

## **BACTERIOTERAPIA CON LACTOBACILOS PROBIÓTICOS PARA LA PREVENCIÓN DE INFECCIONES UROGENITALES.**

Dra. María E. Fátima Nader-Macias. Bioquímica. PhD en Bioquímica.  
Investigador Principal de CONICET. Profesor Asociado de Microbiología y  
Parasitología UNSTA. Vice-Director de CERELA.

Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET)  
Chacabuco 145. 4000. San Miguel de Tucumán. Argentina  
Tel: 54-381-4311720. Fax: 4005600. E-mail: [fnader@cerela.org.ar](mailto:fnader@cerela.org.ar).  
Web: [www.cerela.org.ar](http://www.cerela.org.ar)

### **Resumen**

Los lactobacilos son los microorganismos predominantes en el tracto gastrointestinal y urogenital del hombre y animales homeotérmicos. También se emplean en la elaboración de diferentes alimentos, lo que los categoriza como GRAS (Generally Regarded as Safe). Si bien están disponibles en productos vaginales en el mercado farmacéutico, hay escasas evidencias de su efectividad para la prevención de infecciones urogenitales. Nuestro grupo de trabajo ha aislado lactobacilos vaginales humanos, seleccionando aquellos con propiedades benéficas o probióticas. Se han estudiado las características tecnológicas para obtener el mayor número de microorganismos vivos (biomasa) y las condiciones para la producción óptima de sustancias antagónicas frente a patógenos urogenitales (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas). Se ha demostrado en animales de experimentación (ratones BALB/c hembra endocriados) que la administración intrauretral de lactobacilos no produce efectos adversos ni modificaciones estructurales o ultraestructurales, previniendo efectivamente las infecciones urinarias.

Es necesaria la complementación de estos resultados con estudios en pacientes para demostrar la efectividad de la administración intravaginal de los lactobacilos probióticos seleccionados en la recolonización de la microbiota urogenital, la prevención o terapia de los diferentes síndromes y cuadros clínicos que afectan al tracto, su efecto sobre mujeres embarazadas, etc que permitan proponer la bacterioterapia con lactobacilos como alternativa válida a la terapia con otras drogas.

### **Abstract**

Lactobacilli are the predominant microorganisms in the gastrointestinal and urogenital tracts of human beings and homeothermic animals. They are also used for the elaboration of different fermented foods being categorized as GRAS (Generally Regarded as Safe). Even though they are included into different vaginal products in the pharmaceutical market, there are small amount of evidences of their effectivity in the prevention of urogenital infections. Our research group have isolated human vaginal lactobacilli, selecting those with beneficial or probiotic properties. The technological characteristics to obtain the higher number of viable (biomass) microorganisms and the conditions for the optimal production of

antagonistic substances against pathogenic microorganisms (organic acid, hydrogen peroxide, bacteriocins) were determined. In experimental animals (inbred female BALB/c mice) we demonstrated that the intraurethral administration of lactobacilli does not produce adverse effects or structural or ultra structural modifications in the urogenital tract, preventing effectively the Urinary Tract Infections.

The complementation of these results with human assays is necessary to demonstrate effectively the intravaginal administration of selected probiotic lactobacilli on the recolonization of the urogenital microbiota, the prevention or therapy of different clinical syndromes, their effect on pregnant women, etc, that will allow the proposal of the bacteriotherapy with lactobacilli as a valid alternative to the other drugs therapies.

**Tema Principal:** Lactobacilos preventivos de infecciones

**Palabras Clave:** Lactobacilos, prevención, infecciones urogenitales, probióticos, bacterioterapia

La terapia con probióticos se emplea cada vez con mayor frecuencia para la prevención y terapéutica de diversas infecciones y síndromes clínicos que afectan principalmente al tracto gastrointestinal. El término probióticos implica la administración de microorganismos vivos en número suficiente para ejercer un efecto fisiológico benéfico en el huésped, definición consensuada en la reunión de expertos de ISAPP (1). En los últimos años se ha observado una verdadera eclosión de publicaciones en esta área puntual de investigación, como por ejemplo, metaanálisis o revisiones que sintetizan el efecto benéfico de los probióticos en las diarreas asociadas a antibióticos (2) del viajero y por rotavirus (3), y resultados positivos pero no definitivos sobre la administración de probióticos para la enfermedad de Crohn (4) o en alergias atópicas (5).

