

Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica

Resumen de ponencias

Sumario

Sesión Microbiología

*Susana Delgado
Nuria Salazar
Esther Jiménez
Borja Sánchez
María Antonia Villar*

Sesión Usos Clínicos

*Natalia Borrueal
Gemma González
Rocío Martín
Virginia Martín
Germán Soriano
María Velasco
Peter Whorwell*

Sesión Probiótico-hospedador

*David Beltrán
Julio Gálvez
Gianfranco Grompone
Rebeca Martín
Montserrat Nácher
Marta Olivares
Alfonso Ruiz-Bravo*



Sumario

Sesión Microbiología

Identificación y propiedades de lactobacilos aislados del estómago humano.

Susana Delgado

Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias, CSIC

5

Modulación de poblaciones microbianas intestinales por cepas de bifidobacterias productoras de exopolisacáridos. Integración de estudios con modelos *in vitro* e *in vivo*.

Nuria Salazar

Instituto de Productos Lácteos de Asturias, CSIC

6

Secuenciación del genoma completo de *Lactobacillus salivarius* CECT5713, una cepa probiótica aislada de leche materna y heces de lactante.

Esther Jiménez

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid

7

Respuesta de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA4549 a condiciones aeróbicas.

Borja Sánchez

Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, IPLA-CSIC

8

Estudio de la capacidad productora de CLA por bacterias lácticas y bifidobacterias en productos lácteos.

María Antonia Villar

Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL), (CSIC/UAM)

9

Sesión Usos Clínicos

Eficacia del probiótico DN-173 010 para estabilizar la flora intestinal de pacientes con colitis ulcerosa: estudio de intervención nutricional randomizado, doble-ciego y controlado con placebo.

Natalia Borrue

Unitat d'atenció Crohn-colitis. Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona

10

Evaluación del potencial probiótico de *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 y *Enterococcus faecium* CECT4515 en el perro adulto sano.

Gemma González Ortiz

Servei de Nutrició i Benestar Animal (SNiBA). Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona

11

Efecto beneficioso de un nuevo simbiótico (scGOS/lcFOS y *Bifidobacterium breve* M-16V) en la composición de la microbiota intestinal y síntomas de alergia en niños con dermatitis atópica

Rocío Martín

Danone Research, Centre for Specialised Nutrition, Wageningen, Netherlands

12

Transferencia madre-hijo de lactobacilos y bifidobacterias a través de la leche materna.

Virginia Martín

Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid

13

Probióticos y antioxidantes en la prevención de la translocación bacteriana en la cirrosis experimental.

Germán Soriano

Servicio de Patología Digestiva. Servicio de Microbiología. Institut de Recerca. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona. CIBERehd

14

Probiotics in the prophylaxis of antibiotic-associated diarrhea: a randomized double-blinded controlled trial.

María Velasco

Hospital Universitario Fundación Alcorcón, Madrid

15

Probiotics in Functional Bloating.

Peter Whorwell

University Hospital of South Manchester NHS Foundation Trust, United Kingdom

16

Sesión Probiótico-hospedador

Probióticos en ginecología.

David Beltrán Vaquero

Especialista en Ginecología y Obstetricia (Ayuntamiento de Madrid) y coordinador del Grupo de Trabajo de Probióticos de la AEEM (Asociación Española para el Estudio de la Menopausia)

17

Comparative of the *in vitro* immunomodulatory effects of the probiotics *Escherichia coli* nissle 1917, *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium breve*.

Julio Gálvez

CIBER-EHD, Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada

18

Nematodos alimentados con bacterias o estrategias innovadoras y predictivas para el escrutinio funcional de cepas probióticas...

Gianfranco Grompone

Danone Research, Gut Microbiology & Probiotics Platform, Palaiseau, France

19

La interacción *Lactobacillus salivarius* Lv72 - mucosa vaginal: papel de los proteoglicanos de la superficie epitelial.

Rebeca Martín

Área de Microbiología. Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo

20

Producción de exopolisacáridos (EPS) por bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de productos cárnicos: caracterización del EPS y de sus propiedades probióticas.

Montserrat Nácher

Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Burjassot, Valencia

21

Bifidobacterium longum CECT 7347 reduce la toxicidad y el potencial efecto inmunogénico de las gliadinas en los enterocitos.

Marta Olivares

Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), CSIC, Valencia

22

Valor de las pruebas previas de potencial probiótico para lactobacilos.

Alfonso Ruiz-Bravo

Departamento de Microbiología, Universidad de Granada

23



SUSANA DELGADO
Departamento de Microbiología
y Bioquímica de Productos
Lácteos, Instituto de Productos Lácteos
de Asturias, CSIC

La investigadora del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC) Susana Delgado ha presentado la primera de las comunicaciones orales de la Sesión Microbiología. Su charla se ha centrado en la identificación y propiedades de lactobacilos aislados del estómago humano, un trabajo en el que además de Alicia Noriega y Baltasar Mayo, investigadores del IPLA, también ha participado Adolfo Suárez, del Servicio de Digestivo del Hospital de Cabueñes (Gijón).

¿Qué particularidades tiene el estómago humano para centrarse en este medio como fuente de estudio de lactobacilos?

Trabajos recientes han puesto de manifiesto que el estómago humano no es un ambiente estéril, sino que presenta una microbiota compleja y distinta a la de la boca y el intestino. Entre otros microorganismos, se ha detectado la presencia de diversas especies de bacterias del ácido láctico de los géneros *Lactobacillus* y *Streptococcus*.

“Los lactobacilos del estómago humano son candidatos para su empleo futuro como fermentos y/o probióticos”

¿Esto qué supone?

Es razonable pensar que las cepas de este nicho ecológico tengan una excepcional resistencia al ácido, lo que las hace apropiadas para su utilización industrial.

¿Cuál era el objetivo de esta investigación?

Nos proponíamos la búsqueda de cepas de origen estomacal para su estudio y evaluación como cultivos funcionales o probióticos. Para ello llevamos a cabo tres pasos: el aislamiento de lactobacilos del estómago de personas sanas; la identificación a nivel de especie y tipificación genotípica y la evaluación de propiedades tecnológicas y potencial probiótico.

¿Y cuáles han sido los resultados?

En este trabajo se han aislado 19 cepas de lactobacilos procedentes de líquido gástrico y mucosa estomacal de cinco individuos sanos. Los aislados se identificaron mediante ARDRA del ADNr 16S y posterior secuenciación de amplicones representativos.

¿A qué especies pertenecen los lactobacilos aislados?

A cinco especies distintas: *L. gasseri* (9), *L. reuteri* (4), *L. vaginalis* (3), *L. fermentum* (2) y *L. paracasei* (1).

Una vez aislados, ¿qué estudios se llevaron a cabo?

Tras una tipificación genética mediante REP-PCR, las cepas se sometieron a una caracterización exhaustiva, incluyendo el estudio de diversas propiedades probióticas y tecnológicas como resistencia a acidez y bilis, perfiles de fermentación de carbohidratos, actividades glicosidásicas, patrones de resistencia/susceptibilidad a antibióticos, crecimiento en leche, etc.

¿Qué conclusiones destacarías?

Los lactobacilos del estómago presentaron una buena resistencia a la acidez, lo que presupone una buena supervivencia a la barrera gástrica y una buena viabilidad en los productos lácteos fermentados. Además, son capaces de crecer en leche y poseen actividades glicosidásicas deseables, lo que los convierte en candidatos para su empleo futuro como fermentos y/o probióticos⁵



NURIA SALAZAR
Instituto de Productos Lácteos
de Asturias, CSIC

La investigadora del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Nuria Salazar Garzo ha presentado dentro de la sesión de microbiología una comunicación sobre “Modulación de poblaciones microbianas intestinales por cepas de bifidobacterias productoras de exopolisacáridos. Integración de estudios con modelos in vitro e in vivo”.

¿Cómo surge este trabajo?

La microbiota intestinal juega un papel determinante en la salud del hospedador. La administración de probióticos y/o prebióticos representan estrategias para modular la microbiota intestinal a través de la dieta.

¿Y en este medio qué papel tienen los exopolisacáridos?

