

MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS Y SUS EFECTOS BENÉFICOS EN LA SALUD HUMANA. REALIDAD VS MITO

Gabriela PERDIGON^{1,*}, Carolina MALDONADO^{1,2} y Silvia Inés CAZORLA^{1,2}

¹ Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET)

² Universidad Nacional de Tucumán (UNT)

* Autora a quien dirigir la correspondencia. E-mail: perdigon@cerela.org.ar

RESUMEN	20
SUMMARY. Probiotic microorganisms: their beneficial effects in human health. Reality vs. Myth.	21
INTRODUCCIÓN	21
Microorganismos Probióticos: Efectos benéficos	22
Mecanismos inducidos por los probióticos en la activación inmune	24
Microorganismos probióticos: interrogantes que aún cuestionan su empleo.	28
CONCLUSIONES	30
REFERENCIAS	30
Agradecimientos	32

RESUMEN

El intestino humano es el hábitat natural de una población numerosa, diversa y dinámica de microorganismos, denominada microbiota intestinal. Esta comunidad diversa de microorganismos tiene funciones específicas, que son claves en el mantenimiento de una buena salud. Uno de los aspectos relevantes de la misma es la capacidad para promover el establecimiento y la maduración del sistema inmune. A partir del conocimiento de las funciones de la microbiota, surge la asociación de efectos nocivos y beneficiosos de bacterias vivas con la salud y, casi paralelamente a ello, el concepto de probióticos. Estos últimos pueden formar parte de la microbiota intestinal o también se encuentran disponibles en numerosos alimentos como yogur, conservas, vinos y pan, que ha llevado a numerosos científicos a analizar el efecto probiótico tanto en el huésped sano como en grupos de riesgo. Al presente existe una vasta evidencia científica experimental que demuestra el efecto benéfico de los probióticos, sugiriendo la potencialidad de su empleo en humanos; sin embargo, es necesario continuar con la validación clínica en diferentes patologías concretas que aseguren la inocuidad de los mismos.

PALABRAS CLAVE: microbiota intestinal, probióticos, salud.

SUMMARY. PROBIOTIC MICROORGANISMS: THEIR BENEFICIAL EFFECTS IN HUMAN HEALTH. REALITY VS. MYTH.

The human intestine is the natural habitat of a large, diverse and dynamic population of microorganisms, called intestinal microbiota. This diverse community of microorganisms has specific functions, which are keys in the maintenance of good health. One of the relevant aspects of it, is the ability to promote the establishment and maturation of the immune system. From the knowledge of the functions of the microbiota, there arises the association of harmful and beneficial effects of living bacteria with health and almost parallel to it, the concept of probiotics. The latter can be part of the gut microbiota or are also available in many foods such as yogurt, preserves, wines, bread, which has led many scientists to analyze the probiotic effect in both healthy hosts and risk groups. At present there is vast experimental scientific evidence that proves the beneficial effect of probiotics suggesting the potential of its use in humans. However, it is necessary to continue with clinical validation in different specific pathologies, which ensure the safety of them.

KEY WORDS: health, intestinal microbiota, probiotics.

INTRODUCCIÓN

El intestino humano es el hábitat natural de una población numerosa, diversa y dinámica de microorganismos, principalmente bacterias y levaduras. La microbiota intestinal cumple numerosas funciones: a) *funciones intestinales*: participa en las funciones metabólicas, ya que proporciona una gran variedad de enzimas y vías bioquímicas distintas de los recursos propios del huésped, participa también en el mantenimiento de la barrera intestinal, estimula la producción de sustancias antimicrobianas que regulan la población de las bacterias comensales (Duerkop *et al.*, 2009) y en la motilidad intestinal; b) *participa en la formación de los vasos sanguíneos*; c) *en el metabolismo energético y en adiposidad*; d) *en la homeostasis ósea, osteoclastogénesis y masa ósea*; e) actualmente se la relaciona con lo relativo al *comportamiento*, como ansiedad y percepción del dolor; es decir que contribuye altamente en la fisiología del huésped (Young, 2017). Por otra parte la colonización bacteriana favorece la expansión de los centros germinales promoviendo la maduración de todas las células inmunes asociadas (Matamoros *et al.*, 2013).

La asociación entre microorganismos viables y salud humana tiene una larga historia que comienza muchos años atrás cuando Metchnikoff (1907) en su libro “La prolongación de la vida” puntualiza el efecto que tienen algunas bacterias intestinales como fuente de sustancias tóxicas para nuestro sistema nervioso, contribuyendo así al envejecimiento y la depresión; así también, hace referencia a la longevidad y los efectos beneficiosos de los alimentos fermentados ricos en bacterias del ácido láctico. Estas observaciones han llevado a poner más atención, a través de los años, en la microbiota intestinal y su relación con la salud. Es decir considerar al ecosistema intestinal como un órgano más, ya que el tracto intestinal está colonizado por un enorme número de bacterias, levaduras y virus, donde los productos metabólicos de dichos microorganismos, como también ellos mismos, generan un ambiente muy especial que condiciona el funcionamiento del sistema inmune y con ello la salud, a través de las señales que inducen en las células epiteliales intestinales, las cuales a su vez activan a todas las células inmunes asociadas al intestino, iniciando una compleja red de interacciones.

