recientes revelan que una disminución de colesterol en sangre reduce la incidencia de muerte por afecciones coronarias en poblaciones con dietas ricas en grasa. En la Argentina, un 46% de las defunciones son consecuencia de enfermedades cardiovasculares, siendo los hombres más susceptibles que las mujeres. Además, un 30-40% de la población padece hipercolesterolemia.

En la actualidad existen diversas drogas para el tratamiento de esta anomalía, ya sea inhibiendo la 3-hidroxi-3 metilglutaril coenzima A reductasa (cataliza la formación de mevalonato), aumentando la excreción biliar neta por interrupción de la circulación enterohepática de la bilis, o inhibiendo la lipasa pancreática (15, 16). Sin embargo, los efectos colaterales derivados de las mismas llevan a

replantear su uso terapéutico y la posibilidad de usar BAL con efecto hipocolesterolémico como reguladores biológicos, lo que resultaría en un tratamiento más natural de la hiperlipemia.

Esta hipótesis se generó a partir de un relevamiento sanitario efectuado en la tribu Massai (17) que reveló niveles de colesterol inferiores al valor promedio normal. Los investigadores relacionaron este fenómeno con el consumo de leches fermentadas (alimento base de la tribu) y la presencia de una cepa silvestre de lactobacilo que llevaba a cabo el proceso de fermentación natural.

Estudios posteriores son contradictorios y se informan efectos transitorios o difícilmente extrapolables a condiciones normales de consumo de lácteos fermentados. Por ejemplo, se observó un 10-12% de reducción de colesterol sérico en adultos con la ingesta continuada de yogur, efecto que sólo se mantuvo durante dos semanas (18). Resultados similares en humanos fueron obtenidos con la ingesta de grandes dosis (680 a 5.000 ml/día) de otras leches fermentadas (19) y en animales de experimentación hipercolesterolémicos luego del suministro de leche fermentada con *S. thermophilus* (ratas) y con *L. acidophilus* (cerdos) (20, 21). En todos estos estudios, el efecto hipolesterolémico fue transitorio, no obstante usarse elevadas dosis de BAL viables (108-1010 células).

Taranto y col. (22, 23) pusieron en evidencia el efecto hipocolesterolémico de la cepa *L. reuteri* CRL 1098 en un modelo experimental animal hipercolesterolémico. Se comprobó la efectividad del probiótico administrado en forma terapéutica y preventiva a muy baja dosis (104 cfu/día) sin efectos colaterales, obteniéndose con los tratamientos mencionados una disminución significativa ($P < 0.01$) del orden de 38-20% de colesterol total y 35-22% de triglicéridos. Al mismo tiempo, la administración de *L. reuteri* produjo un aumento de la razón HDL/LDL de 18 y 12 % en cada caso. Estos resultados son muy promisorios, ya que al presente ninguna droga alopática aumenta la lipoproteína de alta densidad (HDL). Un efecto hipocolesterolémico similar se observó utilizando cepas de bifidobacterias, pero los autores no hacen referencia a lipoproteínas (24).

A pesar de los avances en el tema, no se conoce aún el modo de acción de los probióticos liporeductores ni el mecanismo por el cual reducen colesterol *in vivo*. Según estudios realizados *in vitro* (en medios de cultivo) se cree que el fenómeno podría deberse a 1) Asimilación del compuesto por la bacteria (25) 2) Fenómenos físicoquímicos (26) y/o 3) Actividad hidrolasa de sales bilares del probiótico (27, 28).

Efecto gastro-protector

Uno de los agentes etiológicos más comunes asociado a gastritis aguda, crónica y úlcera péptica es la presencia de *Helicobacter pylori*. Cuando esta bacteria Gram negativa alcanza la cavidad gástrica, atraviesa la capa de mucus y se sitúa en íntimo contacto con las células epiteliales de la mucosa, desencadenando una reacción inflamatoria (gastritis aguda) que se traduce clínicamente en una sintomatología difícil de diagnosticar. Tras esta infección aguda, la bacteria, anclada en la superficie de la mucosa gástrica, da lugar a una gastritis crónica, caracterizada por la presencia de un infiltrado de linfocitos y células plasmáticas. Esta infección crónica puede evolucionar hacia patologías más graves como úlcera péptica, cáncer gástrico o linfoma.

Diversos estudios pusieron en evidencia la efectividad de algunas especies del Género *Lactobacillus* contra *H. pylori* (29, 30) entre las cuales podemos mencionar a *L. gasseri* OLL 2716, *L. acidophilus* DDS-1J, *L. casei* cepa Shirota. Una posible explicación del efecto antagónico sería que la inducción de prostaglandinas endógenas en respuesta a la producción de elevadas cantidades de ácido láctico en el estómago (31) u otros mecanismos aún no descriptos, actuarían como mecanismos de defensa con efecto protector de la mucosa gástrica (32).

