

UNIVERSIDAD DE OVIEDO

**MASTER UNIVERSITARIO EN BIOTECNOLOGÍA
ALIMENTARIA**

**“Respuesta del sistema inmune a bacterias
probióticas”**

**TRABAJO FIN DE MASTER
POR**

María Rosa Lucena Prieto

Junio, 2016





Master en Biotecnología Alimentaria
Universidad de Oviedo
C/Julián Clavería s/n. 33071 Oviedo. España
Tel. 985106226. Fax 985103434. <http://www.unioviedo.es/MBTA>



PROFESOR TUTOR:

Dr. D. Borja Sánchez García

Dra. D^a. Rebeca Alonso Arias (Universidad de Oviedo)

CERTIFICA:

Que D^a. **María Rosa Lucena Prieto** ha realizado bajo mi dirección el Trabajo Fin de Master al que corresponde la presente memoria en el contexto de los estudios del Master Universitario en Biotecnología Alimentaria, 10^a promoción curso 2015-2016.

Oviedo, 11 de Julio de 2016

D. Borja Sánchez García

D^a. Rebeca Alonso Arias

V^oB^o

Manuel Rendueles de la Vega

Coordinador del Master en Biotecnología Alimentaria

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a mis tutores del proyecto, Rebeca Alonso y en especial, a Borja Sánchez por sus valiosos consejos, dedicación y ayuda recibida.

Al personal del IPLA-CSIC por el trato recibido durante toda la estancia y principalmente, al grupo de Probióticos y Prebióticos.

A Claudio Hidalgo por emplear gran parte de su tiempo en colaborar con la supervisión y aportar su punto de vista profesional para el mejor desarrollo de este trabajo. Y en general, del grupo del Laboratorio de inmunología HLA del HUCA por integrarme como una más y por todos esos ratos de risas que hacían las horas de trabajo mucho más llevaderas.

Al coordinador del Máster, Manuel Rendueles de la Vega, por su entrega y ayuda en tantas ocasiones.

A todos mis compañeros de MBtA, especialmente a Teresa, Cristina, Soraya, Itziar y Macarena por todos los momentos compartidos y hacerme sentir, estando tan lejos, como en mi casa. Me llevo una verdadera amistad de cada una de vosotras.

Y por último a mi familia y amigos por acompañarme de forma incondicional desde la distancia animándome siempre a continuar en esta andadura.

Gracias a todos.

Índice

Resumen / Abstract.....	7
Lista de Figuras	8
Lista de Tablas.....	9
Lista de Abreviaturas.....	12
1. Introducción.....	13
2. Consideraciones teóricas y/o experimentales	16
2.1. Definición de probiótico.....	16
2.1.1. Efectos beneficiosos de los probióticos.....	17
2.2. Bacterias lácticas	20
2.2.1. Género Lactobacillus.....	21
2.2.2. Género Bifidobacterium	22
2.3. Microbiota intestinal humana	22
2.4. Interacción probiótico-hospedador	24
2.5. Tejido Linfoide Asociado al Intestino (GALT).....	27
2.6. Moléculas implicadas en la interacción.....	28
2.6.1. Proteínas extracelulares	29
2.6.2. Proteínas de superficie.....	30
2.6.3. Ácido lipoteicoico	31
2.6.4. ADN	32
2.7. Citocinas	32
3. Metodología aplicada.....	35
3.1. Cepas y condiciones de cultivo	35
3.2. Fraccionamiento y separación de proteínas extracelulares.....	35
3.3. Extracción de proteínas de superficie.....	36
3.4. Extracción de ácidos lipoteicoicos	36
3.5. Extracción de ADN	37
3.6. PBMCs	37

3.7.	Detección de citocinas	38
4.	Resultados experimentales y Discusión.....	39
5.	Conclusiones.....	49
6.	Bibliografía	51
7.	Apéndices	64

Resumen

Los probióticos están adquiriendo un gran interés en los últimos tiempos tanto por su uso para la elaboración de multitud de productos fermentados, fundamentalmente lácteos, como por su contribución al mantenimiento del estado de salud del consumidor. Las propiedades saludables que se les atribuyen y que sustentan su aplicación en la clínica, se relacionan con algunos mecanismos de acción sobre enfermedades relacionadas con el sistema digestivo y la función inmune. Ha sido evidenciado que afectan a la microbiota intestinal aumentando el número de bacterias beneficiosas y disminuyendo el de patógenas para el mantenimiento del equilibrio intestinal y prevención del desarrollo de enfermedades. Es necesario demostrar su eficacia en la salud humana mediante la realización de ensayos clínicos bien documentados que permitan seleccionar las poblaciones más apropiadas, siendo las bacterias probióticas más habituales las del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Para la realización de éste trabajo fueron seleccionadas tres cepas pertenecientes a la colección del IPLA-CSIC: *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GG (LGG), *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079^T y *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCIMB 8809. Los efectos inmunomoduladores de estas bacterias y la influencia de las mismas sobre la respuesta inmunitaria llevan a estudiar el comportamiento de algunos de sus componentes (proteínas extracelulares, proteínas de superficie, ácido lipoteicoico y ADN) en individuos sanos, siendo el objetivo de este trabajo.

Abstract

Probiotics have received huge interest during the last decades due to their use in fermented products, specially dairy products, and to their contribution to the healthy status of the consumer.

The probiotic affect associated to their intake that favour their use as adjuvant for several diseases is related with their capability to improve the healthy status of patients in intestinal and autoimmune diseases. It has been shown that probiotics could modulate the microbiota increasing beneficial bacteria and decreasing pathogens contributing to the maintenance of the intestinal homeostasis and the prevention of several diseases. The use of probiotics is limited to the demonstration of their capability to improve human health with well performed clinical trials to select the most appropriate probiotic for each populations. The most common probiotic strains belong to the genera *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*.

To perform this study we select three strains from the culture collection of IPLA-CSIC: *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GG (LGG), *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079^T y *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCIMB 8809. The immune modulatory effects of these strains and their influence in the host immune response were study analysing the cytokine pattern induce by different bacterial extracts (extracellular protein, surface proteins, lipoteichoic acid and DNA) in co-culture with immune cells isolated from healthy donors.

Lista de Figuras

Figuras	Leyenda	Pg.
Figura 1.	Criterios de selección de bacterias empleadas como probióticos.	13
Figura 2.	<i>Phylum</i> que componen mayoritariamente la microbiota intestinal.	23
Figura 3.	Mecanismos de acción de los probióticos (Bermudez-Brito y cols., 2012).	25
Figura 4.	Diferenciación celular de linfocitos T según el tipo de estímulo y citocinas expresadas según la línea.	34
Figura 5.	Separación de células por gradiente de densidad con Ficol.	37
Figura 6.	Preparación de la placa de 96 pocillos con las distintas fracciones de cada cepa para los 5 donantes.	38
Figura 7.	Representación gráfica de la producción de IL-10, TNF- α , IL-2, IL-22 e IFN- γ de sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs de <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> GG (LGG), siendo expresadas las concentraciones en pg/mL.	42
Figura 8.	Representación gráfica de la producción de IL-10, TNF- α , IL-2, IL-22 e IFN- γ de sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs con <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079 ^T , siendo expresadas las concentraciones en pg/mL.	44
Figura 9.	Representación gráfica de la producción de IL-10, TNF- α , IL-2, IL-22 e IFN- γ de sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs con <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> NCIMB 8809., siendo expresadas las concentraciones en pg/mL.	46

Lista de Tablas

Tablas	Leyenda	Pg.
Tabla 1.	Cantidades obtenidas de las distintas fracciones de proteína extracelular, proteína de superficie y ácido lipoteicoico a partir de 50mL de cultivo para las cepas LGG, DSM y 8809.	39
Tabla 2.	Concentración obtenida de ADN para <i>Lb. rhamnosus</i> GG, <i>Lb. acidophilus</i> DSM y <i>B. longum</i> 8809.	39
Tabla 3.	Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con medio de cultivo RPMI utilizado como control negativo.	64
Tabla 4.	Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con LPS utilizado como control positivo.	65
Tabla 5.	Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de proteínas extracelulares de <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> GG (LGG).	66
Tabla 6.	Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de proteínas de superficie de <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> GG (LGG).	67
Tabla 7.	Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de ácido lipoteicoico de <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> GG (LGG).	68
Tabla 8.	Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con el ADN de <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> GG (LGG).	69
Tabla 9.	Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de proteínas extracelulares de <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079 ^T .	70
Tabla 10.	Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de proteínas de superficie de <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079 ^T .	71

Tabla 11.	Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de ácido lipoteicoico de <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079 ^T .	72
Tabla 12.	Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con el ADN de <i>Lactobacillus acidophilus</i> DSM 20079 ^T .	73
Tabla 13.	Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de proteínas extracelulares de <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> NCIMB 8809.	74
Tabla 14.	Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de proteínas de superficie de <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> NCIMB 8809.	75
Tabla 15.	Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de ácido lipoteicoico de <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> NCIMB 8809.	76
Tabla 16.	Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con el ADN de <i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i> NCIMB 8809.	77
Tabla 17.	Ratios IL10/TNF α e IL5/IFN γ determinados para las tres bacterias probióticas.	78

Lista de abreviaturas

BAL: Bacterias Ácido Lácticas

CPA: Células Presentadoras de Antígenos

CD: Células Dendríticas

EFSA: “European Food Safety Authority”

EII: Enfermedad Inflamatoria Intestinal

FAO: “Food and Agriculture Organization”

GALT: “Gut-Associated Lymphoid Tissue”

GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa

GRAS: “Generally Regarded As Safe”

IFN: Interferón

IL: Interleucina

ISAPP: “International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics”

LPS: Lipopolisacárido

NFkB: Factor de Transcripción Nuclear kB

NK: “Natural Killer”

NOD: “Nucleotide oligomerization domain”

PBMCs: Células Mononucleares de Sangre Periférica

PP: Placas de Peyer

QPS: “Qualified Presumption of Safety”

TCR: “T cell receptor”

TLR: “Toll-Like Receptor”

TNF- α : Factor de Necrosis Tumoral

WHO: “World Health Organization”

1. Introducción

El consumo de productos fermentados, fundamentalmente lácteos, está aumentando hoy día y han supuesto un gran interés debido a los microorganismos beneficiosos para la salud que contienen. En relación a ellos aparece el concepto de probiótico, cuya definición ha ido evolucionando hasta considerarse como “microorganismo vivo que administrado en cantidades adecuadas ejerce un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador” (FAO/WHO, 2006). En 1907 ya había interés por adicionar bacterias que tenían cierto beneficio en alimentos tal y como hizo referencia el premio Nobel de medicina Elie Metchnikoff, quien indicó que “la dependencia de los microbios intestinales de los alimentos hace posible adoptar medidas para modificar la flora de nuestros cuerpos y para reemplazar los microbios dañinos por microbios beneficiosos” (Oliveira y cols., 2007).

Las bacterias ácido lácticas (BAL) han de presentar una serie de características para ser empleadas como probióticos tal y como se muestra en la siguiente figura.

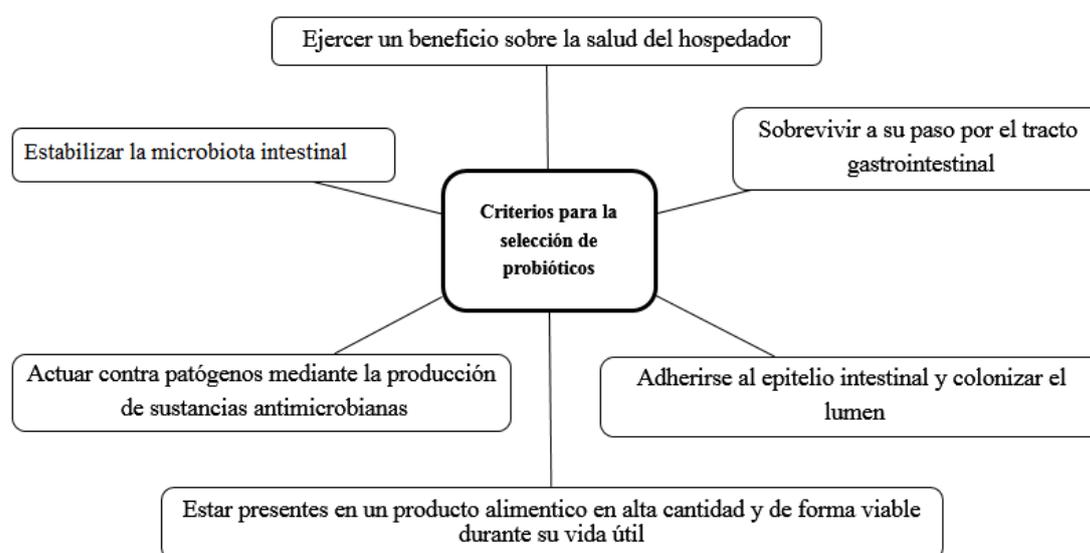


Figura 1. Criterios de selección de bacterias empleadas como probióticos.

Además, los microorganismos probióticos deben estar identificados adecuadamente, carecer de factores de virulencia y de la capacidad de producir metabolitos indeseables, mostrar tolerancia a las condiciones del entorno donde actúan de forma beneficiosa y que se verifique su función con ensayos en humanos. La

Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) evalúa las cepas elaborando una lista con aquellas cuyo uso es seguro para el consumo humano. Es la denominada QPS: *Qualified Presumption of Safety*. El estudio de las distintas poblaciones microbianas ha sido difícil de abordar debido a que hasta el 80% de las especies no pueden ser cultivadas *in vitro* porque requieren unas condiciones tanto físicas como nutricionales muy concretas (Duncan y cols., 2007).

Con el nacimiento, se va estableciendo una flora que aumenta en número y variedad durante los meses siguientes, en los que la madre le transfiere al niño sus propias bacterias a través de la leche materna hasta llegar entre el primer y el segundo año de vida donde la composición se asemeja a la del adulto y se mantiene estable.

Hay evidencias de que la microbiota comensal es clave para un adecuado desarrollo de la mucosa intestinal y del sistema inmune asociado a la misma, por lo que los microorganismos presentes en la leche materna podrían desempeñar importantes funciones en este aspecto (Brunser T., 2013; Delcenserie y cols., 2008). Con ella le confiere anticuerpos específicos y moléculas de inmunidad innata frente a gérmenes, pudiendo repercutir en la vida adulta con diversas enfermedades inmunoinflamatorias. Su composición se modifica con los hábitos alimentarios en conjunto con otros factores como son la dieta, localización geográfica, higiene o el clima. (Delcenserie y cols., 2008). Conocer el papel de éstas bacterias en el desarrollo de la microbiota intestinal del neonato es trascendental para el desarrollo de fórmulas infantiles que imiten los efectos funcionales de la leche materna garantizando siempre su seguridad.

Los lactobacilos pertenecen al filo Firmicutes, presentes en gran cantidad de productos fermentados destinados a la alimentación, algunos de ellos con carácter probiótico. Otro género son las bifidobacterias, que pertenecen a los Actinomycetes presentes tanto en la dieta como en el intestino humano. Ambos grupos son los principalmente empleados como probióticos debido a que sus propiedades beneficiosas están más contrastadas (Andreoletti y cols., 2013). Son capaces de actuar tanto en individuos sanos como en aquellos con diversas patologías, siendo necesario que resistan las condiciones del aparato digestivo y permanecer viables a su paso para interactuar con la microbiota y ejercer un efecto beneficioso, además de que se adhieran a las células intestinales interviniendo en este proceso distintos componentes

entre los que se incluyen exopolisacáridos, ácidos lipoteicoicos y proteínas extracelulares y de superficie (Rodríguez, 2015). En animales nacidos y criados en condiciones de esterilidad (*germ-free*) se han realizado numerosos experimentos en los que se muestra cómo influyen en la estructura de la mucosa del hospedador, en la función y el desarrollo del sistema inmunológico (Herich y cols., 2002).

A los microorganismos probióticos se les atribuye la capacidad de estimular la respuesta inmune o regular la respuesta inflamatoria, además de modular la actividad de monocitos, macrófagos, neutrófilos y células natural killer (NK) que son los principales efectores de la inmunidad innata (Yépez y cols., 2015). Para el inicio de la respuesta inmunitaria innata son imprescindibles receptores de reconocimiento de componentes específicos de bacterias, hongos y virus, entre los que se incluyen los TLR (*Toll-like Receptor*) y los NOD (*Nucleotide Oligomerization Domain*). Su activación desencadena cascadas de señalización intracelular que generan la producción de distintos tipos de citocinas de forma controlada dependiendo del tipo de cepa. Los probióticos interactúan con las células M de las placas de Peyer (PP) con el epitelio intestinal para ejercer su acción (Delcenserie y cols., 2008).

El **objetivo** de este trabajo es analizar cómo afectan distintas fracciones de bacterias probióticas al sistema inmunológico humano. En concreto se emplearon dos cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* (*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GG (LGG) y *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079^T) y una cepa perteneciente a *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCIMB 8809). De las tres cepas se obtuvieron las siguientes fracciones: proteínas extracelulares, proteínas de superficie, ácido lipoteicoico y ADN. La respuesta inmune se analizó mediante el cultivo de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) con los extractos bacterianos y la posterior cuantificación de las citocinas producidas.