Al mismo tiempo se ha incrementado la disponibilidad en el mercado alimenticio de una muy extensa gama y variedad de productos probióticos y alimentos funcionales elaborados por empresas mundiales o regionales, que proclaman una serie de efectos benéficos sobre el huésped, algunas veces no demostrados en ensayos clínicos.

Si bien el concepto de reconstitución de la microbiota indígena se ha estudiado profundamente, demostrándose su efectividad en el tracto gastrointestinal, (6,7,8) este concepto se traslada al reestablecimiento del equilibrio ecológico del tracto urogenital para participar así en la prevención de infecciones. Las infecciones que afectan a este tracto incluyen aquellas de transmisión sexual (por ej sífilis, gonorrea, HIV, etc) como las que se producen como consecuencia del ascenso de la microflora perineal, influidas tanto por factores exógenos (tratamientos hormonales, antibioticoterapias, inmunosupresores) como endógenos (embarazo, menarca, inmunodeficiencias primarias). La incidencia de cada una de ellos es significativa porque producen desde esterilidad hasta distintos efectos sobre la salud de la mujer embarazada como del feto. Asimismo, es cada vez mayor el número de mujeres que sufren de Infecciones del Tracto Urinario (UTI) a lo largo de su vida, o bien en la etapa prepuberal o post-menopáusica.

En base a los antecedentes descritos, nuestro grupo comenzó a investigar sobre la posibilidad de emplear la bacterioterapia con BAL para la prevención y tratamiento de Infecciones Urogenitales. Debido a que existe una especificidad de huésped en muchos de los componentes de la microbiota indígena, (9) nos dedicamos a aislar y seleccionar lactobacilos vaginales de origen humano que pudieran ser empleados para la prevención de infecciones urogenitales, como una alternativa válida para el empleo de antibióticos, antimicóticos y/o antiparasitarios, que producen efectos adversos y depleción de la microbiota indígena con las consecuencias concomitantes. Una vez aislados los lactobacilos de vagina de mujeres de nuestro medio realizamos el relevamiento de sus propiedades benéficas o probióticas que permitieran su empleo como reconstituyentes de la microbiota indígena y prevención de infecciones (10) Se seleccionaron aquellos microorganismos con una superficie hidrofóbica, que les permitiera una mejor adhesión a la membrana de las células epiteliales, o bien a la capa de glicoproteínas mucosas que las recubre, que varía según el estadio del ciclo hormonal. Luego, se seleccionaron los lactobacilos que pudieran producir grandes cantidades de sustancias antagónicas frente a patógenos urogenitales: ácidos orgánicos (por ej. ácido láctico), peróxido de hidrógeno, o bacteriocinas (11,12,13,14). La capacidad de producir peróxido de hidrógeno se empleó como característica determinante de selección, en base a algunos trabajos publicados en los que se demuestra que pacientes normales tienen prevalencia de lactobacilos  $H_2O_2^+$  en vagina, mientras que esta población está depletada o disminuida en pacientes con síndromes infecciosos (15,16,17). La propiedad de producir bacteriocinas en lactobacilos vaginales no fue publicada previamente, por lo que la descripción de *Lactobacillus salivarius*, productor de una bacteriocina termoestable que inhibe a varios patógenos genitales (13) fue uno de los hallazgos más interesantes de nuestro grupo. Ello nos permitiría combinar bacterias vivas con sustancias inhibitorias para su aplicación en el diseño de un producto farmacéutico.

Debido a que todo producto a ser aplicado en seres humanos debe ser probado en animales de experimentación, se trabajó en la implementación de un modelo experimental murino para estudiar la capacidad de colonización de lactobacilos al ser inoculados intrauretralmente. Así determinamos que en ratones hembra adultas (cepa BALB/c) de dos meses de edad, la dosis óptima debía ser de alrededor de  $10^7$  células viables durante tres días para colonizar el tracto urinario, los que permanecían en el tracto hasta el día 7 post inoculación (18,19,20). Debían ser reinoculados para lograr un tiempo más largo de colonización. Demostramos que no producen efectos adversos o colaterales en ninguno de los órganos del tracto urinario, ni modificaciones estructurales o ultraestructurales (21). Son capaces de prevenir la infección por *Escherichia coli* uropatógeno, en mayor grado al ser aplicados preventivamente que terapéuticamente (22). Y si se administran conjuntamente con antibióticos (22) o con hormonas (23) la respuesta frente al patógeno es más intensa, ya que *E. coli* desaparece del tracto más rápidamente y sin producir un efecto tan agresivo en el huésped. Por otra parte, la

administración intravaginal de lactobacilos no produce modificaciones histológicas al ser administrados en el modelo experimental murino (24)

