Microorganismos y salud: bacterias lácticas y bifidobacterias probióticas

Juan Miguel Rodríguez Gómez

UCM EDITORIAL COMPLUTENSE

Queda rigurosamente prohibida sin la autorización escrita de los titulares del Copyright, bajo las sanciones establecidas en las leyes, la reproducción total o parcial de esta obra por cualquier medio o procedimiento, comprendidos la reprografía y el tratamiento informático, y la distribución de ejemplares de ella mediante alquiler o préstamo público.

© 2006 by Juan Miguel Rodríguez Gómez
© 2006 by Editorial Complutense, S. A.
Donoso Cortés, 63 – 4. planta (28015) Madrid
Tels.: 91 394 64 60/1 Fax: 91 394 64 58
e-mail: ecsa@rect.ucm.es
www.editorialcomplutense.com

Primera edición: diciembre 2006

ISBN: 978-84-7491-823-6

Índice

Capítulo 1. **Bacterias lácticas y bifidobacterias como probióticos.** Rocío Martín, Susana Langa, Carlota Reviriego, María L. Marín, Jordi Xaus, Leónides Fernández y Juan M. Rodríguez.

Capítulo 2. Leche materna y placenta: fuentes de bacterias probióticas para el recién nacido y el feto. Rocío Martín, Susana Langa, Carlota Reviriego, Esther Jiménez, María L. Marín, Mónica Olivares, Leónides Fernández, Jordi Xaus, y Juan M. Rodríguez.

Capítulo 3. Potencial probiótico de cepas de lactobacilos aislados de leche humana, heces infantiles y alimentos fermentados. Mónica Olivares, Rocío Martín, M. Paz Díaz-Ropero, Julio Boza, Jesús Jiménez, Juan M. Rodríguez y Jordi Xaus.

Capítulo 4. Seguridad de cepas de *Enterococcus faecium* aisladas de leche materna. Carlota Reviriego, Tracy Eaton, Rocío Martín, Esther Jiménez, María L. Marín, Leonides Fernández, Michael J. Gasson y Juan M. Rodríguez.

Capítulo 5. El método de la madre canguro. Adolfo Gómez Papí, Natàlia Garcia y Ricardo Closa Monasterolo.

Capítulo 6. Función y aplicaciones de lactobacilos de origen vaginal. Covadonga Barbés y Soledad Boris.

Capítulo 7. Estudio y evolución de la microbiota intestinal humana: identificación y selección de bacterias probióticas. Baltasar Mayo y Susana Delgado.

Capítulo 8. Propiedades beneficiosas para la salud relacionadas con la resistencia a sales biliares y con la producción de exopolisacáridos en microorganismos probióticos y bacterias lácticas. Abelardo Margolles, Patricia Ruas-Madiedo y Clara G. de los Reyes-Gavilán.

Capítulo 9. Selección y caracterización de lactobacilos para su uso en productos lácteos probióticos. Raquel Rodríguez, Javier Calzada, Javier Tomillo, Pilar Gaya, Manuel Nuñez, Eva Rodríguez y Margarita Medina.

Capítulo 10. *Bifidobacterium lactis* y su empleo en productos lácteos fermentados. Teresa Requena, Carolina Janer y Carmen Peláez.

Capítulo 11. Bacterias lácticas como probióticos en pollos. Margarita Garriga y Marta Hugas.

Capítulo 12. Caracterización de cepas de enterococos para su posible uso como probióticos en conejos. Raquel Linaje, Gaspar Pérez Martínez y Manuel Zúñiga.

Capítulo 13. Mejora de las propiedades tecnológicas y sensoriales de *Lactobacillus casei* por ingeniería de rutas metabólicas. Gaspar Pérez-Martínez, Mª José Gosalbes, Rosa Viana, Carlos D. Esteban, José Luis Galán, Mª Jesús Yebra y Vicente Monedero.

Capítulo 14. Diseño de probióticos como vectores de vacunas orales y otras moléculas terapéuticas. Vicente Monedero, Isabel Pérez-Arellano, Rosa Viana, Manuel Zúñiga, Javier Buesa, Rebeca Montava Vilaplana, Jesús Rodríguez-Díaz, Paulo Lee Ho, Leonor Sarno de Oliveira y Gaspar Pérez-Martínez.

Capítulo 15. *Lactobacillus,* vehículos presentadores de antígenos. Beatriz Martínez.

Abreviaturas

MICROORGANISMOS Y SALUD: BACTERIAS LÁCTICAS Y BIFIDOBACTERIAS PROBIÓTICAS

Coordinador:
Juan Miguel Rodríguez Gómez
Dpto. Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos,
Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid,
28040 Madrid

Tel.: 91-394 37 47
Fax: 91-394 37 43
Correo electrónico: jmrodrig@vet.ucm.es

Prefacio

Durante una buena parte del siglo XX, la obtención de los alimentos necesarios para satisfacer una dieta sin deficiencias constituyó una de las principales preocupaciones cotidianas de muchas familias españolas. Sin embargo, en las últimas décadas, el aumento de la capacidad adquisitiva ha propiciado una mayor concienciación social sobre las relaciones entre la Alimentación y la Salud. Ciertos alimentos ejercen un efecto beneficioso sobre la salud de los consumidores, más allá del atribuible a su estricto valor nutritivo. Este hecho ha favorecido el desarrollo de alimentos con un valor añadido para el consumidor: los "alimentos funcionales". Se trataría de alimentos naturales, o desarrollados a partir de ingredientes naturales, que se consumen como parte de la dieta y que desempeñan una función concreta, entre otros procesos, en la mejora de los mecanismos de defensa frente a agentes nocivos, la prevención de enfermedades y/o el retraso del proceso de envejecimiento.

Actualmente, los probióticos constituyen el segmento con mayor importancia económica dentro los alimentos funcionales, representando alrededor del 65% de su mercado mundial. Los componentes más típicos de los productos probióticos son las bacterias lácticas y las bifidobacterias. En general, los consumidores perciben estas bacterias como algo "natural" y "beneficioso para la salud", lo que les convierte en candidatos ideales para su selección como probióticos.

El libro recoge las aportaciones realizadas por prestigiosos grupos de investigación españoles en el campo de los probióticos y, a grandes rasgos, está estructurado en cinco secciones. Tras una introducción general al tema (capítulo 1) se tratan distintos aspectos de las bacterias lácticas y bifidobacterias como habitantes naturales de las mucosas humanas, donde desempeñan funciones relevantes para sus hospedadores (capítulos 2-8). La presencia de bacterias probióticas en la leche humana (capítulos 2-4) puede ser la causa de algunos de los efectos beneficiosos derivados de la alimentación de los niños prematuros con leche materna, motivo que justifica la inclusión de un capítulo dedicado a la descripción del todavía ampliamente desconocido "método canguro" (capítulo 5). El tercer bloque se destina a la aplicabilidad de ciertas bacterias probióticas en el sector lácteo (capítulos 9 y 10). No conviene olvidar que los productos lácteos representan el principal vehículo de bacterias probióticas a los consumidores. Los capítulos 11 y 12 están dedicados a los probióticos animales y, más específicamente, a su potencial en avicultura y en cunicultura. La legislación es cada

vez más restrictiva en cuanto al empleo de antibióticos con fines zootécnicos. Este hecho ha despertado un interés creciente por el empleo de probióticos en producción animal. Finalmente, se incluye un grupo de temas (capítulos 13, 14 y 15) que abordan cómo la biotecnología puede contribuir a mejorar las propiedades tecnológicas de ciertas cepas, e incluso conferirles nuevas propiedades beneficiosas, como la de actuar como agentes vacunales.

Como se puede apreciar, se trata de un tema multidisciplinar que se está abordando desde diversas perspectivas, y en el que el interés de los sectores biomédico e industrial es cada día mayor. Los problemas derivados del empleo abusivo de antibióticos en personas y animales han propiciado un renovado interés en el empleo de ciertas bacterias como agentes preventivos y/o terapéuticos. Por ello, cabe esperar que las investigaciones en marcha fructifiquen en conocimientos relevantes y aplicaciones reales.

Juan Miguel Rodríguez Gómez
Coordinador

CAPÍTULO 1

BACTERIAS LÁCTICAS Y BIFIDOBACTERIAS COMO PROBIÓTICOS

Rocío Martín[a], Susana Langa[a], Carlota Reviriego[a], María L. Marín[a], Jordi Xaus[b], Leónides Fernández[a] y Juan M. Rodríguez[a]

[a]Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid. [b]Departamento de Immunología, Puleva Biotech, Granada

En los últimos años, la progresiva comprensión de las estrechas relaciones entre nutrición y salud ha permitido conocer el papel de ciertos alimentos (o de algunos de sus componentes) en la mejora de la salud y/o en la reducción del riesgo de enfermedad de los consumidores, más allá de los efectos atribuibles a su valor estrictamente nutritivo. Este hecho ha favorecido el desarrollo de alimentos con un valor añadido para el consumidor, conocidos, en general, como "alimentos funcionales". En Europa, el término "alimento funcional" no está claramente delimitado por una definición legal. No obstante, Goldberg (1994) ha propuesto una definición ampliamente aceptada hasta la fecha. Para este autor sería cualquier alimento que tenga un impacto positivo, y diferenciado de su valor nutritivo, sobre la salud de un individuo. Se trataría de un alimento natural, o desarrollado a partir de ingredientes naturales, que se consumiría como parte de la dieta y que desempeñaría una función concreta en procesos tales como la mejora de los mecanismos biológicos de defensa frente a agentes nocivos, la prevención de enfermedades o el retraso del envejecimiento. En este contexto, los alimentos que contienen microorganismos probióticos no sólo representan el prototipo de alimento funcional sino que, además, son los que gozan de mayor importancia económica, ya que representan alrededor del 65% del mercado mundial de tales alimentos (aproximadamente 75.000 millones de dólares anuales) (Holzapfel y Schillinger, 2002).

Probióticos, prebióticos y simbióticos: definiciones

Posiblemente, el término "probiótico" fue empleado por primera vez por Vergio (1954), cuando comparaba los efectos adversos ("*antibiotika*") que los antibióticos ejercían sobre la microbiota intestinal con las acciones beneficiosas ("*probiotika*") ejercidas por otros factores que no pudo determinar. Una década más tarde, Lilly y Stillwell (1965) se referían a los probióticos como microorganismos que promovían el crecimiento de otros microorganismos. Fuller (1989) redefinió probióticos como "aquellos suplementos alimenticios integrados por microorganismos vivos que afectan beneficiosamente al

hospedador que los consume mediante la mejora de su equilibrio microbiano intestinal". Más recientemente, se han definido como organismos vivos que ingeridos a dosis definidas ejercen efectos beneficiosos para la salud (Guarner y Schaafsma, 1998). Esta última definición es más amplia y tiene en cuenta los resultados de recientes investigaciones que demuestran la existencia de efectos probióticos que no se restringen al ámbito de la microflora intestinal.

Por otra parte, los "*prebióticos*" son aquellos carbohidratos no digeribles pero fermentables de la dieta que favorecen el crecimiento en el colon de ciertas bacterias consideradas beneficiosas para el hospedador, como los lactobacilos o las bifidobacterias (Cummings y col., 2001; Marteau y Flourié, 2001). Finalmente, un producto alimenticio que combina al menos un probiótico y un prebiótico se denomina "*simbiótico*" (Holzapfel y Schillinger, 2002). Si el carbohidrato prebiótico es utilizado por la cepa probiótica, se promoverá selectivamente su proliferación en el intestino del hospedador. Es interesante señalar que la combinación de probiótico y prebiótico en un mismo producto puede tener un efecto sinérgico y conferir beneficios mayores que los que ejercen cada uno de los componentes del simbiótico por separado, como una mayor disminución de focos crípticos aberrantes en el colon (Rowland y col., 1998) o una reducción de los fenómenos de carcinogénesis en el colon de ratas (Gallaher y Khil, 1999).

Bacterias lácticas y bifidobacterias como probióticos. Perspectiva histórica

En general, el concepto "probiótico" está íntimamente ligado a las bacterias lácticas y las bifidobacterias. Las bacterias lácticas gozan de gran importancia económica ya que, bien de forma natural o añadidas intencionadamente, desempeñan un papel importante en la fermentación de una gran variedad de alimentos. En ellos, sus actividades metabólicas no sólo contribuyen al desarrollo de características organolépticas y reológicas deseables, sino que, además, permiten conservar o aumentar el valor nutritivo y la salubridad de la materia prima. Por otra parte, las bacterias lácticas y los productos de su metabolismo han sido consumidos desde tiempos inmemoriales a través de alimentos fermentados. Esta circunstancia, unida al hecho de que raramente se les haya asociado a procesos patológicos, ha contribuido a la designación de muchas de las especies del grupo como bacterias "seguras" o GRAS (*Generally Recognized As Safe*; reconocidos generalmente como seguros). En contraposición con los aditivos químicos, los consumidores perciben las bacterias lácticas como algo "natural" y "beneficioso para la salud", por lo que su empleo en la conservación de los alimentos tiene gran aceptabilidad (Montville y Winkowski, 1997; Aymerich y Hugas, 1998).

Pero además, las bacterias lácticas y las bifidobacterias resultan atractivas para los sectores médico, veterinario y alimentario por el potencial que tienen para ejercer efectos beneficiosos en la salud de los hospedadores que las ingieren y, de hecho, ocupan el lugar más destacado entre los microorganismos empleados con fines probióticos. A continuación, se hace una breve reseña de los acontecimientos históricos más importantes que han conferido a estos microorganismos el estatus que disfrutan en la actualidad.

Durante el último cuarto del siglo XIX, y sobre la base de los estudios de Pasteur, se empezaron a descubrir los agentes causales de diversas enfermedades infecciosas que afectaban a los animales y a los humanos. En esa época, las continuas revelaciones sobre el papel de las bacterias en las enfermedades estaban empezando a alarmar a la población general, que culpaba a esos recién descubiertos agentes de prácticamente todos los males que padecía la Humanidad. No obstante, William Underwood, del Instituto Tecnológico de Massachusetts, se percató inteligentemente de que no todas las bacterias eran nocivas sino que, muy al contrario, muchas eran imprescindibles para la vida, como se desprende de una conversación con su compañero Samuel Prescott: "*Desde el principio, me gustaría prevenirte frente a la creencia tan extendida de que todas las bacterias son productoras de enfermedades por naturaleza. De hecho, los gérmenes útiles exceden con gran diferencia a los nocivos, de la misma manera que los ciudadanos útiles exceden a los criminales […]. Es más, sin la acción de las bacterias no podríamos existir, por lo que debemos considerarlas como amigas más que como enemigas, a pesar de que existan algunas especies que nos puedan dañar*" (Prescott, 1898).

A principios del siglo XX se empezó a sugerir que la Humanidad no sólo había hecho uso inadvertido de una multitud de microorganismos para la elaboración y/o conservación de una parte sustancial de su suministro de alimentos, sino que además existían algunas bacterias que ejercían ciertos efectos beneficiosos para la salud de los hospedadores (Moro, 1900; Beijerinck, 1901; Cahn, 1901). Así, en una conferencia pronunciada el 3 de octubre de 1901, Elie Metchnikoff, a la sazón director del Instituto Pasteur, afirmaba que "*tan pronto como nace, el hombre se convierte en el hábitat de una rica microflora. La piel, las membranas mucosas y el contenido gastrointestinal se pueblan de tal flora, aunque hasta la fecha sólo se hayan reconocido o descrito un número muy pequeño de estos microorganismos […]. Durante mucho tiempo hemos pensado que en individuos sanos todos estos microorganismos eran inofensivos y algunas veces incluso útiles*" (Metchnikoff, 1905).

Posteriormente, en 1907, el mismo investigador publicó un libro que ejerció una gran influencia en la comunidad científica: *Prolongation of Life* (Metchnikoff, 1907). En él,

Metchnikoff postulaba que las bacterias que intervenían en la fermentación del yogur contribuían al mantenimiento de la salud mediante la supresión de las “fermentaciones de tipo putrefactivo” de la flora intestinal y que ésta era la causa de la longevidad de los campesinos búlgaros, grandes consumidores de yogur.

Un año antes, Cohendy había administrado leche fermentada por *Lactobacillus bulgaricus* (actualmente *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) a pacientes con alteraciones en sus “fermentaciones intestinales”, observando una notable mejoría tras 8-12 días de tratamiento (Cohendy, 1906a; 1906b). Paralelamente, Tissier (1906) no sólo había descubierto la existencia de bifidobacterias en el tracto intestinal de lactantes alimentados exclusivamente con leche materna, sino que había demostrado los beneficios clínicos derivados de la modulación de la flora intestinal de niños con infecciones intestinales. En su trabajo, Tissier abogó por la administración de cultivos de bifidobacterias a niños que sufrieran diarreas ya que creía que estas bacterias desplazaban a las patógenas. No obstante, la base científica todavía no era sólida, razón por la que en esa época muchos científicos mantuvieron una postura muy escéptica sobre la terapia bacteriana y cuestionaron la capacidad de las bacterias del yogur para sobrevivir durante el tránsito gastrointestinal, colonizar la mucosa intestinal y ejercer efectos beneficiosos. Este escepticismo no impidió la popularización de los supuestos beneficios para la salud entre la clase médica y los consumidores.

En ese clima, y entusiasmado por los efectos atribuidos a los yogures balcánicos y los resultados obtenidos en el Instituto Pasteur, Isaac Carasso estableció su primer establecimiento de yogures (Danone) en Barcelona en 1909. Carasso siempre mostró predilección por los círculos médicos, en un momento en el que la profesión médica estaba vivamente interesada por los efectos terapéuticos del yogur. Este hecho contribuyó decisivamente al prestigio de un producto que durante varias décadas sólo se podía adquirir en farmacias y que se empleaba para prevenir o aliviar trastornos tan diversos como diarrea, estreñimiento, dispepsia, colitis mucosa, colitis ulcerativa crónica, disbiosis por antibioterapia, cistitis o dermatitis (Shortt, 1999a).

En la primera mitad de los años 20, Cheplin y Rettger (1922) y Kulp y Rettger (1925) describieron los efectos beneficiosos sobre la función digestiva de la leche fermentada con otra bacteria, *Lb. acidophilus*, y recomendaron el empleo de aislados intestinales ya que pensaban que la colonización y crecimiento en el intestino eran factores esenciales para su eficacia. Estos trabajos estimularon, particularmente en Estados Unidos y Japón, el interés comercial tanto por las leches fermentadas con dicha bacteria como por las no fermentadas a las que simplemente se les había añadido. Así, a principio de los años 30, el médico japonés

Shirota se dedicó a la selección de cepas de origen intestinal que sobrevivían al tránsito intestinal. Su objetivo era el desarrollo de leches fermentadas terapéuticas para emplearlas en su clínica. Su primer producto que contenía *Lb. acidophilus* Shirota (posteriormente reclasificado como *Lb. casei* Shirota) constituyó la base para el establecimiento de la compañía Yakult (Yakult Central Institute, 1998).

Unos años después, Gordon y col. (1957) indicaron, por primera vez, que la selección de lactobacilos con fines terapéuticos debería estar regida por ciertos criterios más o menos definidos. En concreto, sugirieron que: (1) fueran habitantes normales del intestino, (2) carecieran de patogenicidad, (3) fueran capaces de establecerse en el intestino y (4) alcanzaran grandes concentraciones. Hawley y col. (1959) añadieron otro factor que creían clave para el éxito de la terapia: la administración simultánea de una dieta rica en leche o lactosa o que incorporara cualquier factor de crecimiento requerido por los lactobacilos. De este modo, premonizaban el concepto de "prebiótico".

Durante la primera mitad del siglo XX, los criterios para la clasificación taxonómica de las bacterias lácticas no estaban bien definidos y los métodos microbiológicos disponibles eran relativamente rudimentarios. A pesar de ello, tal y como se acaba de exponer, la habilidad de ciertos investigadores propició que muchos de los criterios que se consideran básicos en la actualidad para la selección de bacterias probióticas ya se hubieran enunciado durante aquel período. Lamentablemente, la mayor parte de los estudios clínicos realizados hasta hace unos años en el campo de la terapia bacteriana tenían errores de diseño y/o las preparaciones no estaban bien definidas. Por otra parte, la lista de "posibles" efectos beneficiosos atribuibles a las bacterias lácticas y bifidobacterias ha ido creciendo progresivamente, sin reparar en que a menudo los efectos dependen de la cepa y de unas condiciones de conservación y administración muy concretas. Es decir, se han ido creando unas expectativas irreales o injustificadas en torno a las propiedades de estas bacterias. Estas circunstancias han conducido, a menudo, al desarrollo de productos que no contienen las especies (o cepas) más idóneas y que, por lo tanto, no resultan eficaces para los fines que persiguen. La consecuencia final fue que, en el último cuarto del siglo XX, se cuestionara la base científica de la acción probiótica y creciera el escepticismo médico en torno a este concepto. Afortunadamente, desde hace aproximadamente una década, el número de ensayos clínicos correctamente diseñados ha aumentado espectacularmente (Naidu y col., 1999), lo que ha permitido demostrar la validez de ciertas cepas en aplicaciones clínicas (Salminen y col., 1998a). Adicionalmente, la progresiva preocupación de los consumidores por las relaciones entre la alimentación y la salud, su creciente demanda de productos más naturales y

la concienciación que existe en torno al abuso de la antibioterapia, tanto en medicina humana como en producción animal, ha desencadenado un notable resurgimiento del interés por los probióticos entre los consumidores, los científicos y los industriales de los sectores alimentario, farmacéutico y biotecnológico.

Criterios de selección de bacterias probióticas

El espectro de alimentos probióticos introducidos en el mercado está aumentando rápidamente, incluyendo productos no lácteos, como productos cárnicos fermentados, zumos u otros productos de origen vegetal (Holzapfel y Schillinger, 2002; Jahreis y col., 2002). Hasta la fecha se han incluido numerosas especies de bacterias lácticas y bifidobacterias entre las bacterias (potencialmente) probióticas (Tabla 1) y ese número crecerá notablemente gracias a los avances en las técnicas de biología molecular aplicables a la ecología microbiana. En cualquier caso, la selección de cepas con fines probióticos supone todo un reto para los investigadores y las industrias, ya que cada tipo de alimento tiene sus propias características y resulta difícil uniformizar los criterios de selección de este tipo de microorganismos. En este sentido, se han sugerido numerosos criterios para la selección de bacterias (Charteris y col., 1998; Collins y col., 1998, Holzapfel y col., 1998; Klaenhammer y Kullen, 1999; Mattila-Sandholm y col., 1999; Ouwehand y col., 1999; Shortt, 1999b) (Tabla 2). Entre todos ellos, existen seis sobre los que existe un acuerdo prácticamente general: (1) habitante normal del hospedador diana; (2) ausencia de patogenicidad; (3) resistencia al tránsito por el aparato digestivo; (4) capacidad para resistir los procesos tecnológicos; (5) viabilidad durante toda la vida útil del producto; y (6) evidencia científica de efecto(s) beneficioso(s) específico(s) en estudios clínicos correctamente diseñados. No obstante, en la actualidad, incluso alguno de estos criterios son objeto de controversia. Así sucede con el primero ya que, por una parte, existen bacterias lácticas que pueden ser útiles como probióticos en hospedadores distintos a su fuente original.

En el futuro, es muy posible que los criterios que se adopten para seleccionar una cepa probiótica dependan del segmento de la población al que vaya dirigido. Por ejemplo, tradicionalmente se ha considerado que la presencia de actividad β-glucuronidasa o la capacidad de formar ciertas aminas son características no deseables en una bacteria que se pretenda emplear con fines probiótocos. Sin embargo, estas actividades pueden ser importantes en bebés, en los que la citada enzima participa de forma determinante en la

eliminación de la bilirrubina libre y en los que algunas poliaminas son importantes en la maduración del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal.

Efectos probióticos de las bacterias lácticas y bifidobacterias

Como se ha indicado anteriormente, no se puede asumir que todas las bacterias lácticas y bifidobacterias posean propiedades probióticas. De igual manera, cuando se adscribe un efecto probiótico a una cepa, tampoco se puede extrapolar esa propiedad a las restantes cepas de la misma especie. Incluso la adscripción de un efecto probiótico a una cepa depende de las condiciones de su empleo y, muy particularmente, de la dosis. En este sentido, se recomienda que la concentración de un probiótico en un producto debe ser del orden de 10^8 ufc ml^{-1} (o g^{-1}) o superior (Shortt, 1999a).

Naidu y col. (1999) realizaron una exhaustiva revisión crítica de los efectos de los probióticos, incluyendo datos de estudios *in vitro* e *in vivo*. Según estos autores, desde 1961 a 1998 se han efectuado al menos 143 ensayos clínicos humanos con probióticos y los resultados suelen indicar que, efectivamente, existen ciertas cepas capaces de proporcionar efectos beneficiosos para la salud. En cualquier caso, es necesario profundizar en el desarrollo de marcadores biológicos validados que permitan la comprobación interlaboratorial de los efectos probióticos que se produzcan *in vivo* (Diplock y col., 1999; Yoon y col., 1999). En este sentido, un informe científico financiado por la Unión Europea concluyó que los efectos beneficiosos para la salud humana atribuidos a ciertas cepas de lactobacilos y bifidobacterias podían considerarse científicamente probados (Salminen y col., 1998a). El principal criterio seguido por la Comisión encargada de elaborar el informe fue que el efecto probiótico fuese patente e inequívoco en al menos dos estudios humanos correctamente diseñados e independientes.

De hecho, los probióticos están siendo rigurosamente evaluados en diversos hospitales y centros médicos como adjuntos en el tratamiento y/o prevención de diversas enfermedades (enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, atopias, bronquitis asmática, alergias alimentarias, infección con *Helicobacter pylori*, algunos tipos de cáncer, infecciones urogenitales, etc.) y los resultados son prometedores (Salminen y col., 1998a; 1998b; Arvola y col., 1999; Kalliomäki y col., 2001; Reid y col., 2001; Marteau y col., 2002; Rafter, 2002; Shanahan, 2002). Por ejemplo, los datos epidemiológicos han demostrado que el consumo de leches fermentadas con ciertas bacterias lácticas está asociado a una menor incidencia de úlceras

gastroduodenales en Europa (Elmstahl y col., 1999) y de cáncer de vejiga en Japón (Shortt, 1999a).

Uno de los efectos beneficiosos atribuidos tradicionalmente a las bacterias lácticas y bifidobacterias es el mantenimiento de un equilibrio microbiano en el intestino. Entre otros mecanismos de acción, esta microflora actuaría de barrera frente a bacterias potencialmente patógenas, mediante mecanismos de competencia por nutrientes y por lugares de adhesión y/o mediante la producción de sustancias antimicrobianas. Sin embargo, la microflora intestinal es realmente compleja y dinámica y los conocimientos sobre su composición, su evolución a lo largo de la vida del hospedador y su interacción con otras bacterias y con el epitelio intestinal son todavía muy limitados. En este sentido, los avances en las técnicas de identificación y trazabilidad microbiana permitirán estudios cada vez más sofisticados y precisos sobre la ecología microbiana de los probióticos y su papel como moduladores de la salud (O'Sullivan, 1999; Tannock, 1999).

Actualmente, muchos de los estudios que se están realizando para dilucidar los mecanismos responsables de los efectos probióticos se están centrando en las propiedades inmunomoduladoras de las cepas. Resulta cada vez más evidente que muchas actividades probióticas, incluyendo la prevención de ciertos tipos de cáncer, están mediadas por procesos de regulación inmunitaria, como el aumento de la secreción de IgAs (Schiffrin y col., 1995) y, especialmente, mediante el mantenimiento de un equilibrio entre citoquinas pro- y antiinflamatorias (Isolauri y col., 2001), lo que abre nuevas expectativas para el empleo de bacterias probióticas como agentes terapéuticos (Marteau y col., 2002).

Consideraciones taxonómicas acerca de los probióticos

En los productos probióticos, es importante que la clasificación taxonómica de las bacterias que los integran sea exacta, ya que se trata de un aspecto que puede tener connotaciones para la seguridad y legalidad de los mismos (O'Brien y col., 1999). Diversos estudios han señalado que la composición bacteriana real de algunos productos probióticos no coincide, cualitativa y/o cuantivamente, con la información reflejada en sus etiquetas (Hamilton-Miller, 1996; Anónimo, 1997; Canganella y col., 1997; Hamilton-Miller y col., 1998; Klein y col., 1998; Shortt, 1999b; Fasoli y col., 2003; Temmerman y col., 2003).

La normativa aplicable al empleo de cultivos microbianos en los alimentos varía, en caso de que exista, dependiendo de los países. En muchos casos, los probióticos se aprueban sobre la base de que pertenecen a especies o géneros reconocidos generalmente como seguros

(GRAS) y/o de que se han empleado históricamente en los alimentos sin causar problemas higiénico-sanitarios. El hecho de que la asignación de un aislado a una especie concreta pueda significar la adquisición automática de la condición GRAS ha sido objeto de controversia en los últimos años (Holzapfel y Schillinger, 2002). Por otra parte, la sistemática bacteriana es una ciencia en constante evolución y es frecuente la reclasificación de bacterias ampliamente empleadas por la industria alimentaria dentro de una nueva especie. Este hecho es particularmente acusado dentro de las bacterias lácticas. *Lactobacillus* GG constituye un ejemplo ilustrativo dentro de las bacterias lácticas probióticas. Inicialmente patentada como *Lb. acidophilus* (Gorbach y Goldin, 1989), posteriormente se incluyó en la especie *Lb. casei* (Isolauri y col., 1995) y actualmente se clasifica como *Lb. rhamnosus* (Arvola y col., 1999).

La identificación incorrecta de bacterias probióticas puede ser un problema bastante común ya que resulta extremadamente difícil identificar inequívocamente una bacteria láctica al nivel de especie sin el empleo de las más modernas técnicas (O'Brien y col., 1999; Tannock, 1999). Es más, en ocasiones la identificación resulta complicada incluso recurriendo a dichas técnicas. Además, los fabricantes pueden mostrarse reticentes a modificar la etiqueta de un producto, particularmente si implica un cambio en el nombre de una especie con el que los consumidores están familiarizados y que lo asocian con beneficios para la salud, como *Lb. acidophilus*. En este sentido, las cepas agrupadas originalmente como *Lb. acidophilus* se han dividido en seis especies diferentes (*Lb. acidophilus, Lb. amylovorus, Lb. crispatus, Lb. gallinarum, Lb. gasseri* y *Lb. johnsonii*) desde 1992 (Fujisawa y col., 1992). En consecuencia, es previsible esperar que en el futuro otras bacterias lácticas probióticas se vean sujetas a cambios taxonómicos.

En el caso de las bifidobacterias, la situación no es mejor ya que a menudo en las etiquetas de los productos sólo consta que contienen "*bifidus*". La identificación de las bifidobacterias empleadas como probióticos es importante ya que existen tres especies (*Bifidobacterium dentium, B. denticolens* y *B. inopinatum*) asociadas con el desarrollo de caries dental en la especie humana (O'Brien y col., 1999).

Seguridad de los probióticos

La importancia de demostrar la seguridad de nuevos probióticos antes de su introducción en el mercado está fuera de cualquier duda, considerándose un criterio crítico para la selección de cepas probióticas. Diversos autores (Salminen y col., 1998c; O'Brien y col., 1999) han propuesto una serie de pruebas para evaluar la seguridad de las cepas

bacterianas que se aplican, o se deseen aplicar, como probióticos (Tabla 3). Además del conocimiento de su origen y una correcta caracterización taxonómica al nivel de género, especie y cepa, hay que conocer aquellas propiedades intrínsecas relevantes desde el punto de vista de la seguridad, como posibles factores de virulencia, potencial invasivo, resistencia a antibióticos y facilidad para intercambiar material genético mediante procesos conjugativos.

La actividad metabólica de un microorganismo, tanto en un alimento como en el intestino, constituye un criterio de seguridad importante. En este sentido sería recomendable que se investigaran ciertas actividades metabólicas que pudieran suponer un peligro potencial para los consumidores en general, o para ciertos colectivos en particular (O'Brien y col., 1999). Entre las actividades que convendría evaluar destacan las que se enumeran en la Tabla 3.

En cuanto a la infectividad de los probióticos, la mayor parte de infecciones humanas por bacterias lácticas han sido causadas por cepas de origen endógeno, es decir procedentes de la propia microflora del paciente. Los hospedadores afectados solían padecer algún factor predisponente adicional, particularmente alteraciones en las válvulas cardiacas o presencia de catéteres. En tales casos, la mayor parte de las cepas implicadas eran lactobacilos o enterococos. Entre los lactobacilos destacan cepas de las especies *Lb. rhamnosus, Lb. casei, Lb. paracasei* y *Lb. plantarum* (O'Brien y col., 1999). Mención aparte merecen las cepas clínicas de *Enterococcus faecalis* y *E. faecium*, ya que, aparte de su patogenicidad potencial, suelen estar asociadas a resistencias a ciertos antibióticos, particularmente a la vancomicina, uno de los antibióticos reservados para combatir microorganismos multirresistentes. De hecho, el tema de los enterococos se aborda en un capítulo aparte de este libro. Por el contrario, las asociaciones entre bacterias lácticas de origen alimentario e infecciones han sido extremadamente raras (Saxelin y col., 1996a; 1996b; Adams, 1999; Kirjavainen y col., 1999; Mackay y col., 1999; Rautio y col., 1999).

Con los datos obtenidos de las investigaciones y estudios epidemiológicos realizados en la última década, resulta evidente que los probióticos empleados actualmente son seguros en las condiciones de uso autorizadas. Se debe poner especial énfasis en el hecho de que las bacterias lácticas probióticas se han administrado a pacientes con enfermedad de Crohn, con diferentes tipos de gastroenteritis o con SIDA, y a enfermos de unidades oncológicas sujetos a radioterapia y quimioterapia, sin registrarse ni un solo caso de infección por el probiótico administrado. Bien al contrario, los resultados obtenidos han sido prometedores. Tampoco se han descrito efectos adversos derivados de la administración de bacterias lácticas probióticas

a mujeres gestantes, niños sanos, niños prematuros, niños alérgicos o ancianos (O'Brien y col., 1999).

Aunque se puede especular que un estado de inmunodeficiencia o la presencia de lesiones en el tracto gastrointestinal puede favorecer el paso de probióticos y otros microorganismos desde la luz intestinal a la lámina propia y, por lo tanto, a la circulación linfática y/o sistémica, los estudios en hamsters con colitis por *Clostridium difficile* (Naaber y col., 1998) y en ratones irradiados o inmunodeprimidos (Dong y col., 1987) han demostrado que un probiótico con la propiedad de adherirse a la mucosa intestinal mejora el efecto barrera de la mucosa y previene la entrada de microorganismos intestinales.

La información genética, y especialmente la codificada en plásmidos, puede ser transferida de unos microorganismos a otros. Este fenómeno biológico plantea la cuestión de si pueden existir intercambios genéticos entre microorganismos presentes en los alimentos y los que puedan existir en la microflora intestinal, incluyendo los patógenos (O'Brian y col., 1999). El intercambio de material genético dentro de una comunidad microbiana puede realizarse de tres formas: (1) transducción; (2) conjugación; y (3) transformación. En el caso de la transducción, el DNA se transfiere de una bacteria a otra mediante un bacteriófago. Se trata de un proceso que depende del espectro de hospedadores del fago, por lo que la posibilidad de transferencia genética mediante este sistema suele estar restringido a un número muy limitado de cepas. Por el contrario, tanto la conjugación como la transformación son procesos con un potencial muy superior de intercambio de DNA entre bacterias pertenecientes a distintas especies, e incluso géneros.