Microrganismos Probióticos: efectos benéficos

La palabra probiótico fue introducida por primera vez por Lilly & Stillwell (1965) quienes definieron probiótico como organismos o sustancias que tienen efecto positivo en la salud del huésped. Esta definición fue mejorada por Fuller (1999), quien define a los probióticos como microorganismos vivos que influyen el balance microbiano intestinal contribuyendo a la salud del huésped. A partir de esta última definición se han sucedido otras, siendo la más aceptada la formulada por la FAO/WHO (2001), que los define como microorganismos viables que administrados en cantidades adecuadas tiene efecto benéfico en el huésped. Puesto que estos microorganismos se encuentran en numerosos alimentos como yogur, conservas, vino y pan, ha llevado a numerosos científicos a analizar el efecto probiótico tanto en el huésped sano como en grupos de riesgo y en diferentes patologías. Numerosas investigaciones han establecido la relación del probiótico con la intolerancia a la lactosa (de Vrese *et al.*, 2001), enfermedades intestinales, como intestino irritable (Famularo *et al.*, 2000, Sartor, 2005), diarrea y diarrea asociada a antibióticos (de Roos & Katan, 2000, Guandalini *et al.*, 2000). También se ha descrito su efecto en cáncer de colon y como preventivo de otros cánceres (Anan *et al.*, 2008, Russo *et al.*, 2007). Por otra parte, existen numerosas evidencias experimentales sobre el empleo de probióticos en diferentes modelos de enfermedades agudas y crónicas, como en infecciones (Ishida-Fujii *et al.*, 2007, Castillo *et al.*, 2013, de Moreno de LeBlanc *et al.*, 2010), cáncer (Perdigon *et al.*, 2002, de Moreno de LeBlanc & Perdigon, 2004) y enfermedad inflamatoria (de Moreno de LeBlanc *et al.*, 2009, Chaves *et al.*, 2011). La Figura 1 muestra estudios experimentales del empleo de probióticos en animales y la aplicación de probióticos en humanos en diferentes patologías.

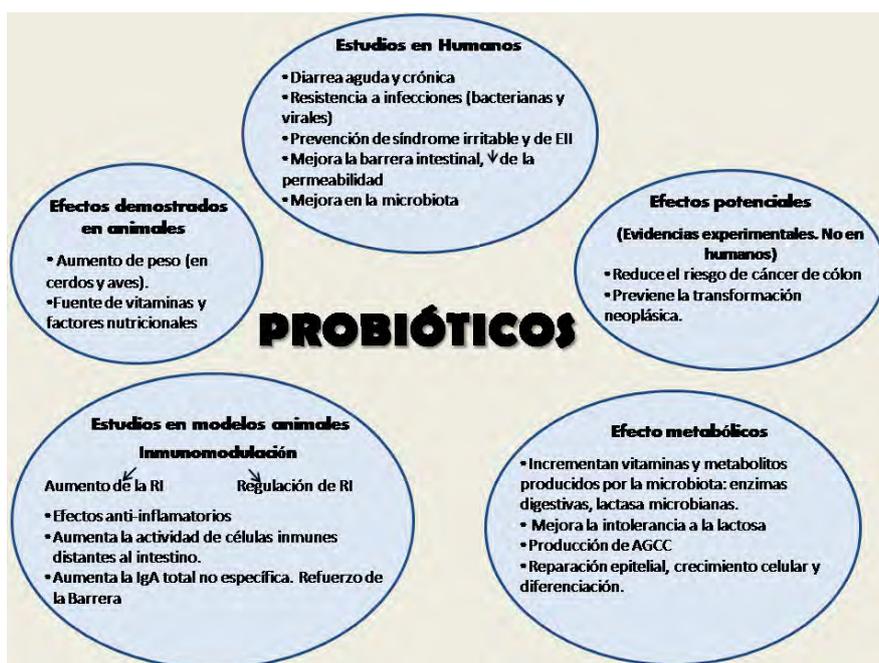


Figura 1. Evidencias científicas del empleo de probióticos.

Como puede observarse, lo referente al empleo de probióticos como adyuvantes inmunes aún se encuentra en fase experimental. Si bien los estudios están muy bien documentados, el introducir un probiótico como adyuvante oral, por ejemplo, para aumentar la eficacia de las vacunas orales es todavía motivo de controversia, ya que en algunas situaciones como en la desnutrición, al estar el intestino muy comprometido, la administración de bacterias viables podría ser un factor de riesgo potencial para la translocación bacteriana. De allí que, al presente, en nuestro laboratorio estamos validando el empleo de paredes celulares de microorganismos probióticos como adyuvante oral sin que signifique un riesgo en estos huéspedes inmunocomprometidos (Lemme-Dumit *et al.*, 2018).

Debido a la importancia que ha adquirido la administración probiótica documentada en numerosas publicaciones atribuyéndole efectos benéficos en salud, es que la administración de microorganismos probióticos o de alimentos que los contengan ha llevado a un creciente mercado de alimentos con diferentes propuestas atractivas para el consumo de los mismos.

La mayoría de los microorganismos probióticos son bacterias lácticas (BL) debido a su capacidad de producir ácido láctico a partir de un sustrato rico en glucosa. Los géneros predominantes son especialmente *Lactobacillus*, otros microorganismos como *Bifidobacteria*, *Enterococcus*, *Escherichia coli* (cepa Nissle) y levaduras como *Saccharomyces boulardii*, también tienen un amplio uso probiótico.

Para que un microorganismo sea considerado probiótico debe cumplir con normativas de seguridad: I) permanecer viables en el tracto intestinal resistiendo al medio ácido del estómago y a las enzimas intestinales, II) adherirse a la célula epitelial intestinal, III) no generar resistencia antibiótica, IV) no inducir hemólisis, V) no generar toxinas y VI) no inducir translocación de bacterias comensales más allá del nódulo mesentérico, es decir ser bacterias General Regarded as Safe (GRAS) de acuerdo a la Federal Drug Administration (FDA, USA).

En lo que respecta al empleo de probióticos en alimentos como muestra la Tabla 1, los microorganismos empleados pueden variar según las matrices que se empleen para el diseño de un alimento funcional (PBDB probiotics database <http://lzubiodrugs.com>).

ALIMENTOS	MICROORGANISMOS
Leche fermentada de vaca o cabra	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i> ,
Queso Leche de vaca, cabra y oveja	<i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Lactococcus</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , <i>Streptococcus</i>
Kefir Leche de vaca, cabra y oveja	<i>Bacillus</i> sp., <i>Lactobacillus</i> sp., <i>L. brevis</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>Lactococcus</i> , levaduras, <i>Leuconostoc</i> , <i>Staphylococcus citrovorum</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>
Legumbres y cereales fermentados	<i>Aeromonas oryzae</i> , <i>Bacillus</i> sp., bacterias ácido lácticas, <i>Candida parapsilopsis</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , levaduras, <i>Pediococcus</i> sp, <i>Streptococcus</i>
Base de Soja	<i>Aeromonas</i> sp, <i>Bacillus</i> sp., <i>Fusarium</i> sp, <i>Lactobacillus</i> sp., <i>Morganella</i> sp, <i>Pediococcus</i> sp., <i>Rhizopus</i> sp., <i>Saccharomyces</i> sp., <i>Torulopsis</i> sp.