Algunas bifidobacterias producen carbohidratos exocelulares complejos, los exopolisacáridos (EPS), cuyo papel como substratos prebióticos está siendo investigado actualmente. En este sentido, nosotros evaluamos la capacidad de cepas de *Bifidobacterium* productoras de EPS y de sus polímeros para modular la microbiota intestinal en modelos *in vitro* e *in vivo*.

“Bifidobacterias productoras de EPS pueden modular la microbiota intestinal”

¿Qué resultados han obtenido?

Cultivos fecales utilizando EPS producidos por bifidobacterias de origen intestinal como fuente de carbono, mostraron que éstos fueron fermentados por la microbiota intestinal humana. Produjeron una modulación de las poblaciones microbianas y de sus actividades metabólicas, resultando en un descenso de la relación acético/propiónico, posible indicador del efecto hipolipidemiante de prebióticos¹.

¿Puede explicar cómo se ha llevado a cabo la investigación?

Se seleccionaron dos polímeros sintetizados por la cepa *B. longum* subsp. *longum* IPLA E44 (aislado intestinal humano) y, la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 (aislado lácteo). Los EPS no sufrieron degradación al someterlos a condiciones simuladas de digestión gastrointestinal, indicando que pueden llegar al colon sin degradar. En cultivos de heces humanas a pH controlado, se detectaron por FISH variaciones significativas en los niveles de *Bifidobacterium* y algunos grupos microbianos relevantes².

¿Los ensayos qué revelan?

Los ensayos *in vitro* e *in vivo* sugieren que las cepas R1 y E44 son seguras. Su administración oral a ratas Wistar macho corroboró el efecto bifidogénico y evidenció variaciones significativas en los niveles de AGCC totales en el ciego y heces respecto al grupo placebo al final del estudio de intervención 3. La modulación de la microbiota intestinal por bifidobacterias productoras de EPS y sus polímeros se corroboró en los modelos de estudio empleados.

De esa modulación, y como conclusión, ¿qué efectos destaca?

Un efecto bifidogénico, variaciones en los niveles de algunas poblaciones microbianas intestinales y variaciones en los perfiles de producción de AGCC.

NOTAS

1. Salazar et al. 2008. Appl. Environ. Microbiol. 74 : 4737-4745.
 2. Salazar et al. 2009. Int. J. Food. Microbiol. 135 : 260-267.
 3. Salazar et al. 2011. Int. J. Food. Microbiol. 144: 342-351.
- Agradecimientos: El equipo da las gracias a los Dres. B. Mayo y S. Delgado (IPLA-CSIC) por la cesión de algunas cepas objeto de estudio y a ambos así como al Dr. JA Moreno (Ordesa S.L.) por su participación en etapas iniciales de este trabajo.



ESTHER JIMÉNEZ
Departamento de Nutrición,
Bromatología y Tecnología de los Alimentos,
Universidad Complutense de Madrid

*Otro de los trabajos de investigación básica presentados en el II Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica lleva por título "Secuenciación del genoma completo de *Lactobacillus salivarius* CECT5713, una cepa probiótica aislada de leche materna y heces de lactante". Esther Jiménez, del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Complutense de Madrid ha sido la encargada de exponer las conclusiones de un estudio que ha contado con la colaboración de Rocío Martín, de la Immunity & Allergy-Baby Division de Danone Research (Netherlands)*

¿Cómo surge este trabajo?

Las bacterias lácticas son componentes importantes para una microbiota intestinal sana y se utilizan normalmente como probióticos. En un trabajo anterior aislamos la cepa *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 simultáneamente de leche materna y de heces de lactante de una pareja madre-hijo. Decidimos secuenciar el genoma completo para corroborar las propiedades probióticas mostradas en ensayos anteriores, que es lo que aquí presentamos.

"El genoma completo de *L. salivarius* CECT 5713 explica su fuerte potencial como probiótico en humanos"

¿Los estudios con esta cepa qué propiedades han revelado?

Ensayos *in vitro* e *in vivo* han demostrado sus propiedades inmunomoduladoras, antiinflamatorias y antiinfecciosas, por lo que esta cepa podría ser de interés para el consumo humano.

¿La secuenciación del genoma ha confirmado esas propiedades?

Sí. Este tipo de estudios permite descubrir aspectos funcionales desconocidos. En este trabajo mostramos la secuenciación y la anotación del genoma completo, llevada a cabo con la tecnología 454 de secuenciación.

De los resultados de esa secuenciación, ¿qué destacarías?

El genoma de *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 contiene un cromosoma circular de 1.828.169 pb, dos plásmidos (44.581 y 20.426) y un megaplásmido (242.962 pb). El genoma completo contiene 1.558 genes codificantes de proteínas, 87 genes codificantes de tRNA y 51 de rRNA.

¿Se han comparado estos datos con algún otro probiótico?

Se comparó el genoma completo de *Lactobacillus salivarius* CECT 5713 con el de la cepa probiótica *L. salivarius* UCC118 que ha sido bien caracterizada en diversos estudios.

¿Y qué resultados revela la comparación?

La cepa CECT 5713 presenta 52 genes codificantes de proteínas que no se encuentran en la cepa UCC118, entre los que se incluyen los genes que explicarían el alto potencial de exclusión competitiva mostrado por esta cepa frente a patógenos en ensayos anteriores. Los genes responsables de la producción de bacteriocina se encuentran localizados en el megaplásmido, que contiene 6 marcos abiertos de lectura bastante relacionados, aunque no idénticos, con los genes responsables de la síntesis de la salivaricina ABP-118 de *L. salivarius* UCC118.

¿Qué conclusiones sobre posibles aplicaciones extraen de estos datos?

En general diversos aspectos del genoma completo de *L. salivarius* CECT 5713 explican su fuerte potencial como probiótico en humanos.

¿Está disponible para la comunidad científica esta información?

Los datos de la secuenciación genómica completa se han depositado en GenBank/EMBL.



BORJA SÁNCHEZ
Departamento de Microbiología y Bioquímica
de Productos Lácteos, IPLA-CSIC

*La “Respuesta de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA4549 a condiciones aeróbicas” ha sido el trabajo presentado por el investigador Borja Sánchez, del Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos del IPLA-CSIC. Este estudio ha contado con la participación de investigadores del Departamento de Genética, Antropología y Evolución de la Universidad de Parma (Italia).*

¿Dónde radica la importancia del oxígeno en relación a las bifidobacterias?

El oxígeno es uno de los factores abióticos que afectan negativamente a la supervivencia de las cepas de bifidobacterias usadas como probióticos, principalmente debido a la inducción de daños oxidativos, letales para estos microorganismos.

“Hemos identificado la estrategia molecular de *B. animalis* subsp. *lactis* IPLA 4549 en respuesta a la presencia de oxígeno”

¿Esto se produce en algún momento concreto?

La aerobiosis está presente durante el periodo de elaboración y almacenamiento de los alimentos funcionales, siendo la aerotolerancia una de las características cuya presencia es deseable en cepas de bifidobacterias utilizadas en la industria.

¿*Bifidobacterium* cumple esta característica?

El género *Bifidobacterium* incluye especies con una tolerancia intrínseca al oxígeno variable, siendo la especie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* una de las más aerotolerantes. Este hecho, unido a su buena resistencia a los factores de estrés propios del tracto gastrointestinal humano, hace de ella la especie de *Bifidobacterium* más usada en la industria alimentaria.

En ese sentido, ¿cuál era el objetivo de esta investigación?

En este trabajo, se ha estudiado la aerotolerancia de la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* IPLA 4549 desde un punto de vista genómico, proteómico y fisiológico.

¿Cómo lo han hecho?

Para ello se utilizaron técnicas de electroforesis bidimensional de proteínas y PCR cuantitativa, identificándose cambios en la expresión de genes y en la producción de proteínas afectadas por la presencia de oxígeno durante el crecimiento. Además, se calcularon parámetros fisiológicos como la ratio redox, el contenido de ATP intracelular, la concentración de productos finales de la glucólisis o la actividad ATPasa de membrana en condiciones de anaerobiosis y aerobiosis.

¿Qué conclusiones han obtenido??