2. Consideraciones teóricas y/o experimentales

2.1. Definición de probiótico:

Un probiótico es un microorganismo vivo que administrado en cantidades adecuadas ejerce un efecto beneficioso sobre la salud del hospedador (FAO/WHO, 2006). El concepto de “alimento funcional” fue introducido en Japón a finales de la década de 1980, el cuál fue expandiéndose mundialmente por la preocupación sobre la nutrición, dieta y salud de la población (Stanton y cols., 2001). Fue en la 6ª Reunión de la Asociación Científica Internacional para Probióticos y Prebióticos (ISAPP) en 2008, donde se actualizó la definición como “ingrediente selectivo fermentado que da lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal, otorgando así beneficios en la salud del huésped” (Gibson y cols., 2010).

Desde los años 90, se han ido estableciendo políticas reguladoras para los alimentos funcionales que presentan variaciones según el país. La nueva regulación europea sobre nutrición y salud entró con mayor ímpetu en el 2007 (Leathwood y cols., 2007).

La mayor parte de los probióticos para el consumo humano son BAL, residentes habituales del tracto gastrointestinal que pertenecen fundamentalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Las especies de *Lactobacillus* que han sido aisladas incluyen: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus gasseri* y *Lactobacillus reuteri*. Dentro de las especies de *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum* y *Bifidobacterium infantis* (Heller, 2001). Además, se emplean otros géneros como *Escherichia coli*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* y *Saccharomyces* (Rodríguez, 2015).

A estos microorganismos les son atribuidas diferentes características como: acción beneficiosa sobre la salud, inmunomodulación, capacidad de reducir el riesgo de infección (Rijkers y cols., 2010), modificación del metabolismo del hospedador, respuesta antiinflamatoria, exclusión y muerte de patógenos en el tracto gastrointestinal,

absorción de nutrientes y disminución del riesgo de contraer enfermedad (Al-Salami y cols., 2012).

2.1.1. Efectos beneficiosos de los probióticos

Los cambios que se han ido produciendo en los hábitos alimentarios hasta la actualidad, han dado lugar a distintos tipos de enfermedades crónicas asociadas con una disbiosis de la microbiota intestinal. La finalidad de los probióticos es servir como alternativa o complementar el tratamiento de estas enfermedades por su capacidad para interactuar con la microbiota humana (Valcheva y cols., 2016). Entre ellas se encuentran: diarreas, alergias, algunos tipos de cáncer, diabetes tipo 2, infecciones del sistema urinario, desórdenes inmunológicos, intolerancia a la lactosa, hipercolesterolemia, obesidad, *Helicobacter pylori*, síndrome metabólico, esteatohepatitis no alcohólica, enfermedad inflamatoria intestinal, síndrome de intestino irritable, aterosclerosis, autismo, asma y enfermedad celíaca (Bäckhed y cols., 2012).

➤ Tratamiento de diarreas

En el caso de diarrea de diferente etiología, se ha demostrado que la administración de cepas probióticas, entre las que se encuentran *L. rhamnosus* GG, *L. reuteri*, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *L. casei*, alguna cepa de *Escherichia coli*, además de ciertas bifidobacterias y enterococos, disminuyen tanto la gravedad como la duración en el caso de diarreas agudas en adultos (De Vrese y cols., 2007; Manzano y cols., 2012). Los mecanismos que explican su acción son la producción de sustancias antimicrobianas como bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y biosurfactantes, la disminución del pH intestinal por la producción de ácido láctico y la resistencia a la colonización de patógenos. Por otro lado, pueden prevenir la infección al competir con virus o patógenos en los sitios de unión a las células epiteliales. Hay que tener en cuenta que estos mecanismos varían entre cepas teniendo distintos efectos (Manzano y cols., 2012; Parvez y cols., 2006).

La administración de LGG en concreto, ha mostrado en algunos estudios que disminuye la incidencia de diarrea en niños malnutridos y la duración de la misma se reduce a un día. Resulta del mismo modo eficaz para prevenir la diarrea asociada a

antibióticos, nosocomial y la asociada a malnutrición, pero no cuando se trata de diarreas severas (De Vrese y cols., 2007; Sanders y cols., 2013).

➤ Prevención y tratamiento de alergias

Por otro lado, se ha observado que en el caso de pacientes con alergias la microbiota cambia con respecto a la de sujetos sanos. Esto lleva a considerar la administración de probióticos como prevención primaria o tratamiento de este tipo de enfermedades debido a sus propiedades inmunomoduladoras (Watanabe y cols., 2003).

Es de tener en cuenta que hay diferencias en los resultados en función del tipo de cepa, el momento de intervención terapéutica, el tipo de enfermedad alérgica y la combinación con otros suplementos alimenticios (Manzano y cols., 2012). En relación a la hipersensibilidad de personas con alergias producidas por alimentos y aquellas con eczema atópico, las bacterias probióticas tienen un importante papel regulador (Parvez y cols., 2006). Marteau y cols., trataron durante dos meses a un grupo de 27 niños con eczema atópico usando distintos tipos de probióticos, entre ellos *Lactobacillus rhamnosus* GG, disminuyendo de forma significativa su severidad.

➤ Prevención del desarrollo de cáncer

Se han realizado estudios en roedores focalizando los efectos de probióticos en lesiones precancerosas y tumorales, observándose que promueven una modificación de la microbiota y su metabolismo, cambios en el pH del colon, unión o inactivación de agentes carcinógenos, mejora de la respuesta inmune, reducción de la inflamación del colon, proliferación epitelial y reducción de apoptosis (Sanders y cols., 2013).

Hay claras evidencias de la contribución de la dieta en la modulación del riesgo de cáncer colorectal, uno de los mayores causantes de muerte en los países industrializados. En estudios con animales, LGG reducía tanto la incidencia como el número de tumores, al igual que *B. longum* (Parvez y cols., 2006). En humanos también se ha observado que pueden tener un efecto protector frente a esta enfermedad en estudios de casos-control (Rowland, 2004).

➤ Mejora de la intolerancia a la lactosa

Los síntomas producidos por este síndrome, tales como dolor abdominal, diarrea, náuseas, etc., son variables en cada persona debido a la capacidad de su microbiota para fermentar la lactosa (Manzano y cols., 2012). El efecto beneficioso se debe al aumento de la actividad de la lactasa en el intestino por las BAL (Parvez y cols., 2006).

➤ Tratamiento de la obesidad

Respecto a la obesidad inducida por la dieta, la suplementación de probióticos, concretamente diversos lactobacilos y bifidobacterias, han demostrado su efecto positivo en modelos animales para contrarrestarla. En cuanto al metabolismo de lípidos, en estudios experimentales se ha visto que han producido una disminución de los niveles de colesterol y lipoproteínas de baja densidad, y un aumento de lipoproteínas de alta densidad. En humanos los estudios son escasos para afirmar el efecto potencial (Manzano y cols., 2012).

La resistencia a la insulina y control de la glucemia, con la cepa LGG en concreto, se ha demostrado su efecto beneficioso en la homeostasis de la glucosa, mejorando en ratones la sensibilidad a la insulina y la reducción de la acumulación de lípidos siendo beneficioso para el control del peso corporal (Kobyliak y cols., 2016).

➤ Tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Otra enfermedad sobre la que tienen actuación los probióticos es la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) que puede presentarse de dos formas: como enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. Se trata de una inflamación crónica de la mucosa del tracto gastrointestinal que se relaciona con una respuesta inmune anómala a la microbiota comensal. Lo que tiene lugar es un desbalance en su composición (disbiosis) que puede relacionarse con su patogénesis (Hevia y cols., 2014). Las bacterias probióticas contribuyen positivamente con la modificación y mejora de la flora intestinal, modulando la barrera epitelial, reduciendo bacterias patogénicas que se unen o penetran en la superficie de la mucosa, previniendo el crecimiento de las mismas, estimulando la función de la barrera y equilibrando el balance en la producción de citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias (Mikov y cols., 2014).

➤ Efectos inmunomoduladores

Otro mecanismo de acción es la estimulación del sistema inmune y el bloqueo de patógenos responsables de infecciones en el intestino mediante la unión de las bacterias probióticas al epitelio intestinal (Mikov y cols., 2014). Se ha demostrado, *in vitro*, como el número de especies patógenas se reduce en el mucus intestinal con la administración de LGG, *L. rhamnosus* LC705, *B. breve* 99 y *Propionibacterium freudenreichii* ssp. *Shermanii* JS (Collado y cols., 2007).

2.2. Bacterias lácticas

Las BAL son un amplio grupo de microorganismos usado en la elaboración de gran variedad de productos fermentados destinados al consumo humano (lácteos, vegetales, cárnicos, de panadería, bebidas alcohólicas) y animal (ensilados). A él pertenecen los microorganismos mayormente utilizados como probióticos. Al ser bacterias utilizadas en alimentación, tienen un *status* de GRAS (*Generally Regarded As Safe*).

Se clasifican según su morfología en cocos o bacilos, o según el modo de fermentar la glucosa en homofermentativos o heterofermentativos. Son bacterias Gram-positivas, anaerobias facultativas, catalasa negativas, no esporuladas, ácido tolerantes, con un pH óptimo de crecimiento entre 5.5 y 6.2 y estrictamente fermentativas presentes tanto en la naturaleza, como en el intestino humano y animal. Además, hay gran diversidad dentro del género según el contenido en G+C en el DNA, que varía entre 32-52%. Sus colonias se caracterizan por ser circulares y de color blanquecino (Jagadeesh, 2015).

Consumen rápidamente los carbohidratos fermentables del alimento como fuente de energía y los convierten en ácidos orgánicos, especialmente en ácido láctico. Como consecuencia de la acidificación, el pH disminuye aumentando la vida útil del producto por la inhibición del crecimiento de patógenos y alterantes y mejorando así su seguridad (Khandelwal y cols., 2015; Saez-Lara y cols., 2015; Salminen y cols., 2004). La producción de ácido láctico puede llevarse a cabo por dos vías: homofermentativa, como producto de la fermentación, o heterofermentativa, en la cual además puede producirse dióxido de carbono, etanol y/o ácido acético (Kandler, 1983).

Algunos de los géneros más importantes son: *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Salminen y cols., 2004). Por razones tecnológicas, a este grupo también pertenecen los géneros *Bifidobacterium*, y *Propionibacterium*. Son bacterias capaces de crecer sólo con unas determinadas condiciones nutricionales del medio puesto que poseen una baja capacidad biosintética y altos requerimientos de fuentes de carbono y nitrógeno (Stackebrandt, 1988).

2.2.1. Género *Lactobacillus*

Es un género que incluye sobre 80 especies reconocidas (Kandler, 1983). Morfológicamente se caracterizan por ser largas y delgadas, aunque en función de la especie éstas varían, pudiendo ser bacilos o coco-bacilos de pequeño tamaño o formar cadenas largas. En general no tienen movilidad, pero en el caso contrario es debida a la presencia de flagelos peritricos (Winn y cols., 2006).

Los lactobacilos son bacilos Gram positivos, aerobios facultativos, presentes en la flora vaginal, tracto intestinal y la cavidad oral en humanos (Tortora y cols., 2007). Se distribuyen ampliamente por la naturaleza y también forman parte de la flora normal de muchos animales. Debido a su capacidad fermentativa, son empleados en multitud de productos comerciales tales como: lácteos, granos, chucrut, *pickles*, mantequilla,... Todas las especies dentro de éste grupo son catalasa y oxidasa negativa, no reducen nitrato, no producen indol ni H₂S y no forman esporas. La pared celular de dichas bacterias se caracteriza por contener un peptidoglucano grueso y ácidos teicoicos ligados a la membrana (Tortora y cols., 2007; Winn y cols., 2006).

Como fuentes de carbono y energía, no solo requieren carbohidratos, sino también aminoácidos, vitaminas y nucleótidos. Sus efectos beneficiosos para la salud son los que les atribuyen la capacidad de actuar como probióticos. Además de sus propiedades para la prevención y control de determinadas enfermedades, otorgan compuestos aromáticos (diacetilo, acetaldehído) a los alimentos.

Lactobacillus rhamnosus GG es una de las principales cepas probióticas usadas debido a la gran investigación que se ha realizado sobre ella tanto en humanos como en animales.

2.2.2. Género *Bifidobacterium*

En la actualidad hay descritas y catalogadas más de 30 especies diferentes de bifidobacterias. Su morfología es variada, generalmente con forma bacilar, cortas, regulares o con ramificaciones. Pueden presentarse individualmente, en cadenas, en empalizada o en forma de V, Y, T. Dicha forma bífida es a la que hace referencia su nombre. Son bacilos Gram positivos, inmóviles, no esporulados, anaerobios estrictos (aunque algunas especies sí toleran el oxígeno), catalasa negativos, productores de ácido láctico en procesos de fermentación (Khandelwal y cols., 2015). Son sacarolíticos (capaces de fermentar glucosa, galactosa y fructosa) y ácido-tolerantes, en general con un pH óptimo de crecimiento de 6.5 y 7.0 (Leahy y cols., 2005).

Fueron aisladas por primera vez de heces de neonatos lactantes por Tissier y cols. en 1990, que las denominaron *Bacillus bifidus* (Vanegas y cols., 2010), pero por su similitud en algunas características con el género *Lactobacillus*, Orla-Jensen en 1924 reconoció el género *Bifidobacterium* como un taxón separado dentro de éste grupo y fueron incluidas en la 7ª ed. del Manual Bergey's. Una de las diferencias con las BAL es su alto contenido cromosómico en G+C y el metabolismo de los azúcares, puesto que carecen de aldolasa y glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Leahy y cols., 2005). Para su cultivo requieren necesariamente cisteína que actúa como agente reductor.

Están presentes de forma natural en el tracto gastrointestinal de humanos, con un contenido de 3% tanto en niños como en adultos sanos y en diversos animales en distinta proporción en función de la edad y mayoritariamente del tipo de alimentación (Candela y cols., 2007; Roy y cols., 2001). El carácter de “microorganismo probiótico” le es otorgado por ser uno de los principales grupos promotores de la salud y por su inocuidad, de ahí su amplio uso en la industria alimentaria.

2.3. Microbiota intestinal humana

La microbiota intestinal es un complejo ecosistema de microorganismos muy diversos que tienen un papel clave en la salud del ser humano, ya que compite por los nutrientes y receptores, desplaza a patógenos, produce factores antimicrobianos, regula

la tasa de recambio de enterocitos, promueve el desarrollo y diferenciación de las células epiteliales, fortifica la barrera intestinal y mantiene el buen funcionamiento de la inmunidad de la mucosa intestinal (Gerritsen y cols., 2011; Sekirov y cols., 2010). Además sintetiza aminoácidos esenciales, vitaminas y ácidos grasos de cadena corta mediante la degradación de proteínas y polisacáridos no digeribles (Sekirov y cols., 2010). Contiene más de 10^{14} microorganismos que están expuestos al ambiente externo, los cuales residen o pasan a través del tracto gastrointestinal, tracto respiratorio y genitourinario.

Los seres humanos nacen estériles y establecen rápidamente la población bacteriana en el parto, siendo considerado en un principio un determinante fundamental de la composición inicial de la microbiota (Hdez y cols., 2015; Isolauri y cols., 2001; Yu y cols., 2012). Sin embargo, en estudios recientes se ha mostrado que el principal factor iniciador es la leche materna por ser una fuente continua de bacterias comensales y mutualistas para el niño, entre las que se encuentran: estreptococos, enterococos, estafilococos y bacterias lácticas (Hdez y cols., 2015). A la edad de 2 años dominan bacterias similares a las del adulto, que contiene mayoritariamente dos filotipos o *phylum*, *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, seguidos de *Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Verrucomicrobia* y *Euyarchaeota* (Arumugam y cols., 2011) (Figura 2). Ésta se mantiene más o menos estable, ya que el sistema inmunológico reconoce y tolera a las especies bacterianas que se adquieren durante esta fase (Hdez y cols., 2015).

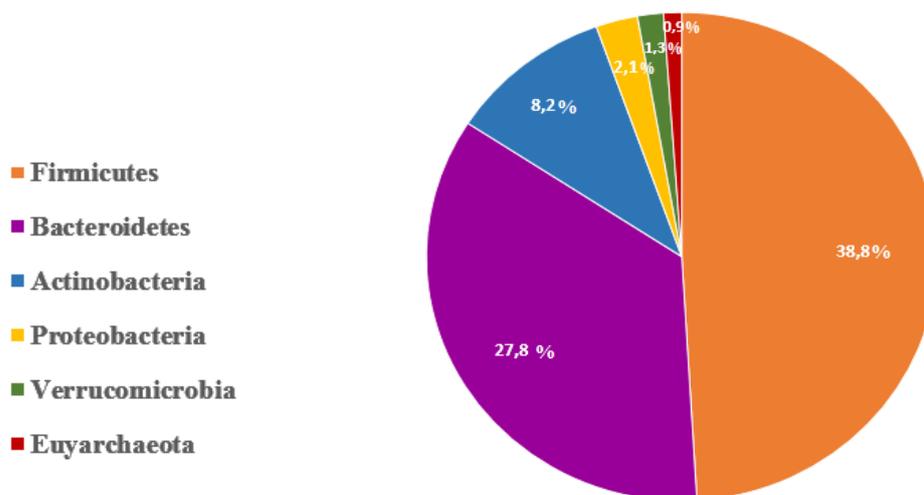


Figura 2. *Phylum* que componen mayoritariamente la microbiota intestinal.

Aunque la microbiota se establece en la primera etapa de la vida, se pueden producir cambios en función de la edad, dieta, origen geográfico, ingesta de complementos alimenticios, fármacos, estrés, infecciones y medio ambiente, produciendo una modificación de la misma y de la expresión de sus genes (Arumugam y cols., 2011; Bäckhed y cols., 2012; Hdez y cols., 2015). Su composición es variable y específica para cada individuo, de forma que no es posible establecer una definición concreta de lo que se consideraría normal y saludable (Gallego y cols. 2016).