Tabla 1. Ejemplos de microorganismos empleados como probióticos.

Los microorganismos probióticos pueden administrarse oralmente e influenciar el comportamiento del Sistema Inmune Sistémico (SIS) a través de las señales que se generan entre las distintas células inmunes asociadas al intestino y, aunque la naturaleza del diálogo entre las diferentes células inmunes para generar una respuesta sistémica no es totalmente entendida, es irrefutable el hecho de que las bacterias probióticas administradas oralmente modulan no sólo la actividad inmune de la mucosa intestinal, sino también la inmunidad sistémica a través de la red de señales que se inducen para la liberación de citoquinas, que son los verdaderos mensajeros biológicos de la inmunidad. Esta evidencia ha llevado a nuevos desafíos en la búsqueda de adyuvantes orales que favorezcan la respuesta inmune sistémica y de mucosas y con ello la prevención de enfermedades, poniendo énfasis en estos microorganismos probióticos, que al ingresar al tracto gastrointestinal en forma viable podrían permanecer intactos e interactuar con la células epiteliales intestinales (CEI) e inmunes asociadas a la mucosa, enviando las primeras señales a las células inmunes subyacentes asociadas a la mucosa intestinal. Al presente, si bien se ha avanzado mucho en el conocimiento sobre cómo estas bacterias estimulan el sistema inmune, su empleo en la prevención de enfermedades está limitado sólo en aquellos casos en las que se ha probado su efecto en humanos en estudios randomizados doble ciego.

Validar el empleo de probióticos para mejorar el estado de salud del huésped ha llevado a numerosos trabajos de investigación a tratar de explicar los mecanismos involucrados en el mencionado efecto benéfico en la salud del huésped (humano o animal) para su potencial empleo como suplemento alimenticio en la prevención o en reducir la progresión de la enfermedad en distintos procesos patológicos. Sin embargo, y a pesar de los números estudios *in vitro* o en modelos experimentales realizados, aún no se conocen los mecanismos exactos de la acción probiótica en huésped sano o inmunocomprometido, lo cual limita su empleo, como también lleva a determinar la importancia de desarrollar estudios clínicos con un número importante de muestra, en diferentes grupos etarios, en diferentes patologías y durante largos períodos de administración probiótica.

Este análisis está dentro del contexto de la Inmunonutrición, que es un área actual de estudio con importancia en salud pública, debido a que los alimentos contribuyen a mejorar el ecosistema intestinal influenciando tanto la microbiota como el sistema inmune mucoso y sistémico.

Mecanismos inducidos por los probióticos en la activación inmune

Explicar cómo los probióticos inducen la activación del Sistema Inmune Mucoso (SIM) implica un profundo conocimiento del funcionamiento del sistema inmune, el cual a su vez está influenciado por las bacterias comensales. Los conocimientos inmunológicos básicos permitirán conocer qué fenotipo celular debería estimularse, así como los marcadores o receptores que deben expresarse, o qué mediadores biológicos (citoquinas) deberán inducirse para evitar efectos adversos (respuesta inflamatoria), o para inducir la activación y regulación de la respuesta inmune inducida. Todo ello sin alterar el proceso de tolerancia oral, mecanismo que aún hoy no está del todo claro.

Las señales celulares inmunológicas, expresión de receptores y marcadores que se desencadenan y ponen en marcha frente a antígenos alimentarios y de la microbiota comensal, son una herramienta fundamental para conocer cómo los probióticos activan el Sistema Inmune (SI). Para entender cómo los probióticos estimulan el SIM intestinal a través de la ingestión de los alimentos que los contienen (leches fermentadas, yogur, queso, etc.) debe considerarse que cuando un probiótico ingresa por vía oral sufre una serie de modificaciones, de acuerdo con el medio que interactúa: acidez gástrica, enzimas, peristaltismo

intestinal, el mucus que recubre el epitelio, IgA presente en el lumen y sustancias antimicrobianas producidas por las células de Paneth (Servin & Coconnier, 2003).

En nuestro laboratorio estudiamos diferentes bacterias lácticas y demostramos que sólo algunas bacterias eran capaces de inducir inmunidad de mucosa intestinal (Perdigón *et al.*, 1999). También observamos que ciertas bacterias que ingresaban por vía oral no sólo estimulaban la respuesta inmune en el intestino delgado sino también a nivel del intestino grueso y algunas además en el tejido asociado a bronquios. Es así, que estudios realizados con la cepa probiótica *L. casei* CRL 431 y con leche fermentada conteniendo *L. casei* DN114001 mostraron aumentos de IgA en intestino, bronquios y en glándula mamaria (de Moreno de LeBlanc *et al.*, 2005).

El hecho de que algunas bacterias lácticas sean capaces de estimular tanto la respuesta inmune específica como inespecífica (Vintiñi *et al.*, 2000) llevó a sugerir que este comportamiento era una característica de determinadas cepas y que esa propiedad no podía extrapolarse ni a género ni a especie. En estudios realizados en ratón, observamos que la administración de diferentes cepas de bacterias lácticas produce la activación de las células inmunes asociadas a intestino, induciendo un aumento en el número de LB productoras de IgA y de LT productores de citoquinas reguladoras y pro-inflamatorias. Las citoquinas producidas en intestino son los mediadores biológicos que influenciaban la respuesta inmune sistémica. Observamos, además que el balance de dicha producción era tanto dosis como cepa dependiente (Perdigón *et al.*, 2002).