El disponer de una serie de lactobacilos probióticos o benéficos implica además el estudio de sus propiedades tecnológicas para su inclusión en un producto de aplicación vaginal. Un producto efectivo para recolonizar el tracto vaginal, de aplicación local, debe contener microorganismos vivos en número no inferior a  $10^7$  bacterias, lo que implica obtener una gran cantidad de biomasa microbiana. Para ello se evaluaron los medios de cultivo y condiciones físico químicas óptimas que permitieran un mayor rendimiento microbiano, (25) tales como la liofilización en presencia de diferentes componentes y excipientes de productos farmacéuticos (26,27,28), para lograr una vida de estante extendida del producto. Por otra parte, se evaluaron las condiciones óptimas de producción de sustancias antagonicas para diseñar productos combinados conteniendo al mismo tiempo bacterias vivas y sustancias inhibitorias de patógenos (29,30,31,32). Así, se determinó que las condiciones óptimas de producción de bacteriocina de *L. salivarius* es similar a las condiciones de crecimiento (30). Mientras que las condiciones óptimas de producción de peróxido de hidrógeno y de autoagregación son diferentes a las de crecimiento, ya que el metabolito oxidante se produce en mayores concentraciones en agitación, situaciones en las que inhibe más efectivamente a *S. aureus*, microorganismo responsable del síndrome del shock tóxico en usuarias de tampones (31,32). Las concentraciones e isómeros de ácido láctico producido por los lactobacilos son diferentes según las condiciones de crecimiento, como la capacidad de autoaglutinar (32).

Los resultados de nuestro grupo han permitido la selección de lactobacilos probióticos (resumidos en la Tabla 1) con características benéficas que incluyen: capacidad de adhesión a epitelios y mucosas, producción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, autoagregación, y sin producir efectos adversos en el modelo animal murino. Estos microorganismos podrán ser incluidos en un producto farmacéutico de aplicación local para la prevención de infecciones urogenitales.

Tabla 1. Lactobacilos vaginales seleccionados por sus características probióticas.

Microorganismo	CRL	Característica Probiótica
<i>L. acidophilus</i>	1266	Productor de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>L. paracasei</i> ss. <i>paracasei</i>	1289	Productor de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<i>L. johnsonii</i>	1294	Auto y co-agregante
<i>L. salivarius</i> ss <i>salivarius</i>	1328	Productor de Bacteriocina
<i>L. gasseri</i>	1259	Productor de Acido Láctico

La aplicación clínica de estos productos y su efectividad recién se encuentra en su etapa inicial, con escasas publicaciones en el tema. Si bien este tipo de productos están disponibles en el mercado farmacéutico mundial, no se han publicado las

características de los microorganismos, ni los efectos beneficiosos o detrimentales en el huésped, con algunas escasas excepciones. El grupo de Reid y cols en Canadá ha demostrado la efectividad y propiedades de *L. fermentum* y *L. rhamnosus* en la prevención de las infecciones urinarias y en vaginosis bacterianas (33, 34,35,36). Otros investigadores están estudiando y realizando ensayos clínicos para evaluar la efectividad de diferentes microorganismos frente a Vaginosis Bacteriana (37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47)

Los pocos ensayos clínicos publicados dan idea de la promisoría efectividad de la prevención y tratamiento de algunos síndromes específicos por cepas específicas de lactobacilos, lo que sería óptimo para evitar las terapias antimicrobianas con sus concomitantes efectos adversos sobre la salud del huésped.

Las posibilidades de investigación en este área puntual son amplísimas, básicamente por la característica GRAS de los lactobacilos, lo que permite en teoría su administración sin que sean sujeto de control de determinadas agencias. Pero es necesario profundizar en el conocimiento de los efectos de la administración prolongada de lactobacilos en el tracto urogenital, si es que producen algún tipo de efecto adverso, si tienen algún efecto sobre los parámetros de alta calidad de vida que se emplean como marcadores poblacionales, cuál es el efecto que producen en la mujer embarazada, en qué momento hay que administrarlos, cuál es la dosis y tiempo óptimos de administración, etc, etc.