Entre la microbiota y el individuo existe una asociación simbiótica, aportando nutrientes y un ambiente adecuado por parte de los microbios gastrointestinales y contribuyendo en el desarrollo y adecuado mantenimiento de la mucosa intestinal por parte de la microbiota (Hevia y cols., 2015). Se ha demostrado con estudios animales que la baja diversidad bacteriana está relacionada con una mayor susceptibilidad de desarrollar distintas enfermedades. Como consecuencia, se considera que es más importante para conservar la salud la función de la microbiota, en lugar de la composición (Nicholson y cols., 2012).

El mantenimiento tanto de la estructura como de la función beneficiosa, se define basado a distintos aspectos: la actividad fisiológica de los metabolitos producidos por las bacterias intestinales, el concepto de disbiosis, que se relaciona con actividad inflamatoria, infecciosa, funcional y/o condiciones nutricionales, y también la manipulación de la microbiota para la mejora o prevención de patologías (Bäckhed y cols., 2012). Es de gran importancia conocer el factor desencadenante del desbalance, ya que el efecto beneficioso de un microorganismo en el hospedador puede modificarse cuando las condiciones cambian (Gallego y cols., 2016).

2.4. Interacción probiótico-hospedador

El sistema inmune juega un gran papel en la modulación de la microbiota intestinal para proteger frente a patógenos y preservar la relación simbiótica entre el hospedador y la misma (Rodríguez y cols., 2013). Con estudios *in vitro* se ha estudiado la respuesta de las células del tracto gastrointestinal a las bacterias probióticas (Marco y cols. 2006).

Los probióticos pueden modular la respuesta inmune ejerciendo sus beneficios a distintos niveles del intestino: en el lumen a través de su interacción con la microbiota o con un efecto metabólico directo, en otros órganos extraintestinales, en la mucosa y el epitelio incluyendo los efectos de barrera, en los procesos digestivos y el sistema inmunológico asociado a mucosa a través de las células M en PP (Guarner y cols., 2010). También pueden intervenir a nivel sistémico por sus propiedades inmunomoduladoras, influyendo en la respuesta inmune del individuo.

Los microorganismos o estructuras antigénicas son captadas y transportadas por células M del epitelio favoreciendo la estimulación del tejido linfoide asociado a mucosa en el cual se encuentran las células receptoras del antígeno (Manzano y cols., 2012). Los linfocitos T estimulan los linfocitos T *helper* encargados de producir distintos tipos de citocinas. Éstas además, son variables según la cepa probiótica, con casos de inhibición o estimulación de la producción de algunas de ellas tales como IL-10, IL-12 o factor de necrosis tumoral (TNF- α) (Chiba y cols., 2010). Las células dendríticas (CD) constituyen la tercera línea de defensa. Pueden introducir las bacterias probióticas en el lumen, induciendo marcadores de proliferación, citotoxicidad y la activación de células NK autólogas (Fink y cols., 2007). Además, actúan en el reconocimiento temprano bacteriano y por tanto, en la formación de células T (Marco y cols. 2006).

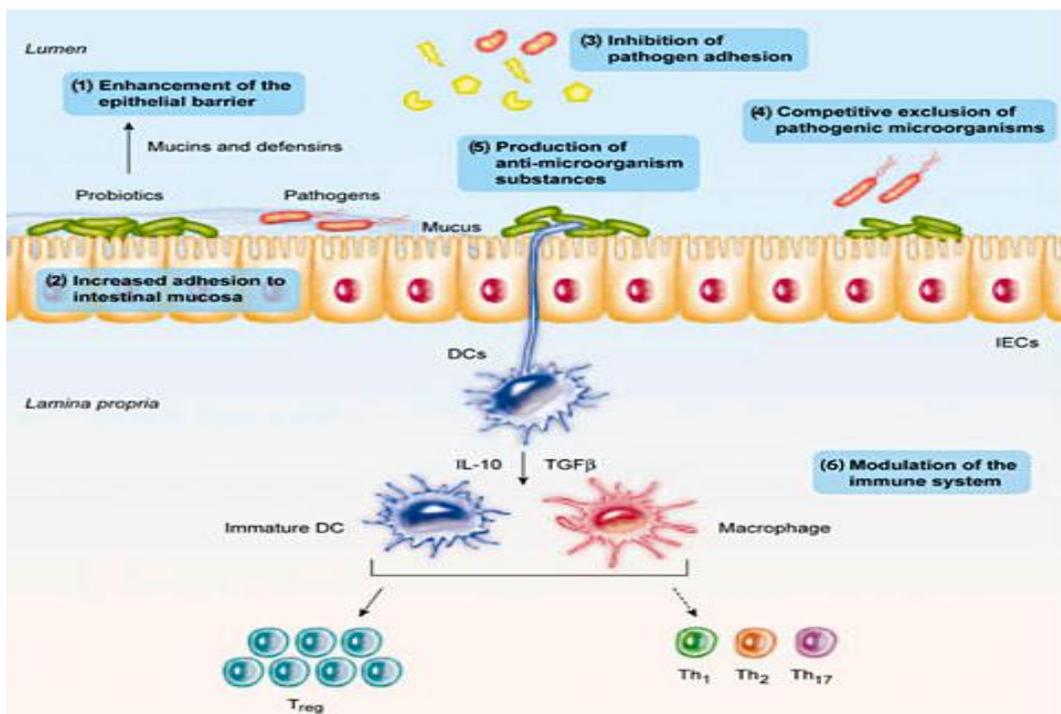


Figura 3. Mecanismos de acción de los probióticos (Bermudez-Brito y cols., 2012).

La barrera intestinal es el mayor mecanismo de defensa frente a organismos externos, a través de la secreción de mucus, clorhídrico y agua, además de la adherencia a las células del epitelio (Yépez y cols., 2015). Es imprescindible ésta adherencia para la colonización e interacción con las bacterias del hospedador y para la modulación del sistema inmunológico frente a patógenos (Bermudez-Brito y cols., 2012). Se ha demostrado que varias proteínas de *Lactobacillus* promueven el proceso de adhesión al tracto gastrointestinal, el cual está mediado principalmente por proteínas, pero también por exopolisacáridos y ácidos lipoteicoicos (Vélez y cols., 2007). El componente implicado en la unión es proteasa resistente y se asocia a la superficie bacteriana. Además, éste se degrada en un péptido antimicrobiano que otorga una protección frente a patógenos en el hospedador, lo que sugiere el efecto beneficioso que pueden presentar las proteínas de superficie (Greene y cols., 1994). Entre éstos péptidos se incluyen bacteriocinas, que contribuyen a la funcionalidad de los probióticos en el tracto gastrointestinal al conferir a las cepas una ventaja competitiva consecuencia de la actividad antimicrobiana (Gerritsen y cols., 2011; Guarner y cols., 2010).

Los receptores TLR pueden interaccionar con moléculas de los patógenos y bacterias comensales tras su anclaje a la superficie mediante el antígeno CD14, de forma que TLR-4 interacciona con LPS (lipopolisacárido) formando un complejo unido a una proteína. Como consecuencia, se activan numerosas moléculas de señalización en las células para la liberación del factor de transcripción nuclear kB (NFkB), que al mismo tiempo transcribe citocinas inflamatorias (IL-8 e IL-6), respondiendo con una respuesta inflamatoria a la invasión del patógeno (Yépez y cols., 2015). Lefteris y cols., investigaron con seis cepas de *Lactobacillus* para ver su efecto frente a bacterias patógenas como *Salmonella entérica* ser. *typhimurium* SL1344, mostrando todas ellas una fuerte actividad antimicrobiana frente a la misma. Del mismo modo fue demostrado, tanto *in vitro* como en animales de laboratorio, para cepas de *Bifidobacterium*, inhibiendo su adhesión al mucus debido a la ácido-resistencia que éstas adquieren (Bermudez-Brito y cols., 2012; Liévin y cols., 2000).

El efecto de los probióticos es mayor cuando se administran distintas cepas en conjunto (Qin y cols., 2010). Se ha visto por ejemplo que la combinación de fructooligosacáridos como es la inulina con cepas de *L. rhamnosus* y *B. lactis*, aumenta el número de cepas de dichas especies de la flora intestinal y disminuye la de

Clostridium perfringens, reduciendo patologías del tracto gastrointestinal (Davis y cols., 2009). En ratas alimentadas con dietas suplementadas con inulina junto con cepas probióticas como *L. acidophilus*, *L. bulgaricus*, *B. bifidum*, *B. longum* y *S. thermophilus*, aumenta la actividad de enzimas como son las disacaridasas intestinales (Yang y cols., 2005).

2.5. Tejido Linfoide Asociado al Intestino (GALT)

En la mucosa intestinal del hospedador tienen lugar distintas interacciones entre los microorganismos comensales que componen la microbiota y patógenos de naturaleza variada (Rodríguez y cols., 2013). Esto sugiere que su modulación para obtener “bacterias beneficiosas” podría contribuir al bienestar del hospedador, lo cual es la base de la utilización de alimentos probióticos.

El principal componente del sistema inmunitario intestinal es el tejido linfoide asociado a la mucosa de tracto gastrointestinal (GALT), el cual contiene el mayor número de células inmunocompetentes del organismo. Presenta en función de la especificidad (Marín y cols., 2011; Hdez y cols., 2015):

- a) una parte inductora de la respuesta inmunitaria intestinal, que es el compartimento constituido por nódulos linfoides, apéndice, PP y ganglios linfáticos mesentéricos. Es lo que se conoce como GALT organizado.
- b) una zona donde se lleva a cabo la fase efectora de la respuesta inmunitaria intestinal, siendo principalmente la lámina propia intestinal. La integran linfocitos individuales de la pared del intestino dispersos, intraepiteliales y de la lámina propia. Es conocido como GALT difuso o efector.

Además de los componentes físicos, están los moleculares (proteínas antimicrobianas) y celulares, que actúan sinérgicamente evitando la invasión de patógenos. Las células del epitelio constituyen una barrera física primaria, que es selectiva, e inician la respuesta inmune al ser el principal nexo de unión con la microbiota (Kemgang y cols., 2014).

A través de la inmunidad innata y adquirida, el organismo es capaz de tolerar los antígenos presentes en la dieta y la propia microbiota residente, además de reconocer y rechazar a aquellos patógenos. Los efectos más importantes respecto a la inmunidad adaptativa son el incremento de la producción de células secretoras de IgA, IgG e IgM como son las células B, incrementos en la IgA secretora total y específica, y la modulación de la respuesta inflamatoria intestinal (Moreno Baptista y cols., 2013). Las IgA requieren la interacción de las CD fagocíticas con las células T y B inmersas en la PP, con las células que presentan el antígeno en folículos linfoides aislados o en ganglios linfáticos mesentéricos. Esto es crucial para que tenga lugar la estimulación de las células inmunes y de la respuesta de la mucosa, actuando la IgA con el bloqueo de la unión de patógenos a la superficie del epitelio y facilitando que llegue el antígeno.

Los antígenos del lumen pueden ser captados por las células M, que los transportan a células presentadoras de antígenos (CPA) por endocitosis o fagocitosis expresándolos en la membrana plasmática donde son reconocidos por receptores de células T (TCR). Según el estímulo recibido se diferencian en linfocitos Th1, Th2 y Th3 (Ramiro-Puig y cols., 2008). También es propiciada la activación de células NK y el aumento de la secreción de interferón (IFN)- γ y TNF- α (Galdeano y cols., 2007; Ogawa y cols., 2006).

2.6. Moléculas implicadas en la interacción

La pared celular de Gram-positivas está compuesta de una capa gruesa fundamentalmente de peptidoglicano a la que se anclan polímeros secundarios como son polisacáridos, ácidos lipoteicoicos y proteínas, que le confieren a la pared propiedades específicas de especie y cepa. Estos componentes actúan directamente en la adherencia al epitelio intestinal, en la interacción bacteria-hospedador e incluso para interaccionar con los microorganismos patógenos en el hospedador (Sengupta y cols., 2013).

2.6.1. Proteínas extracelulares

Las BAL se interrelacionan con las bacterias comensales del intestino del hospedador mediante proteínas secretadas que son transportadas desde la membrana citoplasmática a las células de la mucosa y podrían ser responsables de la inhibición de microorganismos patógenos y de la modulación de la respuesta inmune (Sánchez y cols., 2009). Además, pueden inducir cambios en la expresión génica mediante la interacción probiótico-hospedador ejerciendo así un efecto beneficioso (Sánchez et al., 2008).

Las proteínas extracelulares se pueden dividir en dos grandes grupos: por un lado las que tienen un péptido señal situado en el extremo N-terminal responsable de su secreción al medio y a la superficie bacteriana, que son sintetizadas como pre-proteínas; y por otro lado, las que tienen péptido señal y dominios de unión a la superficie celular de la membrana plasmática del hospedador a la cual se anclan (Sánchez, 2010). Las pre-proteínas que presentan un péptido señal, pueden ser atacadas por peptidasas y ser liberadas o quedar retenidas en la membrana debido a la presencia de aminoácidos hidrofóbicos que están precedidos o seguidos de residuos con carga positiva (Báth y cols., 2005).

Del género *Lactobacillus*, las nucleasas son las principales proteínas secretadas. Su actividad sobre el ADN ubicado en el lumen, puede dar lugar a la formación de oligonucleótidos con carácter inmunomodulador. Además, algunos *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* secretan una serie de compuestos proteínicos solubles de pequeño tamaño que ejercen protección frente a infecciones como la listeriosis causada por *Listeria monocytogenes*. Se han observado sus efectos *in vitro*, pero muchos de estos compuestos están aún por identificar (Sánchez y cols., 2008). *L. rhamnosus* GG produce dos de las proteínas más abundantes secretadas encontradas en el sobrenadante de dicho cultivo. Son: LGG_00324 o p75 y LGG_00031 o p40, capaces de prevenir la apoptosis inducida por citocinas, establecer la homeostasis en el intestino y la prevención y tratamiento de colitis de forma experimental con la p40. (Claes y cols., 2012).

En el género *Bifidobacterium*, en el caso de *B. longum* NCIMB 8809, se han identificado cuatro proteínas que podrían tener un importante papel tanto en la fisiología

como en interacción probiótico-hospedador, como por ejemplo las serpinas que intervienen en la inflamación aguda (Sánchez y cols., 2008; Ruiz y cols., 2014). Concretamente en la cepa *B. longum* NCC2705 ha sido demostrado que éstas inhiben elastasas del páncreas y de neutrófilos, de ahí su posible participación en la inmunomodulación por parte de las bifidobacterias.

2.6.2. Proteínas de superficie

Las proteínas de superficie se encuentran ancladas a la pared bacteriana o son secretadas al medio que las rodea en el que se vuelven a asociar con la pared celular. Se caracterizan por ser moléculas de pequeño tamaño (entre 40-60 kDa) asociadas a la pared celular bacteriana. Pueden unirse a otros componentes (por ejemplo ácidos grasos de cadena larga) de la membrana del citoplasma donde reciben el nombre de lipoproteínas, o anclarse por segmentos hidrofóbicos transmembrana por enlaces covalentes a través del extremo N- o C- terminal. A la pared pueden unirse covalentemente por la acción del enzima sortasa, pero también pueden adherirse de forma no covalente, por interacciones electrostáticas mediante éstos dominios de anclaje que se componen de aminoácidos hidrofóbicos que contienen residuos cargados positivamente (Lebeer y cols., 2008; Sánchez y cols., 2008; Sánchez y cols., 2009).

Las lipoproteínas tienen un péptido señal en el extremo N-terminal, en cuya secuencia incluyen un residuo de cisteína antes del cual corta la peptidasa señal. Cuando el precursor es translocado, la prolipoproteína diacilglicerol transferasa añade un grupo diacilglicerol al grupo SH del residuo de cisteína, actúa la peptidasa señal tras la inserción de la proteína a la bicapa lipídica y ésta se ancla al ácido graso de cadena larga (Sutcliffe y cols., 2002). Están implicadas en el transporte, adhesión, resistencia a antibióticos, procesos sensoriales, homeostasis celular y en la translocación y plegamiento de proteínas (Sengupta y cols., 2013).

En las proteínas de superficie que son ancladas por acción de sortasas, se les reconoce un motivo LPXTG localizado en el extremo C-terminal del precursor, seguido de un dominio hidrófobo y una cola con residuos con carga positiva mediante los cuales se produce el anclaje. Las sortasas utilizan sustratos que funcionan como adhesinas,

internalinas, factores que evitan la coagulación y el sistema inmunológico y transportadores de nutrientes a través de la pared celular (Maresso y cols., 2008).

Dentro del género *Bifidobacterium*, se ha demostrado que algunas especies pueden interactuar con el sistema plasminógeno a través de las proteínas denominadas *moonlighting* o “proteínas pluriempleadas”, las cuales pueden ser exportadas a la superficie bacteriana sin necesidad de una señal. El plasminógeno puede activarse por la presencia de los enzimas gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) y enolasa de la superficie bacteriana, aumentando la capacidad de captación de nutrientes y la capacidad invasiva (Hurmalainen, y cols., 2007; Sánchez y cols., 2008).