La importante activación que se observaba de las células inmunes hacía suponer que los probióticos interactuaban directamente con la CEI y las inmunes asociadas a intestino. La adhesión a la célula epitelial intestinal de la bacteria probiótica sería uno de primeros pasos y es precisamente un prerrequisito para el efecto probiótico. Para comprobar esta hipótesis se realizaron estudios usando bacterias lácticas marcadas (*L. casei* CRL 431 y *L. casei* DN 114001), con isotiocianato de fluoresceína (FITC), de manera de seguir la trayectoria de las mismas al ser administradas por vía oral a ratones. En el análisis de cortes de tejido de intestino delgado, tomado a diferentes tiempos (5, 10, 15 y 20 minutos) luego de la administración de las bacterias, se encontraron células fluorescentes en el interior de las placas de Peyer y lámina propia de las vellosidades intestinales (Maldonado Galdeano & Perdigón, 2006). También realizamos estudios de inmunomarcación con oro coloidal mediante el empleo de técnicas de microscopía electrónica, en los que determinamos para ambas bacterias probióticas, que las bacterias lácticas interactúan con las células epiteliales intestinales (Figura 2). En el citoplasma de éstas células se encontraron pequeñas partículas marcadas con oro, las cuales correspondían a antígenos bacterianos generados como productos de la digestión de las bacterias probióticas por acción de enzimas presentes en la luz intestinal, y transportadas posteriormente al interior de las CEI (Galdeano & Perdigón, 2004, Galdeano *et al.*, 2009). Se encontraron, además, partículas antigénicas marcadas con oro coloidal entre las células epiteliales, evidenciando así un transporte paracelular de los fragmentos bacterianos. Recientemente, demostramos que los probióticos inducen un aumento de las sustancias antimicrobianas producidas por las células de Paneth (Cazorla *et al.*, 2018). Dichas sustancias serían también responsables de la fragmentación de las bacterias probióticas.

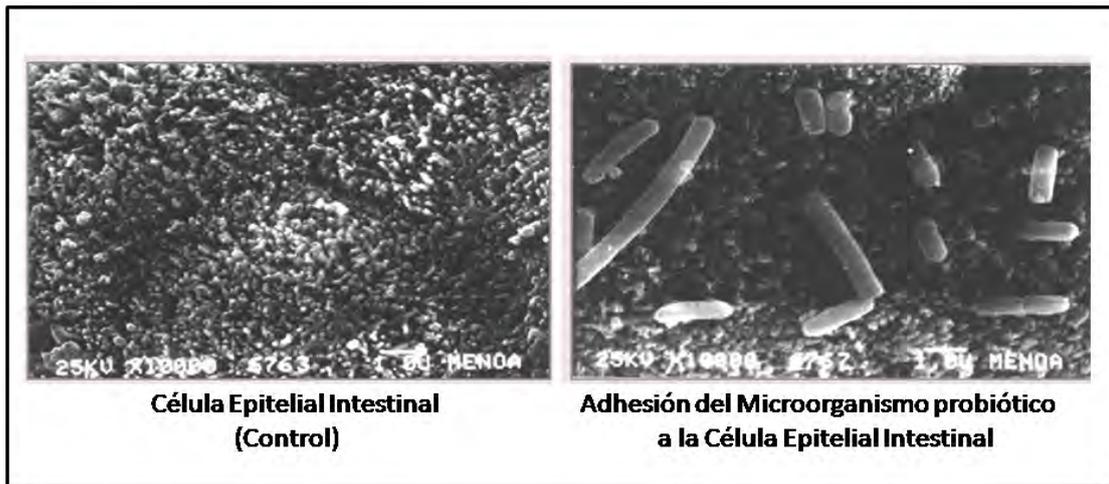


Figura 2. Estudios de microscopía electrónica mostrando la adhesión de bacterias probióticas a la célula epitelial intestinal.

Se sabe que las células epiteliales intestinales establecen una estrecha asociación entre sí, impidiendo el pasaje de moléculas entre ellas. Sin embargo, las células dendríticas expresan moléculas similares a las “tight junctions”, lo que les permite abrirse paso hacia la luz intestinal y captar antígenos (Rescigno, 2008). Atento a ello, no podemos descartar esta posible vía de entrada para las bacterias probióticas o sus fragmentos celulares.

Como se observa en la Figura 3, la estimulación de las células epiteliales intestinales induce una cascada de activación inmune sin que necesariamente el probiótico deba traspasar la barrera epitelial. Ahora bien, si eso ocurre por internalización a través de la célula dendrítica, el probiótico es fagocitado por los macrófagos de la lámina propia. Este hecho es de fundamental importancia, ya que es precisamente el que marca la diferencia con los patógenos enteroinvasivos, donde se produce internalización con daño en la barrera epitelial intestinal.

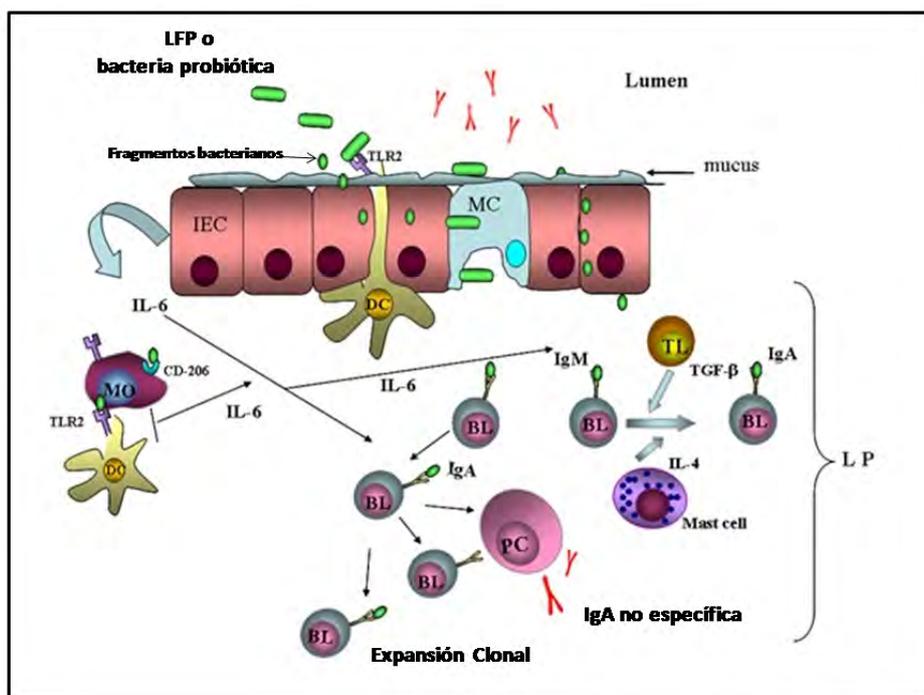


Figura 3. Barrera epitelial como blanco de acción de los probióticos.