Actividad antagónica contra rotavirus

La gastroenteritis aguda provocada por rotavirus es la causa más común de diarrea grave en bebés y niños menores de 5 años, que se manifiesta con diarrea, vómitos y fiebre. El virus se transmite por alimentos o agua contaminados con materia fecal. Algunas bacterias probióticas han demostrado ser benéficas en el tratamiento de este tipo de diarrea aguda, tales como *L. reuteri* y *L. rhamnosus* (33, 34) que colonizan el tracto intestinal y disminuyen significativamente el tiempo de duración de la diarrea aguda asociada con rotavirus.

Prevención de reacciones alérgicas

Las alergias son la respuesta del sistema inmunológico a un alimento, inhalante (sustancias en el aire) o sustancia química en particular. Los alérgenos alimenticios, como las proteínas de leche de vaca o el gluten, pueden provocar una respuesta pro-inflamatoria en el intestino por alteración de la función de la barrera intestinal. Es posible que las bacterias probióticas puedan prevenir esta disfunción intestinal (12), pero existe además una relación directa entre la función del tejido linfoide asociado al intestino y la respuesta alérgica. Uno de los mecanismos primarios involucrados en este proceso podría ser la supresión celular activa responsable de los eventos proinflamatorios en el intestino. Este mecanismo se llevaría a cabo por la secreción de citoquinas supresoras como el *transforming growth factor b* (TGF-b) y la interleuquina 10 (IL-10). Los probióticos actúan reduciendo la inflamación intestinal, corrigen el desbalance de los linfocitos y estimulan a las citoquinas de los linfocitos Th1 (IL-12 e INF-gamma). Algunos de los lactobacilos y bifidobacterias usados como probióticos favorecerían la producción de IgA y reducirían la secreción de IgE mediante el incremento en la captación de los antígenos por las placas de Peyer y el mejoramiento en el procesamiento de los antígenos que llegan al intestino a través de la dieta (35). Este mecanismo aún no fue demostrado en pacientes alérgicos a proteínas de cereales.

L. casei CRL 431, cepa probiótica presente en la LECHE BIO®, puede provocar una regulación negativa en un proceso alérgico modulando el **balance linfocitos Th1/ Th2**, que es fundamental en la regulación de la síntesis de IgE mediante la liberación de citoquinas (36).

Disminución del riesgo de Enterocolitis Necrotizante Neonatal (ECN)

La alimentación del recién nacido con leche materna constituye una protección eficiente contra diferentes tipos de infecciones. La protección está mediada por la presencia de anticuerpos y células inmunocompetentes, así como por factores bioactivos (oligosacáridos, enzimas, hormonas, factores de crecimiento y citoquinas) que participan en la maduración de diferentes estirpes celulares inmunocompetentes. De los anticuerpos presentes en el fluido materno, la IgA representa la mayor proporción. Esta inmunoglobulina secretora inhibe la translocación de bacterias causantes de infecciones intestinales evitando la bacteriemia y la enterocolitis necrotizante (37). Esta última patología afecta principalmente al recién nacido prematuro y se caracteriza por una necrosis en la mucosa o las capas más profundas del colon y del intestino delgado proximal provocada por una superpoblación de bacterias Gram negativas (*E. coli*, *Klebsiella* sp. y *Enterobacter* sp.) en el duodeno (38).

Estudios realizados en modelos experimentales animales indican que el suplemento por vía oral de *B. infantis* o *Saccharomyces bouladii* reducen los riesgos de desarrollar la enfermedad. Dos posibles mecanismos estarían involucrados en el efecto protector: i) la exclusión competitiva del patógeno debido a la colonización del intestino por la bacteria probiótica; ii) la inhibición de los mediadores pro-inflamatorios a nivel intestinal (39, 40).

Conclusión

Los efectos promotores potenciales para la salud adjudicados a las BAL - probióticos por excelencia- debido a sus propiedades inmunomoduladoras, antagónicas de patógenos gástricos e intestinales e hipolipemiantes, entre otras, han promovido en los últimos años una activa investigación científico-tecnológica con el objeto de optimizar los procesos de elaboración de alimentos funcionales fermentados conteniendo este tipo de cultivos, a. Así como, poder comprender los mecanismos por los cuales ejercen sus efectos benéficos. Todo este conocimiento permitirá el uso de estos bio-reguladores de manera segura y efectiva.