Un tipo especial de proteínas asociadas a la superficie de la pared celular bacteriana de forma no covalente son las S-layer (SLp), ejerciendo su función protectora frente a patógenos. Se caracterizan por tener estructura cristalina, una sola subunidad y uno o más dominios N-terminal en algunas bacterias probióticas (Burgain y cols., 2014)

2.6.3. Ácido lipoteicoico

Los ácidos teicoicos representan el segundo mayor componente asociado a la pared celular de bacterias Gram-positivas. Son moléculas compuestas de poliglicerol fosfato o poliribitol fosfato, unidas de forma covalente a peptidoglicanos o anclados en la parte externa de la membrana citoplasmática a lípidos pasando a denominarse ácidos lipoteicoicos. De ésta forma constituyen polímeros cargados negativamente. Tanto en un caso como en otro, existen grandes diferencias según la especie y cepa, la fase de crecimiento, el pH del medio, la fuente de carbono, la disponibilidad de fosfato, etc. (Lebeer y cols., 2008; Neuhaus y cols., 2003; Sengupta y cols., 2013).

El ácido lipoteicoico tiene un papel fundamental en la fisiología y regulación de la división celular (Brown y cols., 2013). Es el que más hidrofobicidad de superficie aporta en función de las sustituciones con ésteres de D-alanina, da rigidez a la pared celular e interviene en la adhesión de la bacteria al intestino desencadenando la respuesta del sistema inmune para mantener la homeostasis. Al poder actuar con efectos tanto proinflamatorios como antiinflamatorios, es de interés su estudio para el tratamiento de distintas patologías (Brown y cols., 2013; Granato y cols., 2004). Fueron

una de las primeras moléculas efectoras de LGG estudiadas por ser considerados equivalentes de LPS de Gram-negativas en la estimulación de la respuesta del sistema inmunológico (Segers y cols., 2014).

2.6.4. ADN

El ADN bacteriano se identifica por la frecuencia de dinucleótidos no metilados de citosina-guanina (CpG) que no suelen estar presentes en eucariotas. Estos motivos CpG que interactúan con receptores tipo Toll-like-9 (TLR-9) de las células del epitelio, son potentes inductores del sistema inmunológico innato y aportan a la mucosa la propiedad de evitar la apoptosis (Marteau y cols., 2002). Rachmilewitz y cols., mediante una mezcla probiótica VSL#3 que contenía cuatro cepas de *Lactobacillus*, tres cepas de bifidobacterias y una de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* demostró que el ADN genómico no metilado tenía efectos positivos en el tratamiento de ratones con colitis inducida.

En estudios *in vitro* se ha mostrado que el procedente de diferentes cepas probióticas interviene en la activación de células NF-KB, involucradas en la activación de TLR. En estudios con ratones actúa en la actividad proliferativa del sistema inmunológico, en los que con LGG, se demostró que su ADN es capaz de inducir la proliferación de células B y estimular la respuesta Th1 siendo beneficioso en la prevención de alergias. En estudios con PBMCs obtenidos de pacientes alérgicos se vio como LGG podía modular la respuesta Th1/Th2 de forma específica. Además, más del 50% del efecto de la IgG podría ser explicado por la acción del ADN genómico (Segers y cols., 2014).

Para otros tipos de enfermedades en humanos, aún no se ha confirmado la actuación del DNA de bacterias probióticas (Rachmilewitz y cols. 2004).

2.7. Citocinas

“Las citocinas o citoquinas, son proteínas o glicoproteínas secretadas por las células inmunocompetentes, de bajo peso molecular (menos de 30 Kd) que a través de su interacción con receptores de superficie celular regulan el desarrollo o la función de

otra célula” (Elizondo y cols., 2011). Distintos tipos de células pueden dar lugar a una misma citocina, produciendo múltiples y variables efectos sobre el sistema inmunológico del hospedador (Kemgang y cols., 2014).

Las vías de señalización son activadas por las distintas moléculas de la bacteria produciendo cambios fenotípicos en las CD (principales células involucradas en la activación de receptores de inmunidad innata para la unión de microorganismos) y en la secreción de citocinas. La actuación de los probióticos sobre el sistema inmunológico adaptativo tiene efectos en las células T_{reg} , células T efectoras, células natural killer T (NKT) y células B (Frei y cols., 2015).

Los linfocitos T son los principales productores de citocinas. Se clasifican en tres subpoblaciones principales cuando son activados dando lugar a la secreción de distintas citocinas en función del tipo de estímulo en el momento de reconocimiento antigénico: Th1 que intervienen en la defensa de microorganismos, Th2 que median en reacciones alérgicas y en la defensa frente a patógenos y T reguladores (Kemgang y cols., 2014).

Algunas cepas probióticas estimulan la respuesta de células Th1, induciendo la producción de $IFN-\gamma$, $TNF-\alpha$ e IL-2 (Figura 4). Sin embargo otras, inducen la respuesta de Th2 con el consiguiente aumento de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-25. Cuando se desencadena una respuesta reguladora, los linfocitos T (Treg, Tr1 y Th3) producen IL-10 y factor de crecimiento transformante beta ($TGF-\beta$), interviniendo en el funcionamiento de las células Th1 y Th2 (Moreno y cols., 2013). Th17 es una subpoblación efectora cuya función parece estar relacionada con la defensa frente a infecciones bacterianas y fúngicas que no se han cubierto totalmente por la respuesta Th1 y Th2.

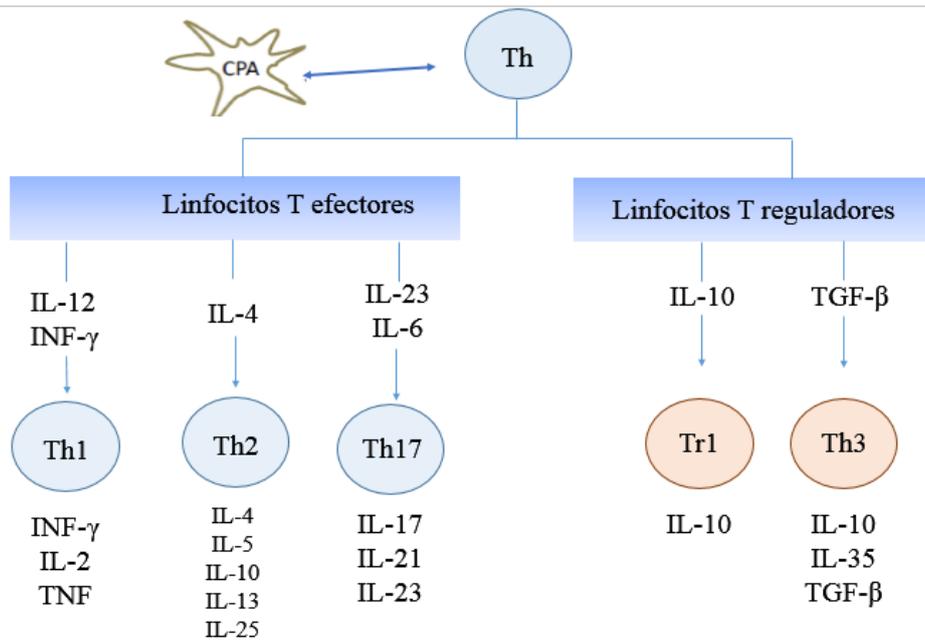


Figura 4. Diferenciación celular de linfocitos T según el tipo de estímulo y citocinas expresadas según la línea.

Como se ha visto anteriormente, la secreción de citocinas es inducida de forma específica además de según el tipo de célula, en función del tipo de especie (Kemgang y cols., 2014). *Bifidobacterium* puede ejercer un efecto antiinflamatorio por la producción de IL-10 en PBMCs, dando lugar a la disminución de IL-8. Con *B. longum* hay una disminución de TNF- α e IL-1 α y un aumento de TGF- β en las células HT-29, que participan en la regulación de la función de la barrera intestinal (Bahrami y cols., 2011). En el caso de *Lactobacillus*, la cepa LGG induce la expresión de citocinas proinflamatorias tipo Th1 TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-12p70 e INF- γ , pero no de la vía Th2 IL-4 y poco de IL-10 (Miettinen y cols., 1998).

3. Metodología aplicada

3.1. Cepas y condiciones de cultivo

Para el aislamiento de las distintas fracciones fueron empleadas tres de las principales bacterias probióticas: *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* GG (LGG), *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079^T y *Bifidobacterium longum subsp. longum* NCIMB 8809. Todas ellas se crecieron en medio MRS (Man, Rogosa y Sharpe, autores que formularon el medio) (Difco[®], Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 55 g/L, suplementado con L-cisteína al 0.05% (p/v) (MRSC) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Las cepas fueron obtenidas de stocks de la colección IPLA congeladas a -80°C en MRSC suplementado con 40% (v/v) de glicerol, que se sembraron (5 µL) por agotamiento en placas de MRSC con 1.8% (p/v) de agar (agar-MRSC; Biokar Diagnostics, Beauvois, Francia). Posteriormente, se dejaron incubar durante 48 horas a 37°C en una cabina de anaerobiosis modelo MG500 (Don Whitley Scientific, West 100 Yorkshire, UK) con una atmósfera de 10% (v/v) de H₂, 10% (v/v) de CO₂ y 80% de N₂. Tras el aislamiento de una colonia, se hicieron precultivos en MRSC (10mL) que se dejaron incubar 18 h en las condiciones descritas anteriormente. A partir de ellos (1% v/v) se inocularon volúmenes de 50 mL por triplicado para cada cepa y se dejaron incubar nuevamente a 37°C en anaerobiosis 18 h. A las 24 h posteriores los cultivos se centrifugaron a 10.000 g, a 4°C, durante 30 min [~15.880 g centrífuga Kobota (Kubota Co., Tokio, Japón) en rotor AG-6512C] y los sobrenadantes obtenidos fueron filtrados (filtros de 0.45 µm), usando MRSC como sobrenadante control.

3.2. Fraccionamiento y separación de proteínas extracelulares

Las proteínas extracelulares fueron obtenidas siguiendo el protocolo desarrollado por Sánchez y cols. 2009. Para confirmar el adecuado aislamiento de las bacterias, fueron observadas en primer lugar al microscópico óptico comprobando que se correspondía la morfología con la característica descrita para cada especie.

Los cultivos de las distintas cepas obtenidos a partir de MRSC, fueron centrifugados a 10.000 g, a 4°C durante 10 min [~15.880 g centrífuga Kobota (Kubota

Co., Tokio, Japón) en rotor AG-6512C] separando el pellet del sobrenadante, al cual se le añadieron 2 volúmenes de etanol frío y se dejaron incubar a -20°C 18 h. Tras el período de incubación, fueron centrifugadas a 10.000 g durante 10 min a 4°C y posteriormente, una vez descartado el sobrenadante, el precipitado fue purificado con dos lavados de etanol (10.000 g, 4°C, 5 min). Para el secado fue utilizado un termobloque dejándolo evaporar a 30°C. La proteína seca fue resuspendida en PBS con ayuda de un baño de ultrasonido (Ultrasons-H, JP Selecta, España) durante 15 min.

3.3. Extracción de proteínas de superficie

Las proteínas de superficie fueron extraídas a partir de los pellets anteriormente obtenidos. En primer lugar, fue añadida una solución de tampón PBS 0,01 M y dos inhibidores de proteasa, como son fenil-metilsulfonilfluoruro (PMSF) 0,2 M mezclado con metanol; y ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0,2 M a una concentración final de 5mM, el cual se mezcla con agua de alta pureza y es llevado a pH 8.5 añadiendo para ello NaOH.

A continuación, se introdujeron en un agitador rotatorio a 37 °C durante 30 min. con el máximo de ciclos (40) con el fin de homogenizar, y seguidamente fueron centrifugados a 10.000 g, a 4 °C, 10 min. El sobrenadante, que contiene las proteínas, fue filtrado con filtros de 0,45 µm y congelado a -20 ° C. Para conocer las concentraciones de proteína de cada cepa, éstas fueron obtenidas determinando la absorbancia a 280 nm en el NanoDrop 2000c de Thermo Scientific.

3.4. Extracción de ácidos lipoteicoicos

A los pellets resultantes de la extracción de proteínas de superficie, fue aplicado el protocolo Metanol/Cloroformo. En cada uno de los tubos fueron resuspendidos ordenadamente 4 ml de agua de alta pureza, 3 ml de metanol y 1 ml de cloroformo , fueron agitados en un vortex para homogenizar y se dejaron incubar 18 h en un agitador rotatorio a 37 °C, con el máximo de ciclos.

Tras las 24 h de incubación fueron centrifugados a 3.000 g durante 5 min. en un rotor basculante. La parte superior se vertió en eppendorfs con volúmenes de 1,5 ml

hasta extraerla de todas las muestras para posteriormente ser llevados a un concentrador de vacío hasta quedar totalmente secos.

3.5. Extracción de ADN

Con el objetivo de aislar el ADN, cada cepa fue crecida previamente en 10 ml de MRSC inoculadas al 1%, durante 24 h en condiciones de anaerobiosis. Para el aislamiento y purificación del ADN total se empleó el kit “*GenElute Bacterial Genomic DNA Kit*” (Sigma) siguiendo las instrucciones del fabricante. Únicamente se modificó el paso de lisis celular incluyendo una digestión previa de la pared celular con 5U/ μ L de mutanolisina (Sigma) para asegurar la digestión de la misma debido a su constitución.

3.6. PBMCs

Para la realización del análisis inmunológico, se llevó a cabo el aislamiento de células mononucleares de sangre periférica, en las que se incluyen a los linfocitos y monocitos que pueden ser aislados por centrifugación en un gradiente de densidad con Ficoll (Lymphoprep™, Oslo, Norway). Los monocitos son un componente del sistema de defensa precursores de macrófagos que desempeñan una primera línea de defensa contra infecciones, activándose por procesos inflamatorios.

Las muestras de sangre fueron obtenidas de cinco pacientes sanos que no presentaban ningún tipo de enfermedad. El aislamiento está fundamentado en las distintas densidades que presenta cada tipo de célula sanguínea. Cada muestra de sangre (5 mL) fue diluida con PBS (1/1 v) y depositada sobre Ficoll (2 v) evitando la mezcla entre la sangre y el medio de separación. A continuación, se centrifugaron en un rotor basculante Sorval ST 16 R Centrifuge (Thermo Scientific) a 1800 rpm durante 30 min.

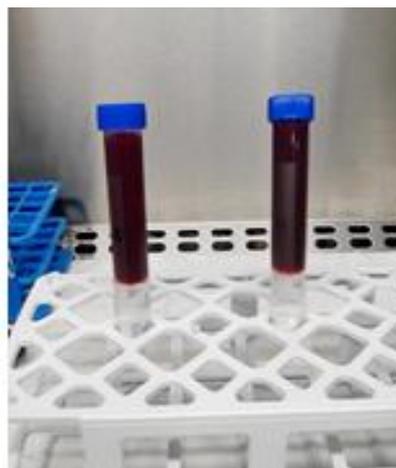


Figura 5. Separación de células por gradiente de densidad con Ficol.

Las células de la interfase que se corresponde con la fracción mononuclear (PBMCs), fue recogida y centrifugada durante 20 min. a 1200 rpm y lavada doblemente con PBS. Tras el contaje de células en una cámara de Neubauer, fue ajustado el número de células a 1×10^6 UFC/mL en el medio de cultivo RPMI 1640 suplementado con antibiótico/antifúngico, suero fetal bovino (FBS) y polimixina B.

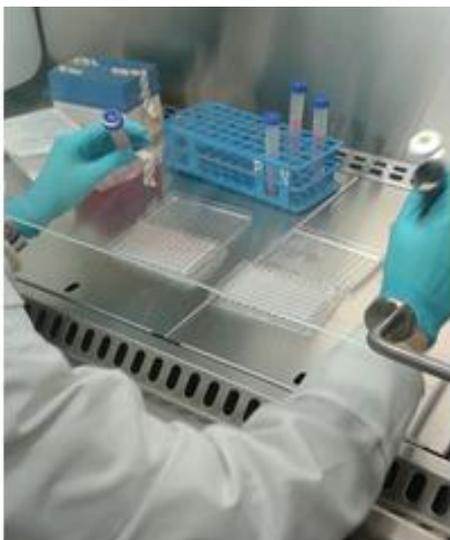


Figura 6. Preparación de la placa de 96 pocillos con las distintas fracciones de cada cepa para los 5 donantes.

Los PBMCs se incubaron a un volumen por pocillo de 200 μ l junto con las distintas fracciones de cada cepa de estudio: *L. casei subsp. rhamnosus* GG (LGG), *L. acidophilus* DSM 20079^T y *B. longum subsp. longum* NCIMB 8809, en una placa de 96 pocillos con fondo en U durante 5 días, con 5% CO₂, a 37 °C. Como controles, fueron utilizados: PBMCs no estimulado con células, medio de cultivo MRS y LPS purificado de *Escherichia coli* O111:B4 como control positivo a concentración de 125 μ g/ mL.

Cada fracción testada fue analizada por triplicado a distinta concentración (0,1 μ g/ mL, 1 μ g/ mL, 10 μ g/ mL para las proteínas extracelulares, de superficie y ácido lipoteicoico y a concentraciones de 1 μ g/ mL y 5 μ g/ mL para el ADN) y los controles por duplicado. Tras los 5 días de incubación los sobrenadantes de cada pocillo fueron traspasados a uno nuevo y almacenados a -80 °C hasta el análisis de las citocinas.

3.7. Detección de citocinas

Las concentraciones de citocinas (GM-CSF, IFN- γ , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17A, IL-18, IL-21, IL-22, IL-23, IL-27 y TNF- α) de los sobrenadantes fueron medidas con el Kit ProcartaPlex TM Immunoassay h Th1/Th2/Th9/Th17/Th22/Treg 18plex (EPX180-12165-901) de Bender MedSystems

(Viena, Austria) siguiendo las instrucciones del fabricante y mediante el citómetro Lecman.