No obstante, con la importante excepción de los enterococos, los plásmidos y elementos genéticos transponibles que contienen genes de resistencia a antibióticos son relativamente raros entre las bacterias lácticas (von Wright y Sibakov, 1998). Entre los lactobacilos, se ha observado que ciertas cepas de *Lb. fermentum, Lb. acidophilus, Lb. reuteri* y *Lb. plantarum* portan plásmidos que confieren resistencia frente a la eritromicina (y macrólidos similares), tetraciclina y cloranfenicol. Por lo tanto, aunque la posibilidad de propagación de resistencias a antibióticos a partir de bacterias lácticas de origen alimentario parezca remota (de hecho no se ha observado nunca hasta el momento), tampoco puede ser completamente excluida y debe ser evaluada. En cualquier caso, cuando se comparan perfiles de resistencia a antibióticos es importante diferenciar entre la resistencia intrínseca y la mediada por elementos genéticos específicos. El ejemplo de la resistencia intrínseca a la vancomicina puede servir de ejemplo ilustrativo. La vancomicina es uno de los antibióticos empleados en el tratamiento de infecciones por estafilococos multirresistentes, por lo que es

particularmente importante que la resistencia a dicho antibiótico no sea transferida a patógenos. Muchas especies de lactobacilos (p.ej.: *Lb. rhamnosus*, *Lb. casei* y *Lb. paracasei*), pediococos y leuconostocs son intrínsecamente resistentes a la vancomicina debido a la estructura que adoptan los precursores del peptidoglicano de su pared celular (Billot-Klein y col., 1994). Muchas cepas de tales microorganismos se encuentran de forma natural en los alimentos, se emplean en la industria alimentaria como cultivos iniciadores o como probióticos, o forman parte de la microflora nativa del tracto gastrointestinal. Pues bien, hasta la fecha no existe ninguna evidencia de que el fenotipo de resistencia intrínseca a la vancomicina pueda ser transferido a ningún otro microorganismo presente en los alimentos o en el intestino.

Probióticos: ¿alimentos o fármacos?

La Unión Europea no permite por el momento que los alimentos puedan utilizar como reclamo efectos directos sobre la salud de los consumidores, a pesar de que, en la práctica, en la publicidad de muchos productos (especialmente lácteos) que contienen probióticos se suele hacer referencia a efectos beneficiosos, como “la estimulación de las defensas del organismo”. Resulta evidente que los alimentos probióticos, al igual que el resto de alimentos funcionales, suponen un desafío para las autoridades legislativas a la hora de establecer claramente qué beneficios relacionados con la salud se pueden reclamar y difundir publicitariamente en asociación con los alimentos (Mollet y Rowland, 2002). En otras palabras: ¿dónde se deben situar los límites entre un alimento funcional y un producto farmaceutico? El hecho de que tanto las industrias alimentarias como las farmacéuticas persigan activamente el desarrollo de nuevos alimentos funcionales no contribuye a aclarar la situación. Recientemente, la Alta Corte de Justicia de Hamburgo (Alemania) ha dado un paso significativo hacia la resolución de esta controversia al aprobar el empleo de la reclamación de “estimulación del sistema inmune” para un alimento alemán (Hanseatisches Oberlandesgericht Hamburg, 2001).

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida a través del proyecto AGL2003-01242 y de un contrato Art. 83 con Puleva Biotech S.A.

Referencias

Adams, M.R. (1999). Safety of industrial lactic acid bacteria. *J. Biotechnol.* **68:**171-178.

Anónimo (1997). Healthy eating bio yoghurts-potted health. *Health Which?* **June:**92-95.

Arvola, T., Laiko, K., Torkkeli, S., Mykkanenm H., Salminen, S., Maunula, L. y Isolauri, E. (1999). Prophylactic *Lactobacillus* GG reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory interactions: a randomised study. *Pediatrics* **104:**64-72.

Aymerich, M.T. y Hugas, M. (1998). Estado actual de la bioconservación en productos cárnicos. *Eurocarne* **72:**39-49.

Beijerinck, M.W. (1901). Sur les ferments de lactique de l'industrie. *Arch. Neerland. Sci. Exact. Nat.* **6:**212-243.

Billot-Klein, L., Gutman, S., Sablé, E., Guittet, Y. y Van Heijenoort, J. (1994). Modification of peptidoglycan precursors is a common feature of the low-level vancomycin resistant species of *Lactobacillus casei, Pediococcus pentosaceus, Leuconostoc mesenteroides* and *Enterococcus gallinarum*. *J. Bacteriol.* **176:**2398-2405.

Cahn, D. (1901). Über die nach Gram färbbaren bacillen des säulingsstuhles. *Centralblatt für Bakteriologie I. Abteilung Originale* **30:**721-726.

Canganella, F., Paganini, S., Ovidi, M., Vettraino, A.M., Bevilacqua, L., Massa, S. y Trovatelli, S.D. (1997). A microbiology investigation on probiotic pharmaceutical products used for human health. *Microbiol. Res.* **152:**171-179.

Charteris, W., Kelly, P., Morelli, L. y Collins, K. (1998). Ingredient selection criteria for probiotic microorganism in functional dairy foods. *Int. J. Dairy Technol.* **51:**123-136.

Cheplin, H. y Rettger, L. (1922). The therapeutic application of *Lactobacillus acidophilus*. *Abst. Bacteriol.* **6:**24.

Cohendy, M. (1906a). Essais d'acclimatation microbienne dans le cavite intestinale. *C. R. Soc. Biol.* **60:**364.

Cohendy, M. (1906b). Description du ferment lactique puissant capable de s'acclimater dans l'intestine de l'homme. *C. R. Soc. Biol.* **60:**558.

Collins, J.K., Thornton, G. y Sullivan, G.O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.* **8:**487-490.

Cummings, J.H., Macfarlane, G.R. y Englyst, H.N. (2001). Prebiotic digestion and fermentation. *Am. J. Clin. Nut.* **73(S):**415S-420S.

Diplock, A., Aggett, P., Ashwell, M., Bornet, F., Fern, E., y Roberfroid, M. (1999). Scientific concepts of functional foods in Europe: Consensus document. *Brit. J. Nutr.* **81:**1-27.

Dong, M.Y., Chang, T.W. y Gorbach, S.L. (1987). Effects of feeding *Lactobacillus* GG on lethal irradiation in mice. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **7:**1-7.

Elmstahl, S., Svensson, U. y Berglund, G. (1999). Fermented milk products are associated to ulcer disease. Results from a cross-sectional population study. *Eur. J. Clin. Nutr.* **52:**668-674.

Fasoli, S., Marzotto, M., Rizzotti, L., Rossi, F., Dellaglio, F. y Torriani, S. (2003). Bacterial composition of commercial probiotic products as evaluated by PCR-DGGE analysis. *Int. J. Food Microbiol.* **82:**59-70.

Fujisawa, T., Benno, Y., Yaeshima, T. y Mitsuoka, T. (1992). Taxonomic study of the *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. Nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. Nov. and synonymy of *Lactobacillus acidophilus* group A3 (Johnson *et al.*, 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (Nakamura, 1981). *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42:**487-491.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66:**365-367.

Gallaher, D.D. y Khil, J. (1999). The effect of synbiotics on colon carcinogenesis in rats. *J. Nut.* **129(S):**1483S-1487S.

Goldberg, I. (1994). *Functional Foods*. Chapman & Hall, Nueva York.

Gorbach, S.L. y Goldin, B.R. (1989). *Lactobacillus* strains and methods of selection. *US Patent* 4.839.281.

Gordon, D., Macrae, J. y Wheater, D. (1957). A *Lactobacillus* preparation for use with antibiotics. *Lancet,* **May:**899-901.

Guarner, F. y Schaafsma, G.J. (1998). Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **39:**237-238.

Hamilton-Miller, J.M.T. (1996). Probiotic remedies are not what they seem. *Brit. Med. J.* **312:**55-56.

Hamilton-Miller, J.M.T., Shah, S. y Winkler, J.T. (1998). Public Health issues arising from microbiological and labelling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. *Public Health Nutr.* **2:**2-8.

Hanseatisches Oberlandesgericht Hamburg (2001). Urteil vom 30.11.200-3 U 86/00. *ZLR I/2001*:147.

Hawley, H., Shepherd, P. y Wheater, D. (1959). Factors affecting the implantation of lactobacilli in the intestine. *J. Appl. Biol.* **22:**360-367.

Holzapfel, W. y Schillinger, U. (2002). Introduction to pre- and probiotics. *Food Res. Int.* **35:**109-116.

Holzapfel, W., Haberer, P., Snell, J., Schillinger, U. y Huis in't Veld, J.H. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **41:**85-101.

Isolauri, E., Joensuu, J., Suomalainen, H., Luomala, M. y Vesikari, T. (1995). Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* **13:**310-312.

Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvillomi, H. y Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nut.* **73(S):**444S-450S.

Jahreis, G., Vogelsang, H., Kiessling, G., Schubert, R., Bunte, C. y Hammes, W.P. (2002). Influence of probiotic sausage (*Lactobacillus paracasei*) on blood lipids and immunological parameters of healthy volunteers. *Food Res. Int.* **35:**133-138.

Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P. y Isolauri, E. (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. *Lancet* **357:**1076-1079.

Kirjavainen, P.V., Crittenden, R.G., Donohue, D.C., Harty, D.W.S., Morris, L.F., Ouwehand, A.C., Playne, M.J., Rautelin, H., Salminen, S.J. y Tuomola, E.M. (1999). Adhesión and platelet aggregation properties of bacteremia-associated lactobacilli. *Infect. Immun.* **67:**2653-2655.

Klaenhammer, T.R. y Kullen, M.J. (1999). Selection and design of probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 50:45-57.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. y Reuter, G. (1998) Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **41:**103-125.

Kulp, L. y Rettger, L. (1925). Comparative studies of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. *Abst. Bacteriol.* **9:**1403.

Lilly, D.M. y Stillwell, R.H. (1965). Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* **147:**747-748.

Mackay, A.D., Taylor, M.B., Kibbler, C.C. y Hamilton-Miller, J.M.T. (1999). *Lactobacillus* endocarditis caused by a probiotic organism. *Clin. Microbiol. Infect.* **5:**290-292.

Marteau, P. y Flourié, B. (2001). Tolerance to low-digestible carbohydrates: symptomatology and methods. *Br. J. Nut.* **85(S):**817-821.

Marteau, P., Seksik, P. y Jian, R. (2002). Probiotics and health: new facts and ideas. *Curr. Op. Biotech.* **13:**486-489.

Mattila-Sandholm, T., Matto, J. y Saarela, M. (1999). Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy J.* **9:**25-37.

Metchnikoff, E. (1905). *Immunity in Infective Diseases*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.

Metchnikoff, E. (1907). *Prolongation of Life*. William Heinemann, Londres, Reino Unido.

Mollet, B. y Rowland, I. (2002). Functional foods: at the frontier between food and pharma. *Curr. Op. Biotech.* **13:**483-485.

Montville, T.J. y Winkowski, K. (1997). Biologically based preservation systems and probiotic bacteria. En *Food Microbiology Fundamentals and Frontiers*, M.P. Doyle, L.R. Beuchat y T.J. Montville (Eds.), p. 557-576. ASM Press, Washington, Estados Unidos.

Moro, E. (1900). Über den *Bacillus acidophilus*. Ein beitrag zur kenntnits der normalen darmbacterien des säuglings (*Bacillus acidophilus* n. spec.). *Jahrbuch für Kinderheilkunde* **52:**38-55.

Naaber, P., Mikelsaar, S., Salminen, S. y Mikelsaa, M. (1998). Bacterial translocation, intestinal microflora and morphological changes of intestinal mucosa in experimental models of *Clostridium difficile* infection. *J. Med. Microbiol.* **47:**1-8.

Naidu, A.S., Bidlack, W.R. y Clemens, R.A. (1999). Probiotic spectra of lactic acid bacteria (LAB). *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **38:**13-126.

O'Brien, J., Crittenden, R., Ouwehand, A.C. y Salminen, S. (1999). Safety evaluation of probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* **10:**418-424.

O'Sullivan, D.J. (1999). Methods for analysis of the intestinal microflora. En *Probiotics, a Critical Review*, G. Tannock (Ed.), p. 23-44. Horizon Scientific Press, Wymondham, Reino Unido.

Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C. y Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* **9:**43-52 (1999).

Prescott, S.C. (1898). Microorganisms and sterilizing processes in the canning industry. *Proceedings of a Joint Convention of the Atlantic States Packaging Association and the Westerns Packers Canned Goods Association*. Buffalo, Estados Unidos.

Rafter, J. (2002). Lactic acid bacteria and cancer: mechanistic perspective. *Br. J. Nutr.* **88:**S89-S94.

Rautio, M., Jousimies-Somer, H., Kauma, H., Pietarinen, I., Saxelin, M., Tynkkynen, S. y Koskela, M. (1999). Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* indistinguisable from *Lactobacillus rhamnosus* strain GG. *Clin. Infect. Dis.* **28:**1159-1160.

Reid, G., Bruce, A.W., Fraser, N., Heinemann, C., Owen, J. y Henning, B. (2001). Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **30:**49-52.

Rowland, J.R., Rumney, C.J., Coutts, J.T. y Lievense, L.C. (1998). Effect of *Bifidobacterium longum* and insulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis* **19:**281-285.

Salminen, S., Ouwehand, A.C. y Isolauri, E. (1998a). Clinical applications of probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **8:**563-572.

Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.C., Cummings, J., Franck, A., Gibson, G., Isolauri, E., Moreau, M.C., Roberfroid, M. y Rowland, I. (1998b). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit. J. Nutr.* **80:**147-171.

Salminen, S., von Wright, A., Morelli, L., Marteau, P., Brassard, D., de Vos, W.M., Fondén, R., Saxelin, M., Collins, K., Mogensen, G., Birkeland, S.E. y Mattila-Sandholm, T. (1998c). Demonstration of safety of probiotics. A review. *Int. J. Food Microbiol.* **44:**93-106.

Saxelin, M., Chuang, N.H., Chassy, B., Rautelin, H., Mäkelä, P.H., Salminen, S. y Gorbach, S.L. (1996a). Lactobacilli and bacteremia in Southern Finland, 1989-1992. *Clin. Infect. Dis.* **22:**564-566.

Saxelin, M., Rautelin, H., Salminen, S. y Mäkelä, P.H. (1996b). The safety of commercial products with viable *Lactobacillus* strains. *Infect. Dis. Clin. Pract.* **5:**331-335.

Schiffrin, E.J., Rochat, F., Link-Amster, H., Aeschlimann, J.M. y Donnet-Hughes, A. (1995). Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **78:**491-497.

Shanahan, F. (2002). Probiotics and inflammatory bowel disease: from fads and fancy to facts and future. *Br. J. Nutr.* **88:**S5-S9.

Shortt, C. (1999a). Host-microflora interface in health and disease. *Trends Food Sci. Technol.* **10:**182-185.

Shortt, C. (1999b). The probiotic century: historical and current perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* **10:**411-417.

Tannock, G. (1999). Identification of lactobacilli and bifidobacteria. En *Probiotics, A Critical Review*, G. Tannock (Ed.), p. 45-56. Horizon Scientific Press, Wymondham, Reino Unido.

Temmerman, R., Pot, B., Huys, G. y Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* **81:**1-10.

Tissier, H. (1906). Le traitement des infections intestinales per la méthode de transformation de la flore bactérienne de l'intestine. *C. R. Soc. Biol.* **60:**359-361.

Vergio, F. (1954). Anti- und Probiotika. *Hippokrates* **25:**16-119.

von Wright, A. y Sibakov, M. (1998). Genetic modification of lactic acid bacteria. En *Lactic Acid Bacteria. Microbiology and Functional Aspects*, S. Salminen y A. von Wright (Eds.), p. 161-210. Marcel Dekker Ltd., Nueva York.

Yakult Central Institute for Microbiological Research (1998). *Lactobacillus casei strain Shirota*. Yakult Honsha Company Ltd., Japón.

Yoon, H., Dubarry, M., Bouley, C., Meredith, C., Portier, A., Tome, D., Renevot, O., Blachon, J., Dugas, B., Drewitt, P. y Postaire, E. (1999). New insights in the validation of systemic biomarkers for the evaluation of the immunoregulatory properties of milk fermented with yoghurt culture and *Lactobacillus casei* (Actimel^{R}): a prospective trial". *Int. J. Immunother*. **15:**79-89.

Tabla 1. Principales especies de bacterias lácticas y bifidobacterias empleadas como probióticos humanos

Lactobacillus spp.:	Otras bacterias lácticas:	*Bifidobacterium* spp.:
Lb. acidophilus	*Enterococcus faecium*	*B. animalis (B. lactis)*
Lb. amylovorus	*Lactococcus lactis*	*B. bifidum*
Lb. casei	*Streptococcus thermophilus*	*B. breve*
Lb. crispatus		*B. infantis*
Lb. delbrueckii		*B. longum*
Lb. fermentum		
Lb. gasseri		
Lb. johnsonii		
Lb. paracasei		
Lb. plantarum		
Lb. reuteri		
Lb. rhamnosus		
Lb. salivarius		

Basado en: Collins y col. (1998), Tannock (1999) y Klaenhammer y Kullen (1999).

Tabla 2. Principales criterios para la selección de bacterias probióticas

1. Identificación taxonómica inequívoca y trazabilidad
2. Habitante normal de la especie hospedadora
3. Ausencia de toxicidad y/o de patogenicidad
4. Estabilidad genética
5. Supervivencia durante tránsito gastrointestinal en especie diana
6. Adherencia a mucosas
7. Capacidad de supervivencia y proliferación en lugar diana
8. Capacidad de competir con la microbiota del lugar diana
9. Actividad antimicrobiana frente a microorganismos no deseables
10. Producción de compuestos bioactivos (enzimas, péptidos, vacunas)
11. Propiedades inmunomoduladoras
12. Antimutagenicidad y/o anticarcinogenicidad
13. Efecto(s) beneficioso(s) clínicamente documentados
14. Capacidad de producción en masa
15. Estabilidad durante procesos tecnológicos
16. Estabilidad durante almacenamiento y distribución
17. Ausencia de propiedades organolépticas indeseables en los alimentos

Basado en: Collins y col. (1998) y Klaenhammer y Kullen (1999).

Tabla 3. Principales pruebas recomendadas para la evaluación de la seguridad de los probióticos

Propiedad	Pruebas
Actividad metabólica	Producción aminas biógenas Desconjugación de sales biliares (7-hidroxilasa) Producción de ácido D-láctico Degradación de la mucina Actividad colil-glicina hidrolasa Actividad azoreductasa Actividad nitroreductasa Actividad β-glucuronidasa Actividad β-glucosidasa
Infectividad	Datos epidemiológicos Adhesividad Invasividad de células endoteliales Producción de hemolisinas Antibiograma Agregación de plaquetas Agregación de eritrocitos Ensayos de fagocitosis Ensayos *in vivo* (ratones irradiados, ratas inmunodeficientes)
Transferencia genética	Transferencia de plásmidos por conjugación

Basado en: Salminen y col.(1998c), O'Brien y col. (1999).

CAPÍTULO 2

LECHE MATERNA Y PLACENTA: FUENTES DE BACTERIAS PROBIÓTICAS PARA EL RECIÉN NACIDO Y EL FETO

Rocío Martína, Susana Langaa, Carlota Reviriegoa, Esther Jiménezа, María L. Marína, Mónica Olivares b, Leonides Fernándeza, Jordi Xaus b y Juan M. Rodrígueza
aDepartamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid. bDepartamento de Immunología, Puleva Biotech, Granada

Leche humana y bacterias lácticas

Como es sobradamente conocido, la leche materna constituye el mejor alimento para los bebés durante los primeros meses de su vida. En primer lugar, satisface todos sus requerimientos nutritivos durante esta etapa de rápido crecimiento. En segundo lugar, diversos estudios han demostrado que la leche de la madre confiere al recién nacido una notable protección frente a enfermedades infecciosas (Lopez-Alarcon y col., 1997; Wright y col., 1998). Este efecto puede ser debido a la acción combinada de algunos componentes de la leche, como inmunoglobulinas, linfocitos, macrófagos y diversas sustancias con propiedades antimicrobianas (Saavedra, 2002). Además, la leche materna también contiene sustancias prebióticas que estimulan de forma selectiva el crecimiento de bacterias deseables en el intestino infantil (Dai y Walker, 1999; Drasar y Roberts, 1990). Aunque resulta indudable que en los últimos años se han producido grandes avances en el campo de la nutrición infantil, todavía existen diferencias cuantitativa y cualitativamente importantes entre la leche humana y las fórmulas infantiles. Es probable que este hecho sea el principal responsable de las diferencias observadas entre la microbiota intestinal de los niños que reciben lactancia materna y la de aquellos alimentados con fórmulas infantiles (Yoshioka y col., 1983; Benno y col., 1984; Harmsen y col., 2000; Favier y col., 2002; Mackie y col., 1999).

Desde un punto de vista microbiológico, los estudios sobre leche materna se han restringido casi completamente a la detección e identificación de bacterias potencialmente patógenas relacionadas con casos de mastitis; en contraste, apenas existen estudios sobre la microbiología de la leche humana obtenida de mujeres sanas. La leche materna es el único alimento ingerido por muchos bebés, una subpoblación especialmente sensible a las enfermedades infecciosas (Morris y Potter, 1997). Por lo tanto, si se aislaran bacterias con efectos probióticos a partir de este fluido biológico, estas serían particularmente atractivas para los sectores alimentario y médico, ya que inmediatamente cumplirían algunos de los requisitos generalmente recomendados para bacterias empleadas como probióticos humanos, tales como origen humano, ingestión infantil prolongada sin efectos adversos y adaptación a substratos lácteos (Collins y col., 1998; Mattila-Sandholm y col., 1999; Ouwehand y col., 1999).

En los últimos dos años, nuestro grupo ha investigado la presencia de bacterias lácticas o bacterias del ácido láctico (BAL) en muestras de leche fresca de 8 mujeres sanas y ha podido aislar BAL en números relativamente elevados (>103 ufc ml-1) a partir de todas ellas. Este hecho sugiere que la presencia de bacterias potencialmente probióticas en la leche materna es un fenómeno ampliamente extendido, y que este fluido puede constituir una de las principales fuentes de bacterias para el intestino del neonato. De hecho, varias de las cepas aisladas han mostrado propiedades probióticas tanto in vitro como in vivo (Martín y col., 2002).

Entre las BAL aisladas inicialmente de leche materna en diversos medios de cultivo (MRS, MRS pH 5.5, GM17, LM17, Elliker, KAA, RCM, APT, Nutrient Agar), se seleccionaron 50 al azar (incluyendo aislados con morfología bacilar y cocoide). La

mayor parte de los aislados con morfología bacilar se identificaron como Lactobacillus gasseri mediante PCR especie-específica y secuenciación de la fracción 16S del rRNA. Por su parte, la mayoría de los aislados cocoides fueron identificados como Enterococcus faecium empleando las mismas técnicas (Martín y col., 2002). Ambas especies se incluyen entre las que contienen cepas probióticas comerciales (Collins y col., 1998; Holzapfel y col., 1998). Aunque los enterococos están íntimamente asociados con una amplia variedad de alimentos fermentados, contribuyendo al desarrollo de sus propiedades organolépticas, su empleo como probióticos requiere una evaluación cuidadosa ya que algunas cepas (especialmente de la especie E. faecalis) poseen factores de virulencia y pueden transmitir genes de resistencia a antibióticos mediante procesos de conjugación (Eaton and Gasson, 2001). No obstante, todas las cepas de enterococos aisladas en este trabajo se sometieron a un análisis de posibles factores de virulencia siguiendo el esquema propuesto por Eaton and Gasson (2001) y no se pudo detectar ningún factor de virulencia (ni los genes que los codifican) en ninguna de las cepas (resultados no publicados). En consecuencia, la leche materna de mujeres sanas puede ser considerada como una fuente de bacterias seguras.

Nuestros resultados indican que la leche materna juega un papel importante en la iniciación y evolución de la microflora intestinal del neonato. El predominio de un número muy reducido de especies altamente competitivas (p.ej.: Lb. gasseri y E. faecium) en la leche podría explicar porqué la microbiota intestinal de los bebés alimentados con leche materna esté integrada por un espectro muy reducido de especies y porqué se empieza a hacer más compleja coincidiendo con el inicio del destete (Hall y col., 1990; Favier y col., 2002). Previamente, se ha observado que la composición de la microflora intestinal está profundamente influenciada por la dieta del niño (Yoshioka y col., 1983; Benno y col., 1984; Mackie y col., 1999), y que la introducción de alimentos sólidos y la paulatina retirada de la leche materna coincide con grandes cambios en la microbiota intestinal (Favier y col., 2002).

La alimentación de los bebés mediante lactancia materna se ha asociado a tasas significativamente más bajas de asma (Gdalevich y col., 2001a) y dermatitis atópica (Gdalevich y col., 2001b) en la población infantil. Las BAL de la leche materna podrían jugar un papel en este efecto protectivo ya que se ha descrito que algunos lactobacilos de origen humano pueden prevenir la aparición de atopia mediante diversos mecanismos (Kalliomäki y col., 2001). De hecho, se considera que las bacterias intestinales son uno de los estímulos más importantes para el desarrollo del tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal y que pueden promover procesos antialergénicos (Kalliomäki y col., 2001). La presencia de BAL en la leche humana podría explicar, al menos parcialmente, la existencia de ciertas sustancias prebióticas en dicho fluido; recientemente se ha demostrado que los lactobacilos de origen humano pueden sintetizar este tipo de compuestos gracias a sus fructosil- y glucosiltransferasas (Kralj y col., 2002; van Hijum y col., 2002).

Origen de las bacterias lácticas presentes en la leche materna y en el intestino del neonato

Para dilucidar el origen de las BAL aisladas de la leche materna y su papel en la colonización del intestino del recién nacido, se aislaron BAL a partir de diferentes fuentes maternales e infantiles, incluyendo meconio, heces (de las madres y los niños), leche, hisopos obtenidos a partir de areola mamaria, piel del pecho, periné y vagina de las madres, y muestras de placenta, líquido amniótico y cordón umbilical. Todas las

muestras fueron recogidas asépticamente por parte del personal médico de los hospitales donde nacieron los respectivos niños.

Entre las BAL aisladas de cada pareja madre-niño, se seleccionaron aproximadamente 150 bacilos y 150 cocos. Cada una de las muestras de meconio, heces maternas e infantiles, placenta, líquido amniótico y cordón umbilical, y las procedentes de areola mamaria y vagina, proporcionaron alrededor de un 10% de los aislados (80% en total). Los aislados de leche representaron el 18% del total. Finalmente, los hisopos de periné (1%) y piel del pecho (1%) contribuyeron con un número muy pequeño de aislados debido a las dificultades observadas para obtener BAL de ambas fuentes.

Inicialmente, los aislados seleccionados se sometieron a análisis con la técnica RAPD empleando 5 cebadores independientes en el caso de los lactobacilos (Veyrat y col., 1999) y una pareja en el caso de los enterococos (Knijff y col., 2001), observándose una variabilidad de perfiles de RAPD. Sin embargo, dentro de cada pareja madre-niño, algunos aislados procedentes de diferentes muestras (leche, heces maternas, meconio, areola mamaria, placenta, líquido amniótico y/o cordón umbilical) compartían el mismo perfil de RAPD con todos los cebadores empleados. En el caso de los bacilos, se comprobó mediante PCR (Song y col., 2000; Walter y col., 2000) que, independientemente de la pareja madre-niño analizada, todos los bacilos que compartían los perfiles pertenecían a la especie Lb. gasseri. Este resultado no es sorprendente ya que esta especie se encuentra generalmente asociada a las mucosas humanas (Zoetendal y col., 2002). Adicionalmente, se identificaron algunas cepas de Lb. fermentum (leche materna) y Lb. salivarius (heces infantiles) entre los lactobacilos que no compartían perfiles de RAPD.

Similares resultados se obtuvieron con los cocos ya que, dentro de cada pareja, también existían aislados procedentes de las fuentes anteriormente citadas que compartían el mismo patrón de RAPD. Todos estos aislados fueron identificados como E. faecium mediante PCR (Dutka-Malen y col., 1995). En las últimas semanas se han iniciado análisis de las cepas mediante la técnica de PFGE y los resultados preliminares están en total consonancia con los obtenidos con los RAPDs.

Resulta particularmente interesante que ninguna de las escasas BAL aisladas de la piel de los pechos de las mujeres participantes compartiera perfiles de RAPD con las BAL aisladas de leche o areola mamaria de las mismas mujeres. Este hecho indica, en primer lugar, que la contaminación cruzada de la leche con bacterias de la piel de la madre tiene, en el mejor de los casos, un escaso protagonismo como fuente de BAL para el intestino del lactante; en segundo lugar, que las BAL aisladas de la leche tienen un origen endógeno. Igualmente relevante es el hecho de que ninguna de las cepas aisladas de vagina o periné de las madres mostraran perfiles de RAPD similares o idénticos a los de cepas aisladas de otras fuentes maternales y/o infantiles. A pesar de no existir evidencias científicas, la idea de que la colonización del intestino del neonato empieza durante el parto debido a la contaminación de la cavidad oral del recién nacido con bacterias procedentes de la vagina (o, por proximidad anatómica, del recto de la madre) ha sido ampliamente aceptada (Tannock, 1995; Isolauri y col., 2001; Favier y col., 2002) desde los estudios clásicos de Tissier (1900) sobre la adquisición de la microflora intestinal infantil. Tal hipótesis es contraria a los hallazgos de este trabajo que sugieren que el tránsito a través del canal del parto no es una fuente remarcable de bacterias para el intestino neonatal. De hecho, en este trabajo no se han encontrado diferencias significativas entre la composición cuantitativa y cualitativa de la flora láctica intestinal del único bebé que nació por cesarea y la del resto de bebés, nacidos por parto natural. Obviamente, serán necesarios más estudios para verificar estos hallazgos.

En conjunto, nuestros resultados indican claramente que la leche materna es una fuente importante de BAL para el intestino infantil ya que aporta de forma continuada una concentración relativamente elevada de estas bacterias. Inicialmente, en este trabajo también se incluyeron medios (como el VRBA) y condiciones de incubación adecuados para el crecimiento de bacterias Gram-negativas; sin embargo, no se pudo aislar ninguna bacteria Gram-negativa a partir de leche, meconio o de heces infantiles, lo que coincide con la reciente observación de que la flora intestinal neonatal está dominada por un escaso número de especies Gram-positivas (Favier y col., 2002).
La glándula mamaria se prepara para la lactación mediante una serie de procesos que ocurren durante la adolescencia y la gestación. En esta última etapa, la influencia de diversas hormonas se traduce en un gran aumento en el número y tamaño de los conductos y alveolos mamarios. En la última fase del embarazo, los lóbulos del sistema alveolar alcanzan su mayor grado de desarrollo y se pueden empezar a secretar pequeñas cantidades de calostro. Adicionalmente, los pezones y las areolas mamarias crecen marcadamente y las glándulas sebáceas que se encuentran en su interior se hacen más prominentes (Beischer y col., 1997). Todos estos cambios proporcionan las condiciones adecuadas para la formación de biofilms ricos en BAL en el interior de los conductos mamarios y en las rugosidades y glándulas de la areola mamaria. Finalmente, el aumento del suministro de linfa y sangre a la glándula mamaria y la liberación de oxitocina que provoca la contracción de las células miopeiteliales que revisten los alveolos mamarios también pueden facilitar la presencia de BAL en la leche (Beischer y col., 1997).

La placenta como fuente de bacterias lácticas para el intestino fetal

En este estudio, no hubo ninguna dificultad para aislar BAL a partir de muestras de placenta, líquido amniótico, cordón umbilical y meconio de recién nacidos que no habían recibido ningún alimento, incluyendo las obtenidas del niño nacido por cesárea. Es muy significativo que, dentro de la misma pareja madre-niño, algunas cepas aisladas de tales fuentes mostraran perfiles de RAPD idénticos a los obtenidos con cepas aisladas leche y de las heces de las madres y de los niños. Globalmente, estos hallazgos sugieren que ciertas BAL del intestino maternal pueden cruzar la barrera placentaria y alcanzar el intestino fetal mediante la deglución de líquido amniótico. Adicionalmente, parecen indicar que la capacidad de algunas BAL intestinales para extenderse a otros tejidos u órganos de hospedadores humanos sanos ha sido tradicionalmente infravalorada.
Aunque los problemas clínicos relacionados con lactobacilos son muy escasos, se han descrito algunos casos de endocarditis, septicemia o abscesos hepáticos causados por estas bacterias, habitualmente en pacientes con graves enfermedades previas (Rautio y col., 1999; Alvarez-Olmos y Oberhelman, 2001). Obviamente tales casos no son representativos de lo que puede suceder en un hospedador sano pero ilustran el hecho de que ciertos lactobacilos tienen mecanismos para extenderse desde el intestino a localizaciones extraintestinales. En un hospedador sano, estas bacterias no provocan ninguna sintomatología, por lo que no se investiga su presencia extraintestinal y pasan completamente desapercibidas. Conviene recalcar que el consumo de lactobacilos (y otras BAL) es extraordinariamente seguro ya que cada año se consumen en el mundo billones de dosis de productos que los contienen (Hamilton-Meyer y col., 1999; Reid, 2002) y el escasísimo número de casos clínicos en los que están implicados se puede considerar irrelevante desde un punto de vista epidemiológico.

Probablemente las BAL habiten, de forma transitoria o permanente, en diversas localizaciones del cuerpo humano, fuera de los tractos digestivo y genitouriario a los que están tradicionalmente asociados. En tales localizaciones, las BAL no sólo no tendrían un efecto negativo para la salud del hospedador sino que contribuirían a ejercer los efectos probióticos extraintestinales que se están poniendo de manifiesto en los últimos años y que resultan muy difíciles de explicar si estas bacterias estuvieran confinadas en el intestino (Aso y col., 1995). Recientemente, se han obtenido evidencias clínicas irrefutables que demuestran que ciertos lactobacilos probióticos administrados oralmente a mujeres con infecciones vaginales eran capaces de llegar a la mucosa vaginal por vía endógena y ejercer un efecto antiinfeccioso (Reid y col., 2001).

El hipotético mecanismo que emplearían las BAL maternales para atravesar el epitelio intestinal y alcanzar la glándula mamaria, la placenta y otras localizaciones podría ser similar al representado en la Figura 1. Tradicionalmente se pensaba que las bacterias sólo podían atravesar el epitelio intestinal intacto a través de las células M, unas células epiteliales especializadas que se localizan en las placas de Peyer. Recientemente, se ha demostrado que las células dendríticas existentes en la lámina propia pueden penetrar el epitelio intestinal intacto y captar bacterias directamente de la luz intestinal (Rescigno y col., 2001). Más concretamente, las células dendríticas son capaces de abrir las zonas de oclusión entre enterocitos adyacentes, proyectar dendritas al exterior del epitelio y captar células viables, preservando la integridad de la barrera intestinal mediante la expresión de las proteínas que integran las zonas de oclusión (Figura 1A). Empleando este mecanismo, una cepa de Salmonella typhimurium no invasiva fue capaz de llegar viable al bazo de ratones inoculados por vía oral (Rescigno y col., 2001). Una vez dentro de las células dendríticas (o de otras poblaciones de linfocitos), las bacterias pueden propagarse fácilmente a mucosas distantes de la del aparato digestivo ya que es bien conocida la circulación de linfocitos dentro del sistema linfoide asociado a mucosas (Roitt, 1994) (Figura 1B). Los linfocitos estimulados por la presencia de las BAL podrían migrar desde la mucosa intestinal y colonizar mucosas distantes, como las de los tractos respiratorio y genitourinario, las de las glándulas salivares y lacrimales, y, lo que es más relevante para este trabajo, la de la glándula mamaria de las mujeres embarazadas y/o lactantes (Figura 1B).

El aislamiento de BAL a partir de placenta, líquido amniótico y cordón umbilical y el hecho de que algunos aislados tengan perfiles genéticos idénticos a los mostrados por otras BAL aisladas de meconio (incluso en el caso del niño obtenido por cesarea) indican que, contrariamente a lo supuesto hasta la fecha (Tissier, 1900; Tannock, 1995; Isolauri y col., 2001; Favier y col., 2002), ciertas BAL pueden atravesar la placenta y colonizar el intestino en una fase prenatal. Posiblemente, el intestino fetal se coloniza con concentraciones relativamente bajas de BAL. Tras el nacimiento, y una vez iniciada la lactancia, se iniciaría una segunda fase en la que el intestino recibiría cantidades mucho más elevadas de estas bacterias que ejercerían efectos beneficiosos para el niño.

Es significativo que entre las pocas bacterias capaces de penetrar barreras complejas como la placenta o el sistema nervioso central se encuentren diversas especies del género Streptococcus, unas bacterias que genética y bioquímicamente se encuentran muy próximas a las BAL (Nassif y col., 2002). La placenta es un órgano muy especializado que deriva de la porción del trofoblasto que está en contacto directo con la decidua uterina. Inicialmente, tres capas bien definidas separan las circulaciones materna y fetal pero, a medida que avanza la gestación, ambas circulaciones se aproximan al hacerse cada vez más finas dichas capas. Al final del embarazo, se produce un aumento en la eficiencia del intercambio de nutrientes, productos de desecho y gases entre la madre y el feto debido al gran estrechamiento de esta barrera

(Mahan y Arlin, 1992). Este incremento del intercambio podría facilitar el paso de ciertas BAL de la madre al feto; seguidamente, se iniciaría la colonización intestinal del feto como una primera adaptación a la vida extrauterina. Esta hipótesis explicaría los resultados obtenidos en este trabajo.