En resumen, todos esos datos nos han permitido esclarecer la estrategia molecular seguida por la cepa *B. animalis* subsp. *lactis* IPLA 4549 en respuesta a la presencia de oxígeno.



MARÍA ANTONIA VILLAR TAJADURA
Grupo Lípidos, Departamento de Bioactividad
y Análisis de Alimentos, Instituto de Investigación
en Ciencias de la Alimentación
(CIAL), (CSIC/UAM)

María Antonia Villar Tajadura, del Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos del Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL) (CSIC/UAM) ha presentado durante la sesión de microbiología del Workshop un estudio de la capacidad productora de CLA por bacterias lácticas y bifidobacterias en productos lácteos. En este estudio también han participado investigadores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

¿Por qué se han centrado en Bifidobacterias y la producción de CLA??

Las bifidobacterias son microorganismos probióticos habitualmente utilizados por sus propiedades saludables, como aumento de la biodisponibilidad de minerales, mejora de las perturbaciones intestinales, aumento de la función inmune, etc. Algunos de estos microorganismos han demostrado tener la capacidad de producir ácido linoleico conjugado (principalmente el isómero CLA cis9, trans11) a partir de ácido linoleico. El hecho de que estos microorganismos produzcan CLA es de gran importancia y puede considerarse una nueva característica probiótica para estos habitantes naturales del intestino.

“Bifidobacterium breve 26M2 ha resultado ser un destacado productor de ácido linoleico conjugado (CLA)”

¿Qué propiedades hacen atractivo el CLA?

La importancia biológica de este ácido graso radica en su actividad como anticancerígeno. Estas actividades han sido comprobadas en estudios *in vitro* (inhibe el crecimiento de células cancerígenas de colon, mama, próstata, etc) e *in vivo* (en modelos animales inhibe la carcinogénesis de cáncer de piel, mama y colon). Su contenido en alimentos está por debajo de los niveles necesarios para ejercer su efecto anti-tumoral en el consumidor, por lo que en nuestras investigaciones evaluamos la manera de enriquecer los alimentos de mayor consumo, especialmente lácteos fermentados, para incrementar considerablemente y de manera natural los niveles de ingesta de este ácido graso.

¿Qué se proponían con este estudio?

La utilización de probióticos productores de CLA en productos lácteos es una estrategia natural para incrementar el contenido de este ácido graso. El objetivo de este estudio es por tanto analizar la capacidad productora de CLA de un conjunto de bacterias lácticas y bifidobacterias y su posible aplicación en productos lácteos fermentados.

¿Cómo lo han llevado a cabo?

El análisis de la producción de CLA se efectuó con cultivos de cepas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. Se usaron como medios de cultivo MRS y leche desnatada incorporando ácido linoleico como sustrato. Las incubaciones se realizaron en anaerobiosis y a 37°C. La detección y cuantificación de CLA se analizó mediante técnicas espectrofotométricas y cromatográficas.

¿Qué ponen de manifiesto los resultados obtenidos?

Los resultados obtenidos indican que la incorporación de linoleico como sustrato al medio de cultivo provoca una inhibición variable del crecimiento de estos microorganismos. De las bacterias estudiadas, *B. breve* 26M2 resultó ser un destacado productor de CLA, con un 60% de conversión de LA. Además, un 72 % del CLA generado correspondió al isómero cis9 trans11. La producción de CLA por *B. breve* 26M2 fue de 148 µg/ml en medio MRS y de 46,2 µg/ml en leche. Este nivel de producción en un producto lácteo fermentado supondría incrementar un 60% la concentración de CLA en leche fermentada.

¿Con qué aplicaciones futuras van a continuar esta línea de trabajo?

Con la optimización de la producción de CLA de *B. breve* 26M2. Para ello se llevará a cabo el análisis de su capacidad productora en medios con base láctea como leches fermentadas y fórmulas lácteas. Con todo ello, se pretende desarrollar un alimento probiótico funcional rico en CLA con excelentes beneficios para la salud humana.



NATALIA BORRUEAL
Unitat d'atenció Crohn-colitis. Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona

La mesa sobre usos clínicos comenzó con la intervención de Natalia Borrueal, en representación de uno de los grupos españoles más activos en investigación clínica sobre colitis ulcerosa y probióticos. Este trabajo de la Unitat d'atenció Crohn-colitis del Servicio de Aparato Digestivo del Hospital Vall d'Hebron de Barcelona llevaba por título "Eficacia del probiótico DN-173 010 para estabilizar la flora intestinal de pacientes con colitis ulcerosa: estudio de intervención nutricional randomizado, doble-ciego y controlado con placebo"

¿Por qué surge este trabajo?

En la colitis ulcerosa (CU) existe una respuesta inmuno-inflamatoria inapropiada frente a antígenos de la microbiota intestinal. Pensamos que la inestabilidad en la composición de la microbiota podría influir en la pérdida de inmunotolerancia, de ahí nuestra hipótesis basada en el uso de probióticos.

"El probiótico DN-173 010 estabiliza la flora intestinal de los pacientes con colitis ulcerosa a niveles similares a los de la población sana"

En este sentido, ¿qué se proponían?

Evaluar el efecto de la intervención nutricional con probióticos en la estabilidad del ecosistema intestinal de pacientes con CU en remisión clínica.

¿Cómo lo llevaron a cabo?

El método utilizado fue un estudio prospectivo, randomizado, doble ciego, controlado con placebo, de intervención nutricional en pacientes con CU en remisión clínica. Los pacientes recibieron además de su medicación habitual, bien un yogur fermentado con *Bifidobacteria animalis* DN-173 010 (grupo test) o leche acidificada (grupo placebo) durante 3 meses. Un grupo de voluntarios sanos sin ninguna intervención nutricional sirvió como control. Se obtuvieron muestras fecales al inicio y a los 3 meses, para estudiar los genes bacterianos más frecuentes y comunes mediante secuenciación y bio-informática.

¿Qué variables se midieron?

La estabilidad microbiana se evaluó mediante el coeficiente de correlación (Spearman) intra-individual antes y después de la intervención. Secundariamente, se analizaron cambios en actividad clínica, calidad de vida y concentración fecal de calprotectina.

¿Cuántos pacientes participaron en el estudio?

Se incluyeron 48 pacientes (29M/19H; edad media 41 años, 25-68) con CU en remisión (24 placebo y 24 test) y 12 controles sanos (5M/7H; 30 años, 22 a 44).

¿Qué resultados obtuvieron?

Los pacientes con CU del grupo placebo mostraron un coeficiente de correlación entre la primera y la segunda muestra más bajo ($R=0,59$) que los controles sanos ($R=0,72$; $p 0,04$) indicando inestabilidad de la microbiota. En los pacientes con CU que recibieron probiótico el índice de correlación fue más alto ($R=0,69$) y sin diferencia estadística respecto a controles sanos ($R=0,72$, $p 0,30$).

¿Qué conclusión se puede extraer de estos datos?

Que la flora fecal de los pacientes con CU es inestable a lo largo del tiempo. La ingesta de un yogur con *Bifidobacterium animalis* DN-173 010 estabiliza a niveles similares a los de la población sana.



GEMMA GONZÁLEZ ORTIZ
Servei de Nutrició i Benestar Animal (SNiBA).
Departament de Ciència Animal i dels Aliments,
Universitat Autònoma de Barcelona

Gemma González, del Servei de Nutrició i Benestar Animal (SNiBA) de la Universitat Autònoma de Barcelona, ha presentado el trabajo "Evaluación del potencial probiótico de Bacillus amyloliquefaciens CECT 5940 y Enterococcus faecium CECT4515 en el perro adulto sano".

¿Cuál era el objetivo de este trabajo?

Evaluar el potencial probiótico formado por 5×10^8 UFC/g de *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 y 5×10^8 UFC/g de *Enterococcus faecium* CECT 4515 en el perro adulto sano.

"El uso de probióticos puede estabilizar la microbiota intestinal canina"

¿Cuántos animales se incluyeron en el estudio?

16 Beagles, machos y hembras de 2 a 7 años, se distribuyeron al azar en dos grupos: control (T1) y tratamiento (T2) (1 g del probiótico/kg de pienso consumido durante 39 días).