Referencias

1. Mollet B, Rowland I, 2002. Functional foods: at the frontier between food and pharma. *Current in Opinion and Biotechnology* 13:483-5
2. Gibson GR, Fuller R, 2000. Aspects of in vitro and in vivo research approaches directed toward identifying probiotics and prebiotics for human use. *Journal of Nutrition* 130(2S Suppl):391S-395S.
3. Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Matto J, Mattila-Sandholm T, 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technology properties. *Journal of Biotechnology* 84: 197-215.
4. Vinderola C.G., Prosello W., Ghiberto D. and Reinheimer J. (2000). Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian Fresh cheese. *Journal of Dairy Science* 83: 1905-1911.
5. Kristo E, Biliaderis C, Tzanetakis N, 2003. Modelling of rheological, microbiological and acidification properties of a fermented milk product containing a probiotic strain of *Lactobacillus paracasei*. *International Dairy Journal* 13: 517-528.
6. Medici M, Vinderola CG, Perdígón G, 2004. Gut mucosal immunostimulation by probiotic fresh cheese. *International Dairy Journal* 14: 611-618.
7. Kolars JC, Levitt MD, Aouji M, Savaiano DA, 1984. Yoghurt-an autodigesting source of lactose. *New England Journal of Medicine* 310:1-3.
8. Garvie EI, Cole CB, Fuller R, Hewitt D, 1984. The effect of yoghurt on some components of the gut microflora and on the metabolism of lactose in the rat. *Journal Applied of Bacteriology* 56:237-245.
9. Barth CA, Kuhn C, Titze A, Lorenz A, de Vrese M, 1996. Lactose intolerance-importance of viability of lactobacilli in fermented milk products. In "Proc. Of Symp. Dairy Microorganism as Probiotics". Potsdam, Germany.
10. Perdígón G, Maldonado-Galdeano C, Valdez J, Medici M, 2002. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *European Journal of Clinical Nutrition* 56(4):21-26.
11. Perdígón G, Medina M, Vintiñi E, Valdez J, 2000. Intestinal pathway of internalization of lactic acid bacteria and gut mucosal immunostimulation. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology* 13: 141-150.
12. Adolfsson O, Nikbin Meydani S, Russell R, 2004. Yogurt and gut function. *American Journal of Clinical Nutrition* 80: 245-256.
13. Vinderola C., Perdígón G., Reinheimer J., Medici M., Prosello W. y Ghiberto D. (2003). Bioqueso Ilolay Vita: un nuevo queso probiótico con alta respuesta sobre el sistema inmune. *Industria Láctea Española* 34-48.

14. Isolauri E, Majamaa H, Arvola T, Rantala I, Virtanen E, Arvilommi H, 1993. Lactobacillus casei GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in sucking rats. *Gastroenterology* 105:1643-1650.
15. Erkelens DW, Baggen MGA, Van Doormeal JJ, Kettner M, Koningsberger JC, Mol MJTM, 1988. Clinical experience with simvastatin compared with cholestyramine. *Drugs*. 39 (Suppl.): 87-92.
16. Hofman AF, 1989. The enterohepatic circulation of bile acids in health and disease. pp. 144-161. In: Sleisinger MH, Fordtran JS (eds) *Gastrointestinal diseases. Pathophysiology, Diagnosis, management*. W.B. Saunders Company, New York.
17. Mann GV, Spoerry A, 1974. Studies of a surfactant and cholesterolemia in the Maasai. *American Journal Clinical of Nutrition* 27:464-469.
18. Massey L, 1984. Effect of changing milk and yoghurt consumption on human nutrient intake and serum lipoprotein. *Journal of Dairy Science* 67:255-262.
19. Hepner G, Fried RST, Jeor S, Fusetti L, Morin R, 1979. Hypocholesterolemic effect of yogurt and milk. *American Journal of Clinical and Nutrition* 32:19-24.
20. Rao DR, Chawan CB, Pulusani SR, 1981. Influence of milk and thermophilus milk on plasma cholesterol levels and hepatic cholesterologenesis in rats. *Journal of Food Science* 46: 1339-1341.
21. Rodas BZ, Gilliland SE, Maxwell CV, 1996. Hypocholesterolemic action of Lactobacillus acidophilus ATCC 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diet. *Journal of Dairy Science* 79:2121-2128.
22. Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF, 1998. Evidence for hypocholesterolemic effect of Lactobacillus reuteri in hypercholesterolemic mice. *Journal of Dairy Science* 81:2336-2240.
23. Taranto MP, Medici M, Perdigon G, Ruiz Holgado AP, Valdez GF, 2000. Effect of Lactobacillus reuteri on the prevention of hypercholesterolemia in mice. *Journal of Dairy Science* 83:401-403.
24. El-Gawad I, El-Sayed EM, Hafez SA, El-Zeini HM, Saleh FA, 2005. The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. *International Dairy Journal* 15: 37-44
25. Gilliland SE, Nelson CR, Maxwell C, 1985. Assimilation of cholesterol by Lactobacillus acidophilus. *Applied and Environmental Microbiology* 49: 377-381.
26. Klaver FAM, Van der Meer R, 1993. The assumed assimilation of cholesterol by lactobacilli and Bifidobacterium bifidum is due to their bile salt deconjugating activity. *Applied and Environmental Microbiology* 59:1120-1124.
27. Taranto MP, Sesma F, Ruiz Holgado AP, Valdez GF, 1997. Bile Salts Hydrolase Plays a Key Role on Cholesterol Removal by Lactobacillus reuteri. *Biotechnology Letters*. 19: 845-847,
28. Lim H, Kim S, Lee W, 2004. Isolation of cholesterol-lowering lactic acid bacteria from human intestine for probiotic use. *Journal of Veterinary Science* 5: 391-395.
29. Cats A, Kuipers E, Bosschaert M, Post R, Vanderbroucke-Grauls C, Kusters J, 2003. Effect of frequent consumption of a Lactobacillus casei-containing milk drink in Helicobacter pylori-colonized subjects. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 17: 429.