Probando nuestra hipótesis en ratones

E. faecium JLM3, una cepa aislada de heces de uno de los lactantes, se seleccionó para investigar si realmente se produce una transferencia de BAL del intestino materno al intestino fetal a través de la placenta, en primera instancia, y, posteriormente, al intestino del neonato a través de la leche. Para facilitar la detección específica de la cepa seleccionada, se recurrió a un marcaje genético novedoso. En primer lugar, se amplificó mediante PCR un fragmento de 189 pb que comprendía la unión entre el promotor 35S rRNA del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) y el gen EPSPS (5-enolpiruvil-shiquimato-3-fosfato sintetasa) de Agrobacterium tumefaciens. La amplificación se produjo a partir de DNA cromosómico de la soja transgénica RoundUp Ready (Monsanto), empleando cebadores a los que se les había incorporado lugares de restricción para la enzima BamHI para facilitar la posterior clonación del fragmento en el vector pTG262. El plásmido resultante se introdujo por electroporación en las células de E. faecium JLM3. Una vez confirmada la estabilidad del plásmido recombinante en esta cepa, se procedió a la administración por vía oral de 200 l de leche con aproximadamente 109 ufc de la cepa marcada a 4 ratonas Balb/c gestantes (grupo A). Posteriormente, estas ratonas recibieron la misma dosis cada dos días hasta el parto. Paralelamente, otro grupo de ratonas (grupo B) recibieron leche no inoculada (con la misma pauta de administración) y sirvieron como control negativo. Dos días antes el parto, la cepa marcada puso ser detectada, no sólo en las heces e intestino grueso de las ratonas del grupo A, sino también en líquido amniótico, placenta y fetos procedentes de los animales de ese grupo, lo que demostró que esta cepa puede cruzar la barrera placentaria. Además, se observó que otras BAL también estaban presentes en esas muestras. Por lo que respecta al grupo B, aunque se obtuvieron algunas BAL a partir de las mismas muestras, ninguna correspondía a la cepa marcada. El hecho de que otras BAL pudieran ser aisladas del líquido amniótico de ratonas no tratadas refuerza la hipótesis de que ciertas BAL maternales tienen la capacidad de atravesar la placenta de hospedadores sanos sin comprometer la salud del feto ni la de la madre, y sugiere que no se trata de un fenómeno excepcional.

Tras el parto, y antes de que los neonatos ingirieran leche, no se detectaron BAL en algunos de los órganos analizados (p.ej.: bazo, hígado, corazón, riñones y pulmones), lo que sugiere que aunque algunas BAL están presentes en el líquido amniótico, placenta y feto, no se produce una diseminación o septicemia generalizada en el neonato. Además, sólo se pudieron detectar pequeñas cantidades de BAL en el estómago, intestino delgado e intestino grueso de los neonatos, por lo que posiblemente ni la vía placentaria ni la vaginal suponen una fuente importante de BAL para los recién nacidos. Una vez iniciada la lactación, la cepa marcada pudo ser aislada en grandes cantidades a partir de la leche coagulada contenida en los estómagos de los neonatos del grupo A, y también a partir de muestras de sus intestinos delgado y grueso, lo que revela que la leche materna es probablemente la fuente más importante de BAL para el neonato, por lo menos desde un punto de vista cuantitativo. El hecho de que no se pudieran encontrar diferencias significativas entre los recuentos de BAL no marcadas obtenidos de neonatos de ambos grupos, refuerza la idea de que la leche materna puede ser la principal fuente de BAL para los recién nacidos.

Actualmente, nuestro trabajo se dirige a dilucidar la composición, origen y significado biológico de la microbiota intestinal fetal y neonatal, incluyendo no sólo a las BAL sino también a otros grupos bacterianos. Para ello, se está recurriendo a técnicas moleculares más adecuadas como la PCR-DGGE (Satokari y col., 2001; Favier y col., 2002; Wang y col., 2002; Zoetendal y col., 2002). En el caso de que nuestros hallazgos preliminares se confirmen, estos tendrían consecuencias prácticas importantes ya que implicaría que la modulación de la microflora intestinal de la madre puede afectar directamente a la composición de la microflora del neonato y, en última instancia a su salud. Además, la leche materna podría convertirse en una fuente muy atractiva para obtener BAL probióticas.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida a través del proyecto AGL2003-01242 y de un contrato Art. 83 con Puleva Biotech S.A.

Referencias

Alvarez-Olmos, M.I. y Oberhelman, R.A. (2001). Probiotic agents and infectious diseases: a modern perspective on a traditional therapy. Clin. Infect. Dis. 32:1567-1576.
Aso, Y., Akaza, H., Kotake, T., Tsukamoto, T., Imai, K. y Naito, S. (1995). Preventive effect of a Lactobacillus casei preparation on the recurrence of superficial bladder cancer in a double-blind trial. Eur. Urol. 27:104-109.
Beischer, N.A., Mackay, E.V. y Colditz, P.B. (1997). Obstetrics and the Newborn. W.B. Saunders Company, Filadelfia.
Benno, Y., Sawada, K. y Mitsuoka, T. (1984). The intestinal microflora of infants: composition of fecal flora in breast-fed and bottle-fed infants. Microbiol. Immunol. 28:975-986.
Collins, J.K., Thornton, G. y Sullivan. G.O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. Int. Dairy J. 8:487-490.
Dai, D. y Walker, W.A. (1999). Protective nutrients and bacterial colonization in the immature human gut. Adv. Pediatrics 46:353-382.
Drasar, B.S. y Roberts, A.K. (1990). Control of the large bowel microflora. En Human Microbial Ecology, M.J. Hill y P.D. Marsh (Eds.), p. 87-111. CRC Press, Boca Raton.
Dutka-Malen, S., Evers, S. y Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. J. Clin. Microbiol. 33:24-27.
Eaton, T. y Gasson, M.J. (2001). Molecular screening of Enterococcus virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. Appl. Environ. Microbiol. 67:1628-1635.
Favier, C.F., Vaughan, E.E., de Vos, W.M. y Akkermans, A.D.L. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. Appl. Environ. Microbiol. 68:219-226.
Gdalevich, M., Mimouni, D. y Mimouni, M. (2001a). Breast-feeding and the risk of bronchial asthma in childhood: a systematic review with meta-analysis of prospective studies. J. Pediatrics 139:261-266.
Gdalevich, M., Mimouni, D., David, M. y Mimouni, M. (2001b). Breast-feeding and the onset of atopic dermatitis in childhood: a systematic review with meta-analysis of prospective studies. J. Am. Acad. Dermatol. 45:520-527.

Hall, M.A., Cole, C.B., Smith, S.L., Fuller, R. y Rolles, C.J. (1990). Factors influencing the presence of faecal lactobacilli in early infancy. Arch. Dis. Childhood 64:185-188.
Hamilton-Miller, J.M., Shah, S. y Winkler, J.T. (1999). Public health issues arising from microbiological and labeling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. Public Health Nutr. 2:223-229.
Harmsen, H.J.M., Wildeboer-Veloo, A.C.M., Raangs, G.C., Wagendorp, A.C., Klein, N., Bondels, J.G. y Welling, G.W. (2000). Analysis of intestinal flora development in breast-fed infants by using molecular identification and detection methods. J. Ped. Gastroenterol. Nutr. 30:61-67.
Holzapfel, W., Haberer, P., Snell, J., Schillinger, U. y Huis in't Veld, J.H. (1998). Overview of gut flora and probiotics. Int. J. Food Microbiol. 41:85-101.
Isolauri, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H. y Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. Am. J. Clin. Nutr. 73S:444S-450S.
Kalliomäki, M., Salminen, S., Arvilommi, H., Kero, P., Koskinen, P. y Isolauri, E. (2001). Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomized placebo-controlled trial. Lancet 357:1076-1079.
Knijff, E., Dellaglio, F., Lombardi, A., Biesterveld, S. y Torriani, S. (2001). Development of the Specific and Random Amplification (SARA)-PCR for both species identification of enterococci and detection of the vanA gene. J. Microbiol. Meth. 43:233-239.
Kralj, S., H., van Geel-Schutten, G., Rahaoui, H., Leer, R.J., Faber, E.J., van der Maarel, M.J.E.C. y Dijkhuizen, L. (2002). Molecular characterization of a novel glucosyltransferase from Lactobacillus reuteri strain 121 synthesizing a unique highly branched glucan with (1 4) and (1 6) glucosidic bonds. Appl. Environ. Microbiol. 68:4390-4398.
Lopez-Alarcon, M., Villalpando, S. y Fajardo, A. (1997). Breast-feeding lowers the frequency and duration of acute respiratory infection and diarrhea in infants under six months of age. J. Nutr. 127:436-443.
Mackie, R I., Sghir, A. y Gaskins, H.R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. Am. J. Clin. Nutr. 69(S):1035S-1045S.
Mahan, L.K. y Arlin, M.T. (1992). Krause`s Food Nutrition and Diet Therapy. W.B. Saunders Company, Filadelfia.
Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Marín, M.L., Fernández, L., Xaus, J. y Rodríguez, J.M. (2002). Transferencia de bacterias lácticas del intestino de la madre al intestino del lactante a través de la leche materna. Abstracts del II Congreso Español de Lactancia Materna. Sevilla.
Mattila-Sandholm, T., Matto, J. y Saarela, M. (1999). Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal flora. Int. Dairy J. 9:25-37.
Morris, J.G. y Potter, M. (1997). Emergence of new pathogens as a function of changes in host susceptibility. Em. Infect. Dis. 3:435-441.
Nassif, X., Bourdoulous, S., Eugène, E. y Couraud, P.O. (2002). How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? Trends Microbiol. 10:227-232.
Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C. y Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. Int. Dairy J. 9:43-52.
Rautio, M., Jousimies-Somer, H., Kauma, H., Pietarinen, I., Saxelin, M., Tynkkynen, S. y Koskela, M. (1999). Liver abscess due to a Lactobacillus rhamnosus strain indistinguisable from L. rhamnosus strain GG. Clin. Infect. Dis. 28:1159-1160.
Reid, G. (2002). Safety of Lactobacillus strains as probiotic agents. Clin. Infect. Dis. 35:349-350.

Reid, G., Bruce, A.W., Fraser, N., Heinemann, C., Owen, J. y Henning, B. (2001). Oral probiotics can resolve urogenital infections. FEMS Immunol. Med. Microbiol. 30:49-52.
Rescigno, M., Urbano, M., Valsazina, B., Francoloni, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P. y Ricciardi-Castagnoli, P. (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. Nature Immunol. 2:361-367.
Roitt, I. (1994). Essential Immunology. Blackwell Scientific Publications, Oxford.
Saavedra, J.M. (2002). Probiotic agents: clinical applications in infants and children. En Infant Formula: Closer to the Reference, N.C.R. Räihä y F.F. Rubaltelli (Eds.), p. 15-27. Lippincott Williams & Wilkins, Filadelfia.
Satokari, R.M., Vaughan, E.E., Akkermans, A.D., Saarela, M. y de Vos, W.M. (2001). Bifidobacterial diversity in human feces detected by genus-specific PCR and denaturing gradient gel electrophoresis. Appl. Environ. Microbiol. 67:504-513.
Song, Y. L., Kato, N., Liu, C. X., Matsumiya, Y., Kato, H. y Watanabe, K. (2000). Rapid identification of 11 human intestinal Lactobacillus species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S-23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA. FEMS Microbiol. Lett. 187:167-173.
Tannock, G.W. (1995). Normal Microflora. An Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body. Chapman & Hall, Londres.
Tissier, H. (1900). Recherches sur la flore intestinale des nourrissons (état normal et pathologique). G. Carre, & C. Naud, París.
Van Hijum, S.A.F.T., van Geel-Schutten, G.H., Rahaoui, H., van der Maarel, M.J.E.C. y Dijkhuizen, L. (2002). Characterization of a novel fructosyltransferase from Lactobacillus reuteri that synthesizes high-molecular-weight inulin and inulin oligosaccharides. Appl. Environ. Microbiol. 68:4390-4398.
Veyrat, A., Miralles, M.C. y Pérez-Martínez, G. (1999). A fast method for monitoring the colonization rate of lactobacilli in a meat model system. J. Appl. Microbiol. 87:49-61.
Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D.M., Munro, K. y Alatossava, T. (2000). Detection and identification of gastrointestinal Lactobacillus species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. Appl. Environ. Microbiol. 66:297-303.
Wang, R.F., Beggs, M.L., Robertson, L-H. y Cerniglia, C.E. (2002). Design and evaluation of oligonucleotide-microarray method for the detection of human intestinal bacteria in fecal samples. FEMS Microbiol. Lett. 213:175-182.
Wright, A.L., Bauer, M., Naylor, A., Sutcliffe, E. y Clark, L. (1998). Increasing breastfeeding rates to reduce infant illness at the community level. Pediatrics 101:837-844.
Yoshioka, H., Iseki, K. y Fugita, K. (1983). Development and differences of intestinal flora in the neonatal period in breast-fed and bottle-fed infants. Pediatrics 72:317-321.
Zoetendal, E.G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L. y de Vos, W.M. (2002). Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. Appl. Environ. Microbiol. 68:3401-3407.

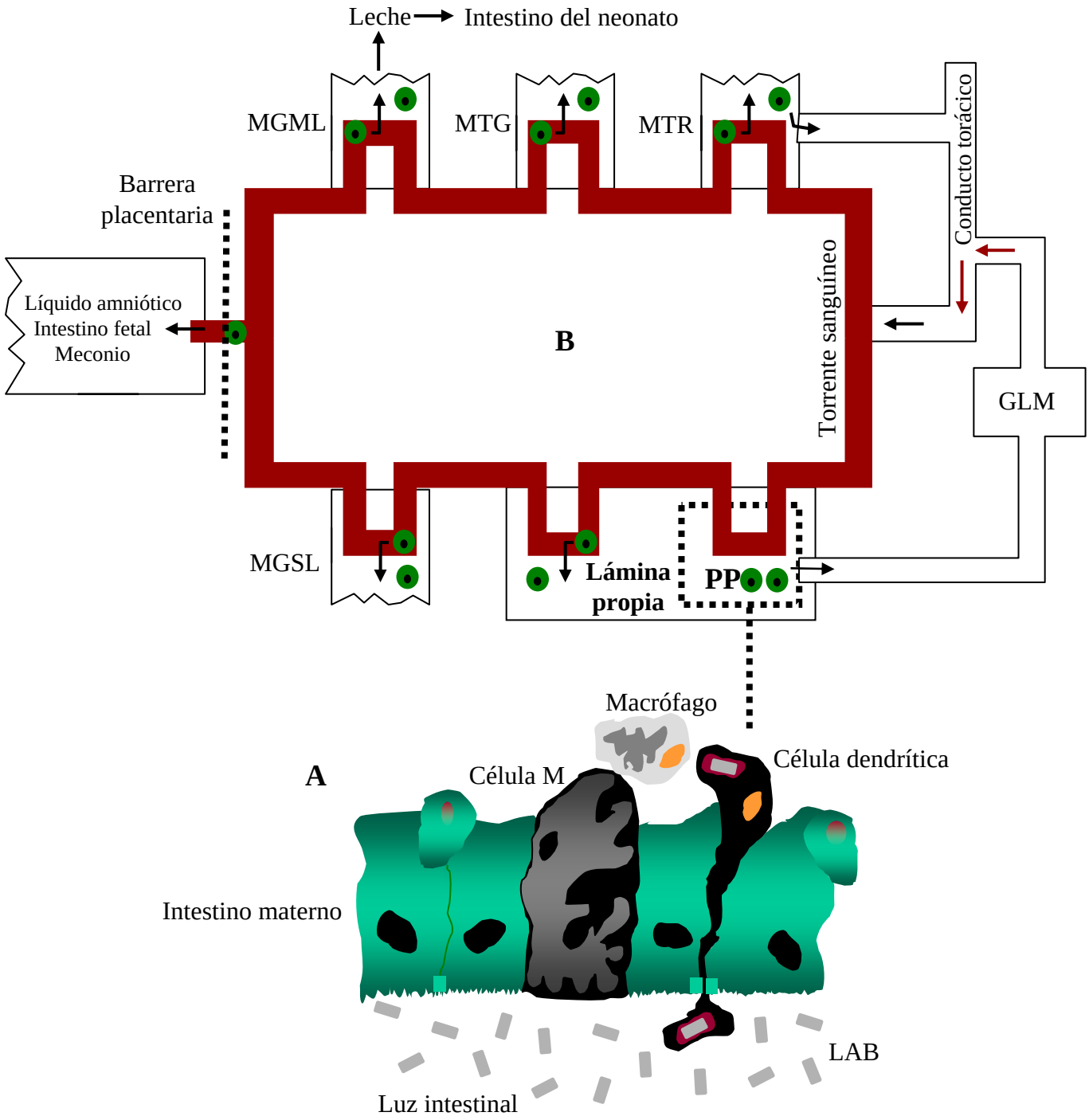


Figura 1. Modelo hipotético para explicar cómo algunas BAL del intestino maternal podrían transferirse al intestino del feto y del neonato. (A) Las células dendríticas podrían penetrar el epitelio intestinal para captar LAB directamente de la luz intestinal. (B) Los linfocitos estimulados por la presencia de BAL podrían migrar desde la mucosa intestinal y colonizar mucosas distantes, ya que hay una circulación de linfocitos dentro del sistema linfoide asociado a mucosas. Abreviaturas: MGML, mucosa de la glándula mamaria lactante; MGSL, mucosa de las glándulas salivares y lacrimales; MTG, mucosa del tracto genitourinario; MTR, mucosa del tracto respiratorio; GLM, ganglio linfático mesentérico; PP, placas de Peyer y tejido linfoide asociado.

CAPÍTULO 3

POTENCIAL PROBIÓTICO DE CEPAS DE LACTOBACILOS AISLADOS DE LECHE HUMANA, HECES INFANTILES Y ALIMENTOS FERMENTADOS

Mónica Olivares[a], Rocío Martín [a,b], Mª. Paz Díaz-Ropero[a], Julio Boza[a], Jesús Jiménez[a], Juan M. Rodríguez[b] y Jordi Xaus[a]

[a]Departamento de Immunología, Puleva Biotech, Granada. [b]Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid

Introducción

La fermentación es una de las técnicas de conservación de alimentos más antiguas que se conocen. Además, los procesos fermentativos permitieron disponer de una mayor variedad de alimentos que, en general, tenían mejores propiedades organolépticas que las materias primas originales. Así, las fermentaciones alcohólicas se explotan desde hace más de 5000 años para la elaboración de cerveza, vino y otras bebidas alcohólicas (Borgstrom, 1968), y existen evidencias de la producción de queso desde el Neolítico. Sin embargo, la Humanidad no se dio cuenta de que los microorganismos fermentativos podían ejercer efectos beneficiosos sobre la salud de los consumidores hasta que, a principios del siglo XX, Metchnikoff relacionó el consumo de los microorganismos presentes en el yogur como la causa de la elevada longevidad de los campesinos búlgaros (Metchnikoff, 1907). Se iniciaba así el estudio de lo que actualmente conocemos como probióticos. Con el paso del tiempo y los progresos científicos en este campo, el concepto de probiótico ha ido evolucionado. Una de las definiciones más completa podría ser "*preparación o producto que contiene microorganismos bien definidos, viables y en número suficiente, los cuales son capaces de alterar la composición de la microflora (ya sea por colonización o implantación) en un compartimento del huésped y que, por ello, son capaces de ejercer un efecto beneficioso para éste*" (Schrezenmeier y Vrese, 2001), ya que integra otras anteriores (Lilly y Stillwell, 1965; Fuller, 1989; Salminen, 1996). Sin embargo, posiblemente sería más sencillo y exacto definir a los probióticos como microorganismos vivos que ejercen un efecto beneficioso sobre su hospedador.

Paralelamente a la creciente complejidad de la definición de probióticos, se han ido proponiendo diversos criterios que deberían cumplir ciertos microorganismos para poder ser considerados como *"buenos"* probióticos. No obstante, la evaluación de las propiedades que debe reunir un probiótico se suele enfrentar a algunas dificultades técnicas. En este sentido,

los modelos *in vivo* no se pueden aplicar para la evaluación inicial de un número relativamente elevado de cepas ya que plantean problemas económicos y/o éticos y suelen requerir mucho tiempo. Por este motivo, se han establecido diversos criterios *in vitro* que, *a priori*, deberían facilitar la selección de cepas con potencial probiótico. Es importante tener en cuenta que las diferencias existentes entre las condiciones *in vivo* e *in vitro* hacen que los resultados obtenidos en los ensayos *in vitro* se tengan que considerar como meramente orientativos pero, en ningún caso, como definitivos. Hasta la fecha, se han propuesto más de 20 criterios de selección de probióticos (Collins y col., 1998; Mattila-Sandholm y col., 1999; Ouwehand y col., 1999).

Acerca de las fuentes de probióticos

Dado que el intestino fetal se suele considerar estéril, la flora intestinal infantil va a estar determinada, en primera instancia, por la composición de las floras vaginal, fecal y dérmica de la madre (Tannock y col., 1995; Favier y col., 2002) y, posteriormente, por la alimentación tras el destete (Mackie y col., 1999; Favier y col., 2002). Este planteamiento nos condujo a analizar la presencia de cepas candidatas en dos fuentes poco habituales: la leche materna, puesto que se trata del principal y, en muchos casos, único alimento que recibe el recién nacido y, por otro lado, alimentos fermentados (quesos y embutidos) consumidos frecuentemente por niños y adultos. También se aislaron cepas de heces de niños alimentados con lactancia materna. Tradicionalmente, las investigaciones sobre probióticos humanos se han centrado en un nicho ecológico: la mucosa intestinal y/o las heces. Sin embargo, las bacterias del ácido láctico (prototipo de los probióticos, junto con las bifidobacterias) habitan de forma natural otros substratos, como los alimentos fermentados. El hecho de que existan pocas cepas probióticas comerciales aisladas de fuentes no relacionadas con el intestino puede deberse a la influencia de un criterio de selección muy extendido: que las cepas probióticas sean aisladas de muestras de la misma especie a la que se vayan a aplicar (Collins y col., 1998).

Tras el aislamiento de las cepas (aproximadamente 2000 colonias de alimentos fermentados, 2500 de leche materna y 1000 de heces infantiles), se evaluó un extenso número de propiedades, que se pueden clasificar en cuatro grupos: 1) aspectos taxonómicos, 2) adaptación al hospedador y ecosistema diana, 3) propiedades funcionales y 4) aspectos tecnológicos. Para comparar el potencial probiótico de las cepas aisladas, en los diversos ensayos se incluyeron tres cepas comercializadas con gran éxito en Europa: *Lactobacillus*

rhamnosus GG (Activ®, Valio), *Lb. johnsonii* La1 (LC1®, Nestlé) y *Lb. casei imunitass* (Actimel®, Danone). Los resultados obtenidos se describirán a lo largo de este capítulo.

Aspectos taxonómicos

Al iniciar nuestros estudios, disponíamos de aproximadamente 5500 aislados, de los que se seleccionaron inicialmente los que reunían las siguientes características: cocos o bacilos Gram-positivos, inmóviles, catalasa- y oxidasa-negativos. Todos los aislados pertenecientes al género *Enterococcus* se eliminaron del proceso de selección, debido a la controversia existente sobre su seguridad (ver Capítulo 4). Progresivamente, se fueron descartando aislados, ya que, por ejemplo, la técnica de RAPD reveló que muchos de los aislados procedentes de una misma fuente constituían realmente una misma cepa. En adelante, sólo se presentarán los resultados correspondientes a las cepas que fueron seleccionadas al final del estudio.

La identificación taxonómica precisa es una de las primeras características necesarias para seleccionar un potencial probiótico. La clasificación de las bacterias lácticas no puede basarse exclusivamente en características bioquímicas y fenotípicas, ya que esta aproximación frecuentemente conduce a resultados erróneos. Por eso, se recurrió a la PCR con cebadores específicos de especie, a la secuenciación de la fracción 16S del rRNA y al análisis del patrón de proteínas totales (SDS-PAGE) para determinar la afiliación taxonómica de nuestras cepas. Las cepas seleccionadas por su potencial probiótico pertenecían a las siguientes especies (entre paréntesis se indica su fuente): *Lb. coryniformis* (queso), *Lb. salivarius* (heces de niño), *Lb. gasseri* (leche materna) y *Lb. fermentum* (leche materna). Finalmente, se recurrió a las técnicas RAPD (Williams y col., 1990) y AFLP (Powels y Simons, 2003) para obtener una identificación al nivel de cepa (Fig. 1). Estas cepas se depositaron en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), de acuerdo con las normas del Tratado de Budapest, con los siguientes números de referencia: *Lb. coryniformis* CECT5711, *Lb. salivarius* CECT5713, *Lb. gasseri* CECT5714, *Lb. gasseri* CECT5715 y *Lb. fermentum* CECT5716.

Aunque los microorganismos de estas especies se suelen considerar seguros (GRAS), las cepas se sometieron a algunas pruebas de seguridad: (1) evaluación de la capacidad infectiva mediante el uso de células intestinales (Caco-2) y un modelo de epitelio intestinal *in vitro* (Rescigno y col., 2001); (2) potencial para degradar mucinas siguiendo el método descrito por Zhou y col. (2001); (3) producción de aminas biógenas mediante el procedimiento de Joosten y Northolt (1989); (4) análisis de actividades enzimáticas (sistema

APIZYM); (5) antibiograma; y (6) administración por vía oral a ratones (30 días). Los resultados obtenidos confirmaron la seguridad de las cepas de *Lactobacillus* seleccionadas.

Adaptación al hospedador y ecosistema diana

En este apartado se han agrupado aquellos prerequisitos que deben cumplir las cepas candidatas a probióticas, como la resistencia al tránsito por el aparato digestivo y la capacidad de colonización del epitelio intestinal.

A lo largo del tránsito gastrointestinal, las bacterias se exponen a diversas secreciones (gástrica, pancreática, biliar) cuyas características pueden comprometer la viabilidad celular. Por lo tanto, las bacterias probióticas deben resistir dicho tránsito y alcanzar el intestino en una concentración suficiente para ejercer un efecto beneficioso en el huésped. Cuando se analizó por separado la resistencia de las cepas al pH ácido y a las sales biliares, los valores de viabilidad fueron del 70% o superiores; sin embargo, la tasa de supervivencia se situó entre un 15 y un 50% cuando los cultivos se sometieron a ambos tratamientos de forma consecutiva (Fig. 2A). Posteriormente, se recurrió a un modelo patentado por el TNO (Holanda) que simula el tránsito de las bacterias por el aparato digestivo, incluyendo las diferentes secreciones, los tiempos de vaciado y los movimientos peristálticos (Marteau y col., 1997). En este caso, las tasas de supervivencia se situaron en torno al 1%, un valor similar al que se obtiene *in vivo* (Goldin y col., 1992). Globalmente, la resistencia de las cepas seleccionadas fue aceptable y comparable (*Lb. rhamnosus* GG, *Lb. johnsonii* La1) o superior (*Lb. casei imunitass*) a la de las cepas comerciales. A pesar de que estos valores puedan parecer bajos, hay que tener en cuenta que la dosis diaria recomendada para los probióticos suele oscilar entre 1×10^9 y 1×10^{10} ufc (Kurmann y Rasic, 1991), lo que supone que, con las tasas de supervivencia obtenidas, llegarían vivas al intestino unas 1×10^8 ufc diarias. Además, se sabe que la viabilidad de los probióticos aumenta drásticamente cuando se administran con alimentos como la leche o el yogur (Conway y col., 1987; Siuta-Cruce y Goulet, 2001). Finalmente, se analizó la capacidad de nuestras cepas para resistir el tránsito gastrointestinal en ratones y se pudo demostrar la presencia específica de nuestras cepas en las heces de los animales inoculados por vía oral.

La colonización intestinal es otro de los criterios más empleados para la selección de probióticos (Brassard y col., 1994) y para ello existen diversos modelos *in vitro* que se basan en la utilización de las líneas celulares de epitelio intestinal humano HT-29 y Caco-2 (Pinto y col., 1982; 1983). La capacidad de adhesión de nuestras cepas a ambas líneas celulares fue

muy alta (Fig. 2B) y similar a las observadas con las cepas comerciales en éste y otros estudios (Elo y col., 1991; Bernet y col., 1993; 1994; Tuomola y Salminen, 1998). Concretamente, los valores de adhesión obtenidos fueron aproximadamente de 300-500 bacterias por campo. Hay que tener en cuenta que estos resultados pueden estar condicionados por la disposición celular propia de cada cepa (células aisladas, parejas, cadenas, fenómenos de agregación). *Lb. casei imunitass* fue la única cepa que mostró niveles de adhesión bajos, un resultado similar al descrito para otras cepas de esta especie (Tuomola y Salminen, 1998). Sin embargo, tanto esta cepa como *Lb. casei* Shirota son capaces de colonizar *in vivo* a los seres humanos (Spanhaak y col., 1998; Agarwal y Bhasin, 2002), lo que sugiere que existen otros factores implicados en la colonización intestinal.

Por este motivo, se analizaron dos factores adicionales: (1) la tasa de crecimiento a concentraciones bajas de nutrientes (0,2% de glucosa o lactosa) y (2) la capacidad para fermentar diversos glúcidos y fibras no digeribles (celulosa, oligofructosa, inulina, pectinas, gomas, etc.). Por lo que respecta al primer factor, a las 2 h de incubación de los cultivos, *Lb. rhamnosus* GG y *Lb. salivarius* CECT5713 presentaron tiempos de duplicación muy cortos (<45 min), mientras que el crecimiento de las otras cepas fue más lento (90 min). No obstante, a las 4 h de incubación todas las cepas mostraron tiempos de generación inferiores a 50 min. Este hecho sugiere una rápida adaptación de todas las cepas a condiciones de estrés nutricional.

En general, las cepas analizadas mostraron una capacidad fermentativa muy diversa. En relación con las cepas obtenidas de otras fuentes, las aisladas de leche materna mostraron una mayor capacidad para utilizar carbohidratos sencillos pero también una menor capacidad para fermentar carbohidratos complejos (fibras solubles e insolubles). Respecto a las cepas comerciales, *Lb. casei imunitass* fue la que mostró un mayor potencial fermentativo.

Aspectos funcionales

Una vez comprobado que las cepas son capaces de llegar viables y en número suficiente al intestino, resulta imprescindible averiguar si son capaces de ejercer algún efecto beneficioso al consumidor y, por tanto, si merecen el preciado apelativo de *probiótico*.

Uno de los efectos más estudiados en los probióticos es su capacidad antiinfecciosa, que ha sido demostrada *in vitro* (Osset y col., 2001; Magnusson y Schnürer, 2001) e *in vivo* (Macfarlane y Cummings, 2002; Sullivan y Nord, 2002). La inhibición de los patógenos puede deberse a diversos mecanismos: (1) competición por nutrientes; (2) competición por los

puntos de unión al epitelio intestinal; (3) acidificación del medio; y (4) producción de sustancias antimicrobianas (H_2O_2, reuterina, bacteriocinas, etc.).

La concentración de ácidos orgánicos en los cultivos de las cepas se analizó por cromatografía de gases-masas (Jouany, 1982). Paralelamente, se estudió el correspondiente descenso del pH. Los resultados obtenidos revelan que las cepas seleccionadas tienen mayor capacidad de disminuir el pH del medio que las cepas comerciales. En todos los casos, los ácidos producidos fueron mayoritariamente ácido láctico y ácido acético.

El efecto de las cepas sobre el crecimiento de patógenos (*Escherichia coli, Salmonella cholerasuis, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus*) se estudió mediante bioensayos de difusión en agar (Lehrer y col., 1991) y cocultivos. Nuestras cepas mostraron un elevado potencial antimicrobiano frente a los patógenos analizados. Entre las cepas comerciales, únicamente *Lb. rhamnosus* GG mostró un potencial similar. También se analizó la capacidad de las cepas para inhibir *in vitro* la adhesión al epitelio de patógenos como *E. coli* o *S. cholerasuis* marcados radiactivamente (Tuomola y Salminen, 1998; Ouwehand y col., 2001) y se observó que la unión al epitelio intestinal de las cepas probióticas dificulta o impide la unión de los microorganismos patógenos. Finalmente, se evaluaron las cepas en modelos animales de toxiinfección por *Salmonella* (Bernet-Camard y col., 1997; Shu y col., 2000). Los resultados obtenidos indican que las cepas seleccionadas tienen un potencial similar al de las cepas comerciales en cuanto a la protección de los ratones frente a *Salmonella* (Fig. 3). *Lb. johnsonii* La1 (entre las cepas comerciales) y *Lb. salivarius* CECT5713 y *Lb. fermentum* CECT5716 (entre las nuestras) fueron las que confirieron una mayor protección a los ratones.

Existen muchos trabajos que señalan el papel inmunomodulador de los probióticos tanto en relación con la inmunidad intestinal como con la sistémica, a nivel de la inmunidad natural y la adquirida, y tanto en lo referente a la inmunidad humoral como a la celular (Blum y col., 1999; Isoulari y col., 2001; Clancy, 2003). Dichos efectos pueden ser activadores o inhibidores y suelen tender a corregir la respuesta inmunológica y/o la relación T_{H1}/T_{H2}, cuando están desequilibradas (Isoulari y col., 2001). Inicialmente, el efecto de los probióticos sobre el sistema inmunológico se suele estudiar *in vitro*, utilizando líneas celulares de epitelio intestinal y células del sistema inmunológico o bien cultivos primarios. Al incubar estas células con probióticos en presencia o ausencia de sus estímulos naturales (LPS, citoquinas, factores de crecimiento) se puede tener una aproximación de cómo va a responder el sistema inmunológico al encontrarse con estas bacterias en el cuerpo humano. Conviene recordar que los probióticos pueden ser presentados al sistema inmunológico intestinal a través de las células M o de las células dendríticas presentes en la mucosa intestinal.

En este trabajo se ha observado que, en general, las cepas analizadas ejercen un efecto inmunoestimulador sobre las células del sistema inmunológico que se encuentran en reposo, induciendo la expresión de citoquinas T_{H1}, como la IL-2, por parte de los linfocitos, y la IL-12 y TNF-α, por parte de macrófagos y células dendríticas. Este efecto inmunoestimulante es la base del empleo comercial de eslóganes comerciales del tipo “refuerza tus defensas”. Sin embargo, posiblemente es más importante el papel de los probióticos sobre las células inflamatorias sobreactivadas. En este sentido, nuestras cepas tienen la capacidad de reducir la secreción de citoquinas T_{H1} y de aumentar la expresión de citoquinas reguladoras T_{H2} o T_{H3}, como la IL-10 o el TGF-β, por parte de las células inflamatorias, regulando el desarrollo de la respuesta inflamatoria. Este efecto podría explicar la actividad de algunos probióticos en enfermedades inflamatorias como la enfermedad de Crohn (Dugas y col., 1999; Erickson y Hubbard, 2000).

Aspectos tecnológicos

Los productos probióticos poseen un elevado interés industrial y comercial y, por lo tanto, se deben tener en cuenta aquellas características tecnológicas que facilitan su explotación industrial. Entre estos aspectos destacan los relacionados con la producción industrial y almacenamiento de las cepas (incluyendo el coste económico), la resistencia de las cepas a los procesos industriales y las propiedades organolépticas que confieren a los productos que los contienen. Su conocimiento es importante para poder aplicar las cepas a los alimentos más adecuados. En estos momentos, se está trabajando enérgicamente en este aspecto, de tal manera que en un breve espacio de tiempo, las cepas seleccionadas podrán gozar de aplicaciones industriales en diversos sectores alimentarios y/o farmacéuticos. De momento, los resultados obtenidos son prometedores.

Conclusión

Aunque evidentemente todavía quedan estudios que realizar (incluyendo ensayos clínicos), globalmente los resultados obtenidos sugieren que algunas de nuestras cepas (incluyendo las obtenidas de fuentes no relacionadas con el ecosistema intestinal) pueden tener un potencial probiótico similar al de las cepas comerciales más representativas. Los estudios en marcha conducirán al desarrollo de productos probióticos que incluyan alguna(s) de la(s) cepa(s) estudiadas.