¿Qué parámetros se tuvieron en cuenta?

Se valoraron parámetros generales de salud de los animales (peso, consumo, condición corporal, consistencia fecal y digestibilidad) y la calidad del pelo. Se recogieron muestras de heces antes, al final del período de suplementación y tras un período de retirada de 6 días. Se valoraron los recuentos de bacterias aeróbicas mesófilas totales, *Enterobacteriaceae* totales, *Escherichia coli*, *Bifidobacterium spp*, *Lactobacillus spp*, sulfitos reductores, *Clostridium perfringens*, y de las cepas probióticas, mediante cultivo tradicional. El probiótico se recuperó en heces tras la suplementación. Ni la salud de los animales ni su digestibilidad se modificaron.

¿Qué destaca de los resultados obtenidos?

No hubo diferencias significativas en los recuentos bacterianos, excepto en *C. perfringens* el cual mostró una reducción estadísticamente significativa en T2 tras la suplementación ($5,64$ vs. $2,94 \pm 0,533$ log UFC/g heces; $p < 0,0001$). Tras el período de retirada, los recuentos recuperaron los valores iniciales. El pelo de T2 fue resistente a los órganos de perforación de *Microsporium canis*, sin embargo en el pelo de T1 se observó una susceptibilidad del 100%.

¿A qué conclusiones lleva el trabajo?

La combinación de las dos cepas, *Bacillus amyloliquefaciens* CECT 5940 y *Enterococcus faecium* CECT 4515, en el perro adulto sano reduce los recuentos de *Clostridium perfringens* y sugiere una mayor resistencia de la estructura del pelo frente a infecciones por *Microsporium canis*. Por tanto, creemos que el uso de probióticos podría estabilizar la microbiota intestinal canina, reduciendo las poblaciones patógenas y mejorando la estructura del pelo frente a infecciones.



ROCÍO MARTÍN

Danone Research, Centre for Specialised Nutrition,
Wageningen, Netherlands

Almirón (del Grupo Danone) es una de las marcas que más esfuerzos está realizando para el estudio de los pro- y prebióticos. En esta línea, durante el Workshop, Rocío Martín, del Danone Research Centre for Infant Nutrition de Wageningen (Netherlands), ha presentado el trabajo “Efecto beneficioso de un nuevo simbiótico (mezcla patentada de Prebiótico- scGOS/lcFOS y Bifidobacterium breve M-16V) en la composición de la microbiota intestinal y síntomas de alergia en niños con dermatitis atópica.

“El simbiótico *B. breve* M-16V y scGOS/lcFOS ha demostrado mejoras en dermatitis y un posible efecto preventivo en asma”

La relación alergias-pro/prebiótico está adquiriendo cada vez más importancia, ¿por qué?

En los últimos años, el escaso contacto con microorganismos durante los primeros meses de vida se señala como una de las causas detonantes del aumento de enfermedades atópicas.

En ese sentido, ¿cuál era el objetivo de este trabajo y en qué ha consistido?

En este estudio se examinó el efecto de un simbiótico en el tratamiento de la dermatitis atópica. En el estudio doble-ciego, aleatorizado, placebo-controlado se reclutaron 90 niños menores de 7 meses de edad con dermatitis atópica, que recibieron una fórmula exhaustivamente hidrolizada suplementada o no con *Bifidobacterium breve* M-16V/scGOS/lcFOS durante 12 meses. Se determinó la composición de la microbiota intestinal y se evaluó la severidad de la enfermedad mediante el índice SCORAD cada 4 semanas.

¿Y qué resultados se han observado?

Se observó una mejora significativa en el subgrupo de niños con elevados niveles de IgE tras 12 semanas de tratamiento con el simbiótico. El porcentaje de bifidobacteria en heces aumentó significativamente en el grupo que recibió la fórmula suplementada, mientras que la proporción de *Clostridium lituseburense/Clostridium histolyticum* fue significativamente más baja. Se observó una mayor proporción de ácido acético y una menor proporción de ácido butírico, iso-butírico e iso-valérico en las heces de los niños que recibieron el simbiótico. Además, disminuyeron los episodios de estreñimiento y de dermatitis del pañal en el grupo que recibió la fórmula suplementada. El seguimiento clínico realizado un año después mostró una menor frecuencia de síntomas o de medicación relacionados con asma en el grupo que recibió el simbiótico.

¿Qué conclusiones destaca por tanto?

Tras 12 semanas de tratamiento con *B. breve* M-16V y scGOS/lcFOS se observó una mejora significativa en niños con dermatitis atópica asociada a IgE, un posible efecto preventivo en síntomas relacionados con asma y posiblemente en el subsecuente desarrollo de asma.



VIRGINIA MARTÍN
Departamento de Nutrición, Bromatología
y Tecnología de los Alimentos.
Universidad Complutense de Madrid

La transferencia madre-hijo de lactobacilos y bifidobacterias a través de la leche materna ha sido el tema presentado durante la reunión por Virginia Martín, del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad Complutense de Madrid.

“La leche materna es una fuente de bacterias viables para el intestino del lactante”

¿Cuál era el objeto del estudio?

Se investigó la posible transferencia madre-hijo de cepas bacterianas a través de la leche materna

¿Cómo se llevó a cabo?

Para ello, se tomaron muestras de leche de 20 mujeres sanas y de heces de sus respectivos hijos. Las muestras se cultivaron en diversos medios de cultivo y, tras su incubación, se seleccionaron diversas colonias de aquellas placas en las que se observó crecimiento, incluyendo al menos un representante de cada morfología.

¿Qué tipo de pruebas utilizaron?

Los aislados se identificaron al nivel de especie mediante pruebas clásicas y moleculares. Paralelamente, se extrajo el DNA de las muestras biológicas y se realizó PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) para una estimación de diversos grupos bacterianos. Los aislados pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* se sometieron a un genotipado mediante las técnicas de RAPD y PFGE.

¿Qué resultados se obtuvieron?

El estudio reveló que 10 parejas madre (leche)-hijo (heces) compartían al menos una cepa de una especie perteneciente a los géneros citados anteriormente. Más concretamente, las cepas compartidas pertenecían a las especies *Lactobacillus gasseri*, *L. fermentum*, *L. salivarius*, *L. vaginalis*, *L. plantarum*, *Bifidobacterium breve* o *B. longum*. La qRT-PCR reveló la presencia de DNA de estos géneros bacterianos en las muestras analizadas.

¿Estos datos qué confirman?

Los resultados de este trabajo confirman que la leche materna es una fuente de bacterias viables para el intestino del lactante.



GERMÁN SORIANO

Servicio de Patología Digestiva. Servicio de Microbiología.
Institut de Recerca. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
Barcelona. CIBERehd

Probióticos y antioxidantes en la prevención de la translocación bacteriana en la cirrosis experimental fue el tema presentado por el grupo de investigación representado por Germán Soriano, del Servicio de Patología Digestiva y Servicio de Microbiología del Institut de Recerca del Hospital de la Santa Creu i Sant Pau de Barcelona (CIBERehd).

“Los datos con VSL#3 sugieren un posible efecto beneficioso sobre la TB en cirrosis experimental”

¿Por qué un estudio centrado en la cirrosis?

Los probióticos, a través de la modulación de la flora intestinal y de la respuesta inflamatoria, y los antioxidantes (AO), mediante la estabilización de la barrera intestinal, pueden ser útiles para prevenir la translocación bacteriana (TB) en la cirrosis.

¿Qué se proponían con este trabajo?

Evaluar el efecto de dos probióticos, *Lactobacillus johnsonii* La1 (La1) y VSL#3, y dos preparados antioxidantes, AO1 (vitamina C+glutamato) y AO2 (vitamina C+E+Se+Zn), en la prevención de la TB en la cirrosis experimental.

¿Cómo lo hicieron?

Con un modelo de cirrosis en ratas Sprague-Dawley mediante la administración de fenobarbital y C14C por sondaje gástrico. Se definió TB como cultivo microbiológico positivo en localizaciones extraintestinales. Se evaluó el efecto sobre la TB de 5 tratamientos durante 10 días por sondaje gástrico: La 1, AO1, La1+AO1, AO2 y VSL#3.