Si bien existen algunos estudios que sugieren que las bacterias no-viables producen efectos beneficiosos similares a los observados con las bacterias vivas (Ouwehand & Salminen, 1998), en estudios empleando un modelo murino y administrando una cepa de lactobacilo probiótico viable y no viable, observamos que las bacterias vivas eran más eficientes en la estimulación del sistema inmune a nivel de mucosa intestinal (Maldonado Galdeano & Perdigon, 2006).

A partir de estos resultados, comenzamos a profundizar el estudio de los mecanismos que llevan a la estimulación inmune por las bacterias probióticas. Se realizaron estudios *in vitro*, los cuales mostraron que la cepa de *Lactobacillus casei* CRL 431 interacciona con las células del epitelio a través de la activación de TLR-2, y como consecuencia de dicha interacción se produce un aumento en los niveles de IL-6 (Vinderola *et al.*, 2005, Maldonado Galdeano *et al.*, 2015). Estos resultados nos llevaron a estudiar en ratones la expresión de dos receptores involucrados en la respuesta inmune innata (CD-206 y TLR-2) luego de la administración oral de *Lactobacillus casei* CRL 431. Observamos que ambos receptores se encontraban aumentados en las células inmunes de la lámina propia y de placa de Peyer, lo cual lleva a pensar que dichos receptores están involucrados en la interacción de esta bacteria con las células inmunes. También estudiamos qué ocurría con la población de linfocitos T (CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺) en cortes de tejido de intestino delgado de ratones que habían sido alimentados con *L. casei* CRL 431. Observamos que dichos marcadores de superficie no se modificaban con la administración de esa bacteria, permaneciendo iguales a los controles. Esto sugirió que las bacterias lácticas estimulaban preferentemente la población de células que participan en la inmunidad innata (macrófagos y células dendríticas), no así a la población de linfocitos T, los cuales participan de la inmunidad adaptativa (Maldonado Galdeano & Perdigon, 2006). Para corroborar que no estábamos induciendo una respuesta inmune adaptativa contra epitopes de los probióticos, determinamos los niveles de IgA específica para las bacterias lácticas (*L. casei*, *L. bulgaricus*) en el fluido intestinal de ratones alimentados con dichas bacterias. Los niveles de IgA específica fueron similares a los encontrados en el fluido intestinal de los ratones controles, lo que indicaría que no hubo presentación antigénica para dichos péptidos. Todos estos resultados nos permitieron elaborar una hipótesis sobre el modo por el cual la bacteria probiótica estimularía la inmunidad innata a nivel de intestino (Maldonado Galdeano *et al.*, 2007). Como se observa en la Figura 4, la estimulación de las CEI activa a su vez todas las poblaciones celulares de la respuesta inmune innata, aumentando la expresión de marcadores y receptores, estimulando la migración celular y la producción de citoquinas, verdaderos mensajeros biológicos de la inmunidad capaces de estimular células a distancia y consecuentemente la respuesta inmune adaptativa.