Referencias

Agarwal, K.N. y Bhasin, S.K. (2002). Feasibility studies to control acute diarrhoea in children by feeding fermented milk preparations Actimel and Indian Dahi. *Eur. J. Clin. Nutr*. **56** (Suppl. 4)**:**S56-S59.

Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R. y Servin, A.L. (1993). Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl. Environ. Microbiol*. **59:**4121-4128.

Bernet, M.F., Brassart, D., Neeser, J.R. y Servin, A.L. (1994). *Lactobacillus acidophilus* LA-1 binds to cultured human intestinal cell lines and inhibits cell-attachment and cell-invasion by enterovirulent bacteria. *Gut* **35:**483-489.

Bernet-Camard, M.F., Lievin, V., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L. y Hudault, S. (1997). The human *Lactobacillus acidophilus* strain La1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substance(s) active in vitro and in vivo. *Appl. Environ. Microbiol*. **63:**2747-2753.

Blum, S., Delneste, Y., Donnet, A. y Schiffrin, E.J. (1999). The influence of probiotic organisms on the immune response. In *Handbook of Nutrition and Immunology*, p. 451-456. Humana Press, Inc, Totowa, New Jersey.

Borgstrom, G. (1968). Principles of Food Science. In *Food Microbiology and Biochemistry*, vol. 2, p. 103-126. Macmillan, New York, USA.

Brassard, D., Nesser, J.R. y Servin, A.L. (1994). The selection of dairy bacterial strains with probiotic properties based on their adhesion to human intestinal epithelial cells. *Gut* **35:**483-489.

Clancy, R. (2003). Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immun. Med. Microbiol*. **1569:**1-4.

Collins, J.K., Thornton, G. y Sullivan, G.O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.* **8:**487-490.

Conway, P.L., Gorbach, S.L. y Goldin, B.R. (1987). Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. *J. Dairy Sci.* **70:**1-12.

Dugas, B., Mecenier, A., Lenoir-Wijkoop, I., Arnaud, C., Dugas, N. y Postaire, E. (1999). Immunity and probiotics. *Trends Immunol.* **20:**387-390.

Elo, S., Saxelin, M. y Salminen, S. (1991). Attachment of *Lactobacillus casei* strain GG to human colon carcinoma cell line Caco-2: comparison with other dairy strains. *Lett. Appl. Microbiol.* **13:**154-156.

Erickson, K.L. y Hubbard, N.E. (2000). Probiotic immunomodulation in health and disease. *J. Nutr*. **130** (2S Suppl.)**:**403S-409S.

Favier, C.F., Vaughan, E.E., de Vos, W.M. y Akkermans, A.D.L. (2002). Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:**219-226.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol*. **66:**365-378.

Goldin, B.R., Gorbach, S.L., Saxelin, M., Barakat, S., Gualtieri, L. y Salminen, S. (1992). Survival of *Lactobacillus* species (strain LGG) in human gastrointestinal tract. *Dig. Dis. Sci*. **37:**121-128.

Isoulari, E., Sütas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H. y Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *Am. J. Clin. Nutr*. **73:**444S-450S.

Joosten, H.M.L.J. y Northolt, M.D. (1989). Detection, growth, and amine-producing capacity of lactobacilli in cheese. *Appl. Environ. Microbiol*. **55:**2356-239.

Jouany, J.P. (1982). Determination of volatile fatty acids and alcohols in digestive contents, ensilage juices, bacterial cultures and anaerobic fermenter contents. *Sci. Alim*. **2:**131-144.

Kurmann, J.A. y Rasic, J.L. (1991). The health potential of products containing bifidobacteria. In *Therapeutic Properties of Fermented Milks*, p. 117-158. Robinson, R.K. (Ed.). London, Elsevier Science Publishers Ltd.

Lehrer, R.I., Rosenman, M., Harwig, S.L., Jackson, R. y Eisenhauer, P. (1991). Ultrasensitive assays for endogenous antimicrobial polypeptides. *J. Immunol. Methods* **137:**167-173.

Lilly, D.M. y Stillwell, R.H. (1965). Probiotics. Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* **147:**747-748.

Macfarlane, G.T. y Cummings, J.H. (2002). Probiotics, infection and immunity. *Curr. Opin. Infect. Dis*. **15:**501-506.

Mackie, R I., Sghir, A. y Gaskins, H.R. (1999). Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. *Am. J. Clin. Nutr.* **69**(S)**:**1035S-1045S.

Magnusson, J. y Schnürer J. (2001). *Lactobacillus coryniformis* subsp. *coryniformis* strain Si3 produces a broad spectrum proteinaceus antifungal compound. *Appl. Environ. Microbiol*. **67:**1-5.

Marteau, P., Minekus, M., Havenaar, R. y Huis in't Veld, J.H. (1997). Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine; validation and effects of bile. *J. Dairy Sci.* **80:**1031-1037.

Mattila-Sandholm, T., Matto, J. y Saarela, M. (1999). Lactic acid bacteria with health claims-interactions and interference with gastrointestinal flora. *Int. Dairy J.* **9:**25-37.

Metchnikoff, E. (1907). *Prolongation of Life*. William Heinemann, Londres, Reino Unido.

Osset, J., Bartolome, R.M., Garcia E. y Andreu, A. (2001). Assessment of the capacity of *Lactobacillus* to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. *J. Infect. Dis*. **183:**485-491.

Ouwehand, A.C., Kirjavainen, P.V., Shortt, C. y Salminen, S. (1999). Probiotics: mechanisms and established effects. *Int. Dairy J.* **9:**43-52.

Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M., Tölkkö, S. y Salminen, S. (2001). Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. *Int. J. Food. Microbiol*. **64:**119-126.

Pinto, M., Appay, S., Simon-Assmann, P., Chevalier, G., Dracopoli, N., Fogh, J. y Zweibaum, A. (1982). Enterocytic differentiation of cultured human colon cancer cells by replacement of glucose by galactose in the medium. *Biol. Cell* **44:**193-196.

Pinto, M., Robine-Leon, S., Appay, M.D., Kedinger, M., Tiadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J. y Zweibaum, A. (1983). Enterocyte like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* **47:**323-330.

Powels, D. y Simons, G. (2003). Fingerprinting microorganisms. *Food Tech*. **57:**36-40.

Rescigno, M., **Urbano, M., Valzasina, B., Francolín, M., Rotta, G., Bonasio, R., Granucci, F., Kraehenbuhl, J.P. y Ricciardi-Castagnoli, P.** (2001). Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nature Immunol*. **2:**361-367.

Salminen, S. (1996). Uniqueness of probiotic strains. *IDF Nutr. News Lett*. **5:**16-18.

Schrezenmeier, J. y de Vrese, M. (2001). Probiotics, prebiotics, and synbiotics: approaching a definition. *Am. J. Clin. Nutr.* **73S:**361S-364S.

Shu, Q., Lin, H., Rutherfurd, K.J., Fenwick, S.G., Prasard, J., Gopal, P.K. y Gill, H.S. (2000). Dietary *Bifidobacterium lactis* (HN019) enhances resistance to oral *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Microbiol. Immunol*. **44:**213-222.

Siuta-Cruce., P. y Goulet, J. (2001). Improving probiotic survival rates. *Food Tech.* **55:**37-42.

Spanhaak, S., Havenaar, R. y Schaafsma, G. (1998). The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur. J. Clin. Nutr.* **52:**899-907.

Sullivan, A. y Nord, C.E. (2002). Probiotics in human infections. *J. Antimicrob. Chemother*. **50:**625-627.

Tannock, G.W. (1995). *Normal Microflora. An Introduction to Microbes Inhabiting the Human Body*. Chapman and Hall, London.

Tuomola, E. y Salminen, S.J. (1998). Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. *Int*. *J. Food Microbiol*. **41:**45-51.

Williams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Res*. **18:**6531-6535.

Zhou, J.S., Gopal, P.K. y Gill, H.S. (2001). Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. *Int. J. Food Microbiol*. **63:**81-90.

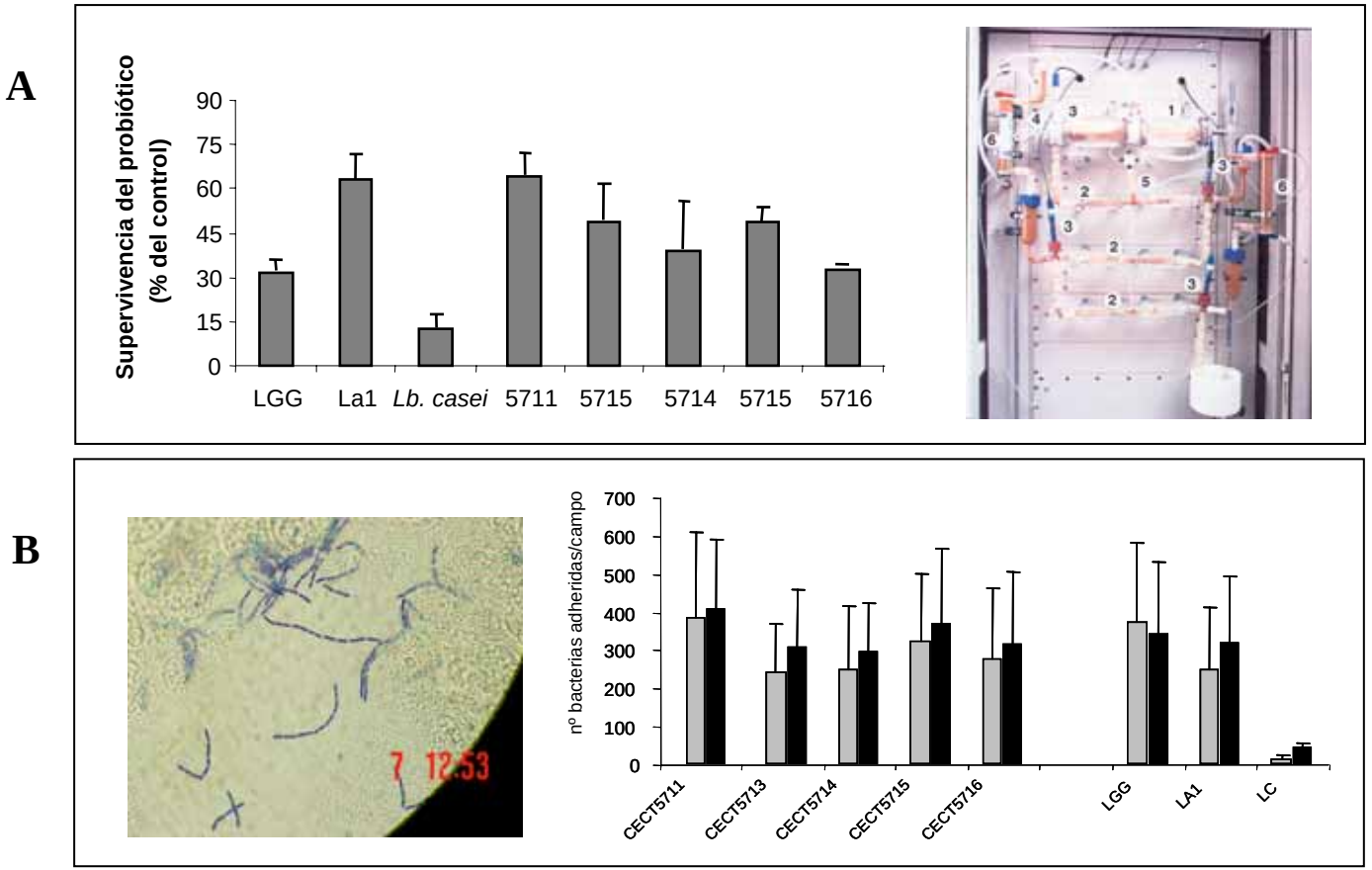


Figura 2. Pruebas técnicas. (A) Resistencia de las cepas seleccionadas al tratamiento con pH ácido y sales biliares, prueba realizada en el simulador del aparato digestivo del TNO (Holanda). (B) Adhesión de las cepas seleccionadas al epitelio intestinal (gris, células Caco-2; negro, células HT-29).

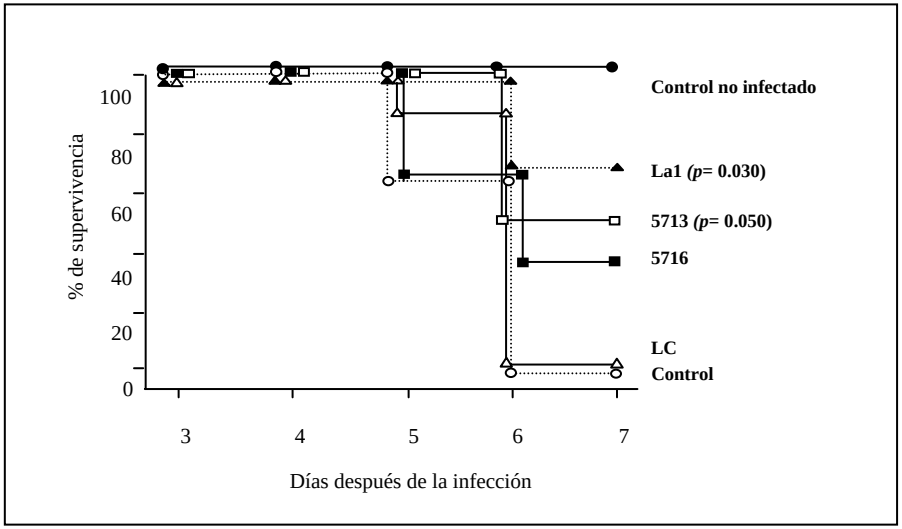


Figura 3. Curva de supervivencia obtenida en un modelo de infección con *Salmonella* tras el tratamiento de ratones con algunas de las cepas seleccionadas.

CAPÍTULO 4

SEGURIDAD DE CEPAS DE *Enterococcus faecium* AISLADAS DE LECHE MATERNA

Carlota Reviriego[a], Tracy Eaton[b], Rocío Martín[a], Esther Jiménez[a], María L. Marín[a], Leonides Fernández[a], Michael J. Gasson[b] y Juan M. Rodríguez[a]

[a]*Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid.* [b]*Food Safety Division, BBSRC Institute of Food Research, Norwich Research Park, Norwich, Reino Unido*

Introducción

En el capítulo anterior se describió el aislamiento de bacterias lácticas a partir de leche materna y la mayor parte de los aislados identificados pertenecían a dos especies, *Lactobacillus gasseri* y *Enterococcus faecium*. En relación con los enterococos, hay que destacar que constituyen una parte importante de la microflora autóctona de las mucosas humanas (Leclerc y col., 1996; Manero y Blanch, 1999). Dentro de las especies de enterococos, *E. faecium* es la más numerosa en el tracto gastrointestinal humano, seguida de *E. faecalis* (Klein, 2003). Tradicionalmente, estas dos especies se han empleado como indicadores de contaminación fecal debido, por una parte, a su amplia distribución en el intestino de animales y personas, y, por otra, a su resistencia a los ambientes extraentéricos. Sin embargo, esta interpretación tan parcial ha evolucionado y actualmente se considera que los enterococos forman parte de la microbiota normal de los alimentos, sin que su presencia sea necesariamente atribuible a una falta de higiene (Franz y col., 1999; Klein, 2003). Los enterococos son microorganismos importantes en los alimentos fermentados, ya que no sólo participan en los procesos madurativos y en el desarrollo de unas características organolépticas específicas, sino que además contribuyen a su seguridad microbiológica mediante la producción de bacteriocinas y otros mecanismos (Franz y col., 2003). De hecho, existen diversas cepas de enterococos que integran cultivos iniciadores o bioprotectores, o que forman parte de productos probióticos.

Por otra parte, algunas cepas de enterococos son patógenos oportunistas que causan infecciones nosocomiales en pacientes (incluyendo neonatos) que sufren enfermedades graves que requieren, habitualmente, convalecencias prolongadas (Moellering, 2000). No obstante, no se debe generalizar esta consideración a todos los enterococos ya que la incidencia de factores de virulencia y de resistencia a antibióticos depende de cada cepa (Eaton y Gasson,

2001; Franz y col., 2001; Temmerman y col., 2003). En un estudio reciente, Vancanneyt y col. (2002) compararon los genotipos de numerosas cepas de *E. faecium* aisladas de muestras humanas, animales y alimentarias, y encontraron que todos los aislados humanos involucrados en infecciones clínicas podrían englobarse en un mismo subgrupo, distinto de todos los demás; los resultados de ese trabajo sugieren que seguramente existe una base genética común a todas las cepas potencialmente peligrosas. Pillai y col. (2002) también han sugerido la existencia de subpoblaciones virulentas entre las cepas de *E. faecalis*. En consecuencia, la seguridad de cualquier cepa de *Enterococcus* spp. de interés clínico o industrial debe ser evaluada de forma individual y meticulosa.

Dado que, como se comentó en el capítulo anterior, la leche materna puede ser una importante fuente de enterococos para el intestino infantil, el objetivo de este trabajo fue la evaluación de la seguridad de las cepas aisladas. Para ello, se seleccionaron 7 cepas de *E. faecium* aisladas de leche materna: LC4 y LC27 (de la madre A), LJx4, LJx27 y LJx33 (de la madre B), y LM1a y LM22 (de la madre C) (Martín y col. 2003).

Determinantes genéticos de virulencia, factores de virulencia y potencial conjugativo

En este trabajo se analizó la presencia de los siguientes genes que codifican factores de virulencia conocidos o presuntivos: $efaA_{fs}^{+}$, $efaA_{fm}^{+}$, esp_{fs}^{+}, esp_{fm}^{+}, cpd^{+}, cob^{+}, ccf^{+}, cad^{+}, $gelE^{+}$, agg^{+} y $cylMBA^{+}$. El papel de los productos de expresión de dichos genes como factores de virulencia se expone en la Tabla 1. Las cepas que se emplearon como controles en las reacciones de PCR y que sirvieron para la obtención de las sondas fueron *E. faecalis* F4, P36 y P4, cepas que comparten el mismo genotipo ($efaA_{fs}^{+}$ $gelE^{+}$ agg^{+} $cylMBA^{+}$ esp_{fs}^{+} cpd^{+} cob^{+} ccf^{+} cad^{+}) y *E. faecium* P61 ($efaA_{fm}^{+}$ esp_{fm}^{+}). Los cebadores para la detección de tales genes y la obtención de las sondas se seleccionaron siguiendo los criterios de Eaton y Gasson (2001) y se muestran en la Tabla 2. Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen total de 25 µl que contenía 2,5 µg de DNA y 20 pmoles de cada cebador, utilizando el sistema *puReTaq Ready-To-Go PCR* (Amersham Biosciences). El programa de amplificación estaba integrado por un ciclo inicial de desnaturalización (95°C, 5 min), seguido de los 35 ciclos siguientes: (95°C, 30 s) + (temperatura específica según los cebadores, 30 s) + (72°C, 1 min). Una vez amplificados, los fragmentos diana (Tabla 2) se purificaron empleando el *kit QIAquick PCR Purification* (QIAGEN) y sirvieron como sondas en las hibridaciones tipo Southern. Las hibridaciones se realizaron utilizando el *kit ECL direct nucleic acid labeling and detection system* (Amersham).

La capacidad para producir gelatinasa se determinó en agar Todd-Hewitt con 30 g l-1 de gelatina (Difco), mientras que la posible producción de hemolisina se determinó en agar con sangre de caballo. La hidrólisis de la gelatina se manifestaba por la aparición de halos de turbidez alrededor de las colonias, mientras que la presencia de β-hemólisis se detectaba por la aparición de halos transparentes. La prueba de agregación se realizó siguiendo el procedimiento descrito por Godon y col. (1994). *Lactobacillus salivarius* CTC2197 (Pascual y col., 1999) se empleó como control de agregación celular.

La presencia o ausencia de los genes *cpd*$^+$, *cob*$^+$, *ccf*$^+$, *cad*$^+$, *gelE*$^+$ y *agg*$^+$ da una idea bastante fiable del potencial conjugativo de los enterococos; no obstante, en este estudio también se incluyeron ensayos de conjugación siguiendo el método de Clewell y col. (1985). Para ello, se seleccionó la cepa *E. faecium* LC27 como receptora ya que tanto su genotipo como su fenotipo eran representativos del resto de las cepas. Como donante se eligió a *E. faecalis* FI9582 debido a que porta un plásmido conjugativo (pAD1; Gilmore y col., 1994) que confiere resistencia a la estreptomicina. Las placas de agar BHI en las que se efectuaron las conjugaciones se complementaron con estreptomicina y X-Gal. Este último agente se empleó para diferenciar las colonias de *E. faecium* (color azul) de las de *E. faecalis* (color blanco). Por lo tanto, los posibles transconjugantes serían aquellas colonias azules que crecieran en presencia de estreptomicina.

Los principales resultados de las distintas pruebas genotípicas y fenotípicas se resumen en la Tabla 3. Los resultados obtenidos por PCR e hibridación de Southern revelaron que ninguna de las cepas contenían determinantes genéticos de factores de virulencia, a excepción del gen $efaA_{fm}$ que estaba presente en todas. Estos resultados coinciden plenamente con los de las pruebas fenotípicas ya que ninguna de las cepas mostró actividad gelatinasa, producción de hemolisina o capacidad de agregación celular (Tabla 3). Tampoco se pudo conseguir la transferencia conjugativa de pAD1 desde *E. faecalis* FI9582 a *E. faecium* LC27, a pesar de que se intentó tres veces.

La presencia en todas las cepas del gen $efaA_{fm}$, que codifica la supuesta adhesina, no es un hecho preocupante ya que hasta la fecha no se le ha podido atribuir ningún papel en la virulencia de *E. faecium*, en contraste con $efaA_{fs}$ de *E. faecalis* (Singh y col., 1998). La presencia de $efaA_{fm}$ no tiene valor como indicador de riesgo en ausencia de otros factores de virulencia. De hecho, se halla presente en el 100% de los *E. faecium* que forman parte de cultivos iniciadores analizados por Eaton y Gasson (2001) y, al menos varias de esas cepas, tienen un largo historial de uso seguro en alimentos humanos. Además, el gen esp_{fm}, que codifica otra adhesina enterocócica, tampoco se pudo detectar en ninguna cepa. La ausencia

de los genes *cylA*, *cylB* y *cylM* explica la ausencia de actividad hemolítica en las cepas analizadas ya que su expresión es imprescindible para la biosíntesis de la citolisina (Gilmore y col., 1994). De forma similar, la ausencia del gen *gelE* está directamente relacionada con la ausencia de actividad gelatinasa.

Algunos enterococos poseen mecanismos de transferencia génica muy eficaces y se sabe que los genes que codifican ciertos factores de virulencia y la resistencia a algunos antibióticos están asociados con plásmidos altamente transferibles. Sin embargo, en este estudio no fue posible detectar los genes relacionados con feromonas sexuales (*cpd*, *cob*, *ccf* y *cad*) ni el gen de agregación *agg* en las cepas analizadas; estos resultados justifican la falta de agregación celular y la repetida incapacidad de *E. faecium* LC27 para adquirir el plásmido pAD1 mediante conjugación. En consecuencia, el potencial de nuestras cepas para adquirir y/o transferir genes es extremadamente bajo, en caso de que exista. El hecho de que algunos genes indeseables estén codificados en plásmidos que responden a feromonas y que generalmente sólo se encuentran en *E. faecalis* podría explicar la mayor incidencia de factores de virulencia en cepas de esta especie y su marcado predominio (80-90%) entre los enterococos involucrados en infecciones humanas (Kayser, 2003). Aunque se ha descrito la transferencia de genes de resistencia a vancomicina a una cepa probiótica de *E. faecium* (Lund y Edlund, 2001), otras cepas se han mostrado totalmente incapaces para participar en procesos de conjugación (Eaton y Gasson, 2001). En este sentido, Franz y col. (2003) consideran que, en muchos estudios, las tasas de transferencia de genes a cepas de *E. faecium* son muy exageradas ya que las condiciones en las que se realizan los experimentos no son representativas de las que pueden existir en ambientes naturales.

Producción de aminas biógenas

El potencial de las cepas para producir aminas biógenas (tiramina, histamina, putrescina, cadaverina) se evaluó empleando el procedimiento descrito por Bover-Cid y Holzapfel (1999). Ninguna de las cepas produjo histamina, putrescina o cadaverina. Por el contrario, todas las cepas produjeron niveles detectables de tiramina, a excepción de *E. faecium* LM1a y LM22 (Tabla 3).

Las aminas biógenas se producen en ciertos alimentos, como consecuencia de la actividad descarboxilasa de algunos microorganismos, y cuando se encuentran en concentraciones elevadas pueden ocasionar problemas toxicológicos en los consumidores (ten Brink y col., 1990). La histamina y la tiramina tienen propiedades vasoactivas y psicoactivas,

mientras que las diaminas putrescina y cadaverina, además de potenciar la toxicidad de las anteriores, son potenciales precursores de nitrosaminas carcinogénicas si simultáneamente existen agentes nitrosables en los alimentos (Bover-Cid y Holzapfel, 1999). En este estudio, se investigó el potencial de las cepas para producir estos compuestos orgánicos en previsión de que algún día se utilicen en alimentos comerciales. No se pudo detectar histamina, putrescina o cadaverina a partir de ninguna de las cepas, mientras que la mayoría formaron tiramina. Las únicas excepciones fueron *E. faecium* LM1a y LM22, dos aislados procedentes de la misma muestra de leche y que muy posiblemente conformen una misma cepa ya que comparten perfiles genéticos (Martín y col., 2003).

A diferencia de lo que sucede con otras aminas biógenas, la capacidad para producir tiramina está ampliamente distribuida entre los enterococos (Le Jeune y col., 1995; Bover-Cid y Holzapfel, 1999; Bover-Cid y col., 2001; Gardini y col., 2001). No obstante, la formación de tiramina parece requerir unas condiciones ambientales que sólo se encuentran en alimentos fermentados o alterados (Bover-Cid y Holzapfel, 1999) y, en consecuencia, la presencia de estas cepas en la leche humana o en el intestino del lactante no debe ser considerada como un riesgo para la salud humana.

Resistencia a antibióticos

La resistencia de las cepas a diversos antibióticos de relevancia clínica (ampicilina, ciprofloxacina, clindamicina, cloranfenicol, eritromicina, kanamicina, tetraciclina y vancomicina) se evaluó empleando el sistema de difusión a partir de discos con concentraciones estándar (Oxoid), siguiendo el procedimiento y criterio de interpretación propuesto por Charteris y col. (1998). Dada la relevancia de la resistencia a la vancomicina entre los enterococos, también se determinó la presencia o ausencia de los genes *vanA* y *vanB* con los cebadores y condiciones descritas por Dutka-Malen y col. (1995), en el caso de *vanA*, y por Ramos-Trujillo y col. (2003) en el caso del gen *vanB*. Las cepas *E. faecium* BM4147 (resistente a la vancomicina, $VanA^+$) y *E. faecalis* V583 (resistente a la vancomicina, $VanB^+$) se emplearon como controles positivos y fueron amablemente cedidas por el Dr. F. Claverie-Martín (Hospital Universitario Nuestra Señora de Candelaria, Santa Cruz de Tenerife).

Todas las cepas analizadas fueron sensibles a la ampicilina, a la clindamicina, al cloranfenicol, a la tetraciclina y, lo que es más significativo, a la vancomicina. Por el contrario, se mostraron resistentes a la eritromicina, a la ciprofloxacina y a la kanamicina. No se detectaron los genes *vanA* o *vanB* en ninguna de las cepas analizadas.

La resistencia a los antibióticos es una propiedad muy importante cuando se evalúa la seguridad de cepas de enterococos. En este contexto, resultan particularmente preocupantes la resistencia frente a glucopéptidos como la vancomicina ya que, en primer lugar, pueden ser transferidas a otras cepas, incluso de otras especies y géneros, y, en segundo lugar, porque estos antibióticos constituyen frecuentemente la única opción para tratar infecciones nosocomiales en hospedadores inmunodeprimidos. Diversos estudios sobre la incidencia de resistencia a antibióticos entre enterococos que no están implicados en infecciones humanas han revelado que la mayoría de las cepas analizadas, especialmente las de *E. faecium*, suelen ser sensibles a los antibióticos clínicamente importantes, incluyendo la vancomicina (Klein y col., 1998; Franz y col., 2001; Temmerman y col., 2003). Recientemente, Temmerman y col. (2003) han demostrado la escasa validez de los métodos basados en difusión a partir de discos para determinar la resistencia real a la vancomicina. A pesar de ello, estos métodos se siguen empleando ampliamente y originan un gran número de falsos resistentes. Por ello, los citados autores sugirieron el empleo de métodos de dilución, como los habitualmente utilizados para establecer concentraciones mínimas en combinación con la detección de los genes *vanAB* por PCR.

La sensibilidad de las cepas a antibióticos tan importantes como la ampicilina, la clindamicina, el cloranfenicol, la tetraciclina y la vancomicina, junto con la ausencia de los genes *vanAB* y la incapacidad manifiesta para adquirir información genética mediante procesos de conjugación, hace que, desde este aspecto, las cepas analizadas se puedan considerar seguras. La resistencia de todas las cepas frente a la kanamicina era un resultado esperado ya que el género *Enterococcus* es intrínsecamente resistente a dicho antibiótico (Franz y col., 1999).

Conclusiones

Las cepas incluidas en este estudio fueron aisladas originalmente de leche materna, el único alimento que es ingerido por un elevado porcentaje de neonatos, un segmento de la población especialmente susceptible a las enfermedades infecciosas (Morris y Potter, 1997). Sin embargo, aunque dichos niños (con edades actuales comprendidas entre 1 y 2 años) recibieron grandes volúmenes de leche materna que contenía elevadas concentraciones de enterococos ($>10^2$ ufc ml^{-1}) durante al menos sus primeros 5 meses de vida, su estado de salud ha sido óptimo hasta la fecha. De hecho, la existencia de una población significativa de enterococos endógenos en la microbiota intestinal de los niños de corta edad puede

representar un beneficio para el hospedador. Hasta hace poco tiempo, se pensaba que las infecciones enterocócicas se adquirían endógenamente, es decir, a partir de la propia flora del paciente; sin embargo, en los últimos años los análisis de casos clínicos han demostrado que prácticamente todas las cepas involucradas tenían un origen exógeno (Kayser, 2003). En este sentido, actualmente se sabe que las infecciones por enterococos suelen seguir un proceso que consta de dos etapas (Kayser, 2003); inicialmente, se produce una colonización asintomática de los pacientes con cepas que poseen factores de virulencia y resistencia a antibióticos y que son endémicas en un hospital o unidad hospitalaria; seguidamente, esta población exógena crece, a menudo favorecida por la eliminación de competidores debida a la antibioterapia, y puede conducir a una enfermedad adicional en pacientes de riesgo (normalmente con enfermedades graves y/o crónicas que requieren una larga hospitalización). Conviene destacar que, incluso en pacientes inmunodeprimidos, los enterococos por sí solos son a menudo incapaces de causar una enfermedad y requieren para ello la presencia de una flora patógena compleja (Kayser, 2003).

En conclusión, la leche de madres sanas puede considerarse como una fuente de enterococos seguros para sus recién nacidos. La elevada concentración de enterococos tanto en la leche materna como en el intestino infantil sugiere que estos microorganismos deben desempeñar un papel biológico importante en los primeros meses de vida del niño. Actualmente nuestro trabajo se dirige a dilucidar dicho significado biológico.

Finalmente, en el caso de que alguna de las cepas aisladas de leche materna poseyera propiedades probióticas reales, éstas resultarían particularmente atractivas, ya que debido a su peculiar origen cumplirían con algunos de los principales criterios generalmente recomendados para probióticos humanos, como origen humano, consumo prolongado y seguro en recién nacidos, y adaptación a ambientes lácteos. A pesar de la progresiva extensión de cierta paranoia científica en torno a la “maldad intrínseca” de los enterococos, estas bacterias forman parte de nuestra flora normal (desde la más tierna infancia) y de la de nuestros alimentos, y algunas cepas se emplean comercialmente como probióticos (Fris-Moller y Hay, 1983; Hougaard, 1994; Agerbaek y col., 1995); en consecuencia, globalmente desempeñan papeles positivos para la salud humana, y para la seguridad y calidad de los alimentos fermentados. Por lo tanto, y dado que existen cepas (generalmente en el ámbito hospitalario) que producen repercusiones clínicas, resulta obvia la necesidad de evaluar la seguridad de los enterococos cepa a cepa, pero sin dar una falsa imagen de patogenicidad generalizada y reconociendo los beneficios que aportan o pueden aportar aquellas cepas que carecen de riesgos para la salud.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido posible gracias a la financiación recibida a través del proyecto AGL2003-01242 y de un contrato Art. 83 con Puleva Biotech S.A.

Referencias

Agerbaek, M., Gerdes, L. U. y Richelsen, B. (1995) Hypocholesterolaeimic effect of a new fermented milk product in healthy middle-aged men. *Eur. J. Clin. Nutr.* **49:**346-352.

Bover-Cid, S. y Holzapfel, W. H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **53:**33-41.

Bover-Cid, S., Hugas, M., Izquierdo-Pulido, M. y Vidal-Carou, M. C. (2001). Amino acid-decarboxylase activity of bacteria isolated from fermented pork sausages. *Int. J. Food Microbiol.* **66:**185-189.

Charteris, W. P., Kelly, P. M., Morelli, L. y Collins, J. K. (1998). Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* **61:**1636-1643.

Clewell, D. B., An, F. Y., White, B. A. y Gawron-Burke, C. (1985). *Streptococcus faecalis* sex pheromone (cAM373) also produced by *Staphylococcus aureus* and identification of a conjugative transposon (Tn*918*). *J. Bacteriol.* **162:**1212-1220.

Dutka-Malen, S., Evers, S. y Courvalin, P. (1995). Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J. Clin. Microbiol.* **33:**24-27.

Eaton, T. y Gasson, M.J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol*. **67:**1628-1635.

Franz, C. M. A. P., Holzapfel, W. H. y Stiles, M. E. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* **47:**1-24

Franz, C. M. A. P., Muscholl-Silberhorn, A. B., Yousif, N. M. K., Vancanneyt, M., Swings, J. y Holzapfel, W. H. (2001). Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl. Environ. Microbiol.* **67:**4385-4389.

Franz, C. M. A. P., Stiles, M. E., Schleifer, K. H. y Holzapfel, W. H. (2003). Enterococci in foods. A conundrum for food safety. *Int. J. Food Microbiol.*, in press (available at www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro).

Fris-Moller, A. y Hay, H. (1983) Colonization of the intestinal canal with *Streptococcus faecium* preparation (Paraghurt®). *Curr. Therap. Res.* **33:**807-815.

Gardini, F., Martuscelli, M., Caruso, M. C., Galgano, F., Crudele, M. A., Favati, F., Guerzoni, M. E. y Suzzi, G. (2001). Effects of pH, temperature, and NaCl concentration on the growth kinetics, proteolytic activity and biogenic amine production of *Enterococcus faecalis*. *Int. J. Food Microbiol.* **64:**105-117.

Gilmore, M. S., Segarra, S. A., Booth, M. C., Bogie, C. P., Hall, L. R. y Clewell, D. B. (1994). Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* **176:**7335-7344.

Godon, J. J., Jury, K., Shearman, C. A. y Gasson, M. J. (1994). The *Lactococcus lactis* sex-factor aggregation gene *cluA*. *Mol. Microbiol.* **12:**655-663.

Hougaard, E. (1994) Gaio has created an enterely new market. *Scan. Dairy Inf.* **8:**10.

Keyser, F. H. (2003). Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.*, in press (available at www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro).

Klein, G. (2003). Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.*, in press (available at www.elsevier.com/locate/ijfoodmicro).

Klein, G., Pack, A. y Reuter, G. (1998). Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl. Environ. Microbiol.* **64:**1825-1830.

Le Jeune, C., Lonvaud-Funel, A., ten Brink, B., Hofstra, H. y van der Vossen, J. M. B. M. (1995). Development of a detection system for histidine decarboxylating lactic acid bacteria based on DNA probes, PCR and activity test. *J. Appl. Bacteriol.* **78:**316-326.

Leclerc, H., Devriese, L. A. y Mossel, D. A. A. (1996). Taxonomical changes in intestinal (faecal) enterococci and streptococci: consequences on their use as indicators of faecal contamination in drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* **81:**459-466.

Lund, B. y Edlund, C. (2001). Probiotic *Enterococcus faecium* strain is a possible recipient of the vanA gene cluster. *Clin. Infect. Dis.* **32:**1384-1385.