### **Citas bibliográficas.**

1. Reid G, Sanders ME, Gaskins R et al. New Scientific paradigms for probiotics and prebiotics. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2003. 37: 108-118
2. Cremonini F, Di Caro S, Nista EC et al. Metaanalysis: The effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhea. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2002. 16:1461-1467
3. Szajewska H, Mrukowics JZ. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double blind, placebo controlled trials. *J. Pediatr. Gastroentl Nutr.* 2001. 33: Sup2: S17-25
4. Sartor RB. Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005. 21: 44-50
5. Weston S, Halbert AR, Richmond P, Prescott SL, Effect of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child.* 2005. 29:
6. Gill HS, Guarner F. Probiotics and humal health: a clinical perspective. *Postgrad Med J.* 2004. 80: 516-526
7. Sullivan A, Nord CE, Probiotics and gastrointestinal diseases. *J. Intern Med.* 2005. 257:78-92
8. de Roos NM, Katan MB. Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am J Clin Nutr.* 2000. 71: 405-411
9. Savage D.C., and Kotarski S.F. Models for study the specificity by which lactobacilli adhere to murine gastric epithelium. *Inf. and Immun.* 1979. 26:966-973

10. Ocaña VS, Bru E, de Ruiz Holgado AP, Nader-Macías ME. Surface characteristics of lactobacilli isolated from human vagina. *J Gen Appl Microbiol.* 1999; 45:203-12.
11. Ocaña VS, de Ruiz Holgado AP, Nader-Macías ME. Selection of vaginal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating *Lactobacillus* for probiotic use. *Current Microbiol.* 1999; 38:279-84.
12. Ocaña VS, de Ruiz Holgado AP, Nader-Macías ME. Growth inhibition of *Staphylococcus aureus* by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* isolated from the human vagina. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 1999. 23:87-92.
13. Ocaña VS, de Ruiz Holgado AP, Nader-Macías ME. Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain. *Appl Env Microbiol.* 1999. 65:5631-35.
14. Juárez Tomas MS, Ocaña VS, Wiesse B, and M.E. Nader-Macias. Growth and Lactic acid production by vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and inhibition of uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Of Medical Microbiology.* 2003. 52: 1117-1124
15. Hillier S.L., M. A, Krhohn, L.K. Rabe, S. Klebanoff and D. Eschenbach. The normal vaginal flora, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-producing lactobacilli and bacterial vaginosis in pregnant women, *Clin. Inf. Diseases.* 1993. 16 (S4) S273-281
16. Redondo-López V., R. L. Cook and J.D. Sobel. Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.* 1990. 12:856-872
17. Esenbach Klebanoff, S.J. Hillier SL, Eschenbach D.A. and Waltersdorph. A. M. Control of the microbial flora of the vagina by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-generating lactobacilli. *J. Inf Dis.* 1991. 164-94-100.
18. Nader de Macias M.E., Lopez de Bocanera M.E., Silva de Ruiz C. and Pesce de Ruiz Holgado A. Isolation of lactobacilli from the urogenital tract of mice. Elaboration of beads for their inoculation. *Microbiologie-Aliments-Nutrition.* 1992. 10:43-7.
19. Silva de Ruiz, C., Nader de Macías, M.E., López de Bocanera, M.E., Ruiz Holgado, A. *Lactobacillus fermentum* administered in suspensions and in agarose beads to mice: a comparative study. *Microbiologie. Aliments. Nutrition.* 1993.11,391-397.
20. Nader-Macias M.E. Silva-Ruiz C, Lopez-Bocanera M.E., Pesce-Ruiz Holgado A. Behaviour of lactobacilli on prevention and therapeutic effects on urinary tract infections (UTI) in mice. *Anaerobe.* 1996. 2; 85-93.
21. Silva de Ruiz C, Rey R, and Mader-Macias ME. Structural and ultrastructural studies of the urinary tract of mice inoculated with *Lactobacillus fermentum*. *British Journal of Urology.* 2003. 91: 878-882
22. Silva de Ruiz C., Lopez de Bocanera M.E., Nader de Macias M.E. and Pesce de Ruiz Holgado A. Effect of lactobacilli and antibiotics on *E. coli* urinary tract infections in mice. *Biol. Pharmac. Bull.* 1996. 19(1):88-93
23. Silva de Ruiz C, Rey R, and Nader-Macias ME . Experimental administration of estradiol on the colonization of *Lactobacillus fermentum* and *Escherichia coli* in the urogenital tract of mice. *Bio. Pharm Bull.* 2001. 24-127-134
24. Vintini E. Ocaña V, Nader-Macias ME, Effect of lactobacilli administration in the vaginal tract of mice: evaluation of side effects and local immune response by local administration of selected strains. *Methods Mol Biol.* 2004. 268:401-410
25. Juárez Tomás MS, Bru de Labanda E, de Ruiz Holgado AP, Nader-Macías ME. Estimation of vaginal probiotic lactobacilli growth parameters with the application of the Gompertz model. *Can J Microbiol.* 2002; 48:82-92.