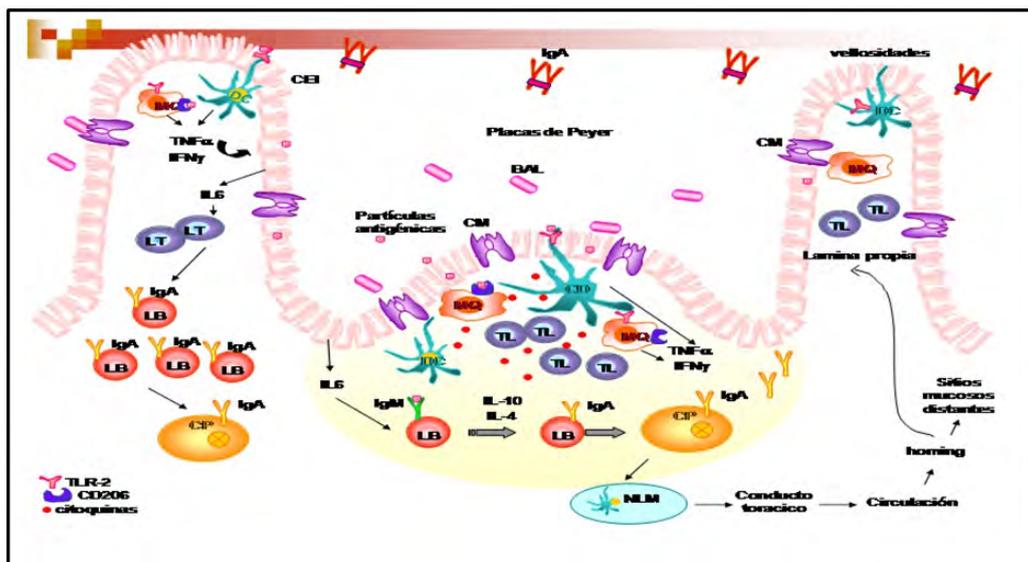


Figura 4. Mecanismos inmunes inducidos por los probióticos

La bacteria probiótica o sus fragmentos celulares, al tomar contacto con las células inmunes mediante receptores Toll o CD206 (receptor manosa) posibilitará la activación de factores transcripcionales que llevarán a la síntesis de citoquinas que van a expandir la respuesta inmune sin inducir la presentación antigénica. Este fenómeno se realiza a través del receptor específico de las células T (TCR/CD3). Aún cuando los fragmentos celulares podrán ser internalizados por el receptor CD206 y quedaran expuestos para el reconocimiento por TCR, el proceso de presentación antigénica sólo es posible en sitios inductores de la respuesta inmune, placa de Peyer o nódulos linfáticos. Una presentación antigénica a nivel de lámina propia del intestino delgado, que es el mayor sitio de interacción de los probióticos, no será posible ya que este es un sitio efector, no inductor. Por otra parte, las células de la respuesta innata deberán adquirir marcadores (moléculas de adhesión) involucradas en el tráfico leucocitario, lo que les permita migrar y llegar a los sitios de presentación antigénica, placa de Peyer o nódulo mesentérico. Es importante tener en cuenta que es poco probable que ocurra una activación de esa magnitud con bacterias no patógenas. Sólo aquellas bacterias o fragmentos que entran por placa de Peyer, o aquellos que activaron a las células dendríticas son transportados a nódulos mesentéricos, como ocurre con patógenos invasivos tendrán mayor probabilidad de originar una respuesta Th2, con producción de anticuerpos específicos contra sus epitopes. Esto no ocurre con los probióticos.

Existen referencias bibliográficas en las que se emplean bacterias lácticas como vectores para vacunas orales. A estas bacterias les han introducido modificaciones que les permitan la interacción/adhesión a células inmunes de placa de Peyer. Ello es una clara indicación que los probióticos no poseen mecanismos que les permitan una adhesión firme al intestino como los patógenos e inducir una respuesta Th2. La pregunta que surge es ¿Cuál es el destino final de las bacterias lácticas (BL) o sus fragmentos al ingresar por placa de Peyer?. Éstos deberían sólo inducir la estimulación de citoquinas liberadas por los macrófagos y células dendríticas, favorecer la depuración y expansión clonal de los LB, pero no la presentación antigénica. Si bien los componentes principales de las bacterias probióticas, ácido lipoteicoico (LTA) y muramildipéptido (MDP), son antigénicos y estimulan las células inmunes, no necesariamente inducen respuesta Th2. Está descrito que altas dosis de peptidoglicano son tóxicas a nivel hepático y renal. Estos hechos justificarían un profundo análisis del contenido de estos constituyentes en la pared de los probióticos, lo que permitiría comprender la estimulación inmune y clarificar el porqué del efecto de la dosis administrada (Mowat, 2003).

Estudios nuestros y de numerosos autores muestran la potencialidad del empleo de los probióticos. Los mecanismos inmunes inducidos por los probióticos ponen en evidencia la total inocuidad de los mismos frente al consumo continuo, aportando además las bases científicas para su potencial empleo como adyuvantes orales en humanos. Este aspecto es muy promisorio para el diseño de vacunas orales o para incrementar la inmunidad en grupos de riesgo como lo son los individuos inmunocomprometidos.

Microorganismos probióticos: interrogantes que aún cuestionan su empleo

Los aspectos benéficos mencionados de los probióticos llevaron a incluirlos en la Inmunonutrición, un área de importancia en salud pública, debido a que los alimentos contribuyen a mejorar el ecosistema intestinal influenciando tanto la microbiota, como el sistema inmune asociado a mucosa intestinal. La inclusión de alimentos funcionales en la dieta diaria puede tener un efecto importante reforzando el Sistema Inmune Mucoso intestinal y previniendo enfermedades en las que la participación del Sistema Inmune es innegable para su control.

Las bacterias probióticas ingeridas con los productos fermentados y que permanecen viables en el intestino, aún cuando no lo colonizan, pueden ejercer importantes efectos fisiológicos, como se explicó anteriormente. Adicionalmente, los probióticos ejercen efectos indiscutidos en los tres niveles de la defensa intestinal: a) microbiota intestinal, b) epitelio intestinal (células caliciformes y de Paneth), y c) células inmunes asociadas a la mucosa. La inmunonutrición se encuentra en un desarrollo destacable, incluyendo tópicos que van más allá de la nutrición y la activación inmune, como lo es el estudio de la compleja red de señales que los alimentos inducen para la activación de genes, que le permiten a las células procariotas y eucariotas sintetizar lo que resulta benéfico para el huésped.

Han surgido algunas dudas respecto al consumo prolongado de probióticos y el empleo de bacterias que permanecen viables en el intestino, en lo que respecta a que ellos podrían modificar el balance de la microbiota intestinal. Sin embargo, se ha demostrado que la microbiota intestinal es estable. Sólo en determinadas situaciones como tratamiento prolongado con antibióticos, procesos de malnutrición (obesidad, desnutrición), o drogas antiinflamatorias, puede producirse una alteración de la microbiota intestinal (Lopetuso *et al.*, 2018). La razón por la cual los probióticos o alimentos funcionales que lo contienen no afectan la microbiota tiene su explicación en que los mismos no colonizan, sino que transitan y son degradados o eliminados por el peristaltismo, como se mencionó anteriormente.

Se puso una alerta sobre que los probióticos al ser consumidos regularmente pueden inducir tolerancia oral con aumento de Treg. Sin embargo, está demostrado que el consumo prolongado no induce tolerancia oral, ya que actúan como inmunomoduladores manteniendo la vigilancia inmunológica como lo demostramos en un modelo de administración prolongada (de Moreno de LeBlanc *et al.*, 2008a).

Se ha promocionado, además, que el empleo de mezclas probióticas son las más adecuadas para el tratamiento de enfermedades inflamatorias (Rossi *et al.*, 2014). Sin embargo, esto sólo es verdadero en algunas patologías inflamatorias intestinales. De hecho, no hay hasta la fecha evidencias científicas de que estas mezclas funcionen en la enfermedad celíaca y esto es aún motivo de estudio.

Se ha discutido mucho si es conveniente la administración temprana de probióticos en lactantes menores de 3 meses. Esta discusión hoy continúa. Nuestra opinión fundamentada en ensayos que realizamos en un modelo animal, es que el efecto probiótico es evidente una vez que la colonización de bacterias en la mucosa intestinal se completa fisiológicamente (de Moreno de LeBlanc *et al.*, 2008b). Antes de ello la administración de probióticos no acelera la maduración del sistema inmune. Si estos resultados los extrapoláramos al ser humano, la administración de probióticos sería favorable después de los 5-6 meses de edad, momento en que las uniones estrechas de la CEIs están consolidadas.