Manero, A. y Blanch, A. R. (1999). Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.* **65:**4425-4430.

Martín, R., Langa, S., Reviriego, C., Jiménez, E., Marín, M.L., Xaus, J., Fernández, L. y Rodríguez, J.M. (2003). Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J. Pediatr.* **143(6):**754-758.

Moellering, R. C. (2000). *Enterococcus* species. En: *Principles and Practice of Infectious Diseases*, 5th ed., G. L. Mandell, J. E. Bennett y R. Dolin (Eds.), pp. 2147-2156. Churchill Livingstone, Filadelfia.

Morris, J.G. y Potter, M. (1997). Emergence of new pathogens as a function of changes in host susceptibility. *Em. Infect. Dis*. **3:**435-441.

Pascual, M., Hugas, M., Badiola, J.I., Monfort, J.M. y Garriga, M. (1999). *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents salmonella enteritidis colonization in chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 4981-4986.

Pillai, S.K., Sakoulas, G., Gold, H. S., Wennersten, C., Eliopoulos, G. M., Moellering, R. C. y Inouye, R. T. (2002). Prevalence of the *fsr* locus in *Enterococcus faecalis* infections. *J. Clin. Microbiol.* **40:**2651-2652.

Ramos-Trujillo, E., Pérez-Roth, E., Méndez-Álvarez, S. y Claverie-Martín, F. (2003). Multiplex PCR for simultaneous detection of enterococcal genes *vanA* and *vanB* and staphylococcal genes *mecA, ileS-2* and *femB. Int. Microbiol.* **6:**113-115.

Singh, K. V., Coque, T. M., Weinstock, G. M. y Murray, B. E. (1998). *In vivo* testing of an *Enterococcus faecalis efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identificaton. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **21:**323-331.

Temmerman, R., Pot, B., Huys, G. y Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* **81:**1-10.

ten Brink, B., Damink, C., Joosten, H. J. y Huis in't Veld, J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *Int. J. Food Microbiol.* **11:**73-84.

Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Björkroth, K. J., Franz, C. M. A. P., Foulquié Moreno, M. R., Revets, H., De Vuyst, L., Swings, J., Kersters, K., Dellaglio, F. y Holzapfel, W. H. (2002). Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:**1381-1391.

Tabla 1. Determinantes genéticos de virulencia descritos en enterococos y evaluados en este trabajo

Gen(es)	**Papel de la(s) proteína(s) expresada(s)**
agg	Proteína de agregación involucrada en la adherencia a células eucariotas, agregación celular y conjugación
gelE	Toxina; metaloendopeptidasa extracelular, hidroliza gelatina, colágeno, hemoglobina y otros compuestos bioactivos
cylM	Modificación postraduccional de la citolisina (hemolisina-bacteriocina que lisa un amplio espectro de células de eucariotas y de bacterias Gram-positivas)
cylB	Transporte de la citolisina
cylA	Activación de la citolisina
esp_{fs}; esp_{fm}	Proteína asociada a la pared celular involucrada en la evasión al sistema inmune por parte de *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente; puede estar asociada con los genes *cyl* en islotes de patogenicidad
$efaA_{fs}$; $efaA_{fm}$	Adhesinas de pared celular, que se expresan en *E. faecalis* y *E. faecium*, respectivamente
cpd, cob, ccf, cad	Feromonas sexuales, quimiotáxicos para leucocitos humanos; facilitan los procesos de conjugación

Adaptado de Eaton y Gasson (2001)

Tabla 2. Cebadores y productos de PCR empleados para la detección de los determinantes de virulencia

Gen y cebadores	Secuencia (5'-3')	Tamaño del producto (pb)
agg$_2$		
TE32	GTTGTTTTAGCAATGGGGTAT	1210 pb
TE33	CACTACTTGTAAATTCATAGA	
efaA$_{fm}$		
TE37	AACAGATCCGCATGAATA	735 pb
TE38	CATTTCATCATCTGATAGTA	
cpd		
TE51	TGGTGGGTTATTTTTCAATTC	782 pb
TE52	TACGGCTCTGGCTTACTA	
cob		
TE49	AACATTCAGCAAACAAAGC	1405 pb
TE50	TTGTCATAAAGAGTGGTCAT	
ccf		
TE53	GGGAATTGAGTAGTGAAGAAG	543 pb
TE54	AGCCGCTAAAATCGGTAAAAT	
cad		
TE42a	TGCTTTGTCATTGACAATCCG	1299 pb
TE43a	ACTTTTTCCCAACCCCTCAA	
efaA$_{fs}$		705 pb
TE5	GACAGACCCTCACGAATA	
TE6	AGTTCATCATGCTGTAGTA	
gelE		
TE9	ACCCCGTATCATTGGTTT	419 pb
TE10	ACGCATTGCTTTTCCATC	
cylM		
TE13	CTGATGGAAAGAAGATAGTAT	742 pb
TE14	TGAGTTGGTCTGATTACATTT	
cylB		
TE15	ATTCCTACCTATGTTCTGTTA	843 pb
TE16	AATAAACTCTTCTTTTCCAAC	
cylA		
TE17	TGGATGATAGTGATAGGAAGT	517 pb
TE18	TCTACAGTAAATCTTTCGTCA	
esp$_{fs}$		
TE34	TTGCTAATGCTAGTCCACGACC	933 pb
TE36	GCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	
esp$_{fm}$		
TE104	TTGCTAATGCAAGTCACGTCC	955 pb
TE105	GCATCAACACTTGCATTACCGAA	

Tabla 3. Resumen de los principales resultados obtenidos mediante PCR, hibridación de Southern y pruebas fenotípicas

Cepa	Genotipo	Fenotipo*
LC4	*efaA*$_{fm}^{+}$	GelE^{-} Hyl^{-} Agg^{+} Tyr^{+} Van^{-}
LC27	*efaA*$_{fm}^{+}$	GelE^{-} Hyl^{-} Agg^{+} Tyr^{+} Van^{-}
LJx4	*efaA*$_{fm}^{+}$	GelE^{-} Hyl^{-} Agg^{+} Tyr^{+} Van^{-}
LJx27	*efaA*$_{fm}^{+}$	GelE^{-} Hyl^{-} Agg^{+} Tyr^{+} Van^{-}
LJx33	*efaA*$_{fm}^{+}$	GelE^{-} Hyl^{-} Agg^{+} Tyr^{+} Van^{-}
LM1a	*efaA*$_{fm}^{+}$	GelE^{-} Hyl^{-} Agg^{+} Tyr^{-} Van^{-}
LM22	*efaA*$_{fm}^{+}$	GelE^{-} Hyl^{-} Agg^{+} Tyr^{-} Van^{-}

* GelE: producción de gelatinasa; Hyl: β-hemólisis; Agg: agregación; Tyr: producción de tiramina; Van: resistencia a la vancomicina.

CAPÍTULO 5

EL MÉTODO DE LA MADRE CANGURO

Adolfo Gómez Papí[a,b], Natàlia Garcia[a], Ricardo Closa Monasterolo[a,b].

[a]*Unidad Neonatal. Servei de Pediatria. Hospital Universitario de Tarragona "Joan XXIII".*

[b]*Unidad de Pediatria. Facultat de Medicina. Universitat Rovira i Virgili.*

Introducción

Cuando una pareja decide tener un hijo se lo imagina sano, activo, regordete e integrado en la familia. Estas expectativas se truncan bruscamente si el bebé nace antes de tiempo. El prematuro será separado inmediatamente de sus padres y se le colocará en una incubadora. Cuanto más inmaduro sea, más cables y tubos llevará y su aspecto será más llamativo. Ante esta situación, es muy probable que los padres experimenten sentimientos de duelo, culpa, preocupación e, incluso, rechazo.

La inmadurez del prematuro se manifiesta, principalmente, por la incapacidad de mantener la temperatura corporal, la predisposición a infectarse, la tendencia a respirar de forma periódica e incluso de presentar apneas, el síndrome de "distress" respiratorio idiopático por déficit de surfactante (enfermedad de las "membranas hialinas"), la falta de reflejos necesarios para su supervivencia (como el de búsqueda, el de succión y el de deglución), y la intolerancia por vía digestiva a otros alimentos que no sean la leche humana. Cuanto más inmaduro es el prematuro, más exageradas y probables son estas manifestaciones.

Los avances en neonatología han conseguido reducir la mortalidad y morbilidad neonatales de forma significativa en todos los países desarrollados. La incubadora ayuda al prematuro a mantener una temperatura corporal óptima y, al mismo tiempo, le aísla del entorno para hacer más difíciles las infecciones adquiridas. La administración sistemática de antibióticos a la madre y al bebé para prevenir las infecciones bacterianas de transmisión vertical ha hecho disminuir de forma significativa este tipo de infecciones, que eran más frecuentes en los prematuros (Comitee on Obstetric Practice, 1996). Los respiradores artificiales lograron sacar adelante a los prematuros con el síndrome de "distress" respiratorio idiopático, enfermedad que ahora, gracias a la administración sistemática de corticoides a las madres con amenaza de parto prematuro (Crowley, 2003) y a la administración de surfactantes exógenos, tiene una menor morbi-mortalidad (Schwartz y col., 1994; Soll, 1998). Las nutriciones parenterales nos permitieron alimentarlos con menor riesgo de enterocolitis necrosante, que se presentaba más

frecuentemente en los prematuros patológicos alimentados con leches artificiales de forma precoz (Lucas y Cole, 1990). En la actualidad, los prematuros salen muy pronto del estado crítico y permanecen mucho tiempo en buenas condiciones en las incubadoras.

Hasta hace poco, no se permitía que salieran de la incubadora y no debían tocarse, no fuera que se infectaran. También por miedo a las infecciones, los padres entraban en las UCI neonatales en horarios restringidos y vestidos y enguantados, procedimientos que se ha comprobado que no disminuyen la incidencia de muertes, infecciones ni colonización bacteriana de los prematuros ingresados (Webster y Pritchard, 2003). Por otra parte, estos bebés tan inmaduros a menudo recibían estímulos táctiles agresivos (sólo se les tocaba para pincharlos o explorarlos), oían el ruido continuo del motor de la incubadora y estaban sometidos a la luz durante las 24 horas del día (Symington y Pinelli, 2003).

En la actualidad estamos en condiciones de incluir en los cuidados del prematuro maniobras de estimulación que favorezcan su desarrollo y aumenten los vínculos afectivos entre los niños prematuros y sus padres (Symington y Pinelli, 2003). Entre estas maniobras se incluye el masaje corporal, el método de la madre canguro (MMC) y otras todavía en fase de experimentación.

Método de la madre canguro

En 1979, los doctores Rey y Martínez del Hospital de S. Juan de Dios de Bogotá, preocupados porque la falta de incubadoras para el número de prematuros que tenían ingresados comportaba un aumento significativo de las infecciones hospitalarias, iniciaron un programa de cuidados del prematuro que, en síntesis, consistía en colocarle en contacto piel con piel entre los pechos de su madre, alimentarle con leche materna, adelantarle el alta y seguir con el método canguro en el domicilio (Rey y Martínez, 1981). Desde entonces, se han descrito numerosas ventajas del MMC sobre el método tradicional (incubadora): mejor termorregulación, aceleración de la adaptación metabólica de los prematuros, mayor supervivencia en países en vías de desarrollo, menor riesgo de infecciones (incluidas las nosocomiales), facilitación de la lactancia materna, mayor ganancia de peso, reducción de la estancia hospitalaria, reducción de los episodios de apnea y aumento de la confianza de las madres en el cuidado de sus hijos (Hadeed y col., 1995; Cattaneo y col., 1998; Conde-Agudelo y col., 2003). Pero las ventajas de MMC van más allá del período neonatal (Zupan, 2000). En países donde el MMC se practica hace más tiempo, y que se realiza no sólo en el hospital, sino también de forma ambulatoria y continuo (las

24 horas del día) se ha descrito que disminuye la mortalidad de año en año de edad, que aumenta el porcentaje y la duración de lactancia materna (Charpak y col., 2000), que aumenta el índice de crecimiento del perímetro cefálico, que presentan menos infecciones graves durante el primer año de edad (Charpak y col., 2001), que mejoran los coeficientes intelectual, de escala motora y personal-social más significativamente en aquellos lactantes que fueron prematuros de alto riesgo (Cristo y col., 2002), y que las madres que han practicado el MMC con sus bebés prematuros responden mejor ante situaciones de estrés, como ingresos hospitalarios prolongados de sus hijos (Tessier y col., 1998).

Cuando se coloca desnudo sobre el tórax de su madre, se estimula en el recién nacido el recuerdo de experiencias intrauterinas (el sonido del corazón materno, el movimiento continuo del tórax, las características de la voz materna), que lo tranquilizan. La madre se siente motivada a acariciarlo y así comienza la estimulación somato-sensorial. El contacto es íntimo y muy emotivo y favorece los lazos afectivos y la interacción madre-hijo. Durante el MMC, las variables fisiológicas del prematuro permanecen normales, la temperatura es estable, la respiración se hace regular y profunda y la frecuencia cardíaca se estabiliza o aumenta ligeramente (Ludington-Hoe y Swinth, 1996). El niño prolonga sus períodos de reposo (alerta tranquila, sueño profundo, menos actividad muscular, llora menos), y de este modo se favorece la maduración y la ganancia de peso y disminuye el número de días de ingreso. Las madres se sienten más partícipes en el cuidado de su hijo prematuro, le estimulan y le dan su leche.

En Trieste (Italia), en octubre de 1996, tuvo lugar el primer Workshop sobre el MMC en el que, entre otros asuntos, se trató del MMC en hospitales de tercer nivel de países desarrollados. En este tipo de hospitales, el MMC se practica de forma intermitente, cuando el prematuro está estable y sólo en el medio hospitalario. Se definió el MMC como el contacto piel con piel entre madre y recién nacido prematuro lo más precoz, continuo y prolongado posible con lactancia materna, para que madre y recién nacido se beneficien de sus ventajas. Se acordó que era tributario del MMC el prematuro de cualquier edad gestacional (aunque sólo está probado en mayores de 27 semanas post-concepcionales), de cualquier peso y con cualquier tipo de enfermedad, mientras sea tolerado por el binomio madre-hijo y por la Unidad Neonatal. Se debe ofrecer a todas las madres y es particularmente beneficioso para las madres adolescentes y para aquellas con problemas sociales. La madre puede ser substituida por cualquier otro familiar que ella indique, si la Unidad Neonatal lo considera razonable. La Unidad Neonatal debe adoptar una política de puertas abiertas, debe proveer a la madre una silla cómoda y la información adecuada sobre el MMC, debe incorporar un protocolo de lactancia materna y de MMC en prematuros y su

plantilla debe estar adiestrada en la práctica de ambos protocolos (Cattaneo y col., 1998).

Alimentación del prematuro con leche materna

La leche de la propia madre es la alimentación preferida para el prematuro por su composición única, la mayor biodisponibilidad de sus componentes, sus propiedades inmunológicas y la presencia de enzimas, hormonas y factores de crecimiento (Pereira, 1995). Además, le protege frente a la enterocolitis necrosante (Lucas y Cole, 1990), lo que permite una estimulación con alimentación enteral precoz.

La leche materna es el alimento mejor tolerado por el prematuro, que presenta un vaciado gástrico más rápido y menos retenciones que cuando es alimentado con fórmulas artificiales. La enterocolitis necrosante es una de las enfermedades con mayor morbi-mortalidad entre los prematuros y la alimentación enteral es uno de sus desencadenantes. Lucas y Cole (1990) describieron que los prematuros alimentados con leche humana presentaban una incidencia de enterocolitis necrosante significativamente inferior a los que recibieron fórmulas artificiales. Posiblemente, la baja osmolaridad de la leche materna, su especificidad de especie y sus cualidades defensivas (Goldman, 1993) hacen posible que proteja a los prematuros frente a la enterocolitis necrosante. Además, parece demostrado que los prematuros alimentados con leche materna que están sometidos al Método de la Madre Canguro sufren menos infecciones nosocomiales (Conde-Agudelo y col., 2003). La madre segrega IgA específicas frente a los gérmenes de su piel y frente a los gérmenes del área neonatal que ella ha ido incorporando y que son los responsables de la infecciones nosocomiales. El MMC es importante porque puede estimular la producción de anticuerpos maternos de forma parecida al sistema inmunitario enteromamario que se ha caracterizado en los recién nacidos a término lactados al pecho (Schanler, 2001). La dieta también afecta a la flora intestinal. Los prematuros alimentados con leche de su propia madre tienen floras intestinales menos patógenas que los que reciben fórmulas artificiales, en los que predominan los gérmenes hospitalarios que son los que causan las enterocolitis necrosante (Schanler, 2001). Así, amamantando a su hijo mientras está en MMC, la madre le nutre y le proteje.

Se ha descrito que los prematuros alimentados con leche humana o, aún mejor, con leche materna, alcanzan un coeficiente intelectual ligera pero significativamente superior a los alimentados a base de fórmulas (Lucas y col., 1992). Parece también demostrado el efecto protector de la leche materna frente a la atopia y la alergia en niños con antecedentes familiares

de atopia (Lucas y col., 1990).

Aporte cuantitativo de nutrientes

La composición de la leche humana varía según sea leche de madre de niño a término o leche de madre de prematuro (Lemons y col., 1982). Durante las primeras 2-4 semanas las madres de los prematuros segregan una leche cuya composición se adapta a los requerimientos estimados de nutrientes de sus hijos. Sólo su contenido en Ca y P resulta inferior. Si se suplementa esta leche a partir de la 4ª semana, que es cuando se vuelve "madura", con preparados que contienen proteínas y minerales, parece que mejora la ganancia de peso y el aumento del perímetro craneal, aunque no hay evidencia de un beneficio a largo plazo ni tampoco de efectos indeseables (Kuschel y Harding, 2003).

Aporte cualitativo de nutrientes

La leche de madre de prematuro contiene más cantidad de una serie de aminoácidos (taurina, leucina y glicina) que son necesarios para el correcto desarrollo del sistema nervioso central del prematuro; su aporte en aminoácidos que han resultado tóxicos en animales de experimentación (fenilalanina, metionina y tirosina) y que sobrecargarían a su inmadura función renal es menor; contiene una serie de substancias (inmunoglobulinas, factores bioactivos, etc.) que le han hecho catalogar al pecho materno como un órgano inmunitario del bebé (Goldman, 1993); contiene ácidos grasos de cadena media y larga en una proporción ($\omega 6/\omega 3 = 2$) idéntica a la de las membranas celulares de la retina y del sistema nervioso central, que se ha relacionado con el mayor coeficiente intelectual que antes nombrábamos y con la menor incidencia y gravedad de la retinopatía del prematuro; más colesterol (necesario también para el desarrollo del sistema nervioso central) que la leche "madura" y mucho más que las fórmulas artificiales; y otras substancias que hacen que sea más fácil de digerir (carnitina, enzimas como las lipasas) o que son más fácilmente absorbidas por el intestino del prematuro (triglicéridos de cadena media, lactosa humana) (Schanler, 1995; 2001). La leche de madre de prematuro es rica en substancias (probióticos: lactosa, oligosacáridos) que favorecen el crecimiento de la flora intestinal no patógena (Schanler, 2001).

Además, al alimentar a su hijo con su propia leche, la madre es consciente de que juega un papel importante en los cuidados del niño y, cuando éste se coja al pecho, podrá relacionarse mucho más íntimamente con él. La relación madre-hijo continuada y estrecha se considera tan

importante que, por sí sola, podría explicar el aumento del coeficiente intelectual descrito en estos niños.

Procesamiento de la leche materna

La Asociación Americana de Bancos de Leche Materna edita una extensa y bien documentada guía para el manejo de la leche de madre para su propio hijo (The Human Milk Banking Association of North America, 1993) de la que destaca: para la extracción de leche no es necesario más que el lavado de manos y uñas de la madre y la ducha diaria; usar un sacaleches eléctrico graduable, que es el método con el que se consigue una mayor producción de leche y mayor cantidad de grasa; iniciar la recogida lo antes posible para evitar la contaminación por *Escherichia coli* y usar recipientes sólidos con tapa, para evitar la contaminación y la oxidación de la leche. En cuanto a la conservación de la leche, a temperatura ambiente permanece inalterada durante 4 horas, en nevera 48 horas y en congelador (-20ºC) 6 meses. No hacen falta controles bacteriológicos. Cuando se hacen cultivos seriados de la leche recién extraída se observa que crecen colonias de microorganismos de la flora cutánea materna y, sin embargo, en los prematuros no se describen consecuencias derivadas de su ingestión (Law y col., 1989). Además, con la práctica rutinaria de cultivos se pierden unos mililitros de leche que pueden resultar preciosos para la alimentación del prematuro. La forma de administración de la leche al prematuro depende de que tenga reflejo de succión. Se administrará por sonda gástrica en "bolus" intermitente o se colocará el niño directamente al pecho. Administrada en perfusión continua, la leche pierde gran parte de su grasa en las paredes de la jeringa y del tubo (Stocks y col., 1985) y corre el riesgo de alterarse al permanecer cerca de las 4 horas a temperatura ambiente, en consecuencia, se debería realizar durante períodos no superiores a una hora y agitando frecuentemente la jeringa.

Nuestra experiencia

Cuando nace el niño prematuro, un neonatólogo informa a la familia sobre el estado de su hijo y sobre la importancia de que sea alimentado con leche de su madre (hasta la fecha, todas las madres de prematuros han accedido a lactar a sus hijos, incluso cuando previamente habían decidido dar biberón) Además, una enfermera de la Unidad le explica el funcionamiento del sacaleches eléctrico y las normas higiénicas que debe observar. Cada 3 horas, en la habitación de

la madre o al lado de la incubadora, se estimula el pecho con el sacaleches. La leche se recoge en unos recipientes previamente etiquetados con el nombre del niño, número de cuna, fecha y hora de la extracción, y se guarda en nevera a 4ºC. La enfermera de Dietética distribuye le leche recogida según el volumen de las tomas prescrito por los pediatras de la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatal. La leche restante, sobre todo la de los primeros días, se guarda en el congelador a -20ºC convenientemente etiquetada. Administramos la leche por sonda gástrica en "bolus" intermitente a los prematuros sin reflejo de succión (Gómez Papí, 1997) y comenzamos, siempre que su estado clínico lo permite, en las primeras 24-48 horas con volúmenes crecientes según el peso del prematuro. En el caso de prematuros de peso muy bajo, la alimentación con leche materna aporta menos del 20% de las calorías totales durante los primeros días (nutrición enteral mínima) y se administra con el fin de estimular el desarrollo de la mucosa intestinal y disminuir la duración de la nutrición parenteral, la intolerancia alimentaria, la colestasis y la hiperbilirrubinemia (Pereira, 1995).

Aunque ha representado un cambio importante en la atención del recién nacido y un aumento de las cargas de trabajo, el MMC ha sido muy bien acogido por el personal de enfermería. Además, ha resultado altamente satisfactorio para las madres. En la actualidad, forma parte de la rutina de atención al recién nacido prematuro. Las madres son informadas, previamente, de las ventajas y de la técnica del MMC. Muchos prematuros hacen el "canguro" coincidiendo con las tomas al pecho. Se les toman las constantes antes, durante y después del MMC y se registran junto a las conductas de la madre y del recién nacido (Tablas 1 y 2) (Closa y col., 1998). La mayoría de prematuros están relajados (manos abiertas) y en pocas ocasiones se muestran incómodos (puños cerrados, muecas). De hecho, están tan a gusto que normalmente están dormidos o duermen profundamente. Y si están despiertos, los encontramos en alerta tranquilla, mirando al su alrededor e, incluso, esbozando una sonrisa (Tabla 1). Durante el MMC, las madres miran a sus hijos, les tocan, les sonríen, les hablan (y les cantan canciones infantiles), y, cuando tienen más confianza, juegan con ellos (Tabla 2) (Closa y col., 1998).

La primera vez que les pones entre sus pechos a sus hijos, vestidos tan sólo con el pañal y un gorro, muchas madres lloran de emoción. La madre de Estefanía no se lo creía cuando pusimos a su hija de menos de 1000 g a "hacer el canguro". Se le empañaron las gafas. Mientras tanto, monitorizamos y registramos las constantes vitales y la temperatura de la niña. Estefanía recibía la leche de su madre por sonda nasogástrica mientras disfrutaba del contacto piel con piel. Joan pesó 1500 g al nacer tras 32 semanas de gestación, sufrió una asfixia neonatal y precisó ventilación mecánica las primeras 36 horas de vida. Cuando le pusimos "al canguro" sólo

pretendíamos favorecer su estimulación. Joan se movía entre los pechos de su madre hasta que encontró el pezón. ¡Y lo succionó! Nos quedamos boquiabiertos. Era muy sorprendente porque los prematuros de su edad gestacional no toleraban los biberones y tenían que ser alimentados por sonda nasogástrica. El padre de Gerard fue el primer padre que se puso a un prematuro "al canguro". El hombre estaba orgulloso y su hijo parecía cómodo sobre la cálida alfombra de pelo que era el tórax de su padre.

A raíz de lo ocurrido con Joan, permitimos a todos los prematuros recibir la leche directamente del pecho de sus madres, que entraban en la Unidad cada 3 horas. Decidimos que se les ofrecería el pecho sin tener en cuenta el tamaño ni el número de prematuros. Y comprobamos que eran capaces de hacer una succión correcta del pecho de su madre desde la semana 31 post-concepcional (34 ± 2 , datos sin publicar). Sin embargo, los más pequeños hacían tomas interminables y casi empalmaban unas con otras ya que alternaban períodos de succión con otros más prolongados de reposo o letargo. Además, las curvas ponderales se estancaron. Decidimos, entonces, suplementarles con la mitad del volumen calculado previamente para cada toma con leche materna recién extraída, que les administramos por sonda gástrica (Gómez Papí, 1995). Así se corrigió el estancamiento ponderal y se acortó la duración de las tomas. Otra solución hubiera sido instaurar el MMC durante las 24 horas del día y permitir la lactancia a demanda, a intervalos no superiores a 2 horas.

Cuando la madre es dada de alta del hospital, se le adiestra en la extracción, recolección, conservación y transporte de la leche. Aprovecha las visitas al hospital para traer la leche y dar el pecho a su hijo mientras hacen el MMC. A medida que van pasando los días, la producción de leche de la madre se estanca por la falta de estímulo directo de su hijo, quien cada día necesita más volumen por toma. Coincide ese momento con la "maduración" de la leche materna. Solventamos el problema mezclando la leche reciente con la leche congelada de los primeros días, en proporción 1 a 1.

El MMC es una técnica sin riesgo: no se ha modificado la mortalidad neonatal e, incluso, nuestros prematuros presentan menos infecciones (datos sin publicar). Debido a que maduran antes y tienen mucho más contacto con sus madres, hemos conseguido adelantar el alta de los prematuros y mejorar la confianza de las madres en su capacidad para cuidar a sus hijos cuando estén en casa. Los pequeños problemas que puedan surgir una vez dados de alta se atienden en la consulta de seguimiento neonatal y de lactancia materna, donde se visitan cada 2 ó 3 días hasta que alcanzan los 2,5 Kg de peso. El MMC se practica sólo dentro del hospital, pero las madres lo pueden hacer, si quieren, en su domicilio.

Referencias

Cattaneo, A., Davanzo, R., Uxa, F., Tambourlini, G. (1998). Recommendations for the implementation of kangaroo mother care for low birth weight infants. *Acta Paediatr.* **87:**440-445.

Charpack, N., Ruiz, J.G. y Figueroa, Z. (2000). Clinical course and outcomes of newborn infants ≤ 2000 grams in the Kangaroo Mother Care Program in Bogotá, Colombia: a 6 year experience. Abstract 7. *IIIrd International Workshop on Kangaroo Mother Care.* Yokaharta, Indonesia. http://kangaroo.javeriana.edu.co/3_workshop/ABSTRACT_7.pdf

Charpack, N., Ruiz J.G., Figueroa Z. y Charpak, Y. (2001). A randomized, controlled trial of Kangaroo Mother Care: results of follow-up at 1 year of corrected age. *Pediatrics* **108:**1072-1079.

Closa Monasterolo, R., Moralejo Beneítez, J., Ravés Olivé, M.M., Martínez Martínez, M.J. y Gómez Papí A. (1998). Método canguro en recién nacidos prematuros ingresados en una unidad de Cuidados Intensivos Neonatal. *An. Esp. Pediatr.* **49:**495-498.

Comitee on Obstetric Practice (1996). Prevention of early onset group B streptococcal disease in newborns. ACOG comitee opinion, Nº 173. Washington DC. American College of Obstetricians and Gynecologists, 1996. Prevention of Perinatal group B streptococcal disease: a public health prespective. *MMWR* **45:**1-24.

Conde-Agudelo, A., Diaz-Rosello, J.L. y Belizan, J.M. (2003). Kangaroo Mother Care to reduce morbidity and mortality in low birth weight infants (Cochrane Review). En *The Cochrane Library,* Issue 4. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Cristo, M., Velez, S., Tessier, R., Giron, M. y Charpak , N. (2002). Cognitive development at 12 months and attachment between the mother and the child at 15 months in the Kangaroo Mother Program of Bogotá, Colombia. Comparission of outcomes whith a term infants cohort. Abstract 6. *IVth International Workshop on Kangaroo Mother Care.* Cape Town. http://kangaroo.javeriana.edu.co/Abstract6.htm

Crowley, P. (2003). Prophylactic corticosteroids for preterm birth (Cochrane Review). En *The Cochrane Library,* Issue 4. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Goldman, A.S. (1993). The immune system of human milk: antimicrobial, antiinflamatory and immunomodulating properties. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **12:**664-671.

Gómez Papí, A., Pacheco Hermoso, A., Díaz de Cerio y Artacoz, M.P. (1995). Procesamiento

de la leche de madre de prematuro (resumen). *An Esp Pediatr*. Libro de Comunicaciones y Pósters. *XV Congreso Nacional de Medicina Perinatal.* p. 170.

Gómez Papí, A. (1997). Lactancia materna en prematuros. *Bol. Pediatr.* **37:**147-152.

Hadeed, A.J., Ludington, S. y Siegel, S. (1995). Skin to skin contact between mothers and infants reduces idiopathic apnea of prematurity (IAOP). *Pediatr. Res.* **37(4):** Part 2, 208 A, #1233 (Abstract of presentation at SPR).

Kuschel, C.A. y Harding, J.E. (2003). Multicomponent fortified human milk for promoting growth in preterm infants (Cochrane Review). En *The Cochrane Library,* Issue 4. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Law, B.J., Urias, B.A., Lertzman, J., Robson, D. y Romance, L. (1989). Is ingestion of milk-associated bacteria by premature infants fed raw human milk controlled by routine bacteriologic screening? *J. Clin. Microbiol.* **27:**1560-1566.

Lemons, J.A., Moye, L., Hall, D. y Simmons M. (1982). Differences in the composition of preterm and term human milk during early lactation. *Pediatr. Res.* **16(2):**113-117.

Lucas, A., Brook, O.G., Cole, T.J., Morley, R., Cole, T.J. y Bamford, M.F. (1990). Early diet of preterm infants and development of allergic or atopic disease: randomised prospective study. *Br. Med. J.* **300:**837-840.

Lucas, A. y Cole, T.J. (1990). Breast milk and neonatal necrotising enterocolitis. *Lancet* **336:**1519-1523.

Lucas, A., Morley, R., Cole, T.J., Lister, G. y Leeson-Payne, C. (1992). Breast milk and subsequent intelligence quotient in children born preterm. *Lancet* **339:**261-264.

Ludington-Hoe, S.M. y Swinth, J.Y. (1996). Developmental aspects of Kangaroo Care. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal Nurs.* **25:**691-703.

Pereira, G.R. (1995). Nutritional care of the extremely premature infant. *Clin. Perinatol.* **22:**61-76.

Rey, E.S. y Martínez, H.G. (1981). Manejo racional del niño prematuro. *Proceedings de la Conferencia I Curso de Medicina Fetal y Neonatal.* Bogotá, Colombia. pp.137-51.

Schanler, R.J. (1995). Suitability of human milk for the low-birthweight infant. *Clin Perinatol.* **22:**207-222.

Schanler, R.J. (2001). The use of human milk for premature infants. *Pediatr. Clin. North Am.* **48:** 207-219.

Schwartz, R.M., Luby, A.M., Scanlon, J.W. y Kellog, R.J. (1994). Effect of surfactant on morbidity, mortality and resource use in newborn infant weighting 500-1500 g. *N. Engl. J.*

Med. **330:**1476-1480.

Soll, R.F. (1998). Surfactant treatment of very preterm infant. *Biol. Neonate* **74**(suppl 1):35-42.

Stocks, R.J., Davies, D.P. y Sewell D. (1985). Loss of breast milk nutrients during tube feeding. *Arch. Dis. Child.* **60:**164-166.

Symington, A. y Pinelli, J. (2003). Developmental care for promoting development and preventing morbidity in preterm infants (Cochrane Methodology Review). En: *The Cochrane Library*, Issue 4. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Tessier, R., Cristo, M., Velez, S., Girón, M., Figueroa, Z., Ruiz-Peláez, J.G., Charpak, Y. y Charpak N. (1998). Kangaroo Mother Care and the bonding hypothesis. *Pediatrics* **102(2):**e17**.** http://www.pediatrics.org/cgi/content/ full/102/2/e17

The Human Milk Banking Association of North America. (1993). Recommendations for Collection, Storage and Handling of a Mother's Milk for Her Own Infant in the Hospital Setting. The Human Milk banking Association of North America, Inc. P.O. Box 370464. West Hartford, CT 06137-0464.

Webster, J. y Pritchard, M.A. (2003). Gowning by attendants and visitors in newborn nurseries for prevention of neonatal morbidity and mortality (Cochrane Methodologic Review). En: *The Cochrane Library*, Issue 4. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd.

Zupan J. (2000). Newborn Health and Kangaroo Mother Care (Abstract 8). *IIIrd International Workshop on Kangaroo Mother Care.* Yokaharta, Indonesia. *http://kangaroo.javeriana.edu.co/3_workshop/ABSTRACT_8.pdf.*

Tabla 1. Constantes vitales antes, durante y después del MMC

	preMMC	MMC	postMMC
Temperatura (ºC)	36.8 ± 0.3	36.8 ± 0.3	36.8 ± 0.3
FC (latidos × min)	150 ± 19	152 ± 16	150 ± 16
FR (respiraciones × min)	49 ± 17	52 ± 17	51 ± 18
Stc Hb (%)	97 ± 3	96 ± 3	97 ± 3

MMC: Método de la Madre Canguro; FC: frecuencia cardíaca; FR: frecuencia respiratoria. Stc Hb: Saturación de hemoglobina.

Tabla 2. Conducta de los prematuros durante el MMC (n=403)

	% de MMC	nº de MMC
Manos abiertas	86	347
Puños cerrados	5	19
Somnoliento	51	207
Dormido	31	126
Activo	10	41
Alerta tranquila	37	149
Mira alrededor	25	99
Sonríe	14	57
Hace muecas	11	43

nº de MMC: número de contactos piel con piel en los que se registró esa conducta.

% de MMC: porcentaje de contactos piel con piel en los que se registró esa conducta.

CAPÍTULO 6

FUNCIÓN Y APLICACIONES DE LACTOBACILOS DE ORIGEN VAGINAL

Covadonga Barbés y Soledad Boris

Departamento de Biología Funcional (Área de Microbiología). Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo.

El ecosistema vaginal

La vagina humana consta de un epitelio escamoso, estratificado y no queratinizado, que prolifera y se engruesa en función de la fase del ciclo menstrual, respondiendo a los niveles altos de estrógenos (McGroarty, 1993). Este epitelio carece de glándulas, de tal modo que todas las secreciones vaginales proceden de las glándulas de Bartholin y Skene, del mucus cervical, de las trompas de Falopio y del endometrio. El exudado vaginal está controlado por el nivel de estrógenos y se reduce después de la mitad del ciclo menstrual cuando el nivel de los mismos decrece.

La degradación de las células epiteliales superficiales libera glucógeno que es metabolizado por enzimas secretados por células epiteliales y cervicales así como lactobacilos, liberando glucosa que es a su vez convertida en ácido láctico. La secreción vaginal está compuesta por 90-95% de agua, sales orgánicas e inorgánicas, urea, quelantes de hierro, carbohidratos, mucina, ácidos grasos, albúmina, inmunoglobulinas, lisozima y otras macromoléculas, leucocitos y restos epiteliales (Redondo-López y col., 1990; McGroarty, 1993; Larsen, 1993). El pH de la vagina varía siendo más alto en la parte superior y durante la menstruación, con una media de pH de 4.5.