30. Sgouras D, Maragkoudakis P, Petraki K, Martinez-González B, Eriotou E, Michopoulos S, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E, Mentis A, 2004. In vitro and In vivo inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* Strain Shirota. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 518-526
31. Aiba Y, Nobuyuki Suzuki M, Abu M, Kabir M, Atushi M, Yasuhiro M, 1998. Lactic acid-mediated suppression of *Helicobacter pylori* by the oral administration of *Lactobacillus salivarius* as a probiotic in a Gnotobiotic murine model. *The American Journal of Gastroenterology* 93: 2097-2101.
32. Uchida M, Kurakazu K, 2004. Yogurt containing *Lactobacillus gasseri* OLL 2716 exerts gastroprotective action against acute gastric lesion and antral ulcer in rats. *Journal of Pharmacology Science* 96: 84-90.
33. Rosenfeldt V, Michaelsen KF, Jakobsen M, Larsen CN, Moller PL, Tvede M, Weyrehter H, Valerius NH, Paerregaard A, 2002. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains on acute diarrhea in a cohort of nonhospitalized children attending day-care centers. *Pediatric. Infection Disease Journal* 21:417-419.
34. Alam NH, Ashraf H, 2003. Treatment of infectious diarrhea in children. *Pediatric Drugs* 5:151-165.
35. Laiho K, Ouwehand A, Salminen S, Isolauri E, 2002. Inventing probiotic functional foods for patients with allergic disease. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology* 89(6):75-82.
36. Fontenla de Petrino S, Bibas Bonet ME, Mesón O, Perdigón G, 2002. The effect of *Lactobacillus casei* on an experimental model of atopy. *Food and Agricultural Immunology* 14: 181-189.
37. Castro A, Porras Villalobo M, 2003. La protección de leche materna a los recién nacidos. Una visión actualizada. *Revista Mejjcana de Pediatría* 70: 27-31.
38. Hoy C, Wood C, Hawkey P, Puntis W, 2000. Duodenal microflora in very-low-birth-weight neonates and relation to necrotizing enterocolitis. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 4539-4547.
39. Caplan M, Miller-Catchpole R, Kaup S, Russell T, Lickerman M, Amer M, Xiao Y, Thomson R, 1999. Bifidobacterial supplementation reduces the incidence of necrotizing enterocolitis in a neonatal rat model. *Gastroenterology* 117: 577-583.
40. Akisu M, Baka M, Yalaz M, Huseyinov A, Kultursay N, 2003. Supplementation with *Saccharomyces boulardii* ameliorates hypoxia/reoxygenation-induced necrotizing enterocolitis in young mice. *European Journal of Pediatric Surgery* 13: 319-323.

*Dra. Graciela Font de Valdez, Investigador Principal CONICET, Laboratorio de Tecnología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA/CONICET), Chacabuco 145, T4000CNK, Tucumán, Argentina. E-mail: gfont@cerela.org.ar.

Dra. María Pía Taranto, Investigador Asistente CONICET, Laboratorio de Tecnología y Genética, CERELA/CONICET. E-mail: ptaranto@cerela.org.ar.

Dra. Marta Médici, Investigador, Profesional de Apoyo, Cepario, Laboratorio de Tecnología, CERELA/CONICET. E-mail: mmedici@cerela.org.ar.