Se ha insistido en que la administración oral protege contra infecciones en sitios mucosos distantes (bronquios, mucosa urogenital). Si bien está la teoría del sistema común de mucosas a partir del tracto gastrointestinal, existe la teoría de la compartimentalización mucosa donde el estímulo *in situ* debe darse (Barbieri *et al.*, 2017, Leccese Terraf *et al.*, 2017).

Existe la creencia que los probióticos no deben administrarse en obesidad por temor a un aumento de peso. Sin embargo, hay estudios que demuestran el beneficio del empleo de los probióticos o leches probióticas en obesidad debido a su efecto sobre el síndrome metabólico observado en esa patología (Novotny Núñez *et al.*, 2015).

Todas estas evidencias sobre el empleo de probióticos en diferentes patologías no indican que cualquier preparación probiótica pueda funcionar en cualquier enfermedad que afecte a las mucosas. Es importante considerar el sitio mucoso donde va a impactar el probiótico y la microbiota normal de ese sitio mucoso (vagina, piel, cavidad oral, tracto respiratorio) como fuera demostrado por otros autores (Pellegrino *et al.*, 2018).

CONCLUSIONES

Al presente existen numerosas evidencias científicas experimentales que demuestra el efecto benéfico de los probióticos y sugieren la potencialidad de su uso en humano. Sin embargo, la validación clínica para su empleo es de fundamental importancia por diferentes razones: a) porque son productos naturales que ingresan con la dieta, no son productos farmacológicos hasta que se demuestre su efecto en la patología deseada, b) aún cuando fueran efectivos, la condición del huésped es muy importante, como así también la complejidad de la etiología y el estadio de la enfermedad. El consumo de leches fermentadas probióticas puede ser efectivo en grupos de riesgo tales como pacientes subnutridos, no sólo por sus propiedades nutricionales sino por la capacidad adyuvante sobre la inmunidad del huésped. Sin embargo, es importante tener presente que no hay ningún estudio clínico con respecto a los efectos inmunomoduladores de las bacterias probióticas.

REFERENCIAS

- Anan, P., A.B. Kunnumakara, C. Sundaram, K.B. Harikumar, S.T. Tharakan, O.S. Lai, *et al.* (2008) Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. *Pharm. Res.* **25**: 2097-116.
- Barbieri, N., M. Herrera, S. Salva, J. Villena & S. Alvarez (2017) *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 nasal administration improves recovery of T-cell mediated immunity against pneumococcal infection in malnourished mice. *Benef Microbes* **8**: 393-405.
- Castillo, N.A., A. de Moreno de Le Blanc, C. Maldonado Galdeano & G. Perdigon (2013) Comparative study of the protective capacity against salmonella infection between probiotic and nonprobiotic lactobacilli. *J. Appl. Microbiol.* **114**: 861-76.
- Cazorla, S.I., C. Maldonado-Galdeano, R. Weill, J. De Paula & G. Perdígón (2018) Oral Administration of Probiotics Increases Paneth Cells and Intestinal Antimicrobial Activity. *Front. Microbiol.* **2018**. doi: 10.3389/fmicb.2018.00736.
- Chaves, S., G. Perdigon & A. de Moreno de LeBlanc (2011) Yoghurt consumption regulates the immune cells implicated in acute intestinal inflammation and prevents the recurrence of the inflammatory process in a mouse model. *J. Food Prot.* **74**: 801-11.
- de Moreno de Leblanc, A. & G. Perdigon (2004). Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. *Med. Sci. Monit.* **10**: BR96-104.
- de Moreno de LeBlanc, A., C. Maldonado Galdeano, C.A. Dogi, E. Carmuega, R. Weill & G. Perdigon (2010) Adjuvant effect of a probiotic fermented milk in the protection against *Salmonella enteritidis* serovar *typhimurium* infection: Mechanisms involved. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **23**: 1235-44.
- de Moreno de LeBlanc, A., C.A. Dogi, C.M. Galdeano, E. Carmuega, R. Weill & G. Perdigon G (2008a) Effect of the administration of a fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114001 on intestinal microbiota and gut associated immune cells of nursing mice and after weaning until immune maturity. *BMC Immunology.* **9**: 27.
- de Moreno de LeBlanc, A., C. Maldonado Galdeano, S. Chaves & G. Perdígón (2005) Oral administration of *L. casei* crl 431 increases immunity in bronchus and mammary glands. *Eur. J. Inflam.* **3**: 23-8.
- de Moreno de LeBlanc, A., S. Chaves & G. Perdigon (2009) Effect of yoghurt on the cytokine profile using a murine model of intestinal inflammation. *Eur. J. Inflamm.* **7**: 97-109.
- de Moreno de LeBlanc, A., S. Chaves, E. Carmuega, R. Weill, J. Antóine & G. Perdígón (2008b) Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. *Immunobiology* **213**:97-108.
- de Roos, N.M. & M.B. Katan (2000) Effects of probiotic bacteria on diarrhea, lipid metabolism, and carcinogenesis: a review of papers published between 1988 and 1998. *Am. J. Clin. Nutr.* **71**: 405-11.