El aparato reproductor contiene microorganismos en vagina y cérvix considerándose estéril el tracto superior. La vagina constituye un ecosistema polimicrobiano y dinámico que puede ser modulado por factores del huésped y del medio tales como: embarazo, menstruación, uso de anticonceptivos orales, terapia hormonal sustitutiva, inmunosupresión, manipulación quirúrgica de la vagina y el uso de antibióticos de amplio espectro.

El primer estudio extensivo sobre la microbiota vaginal humana fue publicado en 1892 por Döderlein que en 1884 había aislado una bacteria Gram-positiva, catalasa negativa no formadora de esporas procedente de la vagina de mujeres embarazadas sanas. En 1901 M.W. Beijerinck describió el género *Lactobacillus* y en 1928, S. Thomas identificó el “bacilo de Doderlein” como *Lactobacillus acidophilus* utilizando métodos bioquímicos (Redondo-López y col., 1990; Hughes y Hillier, 1990). Dicho bacilo está actualmente clasificado como *Lb.*

gasseri (Johnson y col., 1980).

Döderlein y sus contemporáneos consideraban la microbiota vaginal homogénea y constituida sólo por bacilos Gram-positivos. Este viejo concepto de que la vagina está colonizada sólo por lactobacilos ha sido modificado gracias al empleo de métodos de identificación de microorganismos más modernos que han demostrado que la vagina de las mujeres asintomáticas sanas está constituida por unas 100 especies diferentes, que comprenden bacterias tanto Gram-positivas como negativas, micoplasmas y levaduras, pero sin duda *Lactobacillus* es el género dominante con una proporción de 10^8-10^9 ufm ml^{-1} de fluido vaginal, constituyendo el 61,5 % del total de los microorganismos aislados (McGroarty, 1993; Mehta y col., 1995).

La población de lactobacilos varía en diferentes estados de la vida de la mujer, apareciendo mayoritariamente cuando el nivel de estrógenos es alto (período neonatal, menarquía) y disminuyendo cuando el nivel desciende (premenarquía y postmenopausia) (McGroarty, 1993). Esta relación entre lactobacilos, alto nivel de estrógenos y bajo pH podría explicarse si tenemos en cuenta que los estrógenos promueven la deposición de glucógeno sobre el epitelio vaginal, que a su vez sería un sustrato adecuado para la proliferación de los lactobacilos, los cuales fermentarían el glucógeno formando ácidos que contribuirían a disminuir el pH.

Establecer la identidad de las especies de lactobacilos que colonizan la vagina humana es de gran importancia ya que diversos estudios clínicos han demostrado una asociación entre la presencia de cepas de lactobacilos productores de peróxido de hidrógeno y una disminución en la incidencia de gonorrea, vaginosis bacteriana (Hawes y col., 1996) e infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Cohen y col., 1995; Sewankambo y col., 1997; Taha y col., 1999; Royce y col., 1999). La identidad de las especies predominantes de lactobacilos que colonizan la vagina no ha estado muy clara durante años debido a la metodología empleada para su identificación (fermentación de azúcares y otros criterios fenotípicos). Con el empleo de estos métodos clásicos las especies aisladas con más frecuencia eran *Lb. acidophilus* y *Lb. fermentum*, seguido de *Lb. plantarum, Lb. brevis, Lb. jensenii, Lb. casei, Lb. cellobiosus, Lb. leichmanii, Lb. delbrueckii* and *Lb. salivarius* (Rogosa y Sharpe, 1960; Levison y col., 1977; Nagy y col., 1991).

Recientemente mediante estudios de homología de ADN se ha modificado la taxonomía de los lactobacilos y así el grupo *Lb. acidophilus* se ha subdividido en seis grupos de homología, dos de los cuales, *Lb. crispatus y Lb. gasseri* junto con *Lb. jensenii* son considerados actualmente las especies dominantes en la vagina de mujeres sanas europeas,

estadounidenses y japonesas como han demostrado varios autores (Giorgi y col. 1987; Antonio y col., 1999; Song y col., 1999; Vallor y col., 2001).

Función de los lactobacilos en el ecosistema vaginal

La función atribuida a los lactobacilos en el ecosistema vaginal consiste básicamente en mantener este ambiente estable limitando el crecimiento de microorganismos patógenos, así como variaciones en la microbiota vaginal, en particular la pérdida de lactobacilos productores de H_2O_2 causa un aumento de las infecciones genitales y urinarias (Reid, 2001; Famularo y col., 2001). Estas observaciones han conducido a la investigación de las propiedades protectoras de los lactobacilos responsables del mantenimiento del estado de salud. Éstos pueden modular la presencia de otros microorganismos produciendo ácido láctico, H_2O_2, y otros compuestos antimicrobianos o bien compitiendo por nutrientes o sitios de unión a las células del epitelio vaginal (Boris y Barbés, 2000).

La acidez de la vagina se considera el primer mecanismo en el control de la microbiota y se ha relacionado con una disminución en el riesgo de infección por clamidias, tricomonas y micoplamas (Hanna y col., 1985). Esta acidificación se debe al metabolismo anaerobio del glucógeno vaginal produciendo ácido acético y láctico, sin embargo no está muy claro si este metabolismo es llevado a cabo por bacterias y/o células epiteliales (Pybus y Onderdonk, 1999). Boskey y col. (1999) apoyan la hipótesis de la implicación de las bacterias en este fenómeno y así pudieron demostrar que eran suficientes del orden de 10^8 lactobacilos para reproducir las condiciones de acidez observadas *in vivo* en la vagina. Estos lactobacilos de origen vaginal además de producir ácido resisten valores de pH muy bajos, entre 3,2 y 4,8, que son condiciones fisiológicas habituales en el ecosistema vaginal.

Para la colonización a largo plazo de la vagina se considera que es necesaria la adherencia de los lactobacilos a las células. Esta capacidad se puede ver afectada por cambios cíclicos en el nivel de hormonas (particularmente estrógenos), glucógeno, pH vaginal, que pueden alterar la composición de la microbiota vaginal. Se considera que la adherencia de los lactobacilos es mayor en presencia de una alta concentración de estrógenos (Chan y col., 1984) y se observa una reducción de la misma al final del ciclo menstrual (Keane y col., 1997).

Los factores responsables de la adherencia de los lactobacilos a las células vaginales son variados e implican diferentes compuestos de la superficie bacteriana, en algunos casos se trata de glucoproteínas y carbohidratos (Boris y col., 1998), ácido lipoteicoico (Chan y col.,

1985), hemaglutininas (Reid, 2000) o proteínas de unión a colágeno (Roos y col., 1996; Howard y col., 2000). Esta variedad muestra la complejidad y especificidad del mecanismo de adherencia, dicha propiedad es un fenómeno muy importante ya que la unión de los lactobacilos a las células impide a su vez la adherencia de otros microorganismos que podrían ser patógenos. Esta interferencia puede deberse a impedimentos estéricos (Chan y col., 1985) o a un bloqueo específico de receptores celulares (Boris y col., 1998).

Muy interesante resulta la implicación de los biosurfactantes producidos por algunas cepas de lactobacilos en este fenómeno de exclusión competitiva. Heinemann y col. (2000) han identificado una proteína de 29 kDa producida por *Lb. fermentum* RC-14 que no sólo está implicada en la adherencia del lactobacilo sino que además inhibe la unión de *Enterococcus faecalis* a las células. Esta proteína presenta homología con otra proteína de superficie de 32 kDa producida por *Lb. fermentum* BR11 (Roos y col., 1996). En ambos casos se considera que están implicadas en la adherencia de lactobacilos a los tejidos del huésped.

Otro mecanismo de protección del huésped atribuido a los lactobacilos consiste en la producción de compuestos antimicrobianos. Aunque la capacidad de producir peróxido de hidrógeno por los lactobacilos ha sido reconocida hace tiempo, sólo recientemente se ha identificado como un mecanismo importante de antagonismo bacteriano en la vagina. El peróxido de hidrógeno es intrínsecamente un potente antimicrobiano, pero si además su acción se combina con el anión cloruro y la mieloperoxidasa, ambas presentes en la vagina, su efecto se verá potenciado (Klebanoff y col., 1991; Gupta y col., 1998). La importancia de este mecanismo de defensa está avalado por el hecho de que la mayoría de los lactobacilos aislados en vagina de mujeres sanas son productores de peróxido de hidrógeno. Este compuesto no sólo está implicado en la inhibición de microorganismos como *Neisseria gonorrhoeae* o *Candida albicans* (Fitzsimmons y col., 1994; Zheng y col., 1994) sino que también parece tener un efecto viricida sobre el virus VIH afectando a la transmisión heterosexual del mismo (Klebanoff y Coombs, 1991).

En cuanto a la producción de bacteriocinas no se ha aislado ninguna procedente de lactobacilos de origen vaginal. Por el contrario, sí se han descrito sustancias tipo-bacteriocina que tienen un espectro de inhibición de patógenos más amplio abarcando tanto bacterias Gram-positivas como Gram-negativas e incluso hongos (McGroarty, 1993; Reid y col. 1987).

Aplicaciones de los lactobacilos de origen vaginal

Se ha estimado que las infecciones urogenitales, incluyendo las del tracto urinario,

vaginosis bacteriana y vaginitis por *Candida* spp. afectan a un billón de mujeres anualmente (Reid, 2002). La vaginosis bacteriana es una de las infecciones vaginales más comunes y se caracteriza por tres situaciones: supresión de la microbiota normal, aparición del patógeno y aumento de la microbiota anaerobia (el microorganismo más frecuente aislado de pacientes con vaginosis es *Gardnerella vaginalis*). Por otra parte las candidiasis de mucosas oral y vaginal son muy comunes, siendo *Candida albicans* el agente etiológico dominante de la vaginitis por el género *Candida*, aunque otras especies de la misma y otros géneros como *Torulopsis* pueden también producir la enfermedad. Asimismo las infecciones del tracto urinario son un problema común, especialmente en mujeres, siendo la mayoría causadas por *Escherichia coli*.

Los agentes antimicrobianos son muy eficaces en el tratamiento de infecciones bacterianas, pero la resistencia a antimicrobianos de los patógenos urogenitales está en aumento, así en *E. coli* es superior al 18% en Estados Unidos y Canadá para trimetoprim-sulfametoxazol y del 30% para fluoroquinolonas en España (Reid y col., 2001). Estos datos hacen imperativo el desarrollo de estrategias alternativas, siendo el uso de lactobacilos como agentes bioterapéuticos una aproximación potencial (Barbés y Boris, 1999).

En 1995 McFarland define los agentes bioterapéuticos como “microorganismos utilizados para tratar o prevenir enfermedades humanas por interacción con la microecología natural del huésped” (McFarland y Elmer, 1995). El uso tradicional de estos agentes ha estado centrado en la prevención o tratamiento de varios tipos de trastornos gastrointestinales, y posteriormente su utilización se ha extendido al tratamiento de vaginitis e infecciones urinarias recurrentes (McGroarty, 1993; Hilton y Rindos, 1995).

Como ya se señaló previamente, los lactobacilos son componentes importantes de la microbiota vaginal normal, que pueden prevenir infecciones del tracto urinario interfiriendo con uropatógenos como *E. coli* en la colonización del epitelio periuretral, así, una pérdida de lactobacilos vaginales puede predisponer a la mujer a la adquisición de infecciones genitourinarias. Por esta razón, el uso de cepas de lactobacilos seleccionadas puede ser un medio eficaz de restaurar la microbiota normal de la vagina.

La primera referencia sobre el tratamiento de vaginitis y vaginosis con lactobacilos, data de 1933 en Estados Unidos (Mohler y Brown, 1933). Posteriormente se llevaron a cabo otros estudios consistentes en la instilación intravaginal de *Lb. casei* GR-1 para prevenir infecciones del tracto urinario obteniéndose resultados satisfactorios (Bruce y Reid, 1988). También se ha observado un efecto positivo de la administración tópica o sistémica de yogurt conteniendo células viables de *Lb. acidophilus* para la prevención y tratamiento de vaginitis

por *Candida* spp. (Hilton y col., 1992), donde se observa una disminución de la incidencia de la misma durante la administración del yogurt. Asimismo, la cepa *Lb. rhamnosus* GG también se utilizó con éxito en el tratamiento de vaginitis recurrente (Hilton y Rindos, 1995).

Algunas publicaciones evidencian que el tratamiento de infecciones del tracto genitourinario con lactobacilos puede ser efectivo (Sieber y Dietz, 1998). Además de la aplicación tópica de *Lb. acidophilus, Lb. rhamnosus* GR-1, *Lb. fermentum* B-54 o RC-14, y yogurt en vagina, la ingestión de productos lácteos fermentados conteniendo estos lactobacilos también parece tener efectos terapéuticos (Nyirjesy y col., 1997; Reid y col., 2001; Reid, 2002). En este sentido, Reid y col. (2001) demuestran que *Lb. rhamnosus* GR-1 y *Lb. fermentum* RC-14 son capaces de colonizar la vagina tras la ingestión oral sin efectos secundarios. Es la primera evidencia clínica de que dos lactobacilos probióticos específicamente seleccionados por su capacidad para inhibir el crecimiento y la adherencia de patógenos urogenitales pueden colonizar la vagina tras su consumo oral, lo que significa que estos organismos sobreviven al bajo pH del estómago y a las sales biliares y pueden ascender sin intervención funcional a la vagina.

Por todo lo expuesto anteriormente podemos concluir que el uso de preparaciones probióticas es prometedor y avances recientes en la comprensión de la microbiota, sistema inmune y alteraciones metabólicas en el ecosistema vaginal de mujeres con vaginosis bacteriana han incrementado el interés en el uso terapéutico de probióticos.

Resultados recientes y perspectivas

A partir de 70 aislados vaginales humanos de mujeres premenopáusicas sanas obtenidos en el Hospital Monte Naranco de Oviedo (Asturias) se seleccionaron tres cepas de *Lactobacillus* identificadas como *Lb. acidophilus* UO 001, *Lb gasseri* UO 002 y *Lb jensenii* UO 003 (Boris y col., 1998). Estas cepas fueron posteriormente caracterizadas para determinar sus cualidades probióticas. Todas ellas tienen capacidad para autoagregar, propiedad que sería de gran utilidad como un primer paso para adherirse y colonizar el epitelio vaginal. La naturaleza de los factores implicados en este mecanismo se muestra en la Tabla 1. Asimismo, se adhieren a las células vaginales a través de glucoproteínas o carbohidratos (Tabla 1) que reconocen receptores glucolípidicos presentes en las células vaginales. En el caso de *Lb. acidophilus* UO 001 se trata de una unión tipo lectina como se pudo observar por la capacidad de dicha cepa de aglutinar eritrocitos.

Otra propiedad presente en estas cepas es su capacidad para coagregar con algunos patógenos del tracto genitourinario como *E. coli*, *G. vaginalis* y *C. albicans.* Este fenómeno unido a la producción de antimicrobianos como el ácido láctico confiere un mayor efecto inhibidor sobre *E. coli* uropátogeno. Otro mecanismo de exclusión competitiva empleado por estos lactobacilos consiste en el bloqueo específico de receptores celulares compitiendo por el sitio de unión con *G. vaginalis* y *C. albicans.* Además, en el caso de *G. vaginalis*, *Lb. acidophilus* UO 001 es capaz de desplazar a dicho microorganismo (Tabla 2).

Tras esta caracterización previa de las cepas, en la actualidad nuestras investigaciones se centran en la evaluación de su capacidad de supervivencia en las condiciones fisiológicas vaginales, su tolerancia a espermicidas, resistencia a antibióticos y búsqueda de un vehículo adecuado que permita su administración en el tracto urogenital para la prevención y tratamiento de posibles infecciones.

Adicionalmente, *Lb. acidophilus* UO 001 y *Lb. gasseri* UO 002 presentan una serie de propiedades que les hacen idóneos para su utilización en el tracto gastrointestinal (Fernández y col., 2003). Estas cepas son resistentes a las condiciones fisiológicas de dicho ecosistema, sobreviven a pH 2 y 3, en presencia de pepsina, pancreatina y sales biliares, y dicha resistencia es incrementada en presencia de leche en polvo (Fig. 1). Asimismo tienen gran capacidad de adherencia a la línea celular intestinal Caco 2 a través de glucoproteinas en *Lb. gasseri* y carbohidratos en el caso de *Lb. acidophilus*.

Por otra parte, inhiben el crecimiento de algunos enteropatógenos como *Salmonella choleraesuis*, *Yersinia enterocolitica*, *E. coli* O111, *Listeria* spp., *Clostridium* spp. y *Campylobacter jejuni*, sin interferir con algunos miembros de la microbiota normal del tracto gastrointestinal como *E. coli, E. faecalis, Bacteroides fragilis* y *Bifidobacterium bifidum.* Finalmente, *Lb. gasseri* inhibe la unión de *E. coli* O111 a células Caco-2 en condiciones de exclusión.

Podemos concluir que estas cepas con capacidad para inhibir el crecimiento y adhesión de patógenos intestinales y de colonizar el intestino, podrían ser idóneas para su uso futuro como correctoras de alteraciones del tracto genitourinario en aplicaciones tópicas o tras ingestión de las mismas.

Referencias

Antonio, M.A.D., Hawes, S.E. y Hillier, S.L. (1999). The identification of vaginal *Lactobacillus* species and the demographic and microbiologic characteristics of women

colonized by these species. *J. Infect. Dis*. **180:**1950-1956.

Barbés, C. y Boris, S. (1999). Potencial role of lactobacilli as prophylactic agents against genital pathogens. *AIDS Patient Care STDs* **13:**747-751.

Beijerinck, M.W. (1901). Sur les fermentes de lactique de l´industrie. *Arch Néerland des Sciences Extractes et Naturelles.* **6:**212-243.

Boris, S., Suárez, J.E., Vázquez, F. y Barbés, C. (1998). Adherence of human vaginal lactobacilli to epithelial vaginal cells and interaction with uropathogens. *Infect. Immun.* **66:**1985-89.

Boris, S. y Barbés, C. (2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes Infect.* **2:**543-546.

Boskey, E.R., Telsch, K.M., Whaley, K.J., Moench, T.R. y Cone, R.A. (1999). Acid production by vaginal flora in vitro is consistent with the rate and extent of vaginal acidification. *Infect. Immun*. **67:**5170-5175.

Bruce, A.W. y Reid, G. (1988). Intravaginal instillation of lactobacilli for prevention of recurrent urinary tract infections. *Can. J. Microbiol.* **34:**339-343.

Chan, R.C.Y., Bruce, A.W. y Reid, G. (1984). Adherence of cervical, vaginal and distal urethral normal microbial flora to human uroepithelial cells and the inhibition of adherence of uropathogens by competitive exclusion. *J. Urol*. **131:**596-601.

Chan, R.C.Y., Reid, G., Irvin, R.T., Bruce, A.W. y Costerton, J.W. (1985). Competitive exclusion of uropathogens from human uroepithelial cells by *Lactobacillus* whole cells and cell wall fragment. *Infect. Immun.* **47:**84-89.

Cohen, C.R., Duerr, A., Pruithinithada, H., Rugpao, S., Hillier, S.L., García, P. y Nelson, K. (1995). Bacterial vaginosis and HIV seroprevalence among female commercial sex workers in Chiang Mai, Thailand. *AIDS* **9:**1093-1097.

Döderlein, A. (1892). Das Scheidensekret und seine Bedeutung für das Puerperalfieber. *Centralblatt für bacteriologie*. **11:**694-700.

Famularo, G., Pieluigi, M., Coccía, R., Mastraiacovo, P. y De Simone, C. (2001). Microecology, bacterial vaginosis and probiotics: perspectives for bacteriotheraphy. *Med. Hypotheses* **56:**421-430.

Fernández, M.F., Boris, S., y Barbés, C. (2003). Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* **94:**449-455.

Fitzsimmons, N. y Berry, D.R. (1994). Inhibition of *Candida albicans* by *Lactobacillus acidophilus*: evidence for the involvement of a peroxidase system. *Microbios* **80:**125-133.

Giorgi, A., Torriani, S., Dellaglio, F., Bo, G., Stola, E. y Bernuzzi, L. (1987). Identification of vaginal lactobacilli from asymptomatic women. *Microbiologica* **10:**377-384.

Gupta, K., Stapleton, A.E., Hooton, T.M., Roberts, P.L., Fennell, C.L. y Stamm, W.E. (1998). Inverse association of H_2O_2-producing lactobacilli and vaginal *Escherichia coli* colonization in women with recurrent urinary tract infections. *J. Infect. Dis*. **178:**446-450.

Hanna, N.F., Taylor-Robinson, D., Kalodiki-Karamanoli, M., Harris, J.R. y Mcfadyen, I. R. (1985). The relation between vaginal pH and the microbiological status in vaginitis. *Br. J. Obstet. Gynecol*. **92:**1267-1271.

Hawes, S.E., Hillier, S.L., Benedetti, J., Stevens, C.E., Koutsky, L.A., Wolner-Hanssen, P. y Holmes, K.K. (1996). Hydrogen peroxide-producing lactobacilli and adquisition of vaginal infections. *J. Infect. Dis.* **174:**1058-1063.

Heinemann, C., Van Hylckama Vlieg, J. E. T., Janssen, D.B., Busscher, H.J. , Van der Mei, H.C. y Reid, G. (2000). Purification and characterization of a surface-binding protein from *Lactobacillus fermentum* RC-14 inhibiting *Enterococcus faecalis* 1131 adhesion. *FEMS Microbiol. Lett*. **190:**177-180.

Hilton, E., Isenberg, H.D., Alperstein, P., France, K. y Borenstein, M.T. (1992). Ingested yogurt as prophylaxis for chronic candidal vaginitis. *Ann. Intern. Med.* **116:**353-357.

Hilton, E. y Rindos, P. (1995). *Lactobacillus* GG vaginal suppositories and vaginitis. *J. Clin. Microbiol.* **33:**1433.

Howard, J.C., Heinemann, C., Thatcher, B.J., Martin, B., Gan, B.S. y Reid, G. (2000). Identification of collagen-binding proteins in *Lactobacillus* spp. with surface-enhanced laser desorption/ionization time of flight ProteinChip technology. *Appl. Environ. Microbiol*. **66:**4396-4400.

Hughes, V.L. y Hillier, Sh.L. (1990). Microbiologic characteristics of *Lactobacillus* products used for colonization of the vagina. *Obstret. Gynecol.* **75:**244-248.

Johnson, J.L., Phelps, C.F. Cummins, C.S., London, J. y Gasser, F. (1980). Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol*. **30:**53-68.

Keane F.E.A., Ison, C.A. y Taylo-Robinson, D. (1997). A longitudinal study of the vaginal flora over a menstrual cycle. *Int. J. STD AIDS* **8:**489-494.

Klebanoff, S.J., Hillier, S.L., Eschenbach, D.A. y Waltersdorph A.M. (1991). Control of the microbial flora of the vagina by H_2O_2-generating lactobacilli. *J. Infect. Dis.* **164:**94-100.

Klebanoff, S.J. y Coombs, R.W. (1991). Viricidal effect of *Lactobacillus acidophilus* on human immunodeficiency virus type 1: possible role in heterosexual transmission. *J. Exp.*

Med. **174:**289-292.

Larsen, B. (1993). Vaginal flora in health and disease. *Clin. Obstret. Gynecol.* **36:**107-121.

Levison, M.E., Corman, L.C., Carrington, E.R. y Kaye, D. (1977). Quantitative microflora of the vagina. *Am. J. Obstet. Gynecol*. **127:**80-85

McFarland, L.V. y Elmer, G.W. (1995). Biotherapeutic agents: past, present and future. En *Microecology and Therapy*. Institut für Mikroökologie (Ed.), p.46-73. Hernborn-Dill, Germany.

McGroarty, J.A. (1993). Probiotic use of lactobacilli in the human female urogenital tract. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **6:**251-264.

Mehta, A., Talwalkar, J., Shetty, C.V. y Motashaw, N.D. (1995). Microbial flora of the vagina. En *Microecology and Therapy.* Vol. 23. A.B. Onderbondk, P.J. Heidt y V.C. Rusch (Eds.), p. 1-7. Institut für Mikroökologie, Hernborn-Dil.

Mohler, R.W. y Brown, C.P. (1933). Doderlein's bacillus in the treatment of vaginitis. *Am. J. Obst. Gynecol*. **25:**718-723.

Nagy, E., Petterson, M. y Mardh, P.A. (1991). Antibiosis between bacteria isolated from the vagina of women with and without signs of bacterial vaginosis. *APMIS* **99:**739-744.

Nyirjesy, P., Weitz, M.V., Grody, M.H.T., y Lorber, B. (1997). Over-the-counter and alternative medicines in the treatment of chronic vaginal symptoms. *Obstet. Gynecol.* **90:**50-53.

Pybus, V., y Onderdonk, A.B. (1999). Microbial interactions in the vaginal ecosystem, with emphasis on the pathogenesis of bacterial vaginosis. *Microbes Infect*. 1:285-292.

Redondo-López, V., Cook, R.L. y Sobel, J.D. (1990). Emerging role of lactobacilli in the control and maintenance of the vaginal bacterial microflora. *Rev. Infect. Dis.* **12**:856-872.

Reid, G., Cook, R.L. y Bruce, A.W. (1987). Examination of strains of lactobacilli for properties that may influence bacterial interference in the urinary tract. *J. Urol.* **138:**330-335.

Reid, G. (2000). In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM^{TM} as a possible probiotic for the urogential tract. *Int. Dairy. J.* **10:**415-419.

Reid, G. (2001). Probiotic agents to protect the urogenital tract against infection. *Am. J. Clin. Nutr*. **73** (suppl)**:**437S-443S.

Reid, G., Bruce, A.V, Fraser, N., Heinemann, G.H., Owen, J. y Henning, B. (2001). Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **30:**49-52.

Reid, G. (2002). Probiotics for urogenital health. *Nutr. Clin. Care* **5:**3-8.

Rogosa, M. y **Sharpe, M.E.** (1960). Species differentiation of human vaginal lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.* **23:**197-201.

Roos, S., Aleljung, P., Robert, N., Lee, B., Wadstrom, T., Lindberg, M. y Jonsson, H. (1996). A collagen binding protein from *Lactobacillus reuteri* is part of an ABC transporter system 2. *FEMS Microbiol. Lett*. **144:**33-38.

Royce, R.A., Thorp, J., Granados, J.L. y Savitz, D.A. (1999). Bacterial vaginosis associated with HIV infection in pregnant women from North Carolina. *J. AIDS Hum. Retrovirol*. **20:**382-386.

Sewankambo, N., Gray, R.H., Wawer, M.J., Paxton, L., McNaim, D., Wabwire-Mangen, F., Serwadda, D., Li, C., Kiwanuka, N., Hillier S.L., Rabe, L., Gaydos, C.A., Quinn, T.C. y Konde-Lule, J. (1997). HIV-infection asociated with anormal vaginal flora morphology and bacterial vaginosis. *Lancet* **350:**546-550.

Sieber, R. y Dietz, U-T. (1998). *Lactobacillus acidophilus* and yogurt in the prevention and therapy of bacterial vaginosis. *Int. Dairy J.* **8:**599-607.

Song, Y., Kato, N., Matsumiya, Y., Liu, C., Kato, H. y Watanabe, K. (1999). Identification of and hydrogen peroxide production by fecal and vaginal lactobacilli isolated from japanese women and newborn infants. *J. Clin. Microbiol.* **37:**3062-3064.

Taha, E.T., Gray, R.H., Kumwenda, N.I., Hoover, D.R., Mtimavalye, L.A., Liomba, G.N., Chiphangwi, J.D., Dallabetta, G.A. y Miotti, P.G. (1999). HIV infection and disturbances of vaginal flora during pregnancy. *J. AIDS Hum. Retrovirol.* **20:**52-59.

Thomas, S. (1928). Döderlein´s bacillus: *Lactobacilus acidophilus*. *J. Infect*. *Dis.* **43:**218-227.

Vallor, A.C., Antonio, M.A.D., Hawes, S.E. y Hillier S.L. (2001). Factors associated with acquisition of, or persistent colonization by, vaginal lactobacilli: role of hydrogen peroxide production. *J. Infect. Dis.* **184:**1431-1436.

Zheng, H-Y., Alcorn, T.M. y Cohen, M.S. (1994). Effects of H_2O_2-producing lactobacilli on *Neisseria gonorrhoeae* growth and catalase activity. *J. Infect. Dis.* **170:**1209-1215.

Tabla 1. Concentración (log ufc g^{-1}) de diversos grupos microbianos en heces

Grupo microbiano	Concentración media*	Desviación estándar
Microorganismos totales	10,26	± 0,55
Clostridios	10,06	± 0,38
Bifidobacterias	9,30	± 0,71
Bacteroides	8,96	± 0,53
Lactobacilos	6,86	± 1,04
Coliformes	7,19	± 1,05
Enterococos	5,87	± 0,89
Estafilococos	4,45	± 1,10
Mohos y levaduras	3,18	± 0,93

* Media aritmética de 66 muestras obtenidas a lo largo de un año a partir de 8 individuos.

Tabla 2. Actividades enzimáticas modales en las diversas muestras de cada voluntario mediante el sistema API ZYM

ENZIMA	Control	Fosfatasa alcalina	Esteraa (C4)	Esterasa-lipasa (C8)	Lipasa (C14)	Leu-arilamidasa	Val-arilamidasa	Cys-arilamidasa	Tripsina	α-quimiotripsina	Fosfatasa ácida	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	α-Galactosidasa	β-Galactosidasa	β-Glucuronidasa	α-Glucosidasa	β-Glucosidasa	N-acetyl-β-Glucosaminidasa.	α-Manosidasa	α-Fucosidasa
Individuo A	0	40	10	5	0	5[1]	5	0	0	0	30	10	25	40	20	30	20	40	0	5
Individuo C	0	40	5	5	0	2,5	0	0	0	0	15	10	20	25	40	35	20	30	0	5
Individuo E	0	40	10	5	0	20	0	0	0	0	5	5	10	40	10	30	20	20	0	5
Individuo F	0	40	15	10	0	40	20	0	0	0	20	15	25	20	20	20	20	30	0	5
Individuo G	0	40	20	15	0	5	0	0	0	0	20	10	15	20	30	15	40	30	0	0
Individuo H	0	40	10	15	0	20	0	0	0	0	15	10	15	15	20	10	25	25	0	2,5
Individuo L	0	40	10	2,5	0	15	0	0	0	0	10	10	20	30	10	25	20	30	0	2,5
Individuo M	0	40	10	7,5	0	V	0	0	0	0	15	15	20	30	V	30	15	30	0	V

[1] Se subrayan aquellas actividades que se apartan significativamente de la moda global.
[2] V, valor muy diferente en cada una de las muestras.

CAPÍTULO 7

ESTUDIO Y EVOLUCIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA: IDENTIFICACIÓN Y SELECCIÓN DE BACTERIAS PROBIÓTICAS

Baltasar Mayo y Susana Delgado

Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Carretera de Infiesto s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias

Introducción: la microbiota intestinal normal

El tracto gastrointestinal (TGI) humano se coloniza tras el nacimiento por una compleja, diversa y dinámica colección de especies bacterianas. Aunque se han descrito más de 400 especies, el 99% de los microorganismos pertenecen a unas 30 ó 40 y forman lo que se denomina la "flora microbiana intestinal normal" (Drasar y Barrow, 1985). La "flora microbiana normal" es un delicado equilibrio que varía en cada una de las porciones del TGI. Además, su composición cualitativa y/o cuantitativa puede variar entre grupos humanos, e incluso de forma individual, debido a diferencias específicas del hospedador y/o a sus hábitos alimenticios. Los componentes de esta microflora ejercen gran influencia sobre muchas características bioquímicas, fisiológicas e inmunológicas del hospedador. También tienen gran importancia médica, ya que pueden causar infecciones cuando incrementan su número o cuando se establecen fuera del TGI. Además, están relacionados con diversas disfunciones, como la intolerancia a la lactosa, el estreñimiento e, incluso, con las enfermedades cardiovasculares o el cáncer (Parodi, 1999). Los resultados más actuales parecen indicar que cada individuo presenta comunidades microbianas personales y relativamente estables en el tiempo (Tannock, 1999a).

A pesar de su relevancia, aún no se conocen con precisión los microorganismos que integran las poblaciones más abundantes, ni la importancia y el papel biológico que desempeñan las poblaciones minoritarias. Esto se debe a la complejidad del ecosistema intestinal, con una enorme variedad de tipos microbianos, así como a las limitaciones técnicas para detectar los microorganismos difícilmente o no cultivables y las dificultades para el estudio simultáneo de los diferentes grupos. En cualquier caso, resulta conveniente realizar el análisis microbiológico del TGI en el mayor número posible de comunidades humanas antes de extraer conclusiones generales, tal y como recomiendan autores de reconocido prestigio en la materia (Salminen y col., 1998a; Tannock, 1998; Tannock, 1999b).

Los microorganismos probióticos

En este contexto microbiológico, los probióticos se definieron como "suplementos alimenticios con bacterias vivas que contribuyen a mantener el equilibrio microbiano del TGI" (Fuller, 1989). De forma más reciente, se precisa que los probióticos son "microorganismos vivos que, tras su ingestión en cierto número, ejercen efectos beneficiosos en el hospedador más allá de los inherentes a la nutrición básica" (Guarner y Schaafsma, 1998). La utilización de diversos microorganismos intestinales como probióticos se remonta a principios del siglo XX (Nissle, 1925; Rettger y col., 1935). Las especies más utilizadas pertenecen al grupo de las bacterias del ácido láctico (bacterias lácticas o BAL) y a las bifidobacterias. Dichas bacterias parecen ser claves en el mantenimiento del equilibrio microbiano necesario para la salud, como ya propusiera Metchnikoff en sus famosos postulados (Metchnikoff, 1907). Son dominantes en el TGI en los primeros meses de vida y contribuyen, sin duda, a la maduración fisiológica e inmunológica de este órgano. Además, forman parte, desde tiempo inmemorial, de la dieta del hombre a través de diversos productos fermentados, entre los que se incluyen muchos productos lácteos. Por estas razones poseen una merecida reputación de microorganismos saludables o GRAS. Sin embargo, en la actualidad, se aboga por evaluar individualmente en cada cepa las características relacionadas con la seguridad.

Junto al término probiótico, ha aparecido muy recientemente el término prebiótico para referirse a "los ingredientes alimenticios no asimilables que promueven la proliferación selectiva de las bacterias intestinales beneficiosas" (Gibson y Roberfroid, 1995). Así como toda una serie de nuevos términos, en ocasiones redundantes (bioterapéuticos, nutracéuticos, alimentos colónicos, alimentos médicos, etc.). Todos ellos, con los probióticos y prebióticos a la cabeza, conforman los "alimentos funcionales", cuya definición más aceptada es la de "alimentos modificados o ingredientes alimentarios que, además de satisfacer los requerimientos nutritivos tradicionales, proporcionan un beneficio para la salud" (Sanders, 1998).

Funciones de la microbiota intestinal y los probióticos

Las funciones de la microbiota intestinal, y por ende de los probióticos, pueden agruparse en tres categorías: metabólicas, tróficas y protectoras (Guarner y Malagelada, 2003).

La fermentación en el intestino de los carbohidratos no digeridos (almidones no digeribles, celulosas, hemicelulosas, pectinas, gomas y moco endógeno) constituye, sin duda, una fuente de energía importante para los microorganismos y para el hospedador. Este proceso tiene lugar mayoritariamente en el colon proximal y las bacterias lácticas se encuentran entre las poblaciones fermentadoras más eficaces. Los productos metabólicos más importantes que se generan en este proceso son los ácidos grasos de cadena corta (SCFAs, *short-chain fatty acids*) (acetato, butirato y propionato), con gran importancia fisiológica en el TGI (Cummings, 1997). La degradación de las proteínas (putrefacción) también genera SCFAs pero, al mismo tiempo, produce una serie de compuestos potencialmente tóxicos (aminas, amonio, fenoles, tioles, etc.). Este último proceso tiene lugar principalmente en el colon distal y son los grupos de bacteroides y clostridios los microorganismos más activos. Las bacterias intestinales tienen también un papel destacado en la síntesis de vitaminas, en la absorción de algunos minerales (calcio, fósforo, magnesio y hierro) y en la eliminación de compuestos tóxicos, mutagénicos y/o carcinogénicos.