4. Resultados experimentales y Discusión

Las cantidades de extracto seco de proteínas extracelulares, proteínas de superficie y ácido lipoteicoico obtenidas tras la realización de los cultivos bacterianos fueron medidas determinando la absorbancia a 280 nm en el NanoDrop 2000c de Thermo Scientific. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Cantidades obtenidas de las distintas fracciones de proteína extracelular, proteína de superficie y ácido lipoteicoico a partir de 50mL de cultivo para las cepas LGG, DSM y 8809.

	P. Extracelular (mg)	P. Superficie (mg)	Ác. Lipoteicoico (mg)
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	7	2	6
<i>Lb. acidophilus</i> DSM	6	4	6
<i>B. longum</i> 8809	6	2	6

Para conocer la concentración de ADN extraído fue medida espectrofotométricamente a 260 nm y la pureza fue confirmada mediante la razón A_{260}/A_{280} . (Tabla 2).

Tabla 2. Concentración obtenida de ADN para *Lb. rhamnosus* GG, *Lb. acidophilus* DSM y *B. longum* 8809.

	Concentración (ng/μl)	A_{260}/A_{280}
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	87,893	1,673
<i>Lb. acidophilus</i> DSM	145,887	1,757
<i>B. longum</i> 8809	510,878	1,592

El grado de pureza del ADN extraído de cada cepa se encontró dentro del rango considerado como ideal (1.6-2.0), excepto para la muestra 8809 donde fue ligeramente inferior, lo que indica una posible contaminación con proteínas.

El análisis de las características inmunomoduladoras de las cepas bacterianas con potencial probiótico empleadas en este estudio se llevó a cabo mediante el co-cultivo con los PBMCs aislados de cinco donantes sanos con los extractos bacterianos. Previamente se hizo un screening inicial testando tres concentraciones distintas de cada fracción para evaluar cuál de ellas era la más eficaz. Sólo la concentración más alta (10 µg/mL para proteína extracelular, de superficie y ácido lipoteicoico y 5µg/mL para el ADN) dio resultados destacables en el *Luminex*, por lo que fue la seleccionada para la realización de los análisis siguientes.

La cuantificación de las citocinas presentes en el sobrenadante fue realizada tras 5 días de incubación y los resultados se muestran en tablas en los Apéndices 1-4.

Al tratarse de un tejido biológico, la estimulación en los donantes fue variable aun considerando que todos estaban sanos. De las 18 citocinas, fueron seleccionadas cinco de ellas de tipo tanto proinflamatorio como antiinflamatorio (IL-10, TNF- α , IL-2, IL-22, IFN- γ) para comparar, dentro de cada bacteria, la producción de las distintas fracciones extracelulares y ADN. Además de las citocinas medidas individualmente, fueron determinados algunos de los ratios más empleados en bibliografía para analizar la respuesta inmune de cepas probióticas, como son IL-10/TNF- α e IL-5/IFN- γ .

Todos los datos recabados se procesaron con el programa SPSS (versión 17.0) efectuando el análisis de la varianza (ANOVA) y el test *post hoc* de Tukey para ver las diferencias significativas entre las distintas fracciones de cada cepa y el grupo control positivo y negativo, considerando $p < 0,05$ como significativo. Los valores que quedaron fuera de los límites de detección de citocinas fueron eliminados.

Para el estudio de los resultados, fueron seleccionados como control negativo el medio de cultivo RPMI y como positivo LPS. El medio MRS fue descartado puesto que

sólo se empleó para comprobar que no se había producido ningún problema en el cultivo bacteriano previo. En las Tablas 3 y 4 del Apéndice 1, se recogen las concentraciones inducidas de las citocinas para dichos controles con las cuales fueron realizadas las comparaciones con las tres cepas, siendo el análisis enfocado para determinar qué fracción extracelular dentro de cada una de ellas desarrollaba mayor inducción en el sistema inmunológico con la producción de citocinas.

- ***Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* GG (LGG)**

Los resultados obtenidos para la cepa *Lactobacillus casei* subsp. *ramnosus* GG (LGG) se recogen en las Tablas 5, 6, 7, y 8 del Apéndice 2, referentes a las distintas fracciones extraídas. En ellas se muestran los valores de las 18 citocinas medidas excluyendo aquellos que quedaron fuera de límites.

Dados los resultados adquiridos, fueron representadas en gráficos aquellas citocinas con un mayor interés desde el punto de vista de la capacidad inmunomoduladora atribuida a cepas probióticas que son las más empleadas en bibliografía: IL-10, TNF- α , IL-2, IL-22 e IFN- γ , para su comparación con los grupos control (Figura 7).

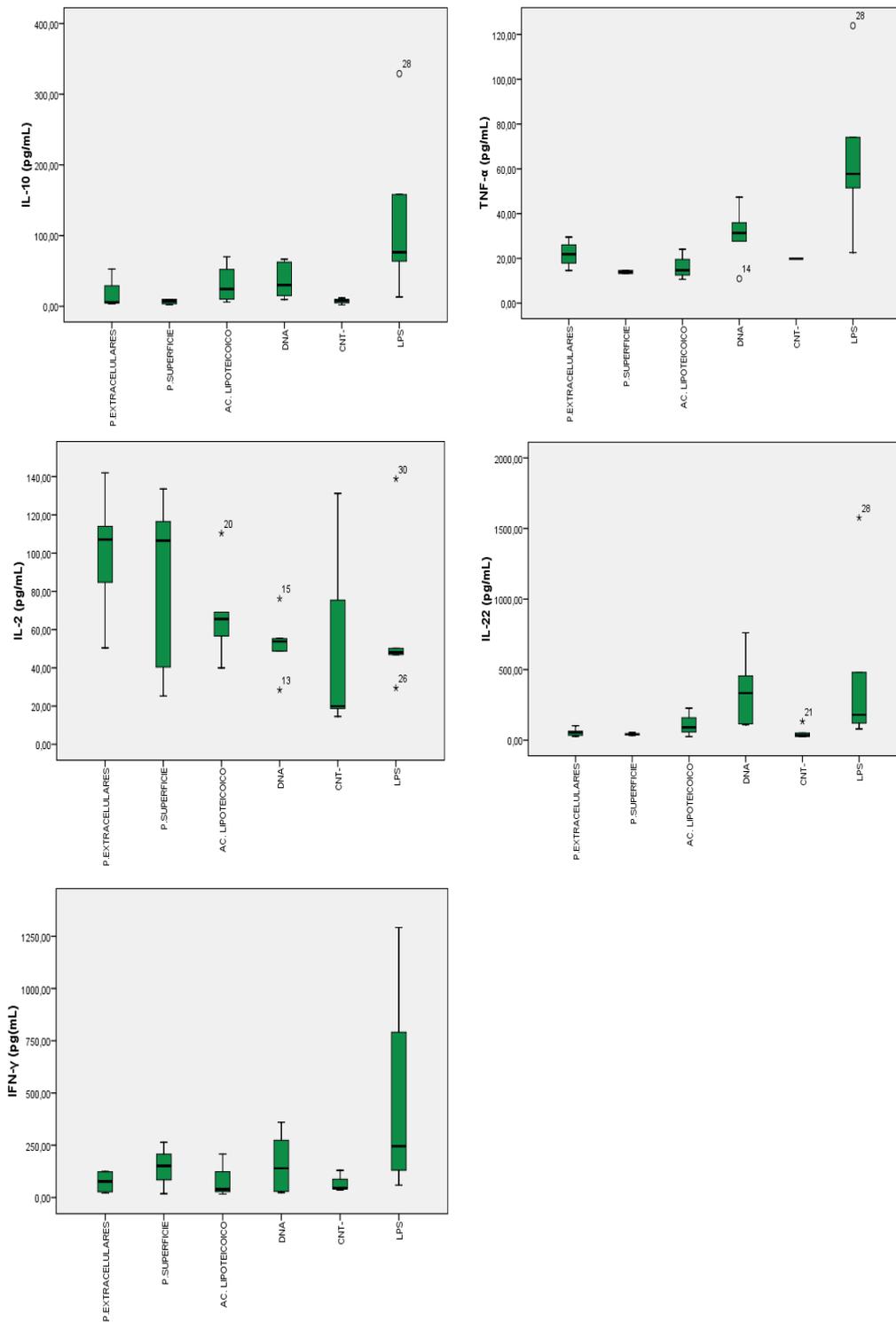


Figura 7. Representación gráfica de la producción de IL-10, TNF- α , IL-2, IL-22 e IFN- γ de sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GG (LGG), siendo expresadas las concentraciones en pg/mL.

Con la cepa LGG se observó un incremento de la citocina IL-10 respecto al control negativo fundamentalmente con el ADN, pero también con los extractos de ácido lipoteicoico y proteínas extracelulares. Del mismo modo destacó el ADN como mayor inductor por encima del control negativo de TNF- α , IL-22 e IFN- γ , aunque en este último caso también hubo secreción por parte de las proteínas de superficie. De forma significativa hubo diferencias entre grupos con IFN- γ , predominando el ADN y las proteínas de superficie en su producción. IL-2 destacó por ser secretada de forma elevada por las proteínas extracelulares y de superficie. Otros autores han demostrado que la cepa LGG induce la expresión de citocinas proinflamatorias tipo Th1 (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-18, IL-12p70 e INF- γ), pero no de la vía Th2 IL-4 y poco de IL-10 (Miettinen y cols., 1998), resultados que concuerdan con nuestros análisis.

Haciendo un análisis general, la fracción que menos manifestó resultados para las cinco citocinas fue la proteína de superficie, a excepción de IL-2 e IFN- γ .

- ***Lactobacillus acidophilus* DSM 20079^T**

En las Tablas 9, 10, 11 y 12 del Apéndice 3, se muestran los datos resultantes de las 18 citocinas producidas por las distintas fracciones extraídas de *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079^T, excluyendo los valores fuera de los límites de detección.

Las citocinas de mayor interés, previamente descritas, se representaron frente a los grupos control para ver el efecto de las distintas fracciones (Figura 8).

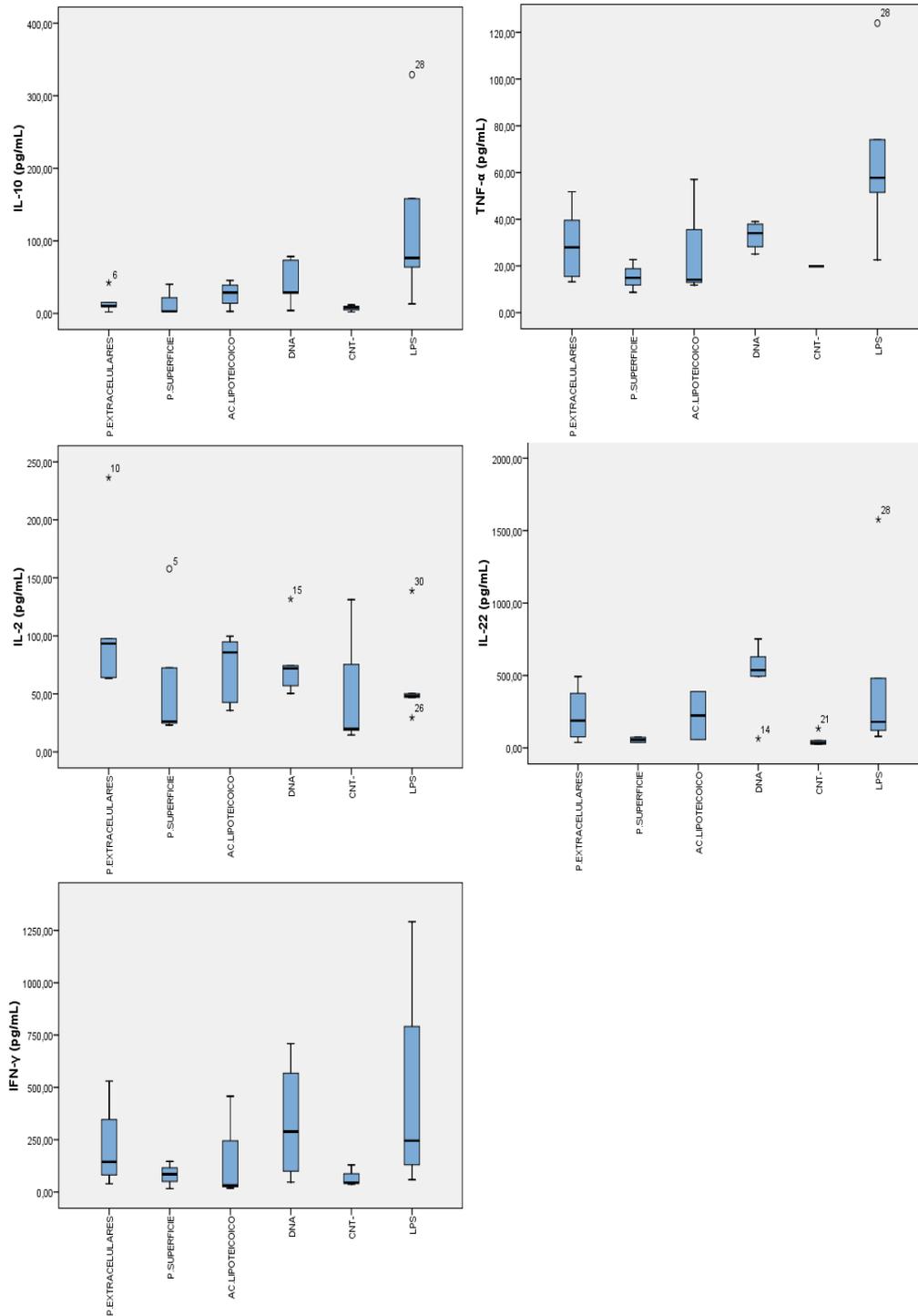


Figura 8. Representación gráfica de la producción de IL-10, TNF- α , IL-2, IL-22 e IFN- γ de sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs con *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079^T, siendo expresadas las concentraciones en pg/mL.

A diferencia de la cepa LGG, con *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079^T se experimentó por parte de las distintas fracciones extracelulares un aumento de IL-10, pero de forma más relevante de TNF- α , IL-2 e IFN- γ . Esto se relaciona con la inhibición de la producción de IL-10 a causa de la acción de éstas citocinas de tipo proinflamatorio. Estudiando uno a uno cada extracto, se vio que las proteínas extracelulares actúan en mayor medida en la secreción de IL-2 y TNF- α con respecto al grupo control, aunque también de IL-22 e IFN- γ . Con las proteínas de superficie fue levemente estimulada la IL-10 e IFN- γ , pero no se observaron grandes efectos teniendo en cuenta el grupo control. Un incremento de las cinco citocinas por encima del control se produjo con el ácido lipoteicoico, mientras que el ADN destacó del resto de fracciones por ser el mayor inductor de IL-10 e IL-22 que son de tipo inmunosupresor. Éste último también indujo el IFN- γ .

- ***Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCIMB 8809**

La producción de citocinas por cada fracción extraída de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCIMB 8809 se reflejan en las Tablas 13, 14, 15 y 16 del Apéndice 4, excluyendo los valores fuera de los límites de detección.

Los gráficos correspondientes a las citocinas seleccionadas permiten observar las diferencias obtenidas entre los extractos testados y los controles experimentales (Figura 9).

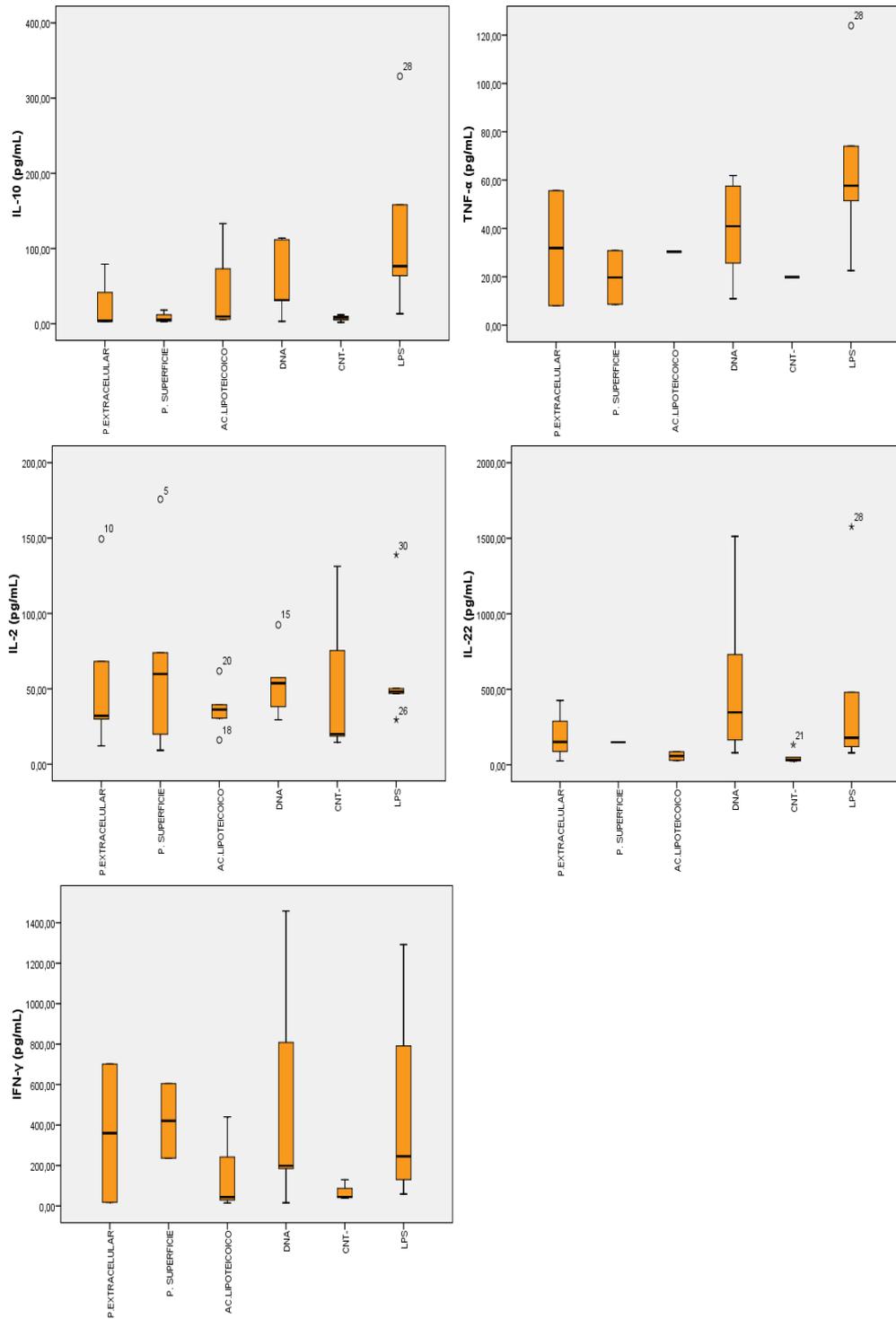


Figura 9. Representación gráfica de la producción de IL-10, TNF- α , IL-2, IL-22 e IFN- γ de sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs con *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCIMB 8809., siendo expresadas las concentraciones en pg/mL.