¿Qué resultados obtuvieron?

La incidencia de TB no disminuyó en los grupos La1 y AO2 respecto a sus grupos control, pero sí disminuyó en los grupos La1+AO1 (0/10 vs 5/8, $p < 0.01$), AO1 (0/10 vs 5/8, $p < 0.01$) y VSL#3 (1/4 vs 4/5, pNS). La endotoxemia disminuyó en el grupo La1+AO1 con respecto a su grupo control, pero no en el grupo AO1. El daño oxidativo intestinal disminuyó en los grupos La1+AO1 y AO1, pero no en los grupos La1 y AO2.

¿Qué conclusiones destaca?

La1 no previene la TB, pero podría contribuir a la disminución de la endotoxemia. La administración de glutamato disminuye la TB, probablemente estabilizando la barrera intestinal al reducir el daño oxidativo. Los datos preliminares sobre VSL#3 sugieren un posible efecto beneficioso de este preparado sobre la TB en la cirrosis experimental.



MARÍA VELASCO
Hospital Universitario Fundación Alcorcón,
Madrid

El efecto de los probióticos en la diarrea asociada a antibióticos (DAA) ha sido el tema expuesto por María Velasco, del Hospital Universitario Fundación Alcorcón de Madrid. La especialista ha presentado un estudio controlado, aleatorio y doble ciego, que ha contado con la colaboración de miembros del Instituto del Frio del CSIC (Madrid).

“Los probióticos en yogur no tienen efecto en la prevención de DAA en adultos ancianos”

¿Por qué surge el estudio sobre este aspecto?

Lo cierto es que se habían llevado a cabo pocos estudios aleatorios controlados a gran escala para evaluar el efecto de los probióticos en la diarrea asociada a antibióticos (DAA). Además esos estudios eran heterogéneos, sobre diferentes poblaciones y su tamaño muestral pequeño.

¿Qué método utilizaron?

Llevamos a cabo un ensayo clínico aleatorio y doble ciego en pacientes ingresados en el Servicio de Medicina Interna entre junio de 2005 y enero de 2008. Los pacientes que comenzaron un tratamiento con amoxicilina-clavulanato o levofloxacino fueron divididos de forma aleatoria (2:2:1) para recibir una dosis diaria de 200 ml de yogur placebo (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus*), o yogur probiótico (el anterior más *L. acidophilus*, *B. lactis*, *L. casei*) o bien no recibir yogur (grupo control no ciego) desde 48 horas después del comienzo del tratamiento antibiótico hasta 5 días después de la interrupción de los antibióticos, y se monitorizó durante un mes. Ambos yogures tenían un sabor y un aspecto externo similares. Ni los pacientes ni el personal que los atendía sabían cuál era el tipo de yogur suministrado. Se definió diarrea como más de dos deposiciones blandas al día. El análisis estadístico también fue ciego.

¿Qué resultados obtuvieron?

En total se distribuyeron aleatoriamente 314 pacientes (122 yogur A; 125 yogur B y 65 sin yogur). Se completó la monitorización en 307 pacientes (97.8%). La media de edad fue de 75 años, el 46% de los pacientes eran mujeres y las comorbilidades fueron frecuentes (40%) sin diferencias entre los grupos. Se registró diarrea en el 23, 18 y 21% de los casos, respectivamente, $p > 1$. No se apreciaron diferencias en la duración de la diarrea, en el número máximo de deposiciones o en los ingresos prolongados a causa de la diarrea entre los tres grupos. La tasa de mortalidad fue del 3, 4 y 7% respectivamente, $p > 0.1$.

¿Qué conclusiones destacan a raíz de estos datos?

Los probióticos vehiculizados en yogur no tienen efecto en la prevención de la DAA en adultos ancianos. En estos pacientes hospitalizados, el tratamiento probiótico fue seguro y no tuvo efecto alguno sobre la mortalidad.



PETER WHORWELL
University Hospital of South Manchester NHS
Foundation Trust, United Kingdom

El workshop ha contado con la intervención como conferenciantes invitados de dos prestigiosos investigadores internacionales especializados en este ámbito. Uno de ellos ha sido el Dr. Peter Whorwell, director del South Manchester Functional Bowel Service de UK, clínica de referencia especializada en el tratamiento de los desórdenes gastrointestinales. Whorwell ha hablado del uso de probióticos en casos de hinchazón abdominal.

¿Qué importancia tiene el cuadro de hinchazón abdominal y cómo se diferencia de la distensión?

Muchos pacientes con síndrome de intestino irritable (SII) se quejan de hinchazón abdominal. Para el especialista gastroenterólogo esto puede significar dos cosas. En primer lugar, puede indicar una sensación de presión abdominal incrementada o, por otra parte, esta sensación puede ir acompañada por un aumento real del contorno, que debe denominarse con mayor propiedad "distensión". Sin embargo, hay que señalar que la mayoría de los pacientes se refieren a ambos síntomas como "hinchazón", mientras que para el médico resulta más interesante saber si sólo existe hinchazón como tal o si va acompañada de una distensión. La investigación en nuestro laboratorio ha sugerido que en aproximadamente el 50% de los pacientes que referían hinchazón, el síntoma aparecía unido a una distensión.

¿Se conocen bien las causas de ambos procesos?

Se ha llevado a cabo bastante investigación acerca de la fisiopatología de la hinchazón y la distensión, y los estudios sugieren que la causa son dos mecanismos diferentes pero coincidentes en ciertos aspectos.

"*Bifidobacterium infantis* 35624 y *bifidobacterium lactis* DN173010 reducen significativamente el síntoma de hinchazón"

Parece ser que la hinchazón se encuentra más asociada a un recorrido anormal del gas, a una hipersensibilidad del tracto gastrointestinal, a cambios en los hábitos intestinales y a la fermentación y posibles alteraciones de la flora intestinal. Por su parte, la distensión parece estar relacionada con una débil musculatura abdominal, a un reflejo de acomodación gástrica anormal, a un tránsito gastrointestinal lento, al estreñimiento o a fermentación y alteraciones en la flora bacteriana.

¿Cómo afecta esta variabilidad al tratamiento?

En consecuencia, el tratamiento debe tener en cuenta estos mecanismos variados y diferenciados. Así, por ejemplo, la aceleración del tránsito o el alivio del estreñimiento deberían ayudar en teoría a mejorar la distensión. Sin embargo, una gestión eficaz de estos problemas implica con cierta frecuencia un proceso de prueba y error.

¿Y el estilo de vida de los pacientes cómo debe ser?

En cuanto al estilo de vida de los pacientes, debería aconsejarse que evitaren los alimentos que forman gases y que tuvieran especial cuidado con las bebidas carbonatadas. Además, existen pruebas cada vez más numerosas de que los carbohidratos de cadena corta, como la fructosa, pueden causar problemas. Los lípidos también cuentan con la capacidad de incrementar la sensibilidad gastrointestinal y, por lo tanto, pueden agudizar la sensación de hinchazón.

¿Cómo es el abordaje farmacológico?

El tratamiento farmacológico de la hinchazón y la distensión no resulta especialmente eficaz, aunque en caso de estreñimiento o tránsito lento, merece la pena probar medicamentos procinéticos. Si se sospecha que la sensibilidad gastrointestinal contribuye al malestar, entonces cabe la posibilidad de incluir un agente que reduzca dicha sensibilidad, como un antidepresivo tricíclico.

¿Y cuál es el papel de los probióticos en esta patología?

Puesto que tanto la hinchazón como la distensión pueden estar asociadas a un desequilibrio de la flora bacteriana gastrointestinal, las pruebas con probióticos pueden ofrecer también una solución. De los 25 ensayos controlados con probióticos en casos de síndrome del intestino irritable que se han publicado hasta la fecha, 20 han dado resultados positivos, aunque no todos ellos han mostrado necesariamente un efecto apreciable sobre la hinchazón.

¿Qué bifidobacterias se han demostrado más efectivas?