La mucosa del TGI es la mayor interfase de nuestro cuerpo con el medio externo. No es de extrañar, por tanto, que este tejido contenga gran parte de las células inmunocompetentes del cuerpo humano (Cebra y col., 1998). Las interacciones que se establecen en la mucosa entre el hospedador y los microorganismos son indispensables para la maduración del sistema inmune, afectando además a la producción y diferenciación de las propias células epiteliales. Las bacterias lácticas, y en particular los lactobacilos, son uno de los grupos con mayor efecto trófico y estimulador de este sistema, tanto mediante efectos específicos como inespecíficos (Gill, 1998).

Las bacterias residentes son también un mecanismo crucial para impedir la colonización por microorganismos exógenos, incluyendo a los patógenos. Este impedimento, denominado efecto barrera, evita también la proliferación excesiva de los patógenos oportunistas que forman parte de la microbiota normal del TGI. El efecto barrera se debe a varios mecanismos, como la competición por los lugares de unión a las superficies epiteliales, la competencia por nutrientes disponibles y/o la producción de inhibidores microbianos (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas, etc.) (Salminen y col., 1998a).

Características de los microorganismos probióticos

Dado que no se conocen con precisión los constituyentes de la flora microbiana intestinal ni los efectos particulares con los que cada tipo contribuye a la homeostasis del

hospedador, es difícil precisar cuáles son las características deseables de un buen microorganismo probiótico. Es más, dichas características podrían variar dependiendo del estado del hospedador. No obstante, se han formulado numerosos criterios de selección, destacando entre ellos la ausencia de patogenicidad o de efectos adversos, la supervivencia durante el tránsito gastrointestinal, la colonización de las mucosas, la producción de sustancias antimicrobianas, la aptitud tecnológica y, además, producir un efecto beneficioso clínicamente demostrado (Collins y col., 1998; Svenson, 1999; Vaughan y col., 1999). Actualmente, existen diversas cepas que se han ensayado con éxito como agentes preventivos o terapeúticos (Salminen y col., 1998a; Dunne y col., 2001; Kaur y col., 2002; Cross, 2002; Ouwehand y col., 2002).

Objetivos

En nuestro país, los estudios sobre la flora intestinal humana son escasos. Nuestra alimentación, incluyendo la saludable dieta mediterránea (Trichopoulou y Lagiou, 1997), y una posible idiosincrasia genética, hacen conveniente un estudio en profundidad. Sólo de esta forma seremos de capaces de aprovechar, en toda su potencialidad, los beneficios de los probióticos, los prebióticos y demás alimentos funcionales.

En este contexto, los objetivos de nuestro trabajo han sido los siguientes:

1. *Conocer la microflora fecal y la asociada a mucosas en individuos sanos con hábitos alimenticios normales de nuestro entorno*. Para ello se han empleado técnicas clásicas de cultivo, que se complementarán en el futuro con técnicas moleculares. Al mismo tiempo, se han determinado algunos parámetros bioquímicos relacionados con las actividades microbianas.
2. *Aislar e identificar las especies microbianas mayoritarias de la flora total y de las poblaciones "beneficiosas" para seleccionar cepas con potencial probiótico*. Después de una clasificación precisa, examinaremos en las cepas seleccionadas diversas características relacionadas con su probiosis (ausencia de patogenicidad, capacidad de colonización, etc.) y con su aptitud tecnológica (compatibilidad con cultivos iniciadores, viabilidad durante la elaboración y conservación de los productos, etc.).

Toma y procesado de las muestras

Entre trabajadores del Hospital de Cabueñes (Gijón), se eligieron a 8 individuos (5 mujeres y 3 hombres) adultos (entre los 32 y los 56 años) con un buen estado de salud. La selección de los donantes y la toma de muestras se llevó a cabo siguiendo las recomendaciones del Comité Ético Regional del Principado de Asturias. Las heces se recogieron en contenedores estériles, se introdujeron en una jarra de anaerobiosis con un sobre de Anaerocult A (Merck) y se remitieron al laboratorio mediante transporte urgente. Las muestras se procesaron en las 2 horas siguientes a la deposición en una cabina de anaerobiosis (Mac 500, Don Whitley Scientific) con atmósfera reductora (10% H_2, 10% CO_2, 80% N_2). Las diluciones se realizaron también en una solución reductora con la siguiente composición: caldo BHI (Merck) con 0,5% de extracto de levadura, 0,25% de cisteína, vitamina K_1 y hemina.

Análisis microbiológicos

Las siembras se realizaron en superficie y se extendieron con asa Digralsky. Los recuentos de los diversos grupos microbianos se efectuaron en los siguientes medios de cultivo: (1) *Microorganismos totales:* Agar BHI con extracto de levadura (0,5%), cisteína (0,25%), vitamina K_1 (10 mg/l) y hemina (0,2 g/l). (2) *Clostridios:* Agar RCM con polimixina B (20 µg/ml). (3) *Bifidobacterias y lactobacilos:* Agar MRS con cisteína (0,25%). (4) *Bacteroides:* Agar EB con cisteína (0,25%), kanamicina (100 µg/ml) y vancomicina (7,5 µg/ml). (5) *Enterobacterias y coliformes:* VRBGA y VRBA, respectivamente. (6) *Enterococos:* Agar Slanetz y Bartley (Merck). (7) *Estafilococos:* Agar Baird-Parker con telurito y yema de huevo. (8) *Mohos y levaduras:* Agar YGC.

Todas las incubaciones se realizaron a 37ºC, excepto las de los mohos y levaduras que se realizaron a 25ºC. Las placas de enterobacterias, coliformes, enterococos, estafilococos y mohos y levaduras se incubaron en aerobiosis.

Análisis bioquímicos

Medida de actividades enzimáticas. La medida de diversas actividades enzimáticas en heces se llevó a cabo mediante el método semicuantitativo de las tiras reactivas API ZYM (bioMérieux). Cada pocillo se rellenó con 65 µl de una dilución 1/500 de la muestra en H_2O

destilada estéril. El revelado se efectuó con los reactivos de la casa suministradora y siguendo sus recomendaciones.

Medida de amonio. La concentración de amonio en heces se midió por medio de una sonda selectiva para iones amonio (Crison Instruments). La muestra de heces se diluyó 1/100 en agua estéril y se centrifugó durante 10 min a 4500 rpm. La concentración del ión amonio se realizó por inmersión directa de la sonda en el sobrenadante.

Determinación de ácidos grasos de cadena corta. Los ácidos grasos de cadena corta se extrajeron de 0,5 g de una muestra acidificada con 0,5 ml de una solución 50% (p/v) H_2SO_4, a la que se añadieron 5 μmol de ácido caproico como estándar. La extracción se llevó a cabo con 1 ml de dietil éter. La detección y cuantificación se realizó por medio de cromatografía de gases en un cromatógrafo 8600 (Perkin Elmer), siguiendo el procedimiento de Tangerman y Nagengast (1996).

Clasificación y caracterización de los aislados

Perfil de fermentación de carbohidratos. La determinación del perfil de fermentación de azúcares se llevó a cabo por medio de las microplacas comerciales PhenePlate™-LB (PhP-MT-AB). La fermentación se comprobó tras 48 h en anaerobiosis a 37°C.

Amplificación parcial y secuenciación del gen rRNA 16S. Utilizando oligonucleótidos universales como cebadores (Y1 e Y2, Young y col., 1991) se amplificó de forma parcial el gen que codifica el rRNA 16S. Los amplicones se purificaron a través de columnas limpiadoras (Micron PCR, Millipore) y se secuenciaron. Las secuencias se compararon con las de los bancos de datos públicos con el programa BLAST (Altschul y col., 1997).

Resistencia a ácidos biliares en placa. La resistencia de las cepas a las sales biliares se evaluó en placas con concentraciones crecientes de bilis bovina (entre un 0,06 y un 2%). La inoculación de las placas se realizó con cultivos activos de 24 ó 48 h por medio de un replicador de Steers. La lectura de los resultados se efectuó al cabo de 48 h de incubación en anaerobiosis a 37ºC.

Resistencia a la acidez. La resistencia a la acidez se determinó en placas microtituladoras con caldo MRS acidificado a pH 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0 y 4,5 con HCl. La inoculación e incubación de las placas se realizó como en el caso anterior.

Resistencia a antibióticos relevantes en bacterias anaeróbicas. Para esta determinación se utilizó el sistema Sensititre Anaero3 siguiendo las recomendaciones de la firma suministradora (Trek Diagnostic Systems).

Producción de sustancias antimicrobianas. La producción de sustancias antimicrobianas se determinó mediante un ensayo en placa, tal y como describen Schillinger y Lüke (1989), utilizando como microorganismos indicadores distintas bacterias de origen alimentario o intestinal (*Bifidobacterium longum, B. bifidum, Lactobacillus acidofilus, Lb. delbrueckii* y *Lb. sakei*).

Resultados y discusión

Microbiología de heces y mucosa

Se ha efectuado el seguimiento de la microbiota intestinal de 8 individuos sanos a lo largo de un año. De cada sujeto se tomaron muestras mensuales de heces y, en la mayoría de los casos, se analizó una muestra de mucosa tras colonoscopia. Las poblaciones microbianas controladas fueron las de microorganismos totales, clostridios, bifidobacterias, bacteroides, lactobacilos, enterobacterias, coliformes, enterococos, estafilococos y mohos y levaduras. Los resultados medios de la flora fecal de todas las muestras analizadas se relacionan en la Tabla 1 junto con sus respectivas desviaciones estándar. Aunque con diferencias notables entre individuos y muestras, algunas poblaciones se sitúan con frecuencia por encima de los 10^{10} ufc g^{-1} de heces. Aún así, el recuento directo al microscopio óptico nos ofrecía de forma consistente una unidad logarítmica por encima de los recuentos en placa, lo que no es sorprendente si se tiene en cuenta que la estimación de culturabilidad varía según diversos autores entre el 10 y el 50% (Langendijk y col., 1995; McCartney y col., 1996; Wilson y Blitchington, 1996; Suau y col., 1999; Zoetendal y col., 1998). En la Fig. 1 se muestra la evolución de las distintas poblaciones descritas en las 9 muestras analizadas del sujeto H. Dentro de cada individuo, las poblaciones se mantuvieron relativamente estables a lo largo del tiempo. La población de bacteroides (cercana a 10^9 ufc g^{-1}) fue notablemente inferior a la que relacionan otros autores (Mitsuoka, 1992; Conway, 1995), lo que quizá sea debido a la excesiva selectividad del medio utilizado (EBA con kanamicina y vancomicina). De hecho, microorganismos morfológicamente similares a los bacteroides aparecían con frecuencia en diluciones superiores de BHI. Los recuentos de los lactobacilos resultaron siempre complicados por el crecimiento de las bifidobacterias en MRS, incluso aunque se acidificara a pH 5,4. En este mismo medio aparecían también varios tipos de cocos Gram-positivos pertenecientes al grupo de los ruminococos, en niveles similares al de las bifidobacterias.

Las poblaciones de los microorganismos anaerobios facultativos (enterobacterias, enterococos y estafilococos) aparecían en números menores a los de las poblaciones de anaerobios estrictos, tal y como han descrito otros autores (Drasar y Barrow, 1985; Mitsuoka, 1992; Conway, 1995; Tannock, 1999a). A pesar de su inferioridad numérica en las heces, estos grupos pueden ser dominantes en otras partes del TGI. Los mohos y las levaduras se encontraban con frecuencia en el límite de detección (10^2 ufc g^{-1}).

En las muestras de los distintos individuos aparece una gran variabilidad en número y biotipos microbianos. Resultados similares se han descrito en numerosos trabajos anteriores (Tannock, 1999a; Vaughan y col., 2000), por lo que eran esperables. También hemos detectado mucha variabilidad entre las diferentes muestras de un solo individuo. A pesar de esta variabilidad, las muestras personales guardaban una gran coherencia entre sí. Por ejemplo, en algunos individuos no se detectaron lactobacilos, mientras que en otros aparecían siempre y en alta concentración; en algunos sujetos la población de enterobacterias y coliformes era elevada (en torno a 10^8 ufc g^{-1} de heces), mientras que en otros era siempre muy baja; finalmente, en algún sujeto aparecían con regularidad coliformes resistentes a cloranfenicol.

Los resultados obtenidos de la microbiología de las muestras de mucosa del individuo F se muestran en la Fig. 2. El número absoluto de microorganimos fue siempre superior en el contenido intestinal que en las muestras de mucosas, aunque las poblaciones dominantes parecían ser las mismas en ambos tipos de muestras. La población de lactobacilos parecía ligeramente superior a la que aparece en las muestras de heces, sobrepasando en algunos casos la población de las bifidobacterias. Los enterococos y estafilococos únicamente parecen estar asociados a la mucosa en zona distal del colon, mientras que los mohos y levaduras no están asociados en absoluto y se pierden tras los sucesivos lavados.

Bioquímica de las heces

Aunque la bioquímica de las heces no era un objetivo prioritario en nuestro trabajo, se nos presentaba una buena ocasión para llevar a cabo unos análisis básicos de algunos parámetros relacionados con la actividad microbiana. Como en el caso de los análisis microbiológicos, los resultados obtenidos ilustran la complejidad del sistema gastrointestinal.

La Tabla 2 presenta los valores modales de las actividades enzimáticas obtenidas en las muestras de todos los donantes con el sistema API ZYM. A grandes rasgos, parece existir también un perfil individual, aunque son frecuentes grandes variaciones intermuestrales en un

mismo individuo. Estas variaciones pudieran deberse a las oscilaciones de las poblaciones microbianas, la variación enzimática debida a la dieta o a la interrelación de estos factores con el hospedador.

La concentración media de amonio se situó en los 1,35 mol l^{-1}, aunque los valores oscilaron ampliamente entre las muestras, incluso entre las de un mismo individuo. El ión amonio se considera un metabolito perjudicial, capaz de promover la aparición y el crecimiento de tumores (Salminen y col., 1998b; Parodi, 1999).

Los perfiles medios de SCFAs fueron similares entre los distintos individuos (Fig. 3). En general, se detectaron los mismos ácidos grasos y en concentraciones comparables. El ácido acético estaba presente en una concentración aproximada de 0,2 mg g^{-1} de muestra, aproximadamente el doble de los valores obtenidos para los ácidos butírico y propiónico. Estos tres ácidos parecen tener un papel fisiológico importante en el TGI, pudiendo servir como fuente de energía y participando en la prevención de enfermedades (Scheppach y col., 1995; Salminen y col., 1998a y 1998b). También se detectaron trazas de ácido valérico e isovalérico en todas las muestras. Las proporciones relativas de los distintos ácidos grasos están de acuerdo con las que se relacionan en la literatura aunque no los valores absolutos, lo que refleja quizá las diferencias existentes entre los distintos métodos de purificación y cuantificación (Scheppach y col., 1995; Cummings y Macfarlane, 1997).

Clasificación de los microorganismos totales

A partir de dos muestras puntuales de heces y una de mucosa, se identificaron 33 colonias procedentes de las placas de BHI, mediante amplificación parcial y secuenciación del gen que codifica el rRNA 16S. En las muestras de heces se recuperó un número importante de bacterias anaerobias estrictas como microorganismos mayoritarios (13 de 21, todas ellas se englobaron en el Cluster XIVa de *Clostridium*). De éstas, un 50% presentaba una similitud menor del 97% con las secuencias de cepas tipo o de representantes cultivados, por lo que podrían pertenecer a nuevas especies. El resto se correspondía con γ-proteobacterias (cepas de *Escherichia* spp. y *Shigella* spp., fundamentalmente) y bacterias del grupo *Bacillus-Lactobacillus-Streptococcus.* Entre los 11 aislados de mucosa, sin embargo, no aparecieron representantes de los grupos más sensibles al oxígeno debido, quizá, a que la preparación de la muestra exige una mayor manipulación durante la que pudieron haber muerto. Los aislados identificados se correspondieron exclusivamente con bacterias anaerobias facultativas (enterobacterias y estreptococos).

Clasificación de las bacterias lácticas y bifidobacterias

Por medio de los perfiles de fermentación de carbohidratos, los aislados se agruparon en unidades fenotípicas que después se clasificaron tras amplificación parcial y secuenciación del gen que codifica el rRNA 16S. En algunos casos, como ocurría con las bifidobacterias, el propio perfil de fermentación ya nos permitía distinguir las distintas especies, ya que presentaban perfiles claramente diferenciados. Sin embargo, no ocurría lo mismo con los perfiles de fermentación de los lactobacilos, que sólo ocasionalmente se asociaron de forma clara con una especie concreta.

En total, se han identificado 241 cepas de bacterias lácticas aisladas de muestras de heces y mucosa, de ellas 180 eran bifidobacterias (136 de heces y 44 de mucosa) y 61 lactobacilos (46 de heces y 15 de mucosa). La Fig. 4 muestra las distintas especies identificadas y su distribución. En concreto, se identificaron 7 especies de bifidobacterias y 14 de lactobacilos. El 50% de los aislados pertenecía a cepas de *Bifidobacterium longum* y aproximadamente el 25% a *B. pseudocatenulatum. B. longum,* junto con las especies *B. bifidum* y *B. adolescentis* se citan frecuentemente como las especies más prevalentes en el hombre (Biavati y col., 1986; Mitsouoka, 1992; Reuter, 2001; Vaughan y col., 2002). En este trabajo, sin embargo, llama la atención el elevado número de cepas de *B. pseudocatenulatum* encontradas, tanto en heces como en mucosa. Entre los lactobacilos, la especie *Lb. gasseri* fue la aislada con mayor frecuencia, lo que no es de extrañar ya que está íntimamente ligada a las mucosas humanas (Mitsuoka, 1992; McCartney y col., 1996; Heilig y col., 2002; Zoetendal y col., 2002). Entre los lactobacilos identificados no aparecieron cepas de *Lb. reuteri;* especie que, a juzgar por la literatura, suele habitar en este ecosistema.

Caracterización de posibles cepas probióticas

Resistencia a la acidez y a las sales biliares. Pequeñas concentraciones de sales biliares afectan de manera significativa al crecimiento de todos los aislados, incluso al de aquellos capaces de resistir concentraciones elevadas. La resistencia media de nuestros aislados se situó alrededor del 0,25%, aunque un porcentaje importante (32%) resistió concentraciones de hasta el 2%. El ensayo se realizó con sales biliares bovinas (Ox Gall). Algunos autores han encontrado diferencias significativas en la resistencia a la bilis dependiendo de su procedencia (Dunne y col., 1999), de forma que habrá que repetir el análisis con sales biliares humanas.

En algunos casos la resistencia parece ir ligada a la especie. Así, las especies de *Lb. gasseri*, *Lb. delbrueckii* y *Lb. rhamnosus* son mucho más susceptibles que las cepas de *Lb. casei*, *Lb. brevis*, *Lb. parabuchneri* o *Lb. acidophilus*. Entre las bifidobacterias también parece existir una resistencia variable, aunque en este caso la variabilidad parece depender de la cepa, como ocurre con las cepas de *B. longum* y *B. pseudocatenulatum*.

Resistencia a la acidez. Se estudió la resistencia a pH ácido de 100 aislados seleccionados entre los más resistentes a las sales biliares bovinas. El 75% de las cepas creció a pH 4,5, un 20% aún lo hacían a pH 3,5, pero prácticamente ninguna a pH 3,0. En cualquier caso, la mayoría de los aislados mostró una notable resistencia a las condiciones ácidas.

Resistencia a antibióticos. Todas las cepas fueron sensibles al cloranfenicol y susceptibles a la mayoría de los β-lactámicos ensayados (piperacilina, piperacilina más tazobactam, amoxicilina, amoxicilina más clavulánico, penicilina e imipenem) con la única excepción de la cefoxitina, frente a la que aparecieron varios lactobacilos resistentes como ya habían descrito otros autores (Danielsen y Wind, 2003). Por el contrario, todas las bifidobacterias fueron sensibles a este antibiótico. Asimismo, los lactobacilos fueron resistentes al metronidazol, tal y como se ha descrito en cepas de otras procedencias (Charteris y col., 1998), lo que sugiere que este antibiótico no es efectivo en las cepas de este género. Las bifidobacterias presentaron de nuevo un comportamiento diferente, mostrando resistencias variables a este antibiótico. Las cepas de *Lb. casei*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. parabuchneri* y *Lb. plantarum* ensayadas presentaron alta resistencia a vancomicina. Estos resultados coinciden con los de Hamilton-Miller y Shah (1996), quienes apuntan que la resistencia a la vancomicina es intrínseca y característica de estas especies.

En general, las bacterias intestinales no parecen presentar demasiadas resistencias a antibióticos y no se encontraron cepas multirresistentes. Algunas, sin embargo, mostraron resistencias atípicas a antibióticos importantes desde el punto de vista clínico, como la eritromicina, la clindamincina o la tetraciclina. Cabe la posibilidad de que tales resistencias puedan ser transferibles, lo que justifica la necesidad de analizar el perfil de resistencia en aquellas cepas que pretendan utilizarse en sistemas alimentarios (Teuber y col., 1999).

Producción de sustancias antibacterianas. La capacidad de producción de antimicrobianos en general, y de bacteriocinas en particular, no está muy extendida entre las bacterias lácticas intestinales (Kailasapathy y Chin, 2000). En nuestro caso, utilizando cinco microorganismos indicadores, tan sólo detectamos la producción clara de sustancias inhibidoras en 3 aislados, dos cepas de *B. catenulatum* y una de *B. pseudocatenulatum*. Esta capacidad se cita frecuentemente como un factor de colonización y dominancia (Riley y Wertz, 2002).

Conclusiones

Se ha seguido la evolución microbiológica y bioquímica en las heces de 8 voluntarios sanos a lo largo de un año. Los perfiles microbiológicos y bioquímicos parecen ser personales y estables a lo largo del tiempo. A grandes rasgos, los resultados que hemos obtenido no difieren de otros publicados con anterioridad, aunque pudiera haber diferencias en los tipos microbianos o en sus frecuencias relativas, respecto de los que aparecen en otras comunidades humanas. Como resultado del trabajo, se han seleccionado finalmente 20 cepas de lactobacilos y bifidobacterias para profundizar en el estudio y caracterización de las propiedades probióticas que pudieran presentar.

Agradecimientos

Este trabajo se ha realizado gracias a un Proyecto de Investigación financiado por MCYT (referencia AGL2000-1474). Susana Delgado disfruta de una Beca de Investigación del Programa FPI. Agradecemos sinceramente a M. J. González y A. Hernández (IPLA-CSIC) su valiosa asistencia técnica.

Referencias

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein databases search programs. *Nucleic Acids Res.* **25:**3389-3402

Biavati, B., Castagnoli, P., Crociani, F. y Trovatelli, L. D. (1986). Species of the genus *Bifidobacterium* in the feces of human adults. *Microbiologica* **9:**39-45.

Cebra, J.J., Periwal, S.B., Lee, G., Lee, F. y Shroff, K.F. (1998). Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev. Immunol.* **6:**13-18.

Charteris, W.P., Kelli, P.M., Morelli, L. y Collins, J.K. (1998). Development and application of an in vitro methodology to determine the transient tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J. Appl. Microbiol.* **84:**759-768

Collins, J.K., Thornton, G. y O´Sullivan, G.C. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.* **8:**487-490.

Conway, P.L. (1995). Microbial ecology of the human large intestine. En *Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, Physiology and Pathology.* G. R. Gibson y G. T. Macfarlane (Eds.). p. 1-24. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Cross, M.L. (2002). Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **34:**245-253.

Cummings, J.H. (1997). *The Large Intestine in Health and Disease*. Danone Chair Monograph, Institute Danone, Bruselas.

Cummings, J.H. y Macfarlane, G.T. (1997). Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *Clinical Nutrition* **16:**3-11.

Danielsen, M. y Wind, A. (2003). Susceptibility of *Lactobacillus* spp. to antimicrobial agents. *Int. J. Food Microbiol.* **82:**1-11.

Drasar, B.S. y Barrow, P.A. (1985). *Intestinal Microbiology*. American Society for Microbiology, Wahington, DC.

Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, Morrissey, D., L., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M.M., O'Sullivan, G. C., Shanahan, F. y Collins, J.K. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek* **76:**279-292.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M., Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. y Collins, J.K. (2001). *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.* **73:**386S-392S.

Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* **66:**365-378.

Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota-introducing the concept of prebiotic. *J. Nutr.* **125:**1401-1412.

Gill, H.S. (1998). Stimulation of the immune system. *Int. Dairy J.* **8:**535-544.

Guarner, F. y Schaafsma, G.J. (1998). Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **39:**237-238.

Guarner, F. y Malagelada, J.R. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet* **360:**512-519.

Hamilton-Miller, J.M. y Shah, S. (1996). Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. *Lett. Appl. Microbiol.* **26:**153-154.

Heilig, G.H.J., Zoetendal, E.G., Vaughan, E.E., Marteau, P., Akkermans, A.D.L., y de Vos, W.M. (2002). Molecular diversity of *Lactobacillus* spp. and other lactic acid

bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:**114-123.

Kailasapathy, K. y Chin, J. (2000). Survival and terapeutic potential of probiotic organisms with a reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol. Cell Biol.* **78:**80-88.

Kaur, I.P., Chopra, K. y Saini, A. (2002). Probiotics: potential of pharmaceutical applications. *Eur. J. Pharmacol. Sci.* **15:**1-9.

Langendijk, P.S., Schut, F., Jansen, G.J., Raangs, G.C., Kamphuis, G.R., Wilkinson, M.H.F. y Welling, G.W. (1995). Quantitative fluorescence *in situ* hybridization of *Bifidobacterium* spp. with genus-specific 16S rRNA-targeted probes and its application in fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **61:**3069-3075.

McCartney, A.L., Wang, W. y Tannock, G.W. (1996). Molecular analysis of the composition of the bifido bacterial and lactobacilli microflora of humans. *Appl. Environ. Microbiol.* **62:**4608-4613.

Metchnikoff, E. (1907). *Prolongation of Life.* Heinemann, Londres.

Mitsuoka, T. (1992). The human gastrointestinal tract. En *The Lactic Acid Bacteria.* Vol. 1. *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease.* B. J. B. Wood (Ed.). p. 69-114. Elsevier Applied Science, Londres.

Nissle, A. (1925). Weiteres über Grundlagen und Praxis der Mutaflorbehandlung. *DMW* **4:**1809-1813.

Ouwehand, A.C., Salminen, S. y Isolauri, E. (2002). Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek* **82:**279-289.

Parodi, P.W. (1999). The role of intestinal bacteria in the causation and prevention of cancer: modulation by diet and probiotics. *Aust. J. Dairy Tecnol.* **54:**103-121.

Rettger, L.F., Levy, M.N., Weinstein, L. y Weiss, J.E. (1935). *Lactobacillus acidophilus and its Therapeutic Application.* Yale University Press, New Haven, USA.

Reuter, G. (2001). The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr. Issues Intestinal. Microbiol*. **2:**43-53

Riley, M.A. y Wertz, J.E. (2002). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie* **84:**357-364.

Salminen, S., Bouley, C., Boutron-Ruault, M.-C., Cummings, J.H., Franck, A., Gibson, G.R., Isolauri, E., Moreau, M.-C., Roberfroid, M. y Rowland, I. (1998a). Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Brit. J. Nutr.* **80:**S147-S171.

Salminen, S., Ouwehand, A. C. y Isolauri, E. (1998b). Clinical applications of probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **8:**563-572.

Sanders, M.E. (1998). Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **8:**341-347.

Scheppach, W.H.P., Bartram, H.P. y Richter, F. (1995). Role of short chain fatty acids in the prevention of colon cancer. *Eur. J. Cancer* **31A:**1077-1080.

Schillinger, U., y Lüke, F.-K. (1989). Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.* **55:**901-906.

Suau, A., Bonnet, R., Sutren, M., Godon, J.-J., Gibson, J.R., Collins, M.D. y Doré, J. (1999). Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **65:**4799-4807.

Svenson, U. (1999). Industrial perspectives. En *Probiotics. A critical review.* G. W. Tannock (Ed.). p. 57-64. Horizon Scientific Press, Norfolk, Inglaterra.

Tangerman, A. y Nagengast, F.M. (1996). A gas chromatographic analysis of fecal short-chain fatty acids, using the direct injection method. *Anal. Biochem.* **236:**1-8.

Tannock, G.W. (1998). Studies on the intestinal microflora: a prerequisite for the development of probiotics. *Int. Dairy J.* **8:**527-533.

Tannock, G.W. (1999a). Analysis of the intestinal microflora: a renaissance. *Antonie van Leeuwenhoek* **76:**265-278.

Tannock, G.W. (1999b). A fresh look at the intestinal microflora. En *Probiotics. A critical review.* G. W. Tannock (Ed.). p. 5-14. Horizon Scientific Press, Norfolk, Inglaterra.

Teuber, M., Meile, L. y Schwarz, F. (1999). Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie van Leeuwenhoek* **76:**115-137.

Trichopoulou, A. y Lagiou, P. (1997). Healthy traditional Mediterranean diet: an expression of culture, history, and lifestyle. *Nutr. Rev.* **11:**383-389.

Vaughan, E.E., Mollet, B. y de Vos, W.M. (1999). Functionality of probiotics and intestinal lactobacilli: light in the intestinal tract tunnel. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10:**505-510.

Vaughan, E.E., Schut, F., Heilig, H.G.H.J., Zoetendal, E.G., de Vos, W.M. y Akkermans, A.D.L. (2000). A molecular view of the intestinal ecosystem. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **1:**1-12.

Vaughan, E.E., de Vries, M.C., Zoetendal, E.G., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L. y de Vos, W.M. (2002). The intestinal LABs. *Antonie van Leeuwenhoek* **82:**341-352

Wilson, K.H. y Blitchington, R.B. (1996). Human colonic biota studied by ribosomal DNA sequence analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62:**2273-2278.

Young, J.P.W., Downer, H.L. y Eardly, B.D. (1991). Phylogeny of the phototrophic *Rhizobium* strain BTAil by polymerase chain reaction-based sequencing of a 16S rRNA gene segment. *J. Bacteriol.* **173:**2271-2277.

Zoetendal, E.G., Akkermans, A.D.L. y de Vos, W.M. (1998). Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **64:**3854-3863.

Zoetendal, E.G., von Wright, A., Vilpponen-Salmela, T., Ben-Amor, K., Akkermans, A.D.L. y de Vos, W.M. (2002). Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:**3401-3407.

Tabla 1. Naturaleza de los factores implicados en la autoagregación y en la adherencia a las células del epitelio vaginal

Cepas	Autoagregación	Adhesinas
Lb. acidophilus	Lipoproteínas	Glucoproteínas
Lb. gasseri	Proteínas	Glucoproteínas
Lb. jensenii	Lipoproteínas	Carbohidratos

Tabla 2. Interacción entre *Lb. acidophilus* y algunos patógenos del tracto genitourinario

Cepas	Inhibición	Competición	Desplazamiento	Coagregación
E. coli	+	-	-	+
G. vaginalis	-	+	+	+
C. albicans	-	+	-	+

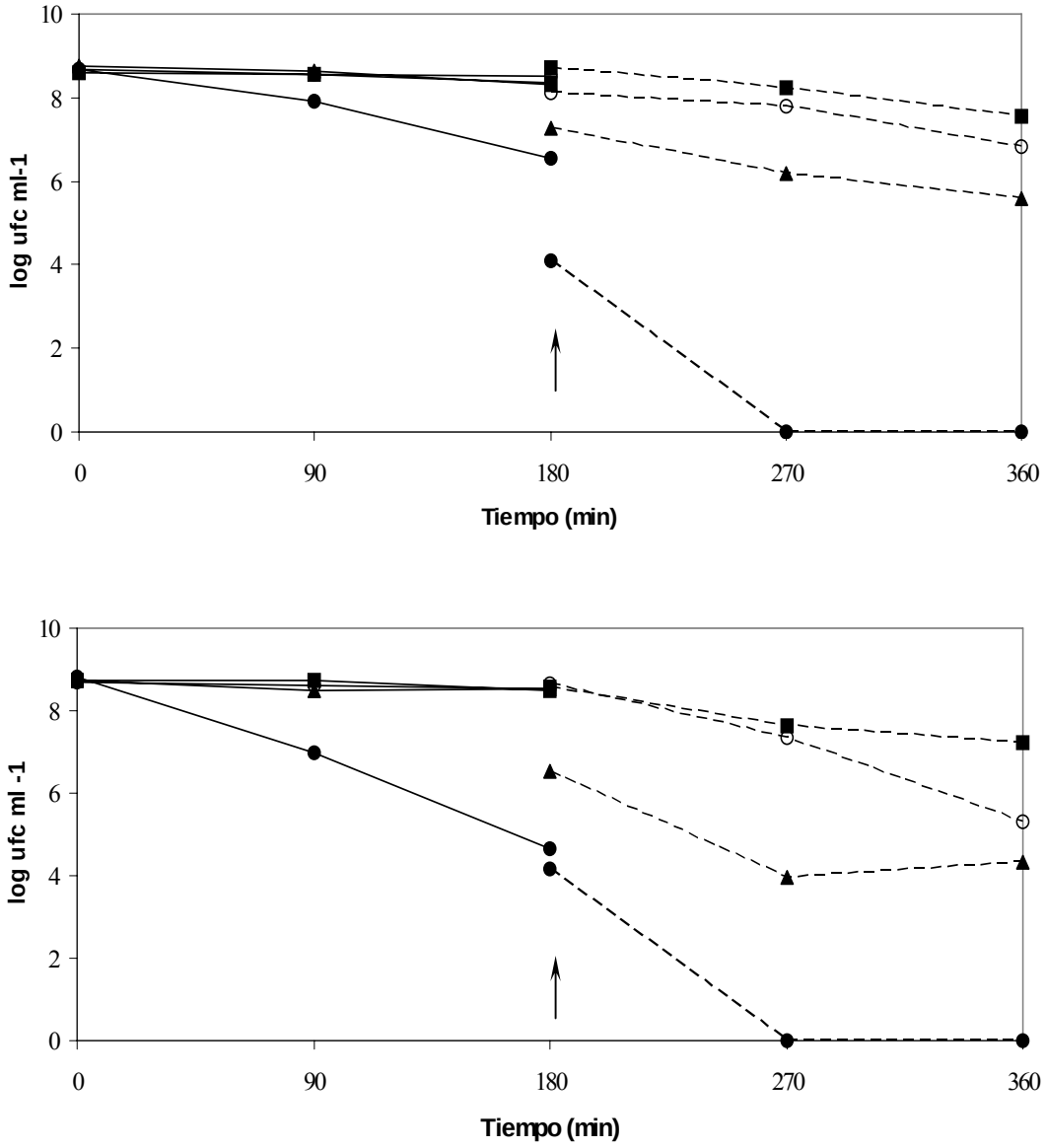


Figura 1. Supervivencia de *Lb. acidophilus* UO 001 (a) y *Lb. gasseri* UO 002 (b) en presencia de jugo gástrico (línea continua) y jugo intestinal (línea discontinua) a pH 2 (●), pH 3 (▲), y pH 7 (■) y en jugo gástrico más leche en polvo (○).