- de Vrese, M., A. Stegelmann, B. Ritcher, S. Fenselau, C. Laue & J. Schrezenmeir (2001) Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: S421-9.
- Duerkop, B.A., S. Vaishnav & L.V. Hooper (2009) Immune Responses to the Microbiota at the Intestinal Mucosal Surface. *Immunity* **31**: 368-76
- Famularo, G., C. de Simone, P. Gionchetti & M. Campieri (2000).The role of digestive flora and probiotics in inflammatory bowel disease. *Microb. Ecol. Health. Dis.* **12**:138-45.
- FAO/WHO (2001) *Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria*. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Expert Consultation Report.
- Fuller, R. (1999) *Probiotics for farm animals*, in *Probiotics a Critical Review*. Horizon Scientific, Wymondham, UK. pp. 15-22.
- Galdeano, C.M. & G. Perdigon (2004) Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J. Appl. Microbiol.* **97**: 673-81.
- Galdeano, C.M., A. de Moreno de LeBlanc, E. Carmuega, R. Weill & G. Perdigon (2009) Mechanisms involved in the immunostimulation by probiotic fermented milk. *J. Dairy Res.* **76**: 446-54.
- Guandalini, S., L. Pensabene & M.A. Zikri (2000) *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **30**: 54-60.
- Ishida-Fujii, K., R. Sato, S. Goto, X.P. Yang, H. Kuboki, S. Hirano, et al. (2007) Prevention of pathogenic *Escherichia coli* infection in mice and stimulation of macrophage activation in rats by an oral administration of probiotic *Lactobacillus casei* I-5. *Biosci Biotechnol. Biochem.* **71**: 866-73.
- Leccese Terraf, M.C., M.S. Juarez Tomás, L. Rault, Y. Le Loir, S. Even & M.E.F Nader-Macías (2017) *In vitro* effect of vaginal lactobacilli on the growth and adhesion abilities of uropathogenic *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* **199**: 767-74.
- Lemme-Dumit, J.M., M.A. Polti, G. Perdigón & C.M. Maldonado-Galdeano (2018) Probiotic bacteria cell walls stimulate the activity of the intestinal epithelial cells and macrophage functionality. *Benef Microbes.* **9**:153-64.
- Lilly, D.M. & R.H. Stillwell (1965) Probiotics: growth-promoting factors produced by 657 microorganisms. *Science* **147**: 747-8.
- Lopetuso, L.R., M. Napoli, G. Rizzatti & A. Gasbarrini (2018) The intriguing role of Rifaximin in gut barrier chronic inflammation and in the treatment of Crohn's disease. *Expert Opin. Investig. Drugs.* **27**: 543-51.
- Maldonado Galdeano, C. & G. Perdigón G (2006) The probiotic bacteria *lactobacillus casei* induces activation of the immune system through the innate immunity. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**: 219-226
- Maldonado Galdeano, C., A. de Moreno de LeBlanc, G. Vinderola, M.E. Bibas Bonet & G. Perdigón (2007) Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. **14**: 485-92.
- Maldonado Galdeano, C., J. Lemme-Dumit, N. Thieblemont, E. Carmuega E, R. Weill & G. Perdigón G (2015) Stimulation of Innate Immune Cells Induced by Probiotics: Participation of Toll-Like Receptors. *J. Clin. Cell. Immunol.* **6**(1): 1- 9. doi: 10.4172/2155-9899.1000283.
- Matamoros, S., C.G. Leguen, F. Françoise Le Vacon, G. Gilles Potel & M.F. de La Cochetiere (2013) Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol.* **21**: 167-73.
- Metchnikoff, E. (1907) *The Prolongation of Life: Optimistic Studies*. trans. P. Chalmers Mitchell. New York 1907: GP Putnam's Sons.
- Mowat, A.M. (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat. Rev. Immunol.* **3**: 331-4
- Novotny Núñez, I., C. Maldonado Galdeano, A. de Moreno de LeBlanc & G. Perdigón (2015) *Lactobacillus casei* CRL 431 administration decreases inflammatory cytokines in a diet-induced obese mouse model. *Nutrition* **31**: 1000-7. doi: 10.1016/j.nut.2015.02.006.
- Ouwehand, A.C. & S.J. Salminen (1998) The effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int. Dairy J.* **8**: 749-58.
- PBDB probiotics database: <http://lzubiodrugs.com>
- Pellegrino, M.S., I.D. Frola, B. Natanael, D. Gobelli, M.E.F. Nader-Macias & C.I. Bogni (2018) *In Vitro* Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Bovine Milk as Potential Probiotic Strains to Prevent Bovine Mastitis. *Probiotics Antimicrob. Proteins* doi: 10.1007/s12602-017-9383-6.

- Perdigón, G., A. de Moreno de LeBlanc, J. Valdez & M. Rachid (2002) Role of yoghurt in the prevention of colon cancer. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56** Suppl **3**: S65-8.
- Perdigón, G., C. Maldonado Galdeano, J.C. Valdez & M. Medici (2002) Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56**: S21-6.
- Perdigón, G., E. Vintiñi, S. Álvarez, M. Medina & M. Medici (1999) Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **82**: 1108-14.
- Rescigno, M.J. (2008) Intestinal epithelial cells control dendritic cell function. *Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **46** Suppl **1**: E17-9. doi: 10.1097/01.mpg.0000313831.09089.36. Review.
- Rossi, G., G. Pengo G, M. Caldin, A. Palumbo Piccionello, J.M. Steiner, N.D. Cohen *et al.* (2014) Comparison of microbiological, histological, and immunomodulatory parameters in response to treatment with either combination therapy with prednisone and metronidazole or probiotic VSL#3 strains in dogs with idiopathic inflammatory bowel disease. *PLoS One.* **9**:e94699. doi: 10.1371/journal.pone.0094699. eCollection 2014.
- Russo, F., A. Orlando, M. Linsalata, A. Cavallini & C. Messa (2007) Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG on the cell growth and polyamine metabolism in HGC-27 human gastric cancer cells. *Nutr. Cancer* **59**: 106-14.
- Sartor, R.B. (2005) Probiotic therapy of intestinal inflammation and infections. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **21**: 44-50.
- Servin, A.L. & M.H. Coconnier (2003) Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **17**: 741-54.
- Vinderola, G., C. Matar & G. Perdigón (2005) Role of the epithelial cells in the immunostimulation induced by lactobacilli. Importance of TLR. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **12**: 1075-84.
- Vintiñi, E., S. Álvarez, M. Medina, M. Medici, M.V. de Budeguer & G. Perdigón (2000) Gut mucosal immunostimulation by lactic acid bacteria. *Biocell* **24**: 223-32.
- Young, B. (2017) The role of the microbiome in human health and disease: an introduction for clinicians. *BMJ* **2017**. 356.j831. doi: 10.1136/bmj.j831

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado gracias al soporte financiero de los siguientes subsidios de investigación: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - CONICET (PIP N°1071) y Dra. Cazorla Res 4822. Universidad Nacional de Tucumán (PIUNT 26D/529).