Con *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCIMB 8809 se vio un importante incremento respecto al resto de grupos de IL-10, de la respuesta inmune Th1 (IFN- γ e TNF- α) y Th17 (IL-22) por parte del ADN en comparación con el control negativo. IL-2 en cambio, fue mayormente secretada por proteínas de superficie y extracelulares, teniendo además estas últimas relevancia en la producción de IFN- γ y TNF- α y en menor medida de IL-10. El ácido lipoteicoico fue la fracción con inferior actividad dentro de esta cepa, a excepción de la estimulación mostrada para la interleucina IL-10. La fracción proteica de superficie indujo efectos en las citocinas de tipo proinflamatorio, es decir, IFN- γ , IL-2 e TNF- α .

Como han podido demostrar otros autores, las BAL probióticas se caracterizan por el incremento de citocinas proinflamatorias como son TNF- α , IFN- γ e IL-2, a través de células mediadoras de la respuesta tipo Th1 e IL-10, una interleucina que disminuye y regula la respuesta inflamatoria que puede ser secretada por dos vías: la Th2 induciendo una respuesta antiinflamatoria, o a través de los linfocitos T reguladores que desencadenan la respuesta reguladora (Treg, Th1 o Th3) (Moreno Baptista y cols., 2013). Los linfocitos T reguladores (Treg) ejercen su función supresora de la respuesta inmune en función de la secreción de citocinas inhibitorias, entre las que se encuentra la IL-10. IL-2 tiene también actuación en el desarrollo y diferenciación de linfocitos Tregs en el timo, produciendo la secreción de IL-10 y TGF- β (Vergara, 2009). Ésta interleucina tiene carácter proinflamatorio y es inductora de la producción de IFN- γ , el cual actúa en la maduración de células dendríticas y en el control de la proliferación celular a nivel del intestino.

En el caso de la IL-22, ésta es producida por la vía Th17 a nivel de la mucosa promoviendo su restauración, interviniendo en la respuesta antibacteriana, en el mantenimiento de la función de barrera y regulando la secreción de moco y la proliferación y regeneración de enterocitos (Aguilar-Jiménez y cols., 2011; Vergara, 2009). En las tres cepas empleadas en este estudio se observó un incremento de la IL22 con respecto al control negativo, en una u otra fracción, lo cual indica que podrían ser empleadas como buenos moduladores de la función barrera del epitelio intestinal promoviendo el mantenimiento de su homeostasis gracias a la inducción de dicha citocina.

Los receptores de reconocimiento de distintas proteínas, incluidos los tipo Toll (TLRs) y de tipo NOD, son capaces de detectar componentes bacterianos de patógenos y no patógenos permitiendo determinar cuál es el causante de una enfermedad (Brown y cols., 2015). La presencia de proteínas y otros componentes bacterianos (LPS, material de la pared celular y ácidos nucleicos), pueden inducir respuesta pro-inflamatoria en el hospedador y dar lugar a un aislamiento de células inmunes en el lugar de la infección manteniendo así la homeostasis intestinal. Se ha comprobado en algunos casos, que una sola bacteria puede inhibir o inducir respuesta en el sistema inmune humano a través de la secreción de proteínas, originando una respuesta de tipo pro- o antiinflamatoria en función del efector más abundante (Asrat y cols., 2015).

- **Determinación de los ratios: IL-10/TNF- α y IL-5/IFN- γ .**

Para conocer el efecto de cada fracción extraída de las cepas de estudio en la inducción de la citocina IL-10 y por el contrario la inhibición de TNF- α , fue determinado el ratio IL-10/TNF- α , siendo uno de los principalmente usados en bibliografía (Cherukuri y cols., 2014; Dong y cols., 2012; Pena y cols., 2003). La IL-10 tiene efectos inhibitorios sobre la respuesta inmune caracterizada por impedir las funciones de macrófagos y la producción de citocinas por los mismos. En estudios previos se ha visto que la medida de dicho ratio es un mejor indicador de antiinflamación y de la actividad reguladora de las células B que la IL-10 expresada individualmente (Cherukuri y cols., 2014).

Un segundo ratio determinado fue la relación de IL-5 e IFN- γ (IL-5/IFN- γ), ya que hay indicios de la posible regulación en la producción de IL-5 por parte de IFN- γ en estudios con PBMCs. Se trata de una citocina tipo Th2 que además de tener efectos inductores del crecimiento de células B, inhibe la producción de citocinas tipo Th1 como es el IFN- γ . Por el contrario, IFN- γ inhibe la respuesta inmune tipo Th2 y los cambios en las células B (Pohjavuori y cols., 2004).

Este ratio es utilizado en la caracterización del balance Th1/Th2 relacionado con enfermedades alérgicas. En estas patologías, la mayor secreción de IFN- γ tiene efectos supresores de la IL-5 y en general de células Th2 contribuyendo a disminuir la

activación de eosinófilos, aunque no está totalmente demostrado el efecto anti-alérgico de las bacterias probióticas (Mastrangeli y cols., 2009).

Para evaluar dicha relación antagónica anti/pro-inflamatoria, fueron recogidos los valores de cada cepa divididos por fracción en la Tabla 17 del Apéndice 5.

Considerando el ratio IL-10/TNF- α , el ADN resultó ser claro inductor de respuesta antiinflamatoria con mayores niveles de IL-10, mostrando un efecto similar en los *Lactobacillus* y levemente superior en la cepa de *Bifidobacterium*. El ácido lipoteicoico extraído de LGG fue el más potente en el balance positivo de la expresión de IL-10. Igualmente resultó ser >1 con *B. longum*. Estos resultados indican que las fracciones extracelulares más efectivas para inhibir la síntesis de citocinas proinflamatorias son el ADN y ácido lipoteicoico.

Por otra parte con el ratio IL-5/IFN- γ fue obtenido un mayor valor con los extractos proteicos extracelulares y de superficie por parte de *Lactobacillus* LGG y *Lactobacillus* DSM, respectivamente. El bajo valor para este ratio podría ser debido a que no pudieron ser utilizados los datos de todos los donantes quedando excluidos por estar fuera de límites.

5. Conclusiones

Con este proyecto se pretendía examinar el papel inmunomodulador de fracciones subcelulares extraídas de las bacterias probióticas *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GG (LGG), *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079^T y *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCIMB 8809, en co-cultivos con PBMCs aislados de 5 sujetos sanos. Para determinar el efecto sobre el sistema inmunológico de estas bacterias, consideradas unas de las más utilizadas como probióticos, fueron comparadas tres fracciones extracelulares y ADN de cada una de ellas analizando la inducción de citocinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias.

A partir de los datos obtenidos, se ha podido llevar a cabo distintas conclusiones al respecto. En primer lugar hay que destacar las grandes diferencias interindividuales existentes en la expresión de las citocinas por los donantes. Los resultados focalizados

en las cinco citocinas seleccionadas para el análisis, a diferencia de lo esperado, mostraron mayores producciones de las de tipo proinflamatorio (TNF- α , IFN- γ e IL-2) en comparación con las antiinflamatorias (IL-10 e IL-22) tras los co-cultivos de extractos con los PBMCs. Concretamente revelan que la fracción de ADN es la más inductora de ambos tipos de citocinas para las tres cepas. Este resultado de su notable respuesta era esperable, ya que para él se han descrito receptores específicos así como vías de respuesta concretas.

El ácido lipoteicoico fue la segunda fracción con más efectos en los *Lactobacillus*, mientras que de *Bifidobacterium* destacaron las proteínas de superficie y extracelulares. Esto sugiere que cada bacteria podría tener una mayor actuación en el sistema inmunológico si se selecciona la fracción que más efectos provoca para su uso como probiótico. En el caso de las fracciones proteicas podría esperarse una respuesta menor dado que el reconocimiento linfocito-proteína requiere una interacción específica con el antígeno previa. Aun así en las fracciones proteicas de *Bifidobacterium* sí se observó una respuesta inmunomoduladora del sistema inmune.

Estos resultados fueron observados tanto en la representación gráfica de los valores brutos como en el posterior cálculo de los ratios, demostrando de nuevo la actuación positiva tanto del ADN como del ácido lipoteicoico en la antiinflamación.

Como ha sido referido anteriormente, los probióticos tienen efectos beneficiosos en multitud de patologías, siendo de gran importancia la selección de la cepa adecuada para asegurar el éxito del desarrollo inmunomodulador puesto que no todas las BAL siguen el mismo patrón de producción de citocinas. Conocer y tener información sobre ello podría ser un gran avance para ayudar en el tratamiento clínico promoviendo la salud.

6. Bibliografía

Aguilar-Jiménez, W., Zapata, W., Rugeles, M.T. (2011). Participación de las células Th17 en la patogenia de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana de tipo 1. *Infectio*, 15(4): 259–267.

Al-Salami, H., Butt, G., Tucker, I., Golocorbin-Kon, S., Mikov, M. (2012). Probiotics decreased the bioavailability of the bile acid analog, monoketocholic acid, when coadministered with gliclazide, in healthy but not diabetic rats. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 37(2): 99–108.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21874525>

Andreoletti, O., Baggesen, D. L., Bolton, D., Butaye, P., Cook, P., Davies, R., y cols. (2013). Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA Journal*, 11(11): 3449. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3449>

Arumugam, M., Raes, J., Pelletier, E., Paslier, D.L., Yamada, T., Mende, D.R. y cols. (2011). Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*, 473(7346): 174-180. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3728647>

Asrat, S., Davis, K.M., Isberg, R.R. (2015). Modulation of the host innate immune and inflammatory response by translocated bacterial proteins. *Cellular Microbiology*, 17(6): 785–795.

Bäckhed, F., Fraser, C.M., Ringel, Y., Sanders, M.E., Sartor, R.B., Sherman, P.M., y cols. (2012). Defining a Healthy Human Gut Microbiome: Current Concepts, Future Directions, and Clinical Applications. *Cell Host & Microbe*, 12(5): 611-622.

Bahrami, B., Macfarlane, S., Macfarlane, G.T. (2011). Induction of cytokine formation by human intestinal bacteria in gut epithelial cell lines. *Journal of Applied Microbiology*, 110(1): 353–363.

<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2672.2010.04889.x>

Báth, K., Roos, S., Wall T., Jonsson, H. (2005). The cell surface of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 highlighted by identification of 126 extracellular proteins from the genome sequence. *FEMS Microbiology Letters*, 253: 75-82.

Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Muñoz-Quezada, S., Gómez-Llorente, C., Gil, A. (2012). Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutrition and Metabolism*, 61(2): 160-174.

Brown, S., Santa Maria, J.P., Walker, S. (2013). Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 67: 313-336.

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC3883102>

Brunser T., O. (2013). El desarrollo de la microbiota intestinal humana, el concepto de probiótico y su relación con la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 40(3): 283-289.

Burgain, J., Scher, J., Francius, G., Borges, F., Corgneau, M., Revol-Junelles, A.M., y cols. (2014). Lactic acid bacteria in dairy food: Surface characterization and interactions with food matrix components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 213:21–35. <http://doi.org/10.1016/j.cis.2014.09.005>

Candela, M., Bergmann, S., Vici, M., Vitali, B., Turrone, S., Eikmanns, B.J. y cols. (2007). Binding of human Plasminogen to Bifidobacterium. *Journal of Bacteriology*, 189(16):5929–5936. <http://doi.org/10.1128/JB.00159-07>

Cherukuri, A., Rothstein, D.M., Clark, B., Carter, C.R., Davison, A., Hernandez-Fuentes, M., y cols. (2014). Immunologic human renal allograft injury associates with an altered IL-10/TNF- α expression ratio in regulatory B cells. *Journal of the American Society of Nephrology: JASN*, 25(7): 1575–1585.

<http://doi.org/10.1681/ASN.2013080837>

Chiba, Y., Shida, K., Nagata, S., Wada, M., Bian, L., Wang, C. y cols. (2010). Well-controlled proinflammatory cytokine responses of Peyer's patch cells to probiotic *Lactobacillus casei*. *Immunology*, 130(3): 352-362. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03204.x>

Claes, I.J.J., Schoofs, G., Regulski, K., Courtin, P., Chapot-Chartier, M.-P., Rolain, T., y cols. (2012). Genetic and biochemical characterization of the cell wall hydrolase activity of the major secreted protein of *Lactobacillus rhamnosus* GG. *PLoS One*, 7(2): e31588. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0031588>

Collado, C.M., Meriluoto, J., Salminen, S. (2007). In vitro analysis of probiotic strain combinations to inhibit pathogen adhesion to human intestinal mucus. *Food Research International*, 40(5): 629–636. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2006.11.007>

Davis, C.D., Milner, J.A. (2009). Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 20(10): 743-752. <http://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2009.06.001>

De Vrese, M., Marteau, P.R. (2007). Probiotics and Prebiotics: Effects on diarrhea. *The Journal of Nutrition*, 137(3 Suppl 2): 803S–811S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17311979>

Delcenserie, V., Martel, D., Lamoureux, M., Amiot, J., Boutin, Y., Roy, D. (2008). Immunomodulatory effects of Probiotics in the intestinal tract. *Current Issues in Molecular Biology*, 10:37–54. <http://www.cimb.org>

Dong, H., Rowland, I., Yaqoob, P. (2012). Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *British Journal of Nutrition*, 108(03):459–470. <http://doi.org/10.1017/S0007114511005824>

Duncan, S.H., Louis, P., Flint, H.J. (2007). Cultivable bacterial diversity from the human colon. *Letters in Applied Microbiology*, 44(4): 343-350. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02129.x>

Elizondo O.J.E., Treviño F.A.C., Rocha P. M. del R., Álvarez, M.M. (2011). Análisis proteómico de expresión de citocinas en líquido crevicular gingival de portadores de VIH/SIDA. *Revista Mexicana de Periodontología*, 2(3): 88-96.

FAO/WHO (2006). Probiotics in food: health and nutritional properties and guidelines for evaluation. *FAO Nutrition Paper*, No. 85 (ISSN 0254-4725).

Fink, L.N., Zeuthen, L.H., Christensen, H.R., Morandi, B., Frøkiær, H. (2007). Distinct gut-derived lactic acid bacteria elicit divergent dendritic cell-mediated NK cell responses. *International Immunology*, 19(12): 1319–1327. <http://doi.org/10.1093/intimm/dxm103>

Frei, R., Akdis, M., O'Mahony, L. (2015). Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system. *Current Opinion in Gastroenterology*, 31(2): 153–158. <http://doi.org/10.1097/MOG.0000000000000151>

Galdeano, C.M., de Moreno de LeBlanc, A., Vinderola, G., Bonet, M.E.B, Perdígón, G. (2007). Proposed Model: Mechanisms of Immunomodulation induced by Probiotic Bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*, 14(5):485-492. <http://doi.org/10.1128/CVI.00406-06>

Gallego, C.G., Salminen, S. (2016). Novel Probiotics and Prebiotics: How Can They Help in Human Gut Microbiota Dysbiosis?. *Applied Food Biotechnology*, 3(2):72-81.

Gerritsen, J., Smidt, H., Rijkers, G.T., de Vos, W.M. (2011). Intestinal microbiota in human health and disease: The impact of probiotics. *Genes & Nutrition*, 6(3): 209-240. <http://doi.org/10.1007/s12263-011-0229-7>

Gibson, G.R., Scott, K.P., Rastall, R.A., Tuohy, K.M., Hotchkiss, A., Dubert-Ferrandon, A. y cols. (2010). Dietary prebiotics: Current status and new definition. *Food Science & Technology Bulletin: Functional Foods*, 7 (1):1–19.

<http://doi.org/10.1616/1476-2137.15880>

Granato, D., Bergonzelli, G.E., Pridmore, R.D., Marvin, L., Rouvet, M., Corthésy-Theulaz, I.E. (2004). Cell surface-associated elongation factor Tu Mediates the attachment of *Lactobacillus johnsonii* NCC533 (La1) to human intestinal cells and mucins. *Infection and Immunity*, 72(4):2160-2169.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15039339>

Greene, J.D., Klaenhammer, T.R. (1994). Factors involved in adherence of lactobacilli to human Caco-2 cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12):4487-4494.