Tanto la *Bifidobacterium infantis* 35624 como la *Bifidobacterium lactis* DN173010 han demostrado que reducen significativamente el síntoma de la hinchazón. Por su parte, la *Bifidobacterium lactis* DN173010 también ha mostrado que reduce la distensión con mediciones objetivas, probablemente como resultado de su capacidad para acelerar el tránsito gastrointestinal.

¿El futuro tratamiento de esta patología?

Cabe señalar que la hinchazón y la distensión abdominal no son problemas de fácil solución, pero un tratamiento que tenga en cuenta los posibles mecanismos fisiopatológicos que los desencadenan, a menudo puede dar como resultado un cierto grado de mejoría.



DAVID BELTRÁN VAQUERO
Especialista en Ginecología y Obstetricia
Ayuntamiento de Madrid
y coordinador del Grupo de Trabajo
de Probióticos de la AEEM
(Asociación Española para el Estudio de la Menopausia)

El uso probióticos en ginecología ha centrado uno de los temas de mayor interés presentados en el Workshop. El ginecólogo David Beltrán, coordinador del Grupo de Trabajo de Probióticos de la AEEM (Asociación Española para el Estudio de la Menopausia), ha sido el encargado de presentar este trabajo en el que también ha participado Ana Crespo Garzón, médico de familia del Centro de Salud Embajadores de Madrid.

¿Qué aspecto explica la relación ginecología-probiótico?

Tiene que ver con la alteración de la microbiota vaginal como consecuencia de la atrofia genital que se produce durante la menopausia. La vagina en su parte interna está recubierta de un epitelio poliestratificado, el cual por la acción estrogénica está sometido a un continuo recambio cada tres días. La mucosa vaginal produce proteínas con acción antimicrobiana, incluida la Ig A. Por otro lado, en este entorno conviven múltiples microorganismos, los cuales constituyen un auténtico ecosistema vaginal. Merecen especial atención los bacilos de Döderlein, los cuales transforman el glucógeno secretado por el epitelio vaginal en ácido láctico, dando lugar a un pH ácido intravaginal, constituyendo un medio hostil para el crecimiento de gérmenes patógenos.

¿Qué ocurre con este medio vaginal en la menopausia?

Con la llegada de la menopausia y la subsiguiente atrofia del epitelio vaginal, se produce una alteración de la microbiota a dicho nivel, hasta el punto de que no es infrecuente el hecho de encontrar como hallazgo en mujeres con menopausia avanzada, un informe citológico cervicovaginal, en el cual el resultado microbiológico indica ausencia de flora

“Múltiples estudios demuestran la eficacia de los probióticos a nivel vaginal como coadyuvantes”

¿Son muy frecuentes las infecciones vulvovaginales?

Las infecciones vulvovaginales representan un motivo muy frecuente de consulta en atención primaria, especializada y urgencias hospitalarias. Representan el 15-20 % de la totalidad de las consultas ginecológicas. El 75 % de las mujeres mayores de 45 años han sufrido un episodio de vulvovaginitis y el 40-50 % tendrán un segundo episodio. Se estima que del 5 al 15 % de vulvovaginitis se convierten en recurrentes (4 o más episodios al año).

¿Cómo es su diagnóstico y tratamiento habitual?

El diagnóstico clínico (anamnesis/exploración) y el tratamiento empírico no siempre son los adecuados. La etiología más frecuente son los hongos y bacterias. Generalmente se trata de cuadros infecciosos banales, que ocasionalmente pueden ser potencialmente graves.

¿Hay factores que predisponen?

Sí, los hay de tipo endógeno (edad, diabetes, inmunodeficiencia, fase del ciclo menstrual, cambios hormonales: embarazo, menstruación, menopausia) y de tipo exógeno (fármacos (AB, corticoides), toma de anticonceptivos, DIU (Actinomyces), actividad sexual, alergias y hábitos higiénicos inadecuados).

En casos de vaginitis, síndrome consecuencia de la sustitución de la flora vaginal normal por altas concentraciones de bacterias anaeróbicas y/u hongos que producen una alteración del ecosistema vaginal, ¿cuál puede ser el papel de los probióticos?

La administración vaginal de lactobacilos ayuda a recuperar el ecosistema a través de las propiedades benéficas de estos microorganismos. Está demostrada la efectividad de los lactobacilos al reducir el riesgo de infección del tracto urinario, de vaginosis bacteriana (*Gardnerella Vaginalis*) y de candidiasis vaginal. Existen múltiples estudios tanto *in vitro* como *in vivo* que demuestran de forma estadísticamente significativa, la eficacia de los probióticos a nivel vaginal

¿Qué indicaciones tienen los probióticos en las vaginitis?

Por un lado, son coadyuvantes al tratamiento de elección en las vaginitis más frecuentes. Asimismo, están especialmente indicados en vaginitis de repetición. En este sentido, en las recaídas se ha observado un mayor efecto si se alarga el tratamiento en dos ciclos, después de cada período menstrual. En tercer lugar, la ingesta de yogur también ha mostrado ser beneficiosa para incrementar las tasas de curación de las pacientes con vaginitis. Por último, hay que destacar que algunas guías de práctica clínica recomiendan su uso como tratamiento coadyuvante.

En esta amplia área de estudio, ¿qué conclusiones destaca?

1. Considerando la mujer en sentido holístico, la menopausia y patologías prevalentes de esta etapa son cruciales en la atención integral de su salud.
2. La atrofia genital lleva implícita una alteración en la microbiota vaginal.
3. Los probióticos representan una alternativa eficaz, como coadyuvantes en el tratamiento de las más frecuentes infecciones vaginales.
4. Sería de gran interés el diseño y desarrollo de un producto que aporte conjuntamente probiótico y prebiótico para su aplicación en Ginecología.



JULIO GÁLVEZ
CIBER-EHD, Departamento de Farmacología,
Centro de Investigación Biomédica,
Universidad de Granada

*Julio Gálvez, miembro del CIBER-EHD y del Departamento de Farmacología del Centro de Investigación Biomédica de la Universidad de Granada, ha presentado un estudio comparativo de los efectos inmunomoduladores in vitro de los probióticos *Escherichia coli* Nissle 1917, *Lactobacillus fermentum* y *Bifidobacterium breve*.*

¿Por qué surge este estudio?

Los probióticos han demostrado ser beneficiosos ante diferentes desórdenes. Sin embargo, no todos ellos presentan los mismos efectos biológicos. Las propiedades inmunomoduladoras que se les suponen pueden contribuir a la diversidad de sus efectos.

El objetivo del estudio era comparar los efectos *in vitro* de tres probióticos, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Lactobacillus fermentum* y *Bifidobacterium breve*, con dos tipos diferentes de células involucradas en la respuesta inmune: células HT-29 (como modelo de células epiteliales) y células RAW 264.7 (como modelo de macrófagos).

“Comparación de los efectos inmunomoduladores de tres probióticos con dos tipos de células”

¿Cómo lo llevaron a cabo?

Cada línea celular se incubó durante 3 horas con cada probiótico. A continuación se estimularon algunas de las células de cada línea con LPS durante 24 horas. Después, se recogieron muestras del sobrenadante y se determinó la producción de citoquinas (IL-8 en las células HT-29 y IL-1 β o TNF α en las RAW 264.7) mediante ELISA y los niveles de nitritos mediante la prueba de Griess.

¿Qué resultados obtuvieron?

Los resultados demostraron que la incubación probiótica (*E. coli* Nissle 1917 a 10⁸ CFU/ml, *L. fermentum* a 4x10⁶ CFU/ml y *B. breve* a 4x10⁶ CFU/ml) contribuía a un aumento de la producción de todos los mediadores inflamatorios estudiados en comparación con las células que no habían pasado por la incubación probiótica. Sin embargo, esta producción fue significativamente más baja que la que se obtuvo para el grupo control con LPS. Cuando se incubaban células con cada probiótico antes de la estimulación con LPS, la producción de estos marcadores se veía significativamente reducida. Sin embargo, los tres probióticos no mostraron la misma eficacia en la inhibición de los distintos parámetros estudiados.

¿Las principales conclusiones del trabajo son por tanto?