26. Juárez Tomás MS, Ocaña V and Nader-Macías ME Viability of vaginal probiotic lactobacilli during refrigerated and frozen storage. *Anaerobe*. 2004. 10: 1-5.
27. Zárate G., MS Juarez Tomas and ME Nader-Macias. Effect of some pharmaceutical excipient on the survival of probiotic vaginal lactobacilli. (2005) In press
28. Zárate G. and Nader-Macias. Viability and biological properties of probiotic vaginal lactobacilli after lyophilization and refrigerated storage into gelatin capsules. (2005) In press.
29. Juárez Tomás MS, Bru E and Nader-Macías ME. Comparison of the growth and hydrogen peroxide production by vaginal probiotic lactobacilli under different culture conditions. *Am J Obstet Gynecol*. 2003. 188: 35-44.
30. Juárez Tomás MS, Bru E, Wiese B, de Ruiz Holgado AAP, Nader-Macías ME. Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production of vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. *J Appl Microbiol*. 2002; 93 (4):714-724.
31. Ocaña VS, and ME. Nader-Macias. Vaginal Lactobacilli: self and co-aggregating ability. *British Journal of Biomedical Sciences*. (2002) 59: 183-190
32. Juarez Tomas MS, B. Wiese and M.E. Nader-Macias. Effects of culture conditions on the growth and auto-aggregation ability of vaginal *Lactobacillus johnsonii* CRL 1294. (2005) In press
33. Reid G, A. Bruce and M. Taylor Influence of three days antimicrobial therapy and Lactobacilli vaginal suppositories on recurrence of Urinary Tract Infections. *Clin. Therap*. 1992. 14: 11-16.
34. Baerheim S, E. Larsen, and A. Di Granes. Vaginal application of lactobacilli in the prophylaxis of recurrent lower urinary tract infections in women. *Scand. J. Prim. Health Care*. 1994. 12: 239-242.
35. Raz R, and W. Stamm. A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *New Eng. J. of Medicine*. 1993. 329: 753-756
36. Parent J, M. Bossens, D. Bayot, et al. Therapy of bacterial vaginosis using exogenously applied lactobacillus acidophilus and a low dose of estriol. *Drug Res*. 1996. 46: 68-73.
37. Mc. Groarty J. Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract . *FEMS Microb and Medical Microbiology*. 1993. 6: 251-264
38. Reid G. and Burton J. Use of *Lactobacillus* to prevent infection by pathogenic bacteria. *Microbes and Infection*. 2002. 4: 319- 324.
39. Boris, S. and Barbes C. Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens *Microbes and Infection*. 2000. 2: 543- 546.
40. Reid G. and Bruce A.W. Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis*. 2001. 183 (Suppl 1): S77-80.
41. Reid G, Jass J, Sebulsy T, McCormick J. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(4):658-72.
42. Reid G, Beuerman D, Heinemann C, Bruce AW. Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 2001; 32: 37-41.
43. Reid G, Bruce AW. 2001. Selection of lactobacillus strains for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis*. 2001; 183(suppl 1):S77-S80.
44. Gardiner G, Heinemann C, Beuerman D, Bruce AW, Reid G. Persistence of *Lactobacillus fermentum* RC-14 and *L. rhamnosus* GR-1, but not *L. rhamnosus* GG in the human vagina as demonstrated by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD). *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002; 9:92-96.

45. Reid G, Cook RL, Bruce AW. Examination of strains of lactobacilli for properties which may influence bacterial interference in the urinary tract. *J Urol.* 1987;138:330-335.
46. Reid G. 2001. Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(suppl):437S-443S.
47. Reid G, Charbonneau D, Erb J, Kochanowski B, Beuerman D, Poehner R, Bruce AW. Oral use of *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *L. fermentum* RC-14 significantly alters vaginal flora: randomized, placebo-controlled trial in 64 healthy women. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2003; 35: 131-134.

## **Reconocimiento**

Los resultados presentados en este trabajo han dado lugar a las tesis doctorales de los siguientes profesionales: Dra Clara Silva de Ruiz, Dra. Virginia Ocaña y Dra. Silvina Juárez Tomas

Los proyectos de investigación cuyos resultados se vuelcan en el presente trabajo han sido financiados por subsidios de CONICET.

Las cepas probióticas seleccionadas se han licenciado a la empresa italiana ANIDRAL, del grupo Molfin-Ace-Probiotical, para su obtención en gran escala y comercialización mundial.