Guarner, F., Requena, T., Marcos, A. (2010). Consensus statements from the workshop “ Probiotics and health: Scientific Evidence”. *Nutr Hosp.*, 25(5):700-704.

<http://doi.org/10.3305/nh.2010.25.5.4844>

Hdez., A.H., Coronel, C.R., Zamorano, M.M, Herrera, C.Q. (2015). Microbiota, Probióticos, Prebióticos y Simbióticos. *Pediatría Integral*, 19(5): 337-354.

Heller, K.J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(Supl 2):374S-379S.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157344>

Herich, R., Levkut, M.(2002). Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. *Veterinarni Medicina*, 47(6): 169–180.

<http://doi.org/10.1371/journal.pone.0043928>.

Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B., Margolles, A. (2015). Molecular players involved in the interaction between beneficial bacteria and the immune system. *Frontiers in Microbiology*, 6:1285. <http://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01285>

Hevia, A., López, P., Suárez, A., Jacquot, C., Urdaci, M.C., Margolles, A., Sánchez, B. (2014). Association of levels of antibodies from patients with inflammatory bowel disease with Extracellular proteins of food and Probiotic bacteria. *BioMed Research International*, vol. 2014 (ID 351204). <http://doi.org/10.1155/2014/351204>

Hurmalainen, V., Edelman, S., Antikainen, J., Baumann, M., Lahteenmaki, K., Korhonen, T.K. (2007). Extracellular proteins of *Lactobacillus crispatus* enhance activation of human plasminogen. *Microbiology*, 153(4): 1112–1122. <http://doi.org/10.1099/mic.0.2006/000901-0>

Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H., Salminen, S. (2001). Probiotics: Effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2): 444S–450S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157355>

Jagadeesh, K.S. (2015). Lactic acid bacteria as a source of functional ingredients. *South Indian Journal of Biological Sciences*, 1(2):70-71. (ISSN:2454-4787)

Kandler, O. (1983). Carbohydrate metabolism in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 49(3): 209–224. <http://doi.org/10.1007/BF00399499>

Kemgang, T.S., Kapila, S., Shanmugam, V.P., Kapila, R. (2014). Cross-talk between probiotic lactobacilli and host immune system. *Journal of Applied Microbiology*, 117(2): 303–319. <http://doi.org/10.1111/jam.12521>

Khandelwal, P., Bustos, G.F., Barreto, C.M.T., Upendra, R.S. (2015). Lactic Acid Bacteria: General Characteristics, Food Preservation and Health Benefits. Montet, D., Ray, R.C. (eds). En: *Fermented foods, Part I: Biochemistry and biotechnology*, 1st edition. Publisher: CRC Press, Taylor & Francis Group, London, NY. (ISBN 9781498740791)

Kobyliak, N., Conte, C., Cammarota, G., Haley, A.P., Styriak, I., Gaspar, L., y cols. (2016). Probiotics in prevention and treatment of obesity: A critical view. *Nutrition & Metabolism*, 13(1): 14. <http://doi.org/10.1186/s12986-016-0067-0>

Leahy, S.C., Higgins, D.G., Fitzgerald, G.F., Sinderen, D. (2005). Getting better with bifidobacteria. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6):1303–1315. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2005.02600.x>

Leathwood, P.D., Richardson, D.P., Sträter, P., Todd, P.M., van Trijp, H.C.M. (2007). Consumer understanding of nutrition and health claims: Sources of evidence. *The British Journal of Nutrition*, 98(3), 474–484. <http://doi.org/10.1017/S000711450778697X>

Lebeer, S., Vanderleyden, J., Sigrid C. J. De Keersmaecker. (2008). Genes and molecules of Lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 72(4):728-764. <http://doi.org/10.1128/MMBR.00017-08>

Liévin, V., Peiffer, I., Hudault, S., Rochat, F., Brassart, D., Neeser, J.-R., Servin, A.L. (2000). *Bifidobacterium* strains from resident infant human gastrointestinal microflora exert antimicrobial activity. *Gut*, 47(5):646–652. <http://doi.org/10.1136/gut.47.5.646>

Manzano, C., Estupiñán, D., Poveda, E. (2012). Efectos clínicos de los pobióticos: qué dice la evidencia. *Revista Chilena de Nutrición*, 39(1): 98-110. <http://doi.org/10.4067/S0717-75182012000100010>

Marco, M.L., Pavan, S., Kleerebezem, M. (2006). Towards understanding molecular modes of probiotic action. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2): 204–210. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.02.005>

Maresso, A.W., Schneewind, O. (2008). Sortase as a target of Anti-Infective therapy. *Pharmacological Reviews*, 60(1): 128–141. <http://doi.org/10.1124/pr.107.07110>

Marín B.F., Cepeda S.A., Martín E.M., Rodríguez F.E., Vidal C.M, Becerril M.C., (2011). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) sobre el papel de la nutrición en las enfermedades

autoinmunes. *Revista del Comité Científico de la AESAN*, No 13:9-28 (ISSN 1885-6586).

Marteau, P., Seksik, P., Jian, R., (2002). Probiotics and health: New facts and ideas. *Current Opinion in Biotechnology*, 13(5): 486–489. [http://doi.org/10.1016/S0958-1669\(02\)00368-3](http://doi.org/10.1016/S0958-1669(02)00368-3)

Mastrangeli, G., Corinti, S., Butteroni, C., Afferni, C., Bonura, A., Boirivant, M., y cols., (2009). Effects of Live and Inactivated VSL#3 Probiotic Preparations in the Modulation of in vitro and in vivo Allergen-Induced Th2 Responses. *International Archives of Allergy and Immunology*, 150(2): 133–143.
<http://doi.org/10.1159/000218116>

Miettinen, M., Matikainen, S., Vuopio-Varkila, J., Pirhonen, J., Varkila, K., Kurimoto, M., Julkunen, I. (1998). Lactobacilli and Streptococci induce Interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infection and Immunity*, 66(12): 6058-6062.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9826398>

Mikov, M.M., Stojančević, M.P., Bojić, G.M. (2014). Probiotics as a promising treatment for inflammatory bowel disease. *Hospital Pharmacology*, 1(1):52–60 (ISSN 2334-9492).

Moreno Baptista, R., Osorio, E.S., Maldonado, C.P., Jiménez, J.M. (2013). Capacidad inmunomoduladora de cepas potencialmente probióticas de *Lactobacillus* aisladas de leche materna y heces de lactante. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 33: 24–27.

Neuhaus, F.C., Baddiley, J. (2003). A continuum of anionic charge: Structures and functions of d-alanyl-teichoic acids in gram-positive bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 67(4): 686-723.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14665680>

Nicholson, J.K., Holmes, E., Kinross, J., Burcelin, R., Gibson, G., Jia, W., Pettersson, S. (2012). Host-gut Microbiota metabolic interactions. *Science*, 336(6086): 1262–1267.

Ogawa, T., Asai, Y., Tamai, R., Makimura, Y., Sakamoto, H., Hashikawa, S., Yasuda, K. (2006). Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clinical and Experimental Immunology*, 143(1): 103-109. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02975.x>

Olveira, F.G., González-Molero, I. (2007). Probióticos y prebióticos en la práctica clínica. *Nutrición Hospitalaria*, 22 (Supl 2):26-34.

Orla-Jensen, M. (1924). La classification des bacteries lactiques. *HAL*, 4 (36):468-474.

Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S., Kim, H.-Y. (2006). Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *Journal of Applied Microbiology*, 100(6): 1171–1185. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.02963.x>

Pena, J.A., Versalovic, J. (2003). *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF-alpha production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cellular Microbiology*, 5(4): 277–285. <http://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2003.t01-1-00275.x>

Pohjavuori, E., Viljanen, M., Korpela, R., Kuitunen, M., Tiittanen, M., Vaarala, O., y cols. (2004). Lactobacillus GG effect in increasing IFN-g production in infants with cow's milk allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 114(1): 131-136. <http://doi.org/10.1016/j.jaci.2004.03.036>

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., y cols. (2010). A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*, (1)464(7285): 59-65. <http://doi.org/10.1038/nature08821>

Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reinus, C., Rudensky, B. (2004). Toll-Like Receptor 9 Signaling Mediates the Anti-inflammatory Effects of Probiotics in Murine Experimental Colitis. *Gastroenterology*, 126: 520-528.

Ramiro-Puig, E., Pérez-Cano, F.J., Castellote, C., Franch, A., Castell, M. (2008). El intestino: Pieza clave del sistema inmunitario. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 100(1): 29–34. <http://doi.org/10.4321/S1130-01082008000100006>

Rijkers, G.T., Bengmark, S., Enck, P., Haller, D., Herz, U., Kalliomaki, M. y cols. (2010). Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics: Current Status and Recommendations for Future Research. *Journal of Nutrition*, 140(3): 671S–676S. <http://doi.org/10.3945/jn.109.113779>

Rodríguez, J.M. (2015). Probióticos: Del laboratorio al consumidor. *Nutrición Hospitalaria*, 31(1): 33-47. <http://doi.org/10.3305/nh.2015.31.sup1.8705>

Rodríguez, J.M., Sobrino, O.J., Marcos, A., Collado, M.C., Pérez-Martínez, G., Martínez-Cuesta, M.C., Peláez, C., Requena, T. (2013). ¿Existe una relación entre la microbiota intestinal, el consumo de probióticos y la modulación del peso corporal?. *Nutrición Hospitalaria*, 28(Supl 1): 3-12. <http://www.nutricionhospitalaria.com/pdf/6407.pdf>

Rowland, I. (2004). Probiotics and colorectal cancer risk. *British Journal of Nutrition*, 91: 805–807. www.journals.cambridge.org/abstract_S0007114504001011

Roy, D. (2001). Media for the isolation and enumeration of bifidobacteria in dairy products. *International Journal of Food Microbiology*, 69: 167-182.

Ruiz, L., Hevia, A., Bernardo, D., Margolles, A., Sánchez, B. (2014). Extracellular molecular effectors mediating probiotic attributes. *FEMS Microbiology Letters*, 359(1): 1-11. <http://doi.org/10.1111/1574-6968.12576>

Saez-Lara, M.J., Gomez-Llorente, C., Plaza-Diaz, J., Gil, A. (2015). The role of Probiotic Lactic acid bacteria and Bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: A systematic review of Randomized human clinical trials. *BioMed Research International*, 2015: 505878. <http://doi.org/10.1155/2015/505878>

Salminen S., Von Wright A., Ouwehand A. (eds). (2004). Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. 3rd edition. Publisher: CRC Press, New York: Marcel Dekker, Inc. (ISBN: 0-8247-5332-1)

Sánchez, B., Bressollier, P., Chaignepain, S., Schmitter, J-M., Urdaci, M. (2009). Identification of surface-associated proteins in the probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, 19:85-88.

Sánchez, B., Bressollier, P., Urdaci, M. (2008). Exported proteins in probiotic bacteria: adhesion to intestinal surfaces, host immunomodulation and molecular cross-talking with the host. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 54(1): 1-17.

Sánchez, B., Chaignepain, S., Schmitter, J.M, Urdaci, M.C. (2009). A method for the identification of proteins secreted by lactic acid bacteria grown in complex media. *FEMS Microbiology Letters*, 295(2): 226–229.

Sánchez, B., Urdaci, M.C., Margolles, A. (2010). Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa–bacteria interactions. *Microbiology*, 156: 3232-3242.

Sanders, M.E., Guarner, F., Guerrant, R., Holt, P.R., Quigley, E.M., Sartor, B.R., y cols. (2013). An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*, 62(5): 787–796.

Segers, M.E., Lebeer, S. (2014). Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG - host interactions. *Microbial Cell Factories*, 13(Supl 1): S7. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-13-S1-S7>

Sekirov, I., Russell, S.L., Antunes, L.C.M., Finlay, B.B. (2010). Gut Microbiota in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 90(3): 859-904.

Sengupta, R., Altermann, E., Anderson, R.C., McNabb, W.C., Moughan, P.J., Roy, N.C., (2013). The Role of Cell Surface Architecture of Lactobacilli in Host-Microbe Interactions in the Gastrointestinal Tract. *Mediators of Inflammation*, Article ID 237921, <http://doi.org/10.1155/2013/237921>

Stackebrandt, E., Teuber, M. (1988). Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3): 317–324.

Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, B.P., Ross, P.R. (2001). Market potential for probiotics. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73(2): 476–483.

Sutcliffe, I.C, Harrington, D.J. (2002). Pattern searches for the identification of putative lipoprotein genes in gram-positive bacterial genomes. *Microbiology*, 148(7):2065–2077. <http://doi.org/10.1099/00221287-148-7-2065>

Tortora, G.J., Funke, B.R., Case, C.L. (2007). Bacterias Gram Positivas. En: *Introducción a la Microbiología.*, 9th edition. Publisher: Panamericana, Buenos Aires, Argentina (ISBN: 978-950-06-0740-7)

Valcheva, R., Dieleman, L.A., Morris, A. P., Voight, B. F., Teslovich, T. M., Ferreira, T y cols. (2016). Prebiotics: Definition and protective mechanisms. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 30(1): 27-37. <http://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.008>

Vanegas, M.C., González, L.M., Arévalo, S.A. (2010). Antibiotic activity of Bifidobacterium sp. isolated from breast milk and newborn faeces, against the main causes for foodborne illnesses. *Infectio*, 14(4): 241–247.

Vélez, M. P., De Keersmaecker, S. C. J., Vanderleyden, J., Aleljung, P., Shen, W., Rozalska, B y cols. (2007). Adherence factors of *Lactobacillus* in the human gastrointestinal tract. *FEMS Microbiology Letters*, 276(2): 140–148.

<http://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00908.x>

Vergara C, U. (2009). Linfocitos T reguladores y respuesta inmune. *Avances en Ciencias Veterinarias*, 24(1 y 2): 72-79.

Watanabe, S., Narisawa, Y., Arase, S., Okamatsu, H., Ikenaga, T., Tajiri, Y., Kumemura, M. (2003). Differences in fecal microflora between patients with atopic dermatitis and healthy control subjects. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(3): 587–591. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12642841>

Winn (h.), Allen, Janda, Koneman, Procop, Schreckenberger, Woods. (2006). Capítulo 14. Especies de *Lactobacillus*. En: Diagnóstico microbiológico, Texto y Atlas en color, 6th edition. Publisher: Panamericana, Buenos Aires, Argentina (ISBN: 978-950-06-0895-4)

Yang, S.-C., Chen, J.-Y., Shang, H.-F., Cheng, T.-Y., Tsou, S. C., & Chen, J.-R. (2005). Effect of synbiotics on intestinal microflora and digestive enzyme activities in rats. *World Journal of Gastroenterology*, 11(47): 7413-7417.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16437710>

Yépez, L., Tenea, G.N. (2015). Genetic diversity of lactic acid bacteria strains towards their potential probiotic application. *Romanian Biotechnological Letters*, 20(2), 10191–10199.

Yu, L. C.-H., Wang, J.-T., Wei, S.-C., & Ni, Y.-H. (2012). Host-microbial interactions and regulation of intestinal epithelial barrier function: From physiology to pathology. *World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology*, 3(1):27-43. <http://doi.org/10.4291/wjgp.v3.i1.27>

7. Apéndices

Apéndice 1

Tabla 3. Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con medio de cultivo RPMI utilizado como control negativo.

Control negativo					
	1	2	3	4	5
GM-CSF	96,38	6,41	8,04	4,64	32,55
INF-γ	129,70	3,60	37,61	1,99	44,84
IL-1β	8,13	1,81	0,71	1,19	0,20
IL-2	75,37	18,72	19,97	14,58	131,23
IL-4	9,04	0	2,82	1,09	2,82
IL-5	38,36	1,02	1,85	1,02	2,63
IL-6	1143,26	15,72	102,31	14,24	433,44
IL-9	70,40	0	4,58	1,90	7,49
IL-10	7,89	1,20	11,88	1,05	1,99
IL-12p70	0,37	0	0	0	0,52
IL-13	491,11	0,43	23,00	1,98	92,52
IL-17A	4,89	0	0	0	0,20
IL-18	144,59	17,65	18,90	1,30	34,33
IL-21	15,36	0	2,65	0	0
IL-22	132,70	26,00	23,71	34,70	50,64
IL-23	0	0	0	3,46	1,65
IL-27	28,53	36,93	19,82	0	10,61
TNF-α	19,88	0,85	1,34	0,85	1,34

Tabla 4. Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con LPS utilizado como control positivo.

Control positivo (LPS)					
	1	2	3	4	5
GM-CSF	1587,52	2629,50	3306,66	162,19	843,91
INF-γ	201,57	58,73	1291,84	3,44	289,54
IL-1β	1692,25	1819,52	1560,61	239,55	352,53
IL-2	29,43	46,98	50,20	48,16	138,84
IL-4	27,83	53,23	77,61	7,76	30,85
IL-5	10,20	9,68	77,27	22,67	26,44
IL-6	10225,00	10225,00	10225,00	10225,00	10225,00
IL-9	1,13	8,14	50,91	213,89	79,99
IL-10	63,84	158,17	329,05	13,21	76,48
IL-12p70	1,42	1,18	0,67	0,36	0,97
IL-13	18,27	102,90	465,06	125,93	608,05
IL-17A	14,68	21,24	101,16	25,80	24,72
IL-18	29,06	61,93	191,28	37,12	202,22
IL-21	1,83	2,67	7,38	38,01	21,83
IL-22	179,34	120,85	1575,67	79,21	480,35
IL-23	95,76	22,94	5,41	13,54	16,78
IL-27	0	5,47	16,71	19,82	19,82
TNF-α	57,72	74,06	123,92	22,60	51,48

Apéndice 2

Tabla 5. Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de proteínas extracelulares de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GG (LGG).