Por una parte, que los tres probióticos promueven un incremento en la producción de citoquinas (IL-8, IL-1 β y TNF α) y de NO en células epiteliales y en macrófagos (acción inmunoestimulante), aunque en menor medida que el LPS.

Por otra parte, que cuando las células se incuban con los tres probióticos antes de estimulación con LPS existe, de forma general, una menor producción de citoquinas (IL-8, IL-1 β y TNF α) y de NO (acción inmunosupresora).

LPS	Sin probiótico		<i>E.coli</i> Nissle 1917		<i>L. fermentum</i>		<i>B. breve</i>	
	-	+	-	+	-	+	-	+
IL-8 (pg/ml)	78,3 \pm 3,3	4014 \pm 220	2501 \pm 163	2841 \pm 222	1357 \pm 86	3528 \pm 276	1739 \pm 135	1465 \pm 146
IL-1 β (pg/ml)	10,2 \pm 0,9	130,0 \pm 13,3	89,4 \pm 14,9	106,3 \pm 14,8	76,5 \pm 7,8	13,4 \pm 2,1	50,9 \pm 9,2	20,9 \pm 7,9
TNF α (pg/ml)	56,2 \pm 6,2	1995 \pm 17,9	838,5 \pm 23,5	1379 \pm 31,8	683,8 \pm 10,5	1327 \pm 24,7	569,4 \pm 8,6	569,8 \pm 7,4
Nitrite(μ M)	0,0 \pm 0,2	62,8 \pm 6,4	37,3 \pm 4,7	39,7 \pm 3,8	24,1 \pm 2,5	51,7 \pm 1,3	38,1 \pm 2,0	41,7 \pm 1,7



GIANFRANCO GROMPONE
Danone Research, Gut Microbiology & Probiotics
Platform, Palaiseau, France

“Nematodos alimentados con bacterias o estrategias innovadoras y predictivas para el escrutinio funcional de cepas probióticas” es el título de la comunicación impartida por Gianfranco Grompone, miembro de Danone Research, Gut Microbiology & Probiotics Platform de Palaiseau (Francia). El trabajo también ha contado con la participación de investigadores del Instituto Pasteur de Montevideo (Uruguay), de Biopolis S.L., firma con sede en el Parque Científico de la Universidad de Valencia y de Danone España (Barcelona).

“Hemos identificado nuevas cepas con efecto protector contra el estrés oxidativo en el modelo de *C. elegans*”

¿En qué contexto se enmarca esta investigación?

Un gran número de microorganismos pueblan el intestino y obligan al sistema inmune a establecer un delicado equilibrio entre destruir patógenos bacterianos peligrosos y tolerar las bacterias benéficas o comensales presentes en la microbiota. Existe considerable información preclínica y clínica que demuestra efectos moduladores de la inflamación mucosal y del estrés oxidativo por parte de diferentes cepas de probióticos.

En ese sentido, ¿cuál es el objetivo de su trabajo?

Nuestro trabajo busca identificar, seleccionar y caracterizar nuevas cepas con capacidades probióticas de tipo antioxidante. Pero, ¿cómo optimizar el carácter predictivo de los ensayos utilizados con tal fin?

¿Qué estrategia han seguido para ello?

Presentamos aquí un modelo completamente innovador en donde 100 cepas de bacterias lácticas (76 cepas del género *Lactobacillus*, 9 del género *Streptococcus* y 15 del género *Bifidobacterium*) de la colección de Danone fueron administradas al nematodo *Caenorhabditis elegans* quien fue utilizado como una plataforma de escrutinio para identificar las cepas con mayor efecto antioxidante.

¿Cuáles han sido los resultados?

Tres de esas 100 cepas presentaron un efecto protector contra el estrés oxidativo en el modelo de *C. elegans*. Además, hemos obtenido correlaciones positivas entre los perfiles antioxidantes obtenidos con estas cepas en el nematodo y la inducción de mecanismos antiinflamatorios en modelos de co-cultivo heterotípico, particularmente en interacciones con células epiteliales intestinales de colon humano, monocitos de sangre periférica o células dendríticas.

¿En qué línea van a continuar estos estudios?

Los próximos trabajos buscarán validar los resultados obtenidos con el nematodo en modelos murinos.



REBECA MARTÍN
Área de Microbiología.
Departamento de Biología Funcional.
Universidad de Oviedo

*Rebeca Martín ha presentado un trabajo del Área de Microbiología del Departamento de Biología Funcional de la Universidad de Oviedo. La investigación se centra en “La interacción *Lactobacillus salivarius* Lv72-mucosa vaginal: papel de los proteoglicanos de la superficie epitelial”.*

¿Por qué el estudio de la interacción *Lactobacillus salivarius* Lv72-mucosa vaginal?

Los lactobacilos son esenciales para el mantenimiento de la homeostasis vaginal porque se adhieren a la mucosa y producen ácido láctico y H₂O₂, todo lo cual previene la colonización de la cavidad por microorganismos indeseables.

En este contexto, ¿cuál es el papel de los proteoglicanos?

Diversos agentes patógenos utilizan los proteoglicanos (PGs) de las superficies epiteliales como anclaje durante la infección. Los PGs son macromoléculas formadas por un tronco proteico que se enraíza en la membrana plasmática al que se unen cadenas de polisacáridos sulfatados denominados glicosaminoglicanos (GAGs)

“Hemos observado una unión muy estable entre el aislado vaginal *L. salivarius* Lv72 y cultivos de células HeLa”

¿Cuál es el planteamiento de esta investigación?

En este trabajo nos planteamos que dichos polímeros podrían mediar también la interacción entre los lactobacilos y el epitelio. Para evaluar la hipótesis elegimos como modelo de estudio la interacción entre el aislado vaginal *L. salivarius* Lv72 y cultivos de células HeLa.

¿Qué método han utilizado?

Para los ensayos, las bacterias se marcaron con fluoróforos, lo que nos permitió determinar que existía unión entre ambos tipos de células y que ésta era muy estable.

¿Qué resultados observaron?

Los experimentos de interferencia utilizando GAGs comerciales revelaron que el heparán sulfato y los condroitín sulfato A y C eran muy buenos competidores de la unión, con constantes de disociación aparentes en rango nM. Sin embargo, el condroitín sulfato B no tenía efecto sobre la adherencia. Complementariamente, las células HeLa tratadas con GAG-liasas perdían gran parte de su afinidad por los lactobacilos, confirmando así la especificidad de la unión. Se encontró, además, que existe organotropismo en la adherencia, por cuanto los GAGs extraídos de células HeLa (de origen genital) interfieren más con la unión de los lactobacilos vaginales que los procedentes de células Ht-29 (intestinales).

¿Estos datos a qué conclusiones llevan?

1. *Lactobacillus salivarius* Lv72 se une específicamente a cultivos de células HeLa.
2. Los proteoglicanos de superficie de las células eucariotas actúan como receptores para *L. salivarius* Lv72 siendo los más adherentes los que presentan heparán sulfato seguidos por los que poseen condroitín sulfato A y C.
3. El efecto competitivo varía en función del origen celular de los GAGs, sugiriendo la existencia de un cierto organotropismo.
4. La adhesión de la superficie bacteriana que media el proceso de adherencia a los proteoglicanos eucariotas es, probablemente, la proteína OppA, la cual presenta varios dominios de unión a heparina. Dos de estos dominios bordean un surco que se postula como el sitio de unión del polisacárido a la proteína.



MONTSERRAT NÁCHER VÁZQUEZ
Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica
y Tecnología de Alimentos (CSIC), Burjassot, Valencia

Montserrat Nacher, del Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), con sede en Burjassot (Valencia), ha analizado durante el workshop un trabajo sobre la producción de exopolisacáridos (EPS) por bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de productos cárnicos y la caracterización del EPS y de sus propiedades probióticas.

¿Qué centros han participado en esta investigación?

El trabajo ha sido desarrollado en la Universidad de Valencia, el Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC) y el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC).

¿Cómo surge este trabajo?

Los exopolisacáridos (EPS) producidos por las bacterias del ácido láctico (BAL) son de gran interés para la industria alimentaria debido a su potencial como prebiótico y por mejorar la textura y características reológicas de los alimentos. Son polímeros de cadena larga de alto peso molecular cuya cantidad

“Distintas bacterias del ácido láctico aisladas de productos cárnicos producen exopolisacáridos”

y tipo depende de cepa y de las condiciones de crecimiento. En este trabajo, se aborda la producción de EPS de BAL aisladas de productos cárnicos, valorando su adhesión a células Caco-2 y su capacidad de inducir la producción de citocinas por macrófagos.

¿Cómo se llevó a cabo?

Las cepas seleccionadas pertenecen a tres especies: *Lactobacillus plantarum* MMB2, *Lactobacillus sakei* MMH(2M)2 y *Leuconostoc mesenteroides* RTF10. La producción de EPS se cuantificó por el método del fenol-sulfúrico, cultivando las cepas en medio definido, en presencia de glucosa, sacarosa, maltosa, lactosa o fructosa como fuente de carbono. La máxima producción de EPS se obtuvo en sacarosa, llegando a niveles superiores a 1 g/l. Los EPS fueron purificados, liofilizados y caracterizados mediante métodos físico-químicos, siendo en los tres casos mayoritariamente dextrano.

¿A qué resultados y conclusiones ha llevado esta investigación?

1. Las tres cepas producen inmunestimulación de macrófagos peritoneales de ratón presentando la mayor proporción IL10/TNF- α de las cepas estudiadas. Las tres cepas indujeron los siguientes niveles de IL-10 y TNF- γ (media de triplicados, pg/ml): *Lb. sakei* MMH(2M)2 (278, 1.806), *Lc. Mesenteroides* RTF10 (55, 223) y *Lb. plantarum* MMB2 (120, 669).
2. En cuanto a la adhesión a enterocitos (Caco-2), ensayada mediante recuento en placa, las cepas *Lb. plantarum* MMB2 y *Lb. sakei* MMH(2M)2 mostraron niveles de alrededor del 5% mientras que *Leuconostoc mesenteroides* RTF10 no superó el 1%.
3. La máxima producción de EPS se obtuvo en sacarosa, llegando a niveles superiores a 1 g/l tras 10 h de incubación a 30 °C, en medio definido para las cepas *Lb. sakei* MMH(2M)2 y *Leuconostoc mesenteroides* RTF10.
4. En las tres cepas el EPS mayoritario es un α -(1-6)-glucano casi lineal, tipo dextrano.
5. Los genes dextranasa de las tres cepas son plasmídicos.
6. *Lactobacillus sakei* MMH(2M)2 posee una dextranasa que pertenece a la familia de las alfa-amilasas, y que difiere de las pertenecientes a la familia 70 de las glicosil hidrolasas.



MARTA OLIVARES
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos
(IATA), CSIC, Valencia

La relación de la enfermedad celíaca con el uso de probióticos ha estado presente en el workshop a través de la intervención de Marta Olivares, del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA) del CSIC (Valencia), quien ha presentado el trabajo titulado: “Bifidobacterium longum CECT 7347 reduce la toxicidad y el potencial efecto inmunogénico de las gliadinas en los enterocitos”.

Este trabajo tiene que ver con la celiaquía, ¿por qué?

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía de carácter autoinmune en la que están implicados diversos factores genéticos y ambientales. El principal factor ambiental desencadenante de la patología son las proteínas del gluten (gliadinas) de los cereales. La EC también se ha asociado a desequilibrios en la composición de la microbiota intestinal y, particularmente, a una reducción en las proporciones de bifidobacterias en pacientes celíacos en comparación con sanos.

“B. longum CECT 7347 reduce la toxicidad y el potencial efecto inmunogénico de las gliadinas sobre células del epitelio intestinal”

¿Qué se proponían con este trabajo?

Avanzar en el conocimiento de las interacciones entre las gliadinas y la cepa *Bifidobacterium longum* CECT 7347 en condiciones gastrointestinales simuladas y su efecto sobre células del epitelio intestinal. Concretamente, nuestro objetivo era evaluar los cambios en el proteoma de células Caco-2 expuestas a gliadinas digeridas *in vitro* en presencia y en ausencia de *B. longum* CECT 7347.

¿Qué metodología utilizaron?

Un extracto comercial de gliadinas se digirió *in vitro*, en presencia o no de suspensiones celulares de *B. longum* CECT 7347, y los digeridos obtenidos se incubaron con cultivos de células intestinales humanas (Caco-2). Los cambios en el proteoma celular se evaluaron mediante electroforesis 2D y posterior determinación de la huella peptídica (MALDITOF/Ms) de aquellas proteínas con una expresión alterada.

¿Cuáles fueron los resultados obtenidos?

Los digeridos de gliadinas, en ausencia de la bifidobacteria, causaron una mayor expresión de proteínas relacionadas con la integridad del citoesqueleto, la apoptosis, la activación de neutrófilos y el receptor de células T (TCR) implicado en la activación de la respuesta inmune. Sin embargo, los digeridos obtenidos en presencia de *B. longum* CECT 7347 indujeron la expresión de un número menor de proteínas, implicadas en el transporte vesicular, homeostasis intracelular de calcio y supervivencia y metabolismo celular. La presencia de *B. longum* CECT 7347 durante la digestión de gliadinas provoca una mayor viabilidad y menor producción de citoquinas inflamatorias.

¿Qué conclusión se extrae de estos datos?

Que *B. longum* CECT 7347 reduce *in vitro* la toxicidad y el potencial efecto inmunogénico de las gliadinas sobre células del epitelio intestinal.



ALFONSO RUIZ-BRAVO
Departamento de Microbiología,
Universidad de Granada

El valor de las pruebas previas de potencial probiótico para lactobacilos ha sido el tema que ha cerrado la tercera sesión de la reunión sobre relación probiótico-hospedador. La presentación de este trabajo ha corrido a cargo de Alfonso Ruiz-Bravo, del Departamento de Microbiología de la Universidad de Granada.

¿Cuál es el origen de esta investigación?

Tiene que ver con el hecho de que la resistencia a pH ácido y a sales biliares, la antibiosis frente a bacterias patógenas y la adherencia a células de epitelio intestinal se consideran entre las características exigibles a los microorganismos probióticos.

¿Qué han estudiado en el trabajo?

En esta comunicación presentamos datos relativos a 22 cepas de lactobacilos aislados de leche y de fermentados lácteos, todas las cuales mostraron resistencia al pH ácido y a la bilis.

“No hay relación entre inhibición del crecimiento de bacterias enteropatógenas *in vitro* y protección frente a la infección *in vivo*”

¿Qué resultados han registrado?

Varias de esas cepas demostraron capacidad para inhibir *in vitro* el crecimiento de la bacteria enteropatógena *Yersinia enterocolitica*. Tres de las cepas con mayor actividad inhibidora se ensayaron en un modelo de infección experimental de ratones BALB/c con *Y. enterocolitica* por vía intragástrica, pero sólo una de ellas fue capaz de acortar el curso de la infección intestinal. Las tres cepas ensayadas en el modelo de infección mostraron capacidad para adherirse *in vitro* a células Caco-2. Mediante el uso de un medio selectivo y diferencial apropiado para detectar la cepa C4 en coprocultivo, se examinó su capacidad para colonizar el intestino de ratones BALB/c. C4 no fue capaz de colonizar de forma persistente, ya que dejó de detectarse en heces a los tres días después de terminado el periodo de administración intragástrica. No obstante, esta cepa ha demostrado capacidad inmunomoduladora *in vivo*.

¿Qué ponen de relieve estos datos?

Que la colonización persistente no es imprescindible para ejercer efectos potencialmente probióticos en animales de experimentación.

¿Qué conclusiones resultan de esta investigación?

Nuestros resultados contradicen el valor real de las pruebas *in vitro* de antibiosis y de adherencia a células epiteliales a la hora de seleccionar cepas con potencial probiótico. La adherencia a células epiteliales no se correlaciona con la capacidad de colonización intestinal. No hay relación entre inhibición del crecimiento de bacterias enteropatógenas *in vitro* y protección frente a la infección *in vivo*. La colonización intestinal no es necesaria para ejercer efectos de inmunomodulación o de protección frente a infecciones.