Proteínas Extracelulares						
	1	2	3	4	5	MEDIA
GM-CSF	175,00	128,00	82,00	-	198,00	145,75
INF-γ	120,42	33,59	124,7	-	21,45	75,05
IL-1β	19,12	45,19	15,99	3,04	22,15	21,10
IL-2	84,75	114,00	107,1	50,45	141,97	99,66
IL-4	-	-	-	-	-	-
IL-5	57,67	28,23	20,57	-	26,07	33,14
IL-6	6294,5	10225,	3253,	50,20	2109,3	4386,56
IL-9	256,48	62,65	12,47	-	124,45	114,01
IL-10	52,65	5,70	3,40	-	5,60	16,84
IL-12p70	-	-	-	-	-	-
IL-13	415,09	240,38	138,5	7,19	433,58	246,96
IL-17A	69,79	7,82	3,79	-	2,49	20,97
IL-18	116,12	84,27	96,81	-	122,99	105,05
IL-21	22,59	-	27,73	-	8,91	19,74
IL-22	102,02	53,09	27,87	33,86	63,77	56,12
IL-23	-	-	89,31	-	-	89,31
IL-27	-	-	27,23	-	-	27,23
TNF-α	29,50	14,58	21,15	-	22,57	21,95

* Los “-“ representan aquellos datos fuera del rango del límite de detección para la correspondiente citocina.

Tabla 6. Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de proteínas de superficie de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GG (LGG).

	Proteínas de Superficie					MEDIA
	1	2	3	4	5	
GM-CSF	63,81	68,80	44,97	-	15,88	48,37
INF-γ	264,4	151,54	17,89	-	-	144,63
IL-1β	-	28,59	26,92	-	-	19,22
IL-2	116,5	106,58	25,26	40,4	133,53	84,47
IL-4	-	-	-	-	-	-
IL-5	18,13	15,13	-	-	-	16,63
IL-6	934,0	7219,2	2406,4	36,3	245,62	2168,35
IL-9	35,85	34,88	-	-	11,74	27,49
IL-10	9,68	9,84	2,19	-	5,15	6,72
IL-12p70	-	-	-	-	-	-
IL-13	192,2	165,81	41,91	14,1	78,24	98,47
IL-17A	6,34	8,03	2,78	-	-	5,72
IL-18	61,53	76,44	17,88	-	16,10	42,99
IL-21	-	-	-	-	-	-
IL-22	53,09	40,12	-	-	33,86	42,36
IL-23	-	-	-	-	-	-
IL-27	-	-	-	-	-	-
TNF-α	14,58	13,24	-	-	-	13,91

* Los “-” representan aquellos datos fuera del rango del límite de detección para la correspondiente citocina.

Tabla 7. Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de ácido lipoteicoico de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GG (LGG).

	Ácido Lipoteicoico					MEDIA
	1	2	3	4	5	
GM-CSF	351,50	98,84	128,00	15,88	103,05	139,45
INF-γ	207,88	39,52	16,12	-	-	87,84
IL-1β	50,60	78,85	84,34	28,28	30,69	54,55
IL-2	69,06	65,55	39,96	56,62	110,35	68,31
IL-4	-	-	-	-	-	-
IL-5	26,11	27,52	18,72	10,20	-	20,64
IL-6	10225,	10225,	6682,49	2871,73	6302,54	7261,35
IL-9	198,73	12,85	69,53	122,38	179,50	116,60
IL-10	34,57	14,20	5,99	-	70,02	31,20
IL-12p70	-	-	-	-	-	-
IL-13	348,11	129,58	123,70	104,30	196,87	180,51
IL-17A	47,43	22,98	29,75	18,20	23,15	28,30
IL-18	114,92	57,48	44,06	29,59	48,97	59,00
IL-21	17,72	-	-	9,91	15,88	14,50
IL-22	226,94	-	-	25,44	90,46	114,28
IL-23	-	-	-	-	-	-
IL-27	-	-	-	-	-	-
TNF-α	24,05	15,03	14,35	-	10,66	16,02

* Los “-” representan aquellos datos fuera del rango del límite de detección para la correspondiente citocina.

Tabla 8. Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con el ADN de *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* GG (LGG).

	ADN					MEDIA
	1	2	3	4	5	
GM-CSF	888,93	1500,72	672,15	134,48	386,33	716,52
INF-γ	360,47	273,59	29,30	23,69	139,54	165,32
IL-1β	218,29	444,48	408,05	161,84	309,47	308,43
IL-2	53,79	55,28	28,41	48,75	76,15	52,48
IL-4	22,01	32,53	13,82	-	-	22,79
IL-5	41,25	33,79	30,60	10,20	55,70	34,31
IL-6	10225,00	10225,00	10225,00	10225,00	10225,00	10225,00
IL-9	37,78	29,57	-	129,01	129,01	81,34
IL-10	62,45	66,76	14,98	9,59	30,03	36,76
IL-12p70	-	-	-	-	-	-
IL-13	6,46	6,46	-	-	6,16	6,36
IL-17A	56,03	40,82	5,06	45,90	60,20	41,60
IL-18	33,26	41,65	-	-	16,10	30,34
IL-21	-	-	-	8,91	9,91	9,41
IL-22	761,69	454,99	109,35	116,05	333,25	355,07
IL-23	-	-	-	-	-	-
IL-27	-	-	-	-	-	-
TNF-α	35,88	47,35	27,67	10,94	31,34	30,64

* Los “-“ representan aquellos datos fuera del rango del límite de detección para la correspondiente citocina.

Apéndice 3

Tabla 9. Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de proteínas extracelulares de *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079^T.

Proteínas Extracelulares						
	1	2	3	4	5	MEDIA
GM-CSF	1082,00	190,00	286,00	30,00	225,00	362,60
INF-γ	529,84	39,37	163,60	-	124,00	214,20
IL-1β	146,57	268,91	138,29	71,22	51,10	135,22
IL-2	97,67	63,31	93,43	64,13	236,26	110,96
IL-4	27,37	-	12,02	-	-	19,69
IL-5	51,84	20,34	66,45	14,03	15,92	33,72
IL-6	10225,00	10225,00	10225,00	10225,00	10225,00	10225,00
IL-9	218,94	13,79	88,82	147,37	98,56	113,50
IL-10	42,22	15,11	9,25	2,01	10,27	15,77
IL-12p70	-	-	-	-	-	-
IL-13	657,70	56,95	287,99	121,85	312,33	287,36
IL-17A	152,99	16,57	33,77	2,57	20,78	45,34
IL-18	178,07	47,96	128,87	31,97	108,38	99,05
IL-21	16,73	-	27,73	12,90	9,41	16,69
IL-22	492,89	-	260,49	37,71	116,05	226,79
IL-23	-	-	42,54	-	-	42,54
IL-27	-	-	-	-	-	-
TNF-α	51,73	15,48	39,56	13,22	27,95	29,59

* Los “-” representan aquellos datos fuera del rango del límite de detección para la correspondiente citocina.

Tabla 10. Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de proteínas de superficie de *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079^T.

Proteínas de Superficie						
	1	2	3	4	5	MEDIA
GM-CSF	117,20	-	63,30	-	112,30	97,60
INF-γ	146,12	-	16,12	-	84,87	82,37
IL-1β	18,92	8,19	44,18	7,01	11,91	18,04
IL-2	72,46	24,83	23,09	26,33	157,82	60,91
IL-4	-	-	-	-	-	-
IL-5	36,52	-	31,50	-	-	34,01
IL-6	3787,63	198,34	2038,75	45,95	1299,75	1474,08
IL-9	238,19	-	-	-	46,65	142,42
IL-10	40,33	2,78	2,87	-	2,48	12,12
IL-12p70	-	-	-	-	-	-
IL-13	309,53	5,48	91,22	10,82	289,76	141,36
IL-17A	84,57	-	11,45	-	7,00	34,34
IL-18	98,11	24,19	27,48	-	80,79	57,64
IL-21	17,72	13,16	-	-	-	15,44
IL-22	73,66	-	-	-	37,71	55,68
IL-23	-	-	-	-	-	-
IL-27	-	-	-	-	-	-
TNF-α	22,70	-	14,92	-	8,67	15,43

* Los “-“ representan aquellos datos fuera del rango del límite de detección para la correspondiente citocina.

Tabla 11. Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de ácido lipoteicoico de *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079^T.

Ácido Lipoteicoico						
	1	2	3	4	5	MEDIA
GM-CSF	1160,70	46,20	117,40	-	107,20	357,88
INF-γ	457,78	-	32,23	-	18,34	169,45
IL-1β	102,69	29,00	45,38	4,52	15,17	39,35
IL-2	99,66	85,71	42,67	35,79	94,79	71,72
IL-4	28,62	-	-	-	-	28,62
IL-5	74,15	-	21,96	-	-	48,06
IL-6	10225,00	10180,16	5415,02	241,15	2883,73	5789,01
IL-9	228,05	10,02	25,13	8,83	128,18	80,04
IL-10	45,61	25,19	2,89	-	32,24	26,48
IL-12p70	-	-	-	-	-	-
IL-13	636,01	44,19	200,66	26,22	185,33	218,48
IL-17A	131,69	7,82	8,36	-	5,20	38,27
IL-18	168,08	32,44	58,89	-	42,98	75,60
IL-21	18,71	-	-	-	12,90	15,81
IL-22	388,79	-	-	-	57,81	223,30
IL-23	-	-	-	-	-	-
IL-27	-	-	-	-	-	-
TNF-α	57,05	-	14,07	-	11,80	27,64

* Los “-” representan aquellos datos fuera del rango del límite de detección para la correspondiente citocina.

Tabla 12. Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con el ADN de *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079^T.

	ADN					MEDIA
	1	2	3	4	5	
GM-CSF	1374,20	1241,00	1180,10	60,50	408,20	852,80
INF-γ	709,09	425,66	47,23	-	151,77	333,44
IL-1β	195,82	411,87	679,53	125,32	179,15	318,34
IL-2	72,04	74,34	50,45	57,03	131,70	77,11
IL-4	31,32	31,08	26,39	-	12,62	25,35
IL-5	10,48	-	17,79	10,20	12,12	12,65
IL-6	10225,00	10225,00	10225,00	10225,00	10225,00	10225,00
IL-9	169,52	96,65	19,87	288,92	111,66	137,32
IL-10	78,47	73,28	29,14	4,02	27,71	42,52
IL-12p70	-	-	-	-	-	-
IL-13	228,41	178,76	80,26	65,16	252,63	161,04
IL-17A	509,40	269,26	34,02	41,07	163,32	203,41
IL-18	101,71	80,86	33,83	22,26	90,49	65,83
IL-21	12,69	8,47	-	26,75	11,41	14,83
IL-22	752,59	494,32	536,79	63,77	629,31	495,36
IL-23	-	-	-	-	-	-
IL-27	-	-	-	-	-	-
TNF-α	36,80	31,32	38,99	-	25,12	33,06

* Los “-” representan aquellos datos fuera del rango del límite de detección para la correspondiente citocina.

Apéndice 4

Tabla 13. Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de proteínas extracelulares de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCIMB 8809.

Proteínas Extracelulares						
	1	2	3	4	5	MEDIA
GM-CSF	1681,00	16,00	-	-	27,00	574,67
INF-γ	701,57	18,24	-	-	-	359,91
IL-1β	337,37	11,56	3,89	4,10	2,39	71,86
IL-2	68,19	32,04	29,93	12,12	149,37	58,33
IL-4	37,07	-	-	-	-	37,07
IL-5	38,00	-	-	-	-	38,00
IL-6	10225,00	1403,26	275,37	101,65	556,46	2512,35
IL-9	156,47	-	8,83	-	52,13	72,48
IL-10	79,15	3,54	2,84	-	4,02	22,39
IL-12p70	-	-	-	-	-	-
IL-13	545,72	12,48	5,75	-	141,88	176,46
IL-17A	344,95	-	2,20	-	-	173,58
IL-18	177,87	28,94	-	-	35,97	80,93
IL-21	16,73	-	24,78	-	-	20,76
IL-22	426,35	-	151,19	-	25,44	200,99
IL-23	-	-	31,20	-	-	31,20
IL-27	-	-	-	-	-	-
TNF-α	55,66	-	-	-	8,10	31,88

* Los “-” representan aquellos datos fuera del rango del límite de detección para la correspondiente citocina.

Tabla 14. Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de proteínas de superficie de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCIMB 8809.

Proteínas de Superficie						
	1	2	3	4	5	MEDIA
GM-CSF	210,68	-	-	-	75,47	143,08
INF-γ	604,73	-	-	-	236,20	420,47
IL-1β	18,62	3,70	12,12	-	3,47	9,48
IL-2	59,85	19,93	9,22	73,95	175,74	67,74
IL-4	-	-	-	-	-	-
IL-5	17,39	-	-	-	-	17,39
IL-6	7683,45	258,87	620,44	86,03	1886,10	2106,98
IL-9	106,57	-	-	-	40,44	73,50
IL-10	18,00	2,82	3,87	-	5,96	7,66
IL-12p70	-	-	-	-	-	-
IL-13	397,40	-	4,07	22,22	242,19	166,47
IL-17A	37,08	-	2,64	-	3,07	14,26
IL-18	123,72	20,65	-	-	80,79	75,05
IL-21	12,69	-	-	-	-	12,69
IL-22	149,36	-	-	-	-	149,36
IL-23	-	-	-	-	-	-
IL-27	-	-	-	-	-	-
TNF-α	30,87	-	-	-	8,67	19,77

* Los “-“ representan aquellos datos fuera del rango del límite de detección para la correspondiente citocina.

Tabla 15. Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con la fracción de ácido lipoteicoico de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCIMB 8809.

	Ácido Lipoteicoico					MEDIA
	1	2	3	4	5	
GM-CSF	1063,07	64,53	-	-	54,28	393,96
INF-γ	440,13	43,65	-	-	14,79	166,19
IL-1β	454,33	42,41	4,52	24,63	8,45	106,87
IL-2	30,56	39,41	16,06	36,26	61,80	36,82
IL-4	22,52	-	-	-	-	22,53
IL-5	14,37	-	-	12,12	-	13,25
IL-6	10225,00	10225,00	448,01	740,17	1403,14	4608,26
IL-9	64,12	-	-	36,58	94,49	65,06
IL-10	133,08	5,80	5,93	-	13,11	39,48
IL-12p70	-	-	-	-	-	-
IL-13	81,66	107,45	3,64	51,11	120,19	72,81
IL-17A	35,92	2,75	7,95	-	-	15,54
IL-18	61,12	54,24	-	-	43,52	52,96
IL-21	-	-	-	-	-	-
IL-22	86,64	-	-	29,80	-	58,22
IL-23	-	-	-	-	-	-
IL-27	-	-	-	-	-	-
TNF-α	30,41	-	-	-	-	30,41

* Los “-” representan aquellos datos fuera del rango del límite de detección para la correspondiente citocina.

Tabla 16. Nivel de citocinas (pg/mL) cuantificado en los sobrenadantes de los co-cultivos de PBMCs (de 5 donantes) con el ADN de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* NCIMB 8809.

ADN						
	1	2	3	4	5	MEDIA
GM-CSF	1841,16	2169,83	741,49	31,00	299,32	1016,56
INF-γ	1458,30	808,34	184,99	15,45	198,55	533,13
IL-1β	644,42	1041,35	959,08	203,97	580,31	685,83
IL-2	57,47	53,79	29,43	38,13	92,41	54,24
IL-4	48,33	44,71	15,90	-	-	36,31
IL-5	21,80	15,13	17,79	10,20	14,97	1,98
IL-6	10225,00	10225,00	10225,00	7285,67	10225,00	9637,13
IL-9	69,03	38,27	-	46,65	49,38	50,83
IL-10	113,95	111,72	31,34	3,13	30,79	58,19
IL-12p70	-	-	-	-	-	-
IL-13	110,05	63,95	7,40	23,08	94,90	59,88
IL-17A	353,27	186,22	57,14	-	75,77	168,10
IL-18	132,31	98,11	26,17	-	56,12	78,18
IL-21	8,47	-	-	-	-	8,47
IL-22	1512,52	730,61	164,59	80,29	346,99	567,00
IL-23	-	-	34,44	-	27,14	30,79
IL-27	-	-	-	-	-	-
TNF-α	57,52	61,93	40,97	10,94	25,68	39,41

* Los “-“ representan aquellos datos fuera del rango del límite de detección para la correspondiente citocina.

Apéndice 5

Tabla 17. Ratios IL-10/TNF- α e IL-5/IFN- γ determinados para las tres bacterias probióticas.

Bacteria Probiótica	Fracción Extracelular	Ratios	
		IL-10/TNF- α	IL-5/IFN- γ
<i>Lb. Rhamnosus</i> GG	Proteína Extracelular	0,77	0,44
	Proteína de Superficie	0,48	0,11
	Ácido Lipoteicoico	1,95	0,23
	ADN	1,20	0,21
<i>Lb. Acidophilus</i> DSM	Proteína Extracelular	0,53	0,16
	Proteína de Superficie	0,79	0,41
	Ácido Lipoteicoico	0,96	0,28
	ADN	1,29	0,04
<i>B. longum</i> 8809	Proteína Extracelular	0,70	0,11
	Proteína de Superficie	0,39	0,04
	Ácido Lipoteicoico	1,30	0,08
	ADN	1,48	0,11