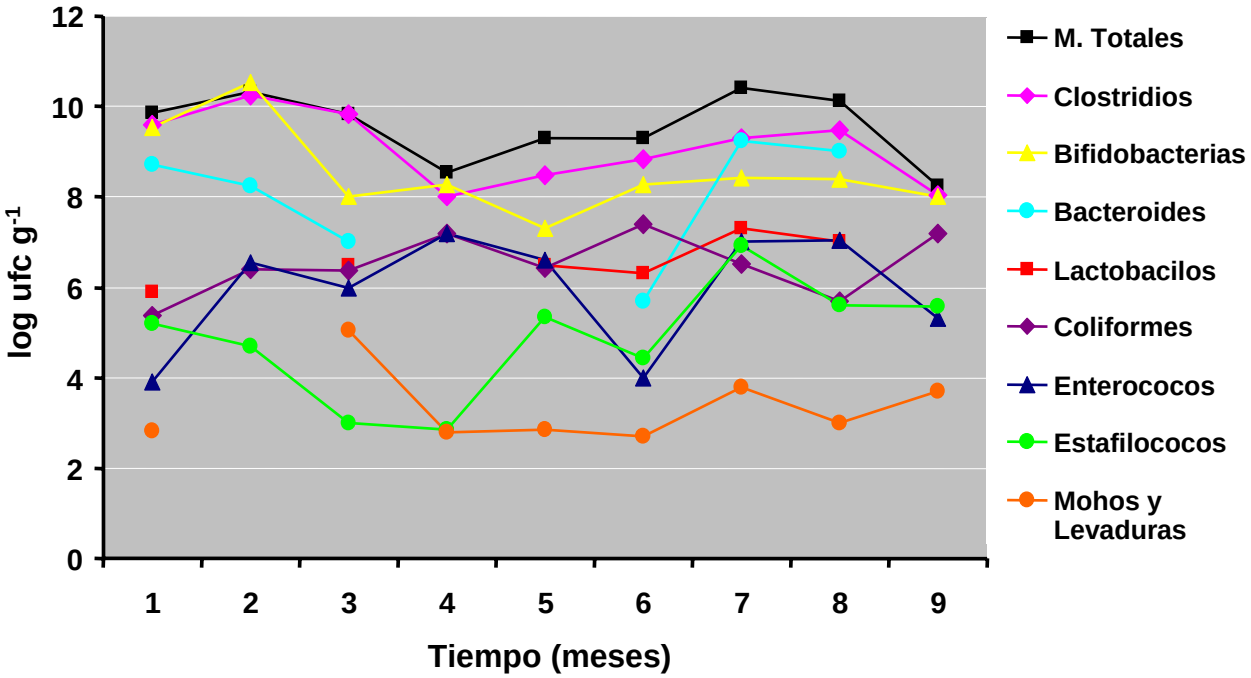


Figura 1. Evolución de diversos grupos microbianos en las heces del individuo H.

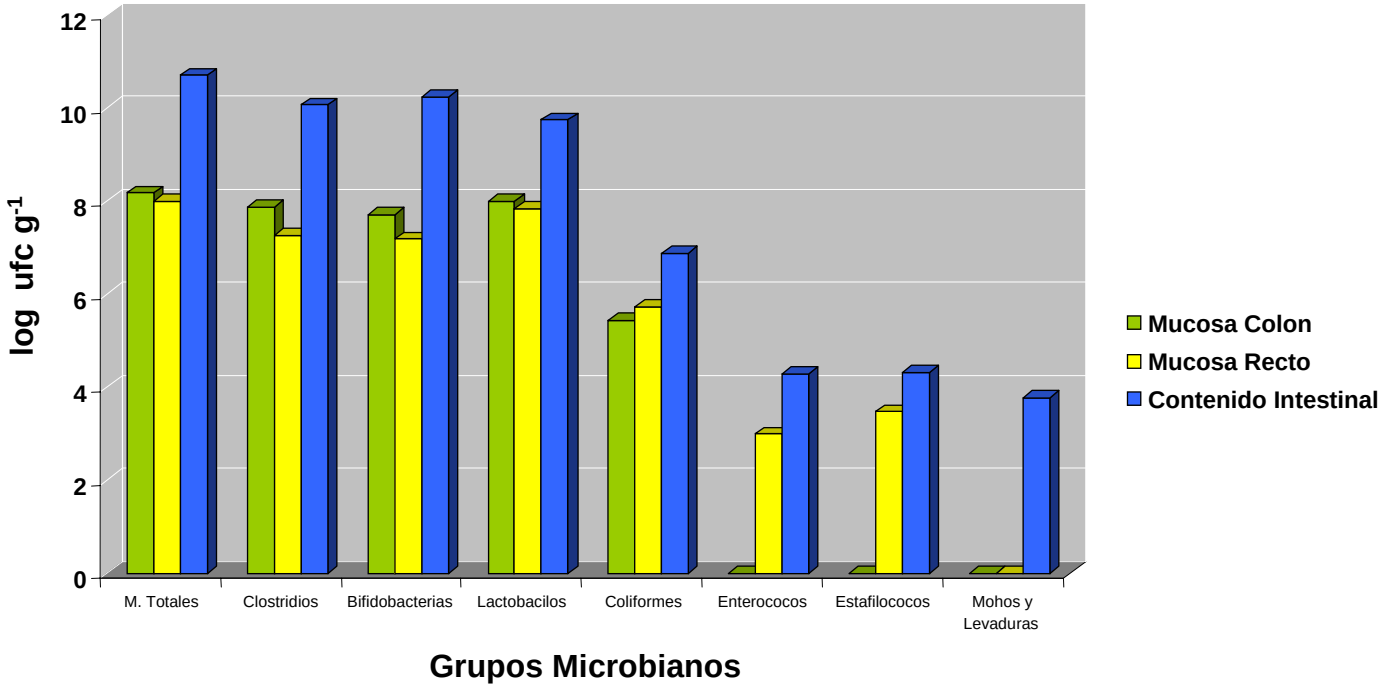


Figura 2. Comparación de las concentraciones de diversos grupos microbianos en mucosa (colon y recto) y contenido intestinal del individuo F.

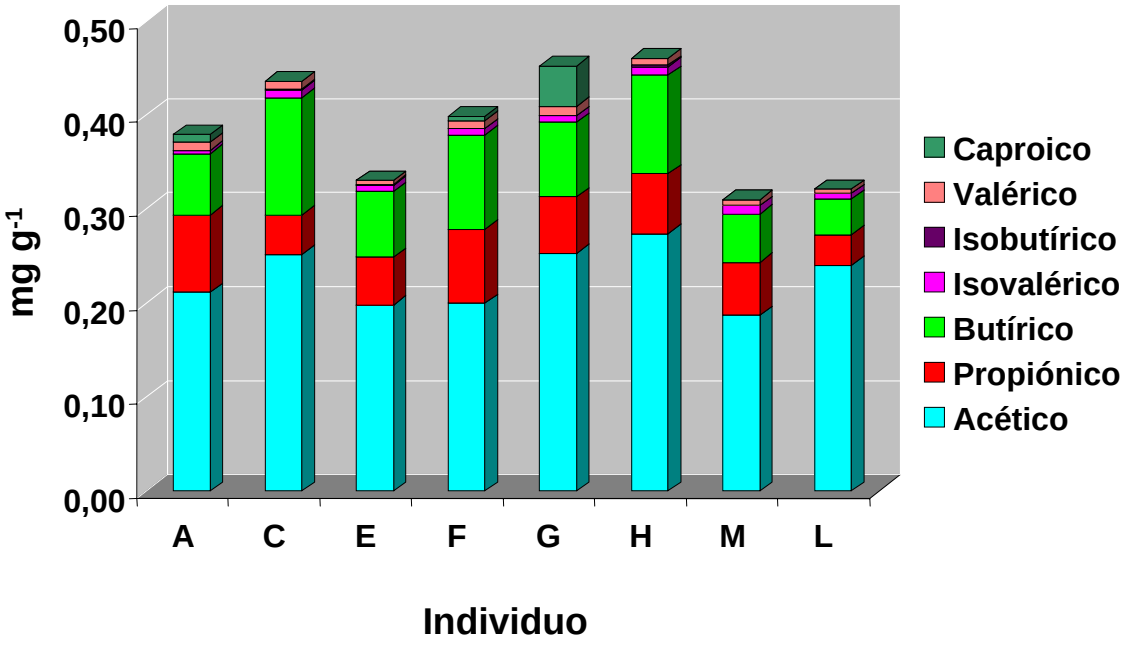


Figura 3. Concentración de ácidos grasos de cadena corta en las heces de los individuos donantes.

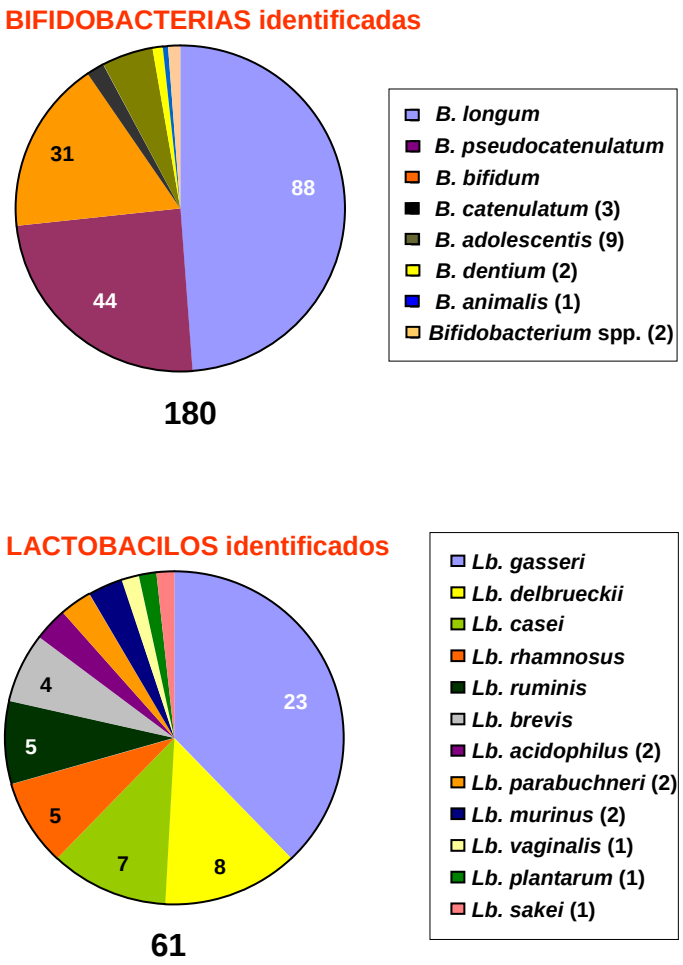


Figura 4. Representación esquemática del número y especie de las cepas identificadas de bifidobacterias y lactobacilos.

CAPÍTULO 8

PROPIEDADES BENEFICIOSAS PARA LA SALUD RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA A SALES BILIARES Y CON LA PRODUCCIÓN DE EXOPOLISACÁRIDOS EN MICROORGANISMOS PROBIÓTICOS Y BACTERIAS LÁCTICAS

Abelardo Margolles, Patricia Ruas-Madiedo y Clara G. de los Reyes-Gavilán

Instituto de Productos Lácteos de Asturias, CSIC, Carretera de Infiesto s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias

Probióticos orales y tránsito a través del tracto gastrointestinal

Los probióticos orales se han definido como *microorganismos vivos que, tras su ingestión en cierto número, ejercen efectos beneficiosos sobre la salud más allá de la inherente nutrición básica* (Guarner y Schaafsma, 1998). Esta definición implica que los microorganismos deben de ser viables en el momento de su ingestión. Sin embargo, se ha observado que formas no viables de algunos microorganismos tienen también efectos beneficiosos para la salud (Ouwehand y Salminen, 1998), lo que ha llevado a algunos autores a proponer una nueva definición: "*Los probióticos son preparaciones de células microbianas o componentes de las mismas que presentan un efecto beneficioso en la salud y el bienestar del hospedador*" (Salminen y col., 1999). Los probióticos son mayoritariamente, aunque no de forma exclusiva, bacterias lácticas de origen intestinal, pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. A estos microorganismos se les atribuyen acciones beneficiosas tales como la mejora de la digestión de la lactosa en personas con intolerancia a este disacárido, inhibición de patógenos en el intestino, mejora del estreñimiento y prevención de la diarrea, acción antimutagénica y anticancerígena, aumento de la respuesta inmune y reducción de los niveles de colesterol en sangre (Salminen y col., 1998; Tannock, 1999); no obstante, la mayoría de estas propiedades no se han demostrado de forma efectiva para todas las cepas consideradas como probióticas, siendo suficiente haber demostrado una de ellas para que el microorganismo sea considerado como tal.

Los probióticos en humanos se consumen mayoritariamente como productos lácteos. De hecho, en los últimos años se ha incrementado notablemente el interés por las leches fermentadas elaboradas con microorganismos probióticos de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Esto ha dado lugar a la explotación comercial de algunas bacterias probióticas así como a la aparición en el mercado de una gran variedad de productos. Para que

estos microorganismos puedan ejercer su efecto beneficioso, han de encontrarse en concentraciones elevadas en el producto (nivel mínimo 10^5 a 10^6 ufc ml^{-1} o una ingesta diaria de 10^9 a 10^{10} células viables) (Samona y Robinson, 1994; Perdigón y col., 1995), ser capaces de resistir el tránsito gastrointestinal e implantarse o mantenerse un cierto tiempo en el intestino. Durante la digestión, el tiempo medio de permanencia de los alimentos en el estómago es de 90 minutos (Berrada y col., 1991) a un pH próximo a 1,5 ó 2,0 (Hill, 1990). Los demás procesos digestivos tienen tiempos de residencia mayores. La concentración de bilis en el intestino oscila entre 1,5 y 2,0% en la primera hora de digestión, disminuyendo ésta posteriormente hasta el 0,3% (Sjovall, 1959).

Interacción de la microbiota intestinal con el metabolismo de las sales biliares y del colesterol.

El tracto gastrointestinal (TGI) constituye un sistema ecológico microbiano complejo, con varios cientos de especies bacterianas diferentes. El colon particularmente es la zona más densamente poblada, con más de 10^{12} bacterias por gramo de heces. Así, el TGI de personas sanas contiene una gran diversidad de poblaciones microbianas, entre las que se encuentran lactobacilos, bifidobacterias, enterobacterias, clostridios, diferentes especies de los géneros *Eubacterium, Peptostreptococcus* y *Ruminococcus* y bacilos Gram-negativos anaerobios potencialmente perjudiciales como *Fusobacterium* y *Bacteroides* (Tannock, 1999).

Distintos factores pueden condicionar la supervivencia a través del TGI de los microorganismos probióticos ingeridos con los alimentos. Entre estos factores, el pH ácido del estómago y la elevada concentración de sales biliares en el intestino son las barreras fisiológicas más importantes que estos microorganismos han de superar para poder establecerse inicialmente en el colon. Los ácidos biliares primarios (ácidos cólico y quenodesoxicólico, principalmente) se sintetizan en el hígado a partir de colesterol y se almacenan como sales conjugadas de taurina o glicina (ácido glicocólico, glicoquenodesoxicólico, taurocólico y tauroquenodesoxicólico) en la vesícula biliar (Fig. 1A). La formación y excreción de bilis es la vía principal de eliminación de colesterol en mamíferos (Chen y col., 1995). Durante la digestión, la bilis se vierte al duodeno, emulsionándose con las grasas para facilitar la absorción de triacilglicéridos, colesterol y vitaminas liposolubles. Las sales biliares conjugadas son reabsorbidas en su mayoría en el íleon, volviendo al hígado por la circulación portal en el proceso que se conoce como “circulación enterohepática de las sales biliares” (Hofmann, 1984). Sin embargo, una fracción

minoritaria aunque significativa de sales biliares no es absorbida y alcanza el intestino grueso, eliminándose con las heces. En el colon las sales biliares pueden sufrir principalmente dos tipos de modificaciones por acción de la microbiota intestinal. La hidrólisis la llevan a cabo hidrolasas y conduce a la liberación del ácido biliar primario y el aminoácido a partir de la sal conjugada. Por otra parte, el ácido biliar primario en su forma desconjugada puede sufrir a su vez una deshidroxilación en posición 7 α para formar los correspondientes ácidos biliares secundarios (ácidos desoxicólico y litocólico, principalmente) (Baron y Hylemon, 1997) (Fig. 1B). La desconjugación la llevan a cabo la mayoría de los microorganismos intestinales (Stellwag y Hylemon, 1976; Chikai y col., 1987; Gopal-Srivastava y Hylemon, 1988; Moser y Savage, 2001; Ahn y col., 2003) y, entre los probióticos, parece estar más extendida en las bifidobacterias que entre los lactobacilos (Tanaka y col., 1999). Por el contrario, la hidrólisis del grupo hidroxilo en posición 7 α del anillo esteroide se ha descrito únicamente en los géneros *Clostridium* y *Eubacterium*, no considerados generalmente como probióticos (Wells y Hylemon, 2000).

El consumo de probióticos se ha propuesto como una alternativa para reducir el colesterol sérico en personas con hipercolesterolemia o para mantenerlo en niveles normales en individuos sanos (De Rodas y col., 1996; Taranto y col., 1998). La hipercolesterolemia es el principal factor de riesgo en la enfermedad coronaria en humanos, la cual representa una de las principales causas de muerte en los países industrializados. Algunas bifidobacterias y lactobacilos son capaces de acumular colesterol en la pared celular (Usman y Osono, 1999a), en la membrana plasmática (Noh y col., 1997; Dambekodi y Gilliland, 1998) o en el citoplasma (Tahri y col., 1996; Usman y Osono 1999b; Pereira y Gibson, 2002). Por otra parte, al pH ligeramente ácido del intestino los ácidos biliares desconjugados son menos solubles que las correspondientes sales conjugadas (Dietschy y Wilson, 1970), y coprecipitan el colesterol en el lumen intestinal (Klaver y van der Meer, 1993; Tahri y col., 1996; Ahn y col., 2003), uniéndose éste a las células bacterianas y a la fibra dietética, lo que aumenta su excreción (Chikai y col., 1987) (Fig. 1B). Se supone que a través de todos estos mecanismos la desconjugación aumentará la eliminación de sales biliares y colesterol con las heces, lo que conducirá a una absorción menos eficiente del colesterol en el intestino (Reyner y col., 1981) y a una activación de la síntesis de nuevas sales biliares, cuyo precursor es el colesterol, que son necesarias para reemplazar a las que han escapado a la circulación enterohepática, provocando finalmente una reducción de los niveles de colesterol sérico.

No obstante, se sabe que los ácidos biliares primarios son también menos efectivos como detergentes y menos eficientes en la formación de micelas que las correspondientes

sales conjugadas (Reyner y col., 1981), por lo que una excesiva desconjugación puede dar lugar a malabsorción de grasas y vitaminas liposolubles. Por otra parte, una alta concentración de ácidos biliares secundarios se ha relacionado con la formación de cálculos biliares y con un incremento del riesgo de padecer cáncer de colon (Marteau y Rambaud, 1993).

Mecanismos de resistencia a ácidos y sales biliares en microorganismos probióticos

Los ácidos y sales biliares son detergentes biológicos altamente tóxicos, capaces de desorganizar la estructura de bicapa lipídica de la membrana celular. La presencia de estos compuestos representa un importante factor de estrés para los microorganismos, por lo que la microbiota intestinal ha debido adaptarse desarrollando mecanismos de defensa para protegerse de la acción citotóxica de las sales biliares. Por ello, entre las propiedades que confieren a las bacterias probióticas una ventaja selectiva para la colonización del TGI, la resistencia a ácidos y sales biliares es de notable interés. No obstante, el conocimiento sobre los mecanismos celulares de resistencia a acidos y sales biliares en microorganismos probióticos es actualmente muy escaso, particularmente en las bifidobacterias.

Se ha sugerido que las hidrolasas de sales biliares podrían tener algún papel en la resistencia, ejerciendo un efecto protector sobre la célula productora (Adamowicz y col., 1991; Flahaut y col., 1996) o disminuyendo la toxicidad de las sales conjugadas al transformarlas en ácidos desconjugados, menos tóxicos (De Smet y col., 1995). Los datos que se poseen hasta el momento son contradictorios ya que algunos autores relacionan la resistencia a sales biliares con la actividad hidrolasa (Grill y col., 2000), mientras que otros no detectan ninguna relación (Usman y Hosono, 1999b; Moser y Savage, 2001) (Fig. 1B).

Por otra parte, el transporte de sales biliares es otro de los mecanismos utilizados por las bacterias intestinales para contrarrestar la toxicidad de estos compuestos (Fig. 1B). Tanto las sales biliares conjugadas como los ácidos desconjugados son capaces de penetrar en la célula atravesando la membrana plasmática de numerosas bacterias intestinales (Mallonee y Hylemon, 1996; Thanassi y col., 1997; Elkins y Savage, 1998; Yokota y col., 2000). Recientemente se ha demostrado que lactobacilos y bifidobacterias son capaces de acumular ácido cólico en el citoplasma de forma pasiva, a favor del gradiente transmembrana de protones, de manera que en ambientes moderadamente ácidos (como es el caso del intestino) aumentaría la acumulación intracelular de colato (Kurdi y col., 2000; 2003). Esta aparente acumulación intracelular de colato es sorprendente debido a su toxicidad para las células y por eso es bastante probable que las bacterias probióticas posean, además, un mecanismo activo

de destoxificación que transporte los ácidos y/o sales biliares al exterior. En este sentido, se ha comprobado que *Lactococcus lactis* posee un sistema de excreción de colato dependiente de ATP (Yokota y col., 2000), aunque el transportador responsable de dicha actividad no se ha identificado. *Escherichia coli* utiliza la energía generada por la fuerza protón-motriz para expulsar quenodesoxicolato y taurocolato (Thanassi y col., 1997). Además, se sabe que *Eubacterium* spp. (Mallonee y Hylemon, 1996) y *Lactobacillus johnsonii* (Elkins y Savage, 1998) poseen transportadores que facilitan el paso de sales biliares desde el medio externo al citoplasma, habiéndose sugerido en ambos casos (aunque no se ha demostrado aún) la presencia de proteínas de membrana excretoras que expulsen las sales biliares acumuladas en el interior celular. No obstante, no existen hasta el momento datos concluyentes que demuestren la presencia de sistemas activos de transporte de ácidos y sales biliares en el género *Bifidobacterium*.

De lo expuesto hasta ahora se puede deducir que la resistencia a sales biliares de las bacterias intestinales, y más concretamente de los microorganismos probióticos, es probablemente un proceso complejo derivado de la interacción de varias de las actividades indicadas, más que de la acción de cualquiera de ellas por separado. Por el momento, el estudio de los mecanismos celulares de resistencia a sales biliares es un campo que precisa aún mucha investigación para ser comprendido plenamente.

Adaptaciones fisiológicas a altas concentraciones de sales biliares en bifidobacterias

El estudio de las adaptaciones fisiológicas que sufren las bacterias intestinales cuando se ven sometidas a un estrés causado por elevadas concentraciones de sales biliares puede ser de gran ayuda para entender la complejidad de los procesos implicados en la resistencia a estos compuestos. Se sabe que algunos microorganismos probióticos son capaces de adaptarse fácilmente a altas concentraciones de ácidos y sales biliares por exposición progresiva a concentraciones subletales de estos compuestos (Ibrahim y Bezkorovainy, 1993; Chung y col., 1999). En nuestro grupo de investigación hemos comprobado recientemente que esta adaptación en bifidobacterias conlleva en algunos casos un cambio en el nivel de expresión de proteínas asociadas a membrana y una serie de cambios morfológicos (Fig. 2). Los derivados adaptados son capaces de multiplicarse *in vitro* en presencia de concentraciones de sales biliares muy superiores a las que resisten las cepas originales más sensibles (Margolles y col., 2003). El fenotipo es estable y los niveles de resistencia se mantienen invariables después de más de 500 generaciones en un medio carente de sales biliares. Además, la adquisición de

resistencia frente a una determinada sal biliar confiere resistencias cruzadas frente a otras sales biliares y provoca, en muchos casos, un aumento de la supervivencia a pH ácido y variaciones en los niveles de algunas actividades glicosidasas (Noriega y col., 2003). Parece, por tanto, que la exposición de estos microorganismos a elevadas concentraciones de sales biliares podría inducir un efecto sinérgico de adaptación, aumentando en ellos su resistencia a las condiciones adversas del TGI (pH bajo en el estómago y elevadas concentraciones de sales biliares en el intestino).

La alteración del nivel de ciertas actividades glicosidasas en las cepas de *Bifidobacterium* con resistencia adquirida a sales biliares podría tener, además, una función importante en el metabolismo celular. Se sabe que el metabolismo de azúcares en bifidobacterias está regulado por la relación ATP/ADP, de tal manera que el exceso de ADP produce una disminución del metabolismo celular. En las bacterias anaerobias, la energía metabólica se almacena en forma de intermediarios ricos en energía, como el ATP. Esta fabricación de ATP se destina fundamentalmente a la generación de la fuerza protón-motriz y a la regulación del pH intracelular a través de la actividad de una ATP-sintetasa (Konings y col., 1998), que transporta protones a expensas de la hidrólisis de ATP desde el citoplasma al exterior celular en contra de gradiente, manteniendo así el pH intracelular 0,5-1,0 unidades por encima del pH extracelular. Es posible que una mayor actividad de determinadas glicosidasas en los derivados resistentes pudiera dirigirse a una mayor producción de ATP, que podría activar determinados mecanismos celulares de protección frente a la acción tóxica de las sales biliares. Asimismo, la elevada resistencia a pH ácido que paralelamente han desarrollado los derivados resistentes a sales biliares podría estar relacionada con la potenciación del mecanismo de regulación del pH intracelular, debido a la mayor concentración de ATP en la célula y al consiguiente incremento de su capacidad para expulsar protones al exterior.

El estudio en detalle de las proteínas celulares cuya expresión se modifica con la adquisición de resistencia a sales biliares y de las variaciones en el nivel de determinadas actividades enzimáticas supondrá, sin duda, un avance importante en el conocimiento de los mecanismos de resistencia. Por otro lado, la alteración de los niveles de actividades glicolíticas en bifidobacterias podría modificar el patrón de utilización de carbohidratos por estos microorganismos.

Interacción de los carbohidratos no digeribles de la dieta con los microorganismos probióticos en el colon

Los principales substratos para la proliferación microbiana en el colon son la gran cantidad y diversidad de compuestos no digeribles procedentes de la dieta, principalmente carbohidratos, que llegan a esta localización. Algunos de estos carbohidratos (entre los que se encuentran oligosacáridos, polisacáridos o derivados hidrolíticos de los mismos) pueden ser fermentados de forma preferente por la microbiota beneficiosa del colon (microorganismos probióticos), confiriéndole así a estos microorganismos una ventaja selectiva en este ambiente. Estos substratos, denominados "*prebióticos"***,** se definieron como "*ingredientes alimentarios no digeribles que afectan de forma beneficiosa al hospedador estimulando selectivamente el crecimiento y/o la actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon, pudiendo mejorar la salud del hospedador*" (Gibson y Roberfroid, 1995). Esto implica que para que un substrato prebiótico pueda ejercer su efecto beneficioso ha de ser resistente al ácido del estómago y a las enzimas presentes en las secreciones pancreáticas e intestinales, no debe de ser absorbido en el intestino delgado y ha de ser fermentado (preferiblemente de forma selectiva) por las bacterias "beneficiosas" presentes en el colon.

Entre los substratos prebióticos se incluyen componentes de la leche (aminoazúcares, galactosil-lactosa, glicomacropéptido de la κ-caseína), componentes de las paredes vegetales entre los que se encuentran las hemicelulosas (arabinanos, xilanos, galactanos, glucanos, mananos) y pectinas, así como materiales de reserva de vegetales (inulina, almidón resistente) y exopolisacáridos (EPS) producidos por microorganismos, principalmente por bacterias del ácido láctico (BAL). La consideración de los EPS como posibles prebióticos es muy reciente y dado que se trata con frecuencia de polímeros sintetizados por los propios microorganismos, se analizarán con detalle en el último apartado de este capítulo.

En la degradación de los carbohidratos en el intestino intervienen varias enzimas glicolíticas bacterianas de forma combinada. El análisis reciente del genoma de *Bifidobacterium longum* refleja la existencia de una gran cantidad de proteínas especializadas en el catabolismo de oligosacáridos. El control transcripcional negativo parece ser el principal mecanismo de regulación de la expresión génica en estos microorganismos, dado que el 70% de los reguladores transcripcionales son represores (Schell y col., 2002). Esta organización favorecería la rápida adaptación de las bifidobacterias a la fluctuación de substratos que ocurre en el colon. Existen aún pocos datos sobre los mecanismos de inducción, especificidad de substrato y modo de acción de las enzimas glicolíticas implicadas en la degradación de

prebióticos en microorganismos probióticos. El estudio de estas enzimas podría ser de gran ayuda para comprender los complejos mecanismos que permiten a las bacterias probióticas sobrevivir y colonizar el tracto intestinal. A este respecto, en nuestro grupo de investigación hemos clonado y caracterizado recientemente una α-L-arabinofuranosidasa de *B. longum,* capaz de liberar residuos de arabinosa a partir de polisacáridos y oligosacáridos de origen vegetal y que podría jugar un papel fundamental en la degradación de hemicelulosas de la dieta en el intestino grueso (Margolles y de los Reyes-Gavilán, 2003). Por otra parte, el cambio notable en el nivel de algunas actividades glicosidasas que hemos detectado asociado al incremento de resistencia a sales biliares en bifidobacterias, ya comentado previamente en este capítulo, podría estar relacionado con una respuesta sinérgica de adaptación a las condiciones del TGI que prepare a la célula para una mejor asimilación de los carbohidratos no digeribles del colon (Noriega y col., 2003).

La fermentación de carbohidratos en el colon da lugar a la liberación de ácidos grasos de cadena corta (principalmente acetato, propionato y butirato), gases (anhídrido carbónico, metano e hidrógeno) y ácido láctico al lumen intestinal (Cummings y col., 2001). Los ácidos grasos de cadena corta pueden actuar directa o indirectamente sobre las células intestinales y participar en el control de varios procesos (Crittenden, 1999). La proliferación selectiva de bacterias beneficiosas disminuye el riesgo de infecciones por microorganismos comensales oportunistas. Junto con el descenso moderado del pH que produce la fermentación de estos carbohidratos, la proliferación de bacterias beneficiosas va a actuar también dificultando la proliferación de poblaciones de patógenos y microorganismos de la putrefacción, lo que conducirá a una disminución del metabolismo de proteínas y aminoácidos así como de enzimas y metabolitos genotóxicos, disminuyendo finalmente el riesgo de cáncer. El descenso del pH incrementa la solubilidad de minerales, mejorando su biodisponibilidad y, como ya vimos en apartados anteriores, puede contribuir también a reducir la formación de ácidos biliares secundarios (y con ello, el riesgo de cáncer de colon) y a disminuir la recuperación de ácidos biliares a través de la vena porta (con la consiguiente reducción de los niveles de colesterol sérico). Por otra parte, los ácidos grasos de cadena corta son rápidamente absorbidos por los colonocitos. El butirato es metabolizado por las células intestinales, sirviéndoles como fuente de energía. Pero además, esta molécula es capaz de estimular *in vitro* la diferenciación celular, suprimir la división celular e inducir la apoptosis de células tumorales (Avivi-Green y col., 2000; Buommino y col., 2000; Chai y col., 2000), disminuyendo con ello el riesgo de cáncer de colon. Por su parte, el acetato y el propionato alcanzan intactos el hígado a través de la vena porta. El acetato se incorpora a los procesos de

colesterogénesis y lipogénesis en el hígado. Por el contrario, el propionato es un inhibidor competitivo del transportador de acetato hacia el interior de la célula hepática, fenómeno que contribuye *in vitro* a la disminución de la lipogénesis y colesterogénesis en hepatocitos de ratas (Delzenne y Williams, 2002). Por ello, la producción de altas concentraciones de propionato, mediante fermentación, se ha propuesto como explicación a la disminución de los niveles séricos y hepáticos de colesterol en animales de experimentación alimentados con determinados prebióticos (Delzenne y Kok, 2001).

En la revisión sobre substratos prebióticos de Crittenden (1999) se puede encontrar un excelente y clarificador esquema de los mecanismos de acción beneficiosos sobre la salud humana propuestos para los prebióticos.

Efectos beneficiosos para la salud de los EPS producidos por BAL

En los últimos años se ha sugerido que los EPS producidos por BAL podrían tener un efecto fisiológico beneficioso para la salud humana a través de diversos mecanismos. Entre las acciones beneficiosas atribuidas a los EPS se encuentran su posible papel como substrato prebiótico, la capacidad de modular el sistema inmunitario, la actividad antiulcerante y antitumoral y la regulación de los niveles de colesterol en sangre. No obstante, los estudios que muestran las acciones beneficiosas que los EPS pueden ejercer sobre la salud humana (Tabla 1) se limitan en su mayor parte a experimentos realizados *in vitro*, siendo escasos aún los estudios *in vivo* (Ruas-Madiedo y col. 2002). Mediante administración oral a animales de experimentación, se ha comprobado que algunos EPS producidos por bifidobacterias tienen un efecto antiulcerante que parece estar mediado por la activación del sistema inmunitario del hospedador (Nagaoka y col., 1994). La composición en monosacáridos del polímero es un factor determinante ya que aquellos EPS con alto contenido en ramnosa (60% o más) fueron más efectivos como estimulantes de la cicatrización de la úlcera gástrica.

Existen evidencias que indican que determinadas cepas de BAL productoras de EPS podrían tener una actividad anticancerígena mediada por una estimulación de la respuesta inmune. Así, Kitazawa y col. (1991) observaron que tras la inyección intraperitoneal de un liofilizado de células de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* KVS20 se conseguía una inhibición *in vivo* de la proliferación del sarcoma S-180 en ratones, aunque no se detectaba citotoxicidad *in vitro*, lo que indicaba la participación del sistema inmunitario del hospedador en el mecanismo antitumoral. Los mismos autores demostraron posteriormente que el EPS producido por esta cepa era capaz de inducir la mitosis de linfocitos B (Kitazawa y col.,

1992). Por otra parte, Nakajima y col. (1995) sugirieron un efecto adyuvante para el EPS producido por *L. lactis* subsp. *cremoris* SBT0495, ya que este polímero administrado intraperitonealmente era capaz de estimular la síntesis de anticuerpos específicos de antígeno en ratones. La composición química de los EPS es también en este caso un factor determinante para la estimulación del sistema inmune. Así, el polímero (cargado negativamente) producido por *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL 1073R-1 es capaz de estimular la proliferación de linfocitos B en ratones, actuando el grupo fosfato del EPS como inductor de la mitosis (Kitazawa y col., 1998). No obstante, en la estimulación del sistema inmune por los EPS de BAL pueden participar también otros mecanismos como la proliferación de linfocitos T (Forsén y col., 1987), la activación de macrófagos, la producción de citoquinas (interferón e interleuquinas) y la activación de factores celulares como el factor de necrosis tumoral (Kitazawa y col., 1996; Chabot y col., 2001). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que los estudios mencionados hasta ahora sobre la acción anticancerígena atribuida a los EPS no se han llevado a cabo mediante administración oral del polímero y, hasta donde abarca nuestro conocimiento, únicamente existe un trabajo en el que la administración oral de la fracción de EPS soluble en agua de granos de kéfir produjo una activación de la respuesta inmunitaria en ratones, mediante la activación de linfocitos T (Zubillaga y col., 2001).

Un único estudio *in vivo* muestra la habilidad para reducir los niveles de colesterol sérico en ratas alimentadas con leche fermentada con la cepa *L. lactis* subsp. *cremoris* SBT0495 productora de EPS (Nakajima y col., 1992). Recientemente se ha demostrado *in vitro* la capacidad de ciertos EPS producidos por bacterias del cultivo iniciador del yogur (*Streptococcus thermophilus* y *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) para unir ácidos biliares (Pigeon y col., 2002). Este efecto, según sugieren los autores del estudio, podría emplearse en combinación con la administración de bacterias probióticas para reducir los niveles de colesterol en individuos hipercolesterolémicos o para mantener unos niveles adecuados en individuos sanos.

Existen estudios puntuales acerca del efecto prebiótico de los EPS producidos por BAL, habiéndose demostrado que algunos de ellos pueden ser fermentados por la microbiota intestinal, aunque su degradación es en general escasa. Ruijssenaars y col. (2000) comprobaron que dos EPS producidos por cepas de *S. thermophilus* fueron degradados por la microbiota intestinal de heces humanas. Los autores sugirieron una relación entre la estructura y composición de los EPS y su susceptibilidad a la degradación. Dal Bello y col. (2001) demostraron el efecto bifidogénico del EPS (fructano tipo levano) producido por dos cepas de *Lactobacillus sanfranciscensis* aisladas de panes ácidos fermentados. Estos autores

obtuvieron un enriquecimiento en bifidobacterias a partir de heces cuando éstas se cultivaron en medio selectivo en presencia del EPS, aunque también se favoreció la proliferación de *Eubacterium biforme* y *Clostridium perfringens*. Finalmente, Korakli y col. (2002) comprobaron que algunas bifidobacterias de origen humano fueron capaces de metabolizar el fructano producido por *Lb. sanfranciscensis* TMW1392.

Consideraciones finales

El estudio de los mecanismos celulares de resistencia a sales biliares en microorganismos probióticos es un campo que precisa aún mucha investigación básica para ser comprendido en profundidad. Dado que la resistencia microbiana a sales biliares representa un mecanismo adaptativo de respuesta al estrés producido por las condiciones adversas del TGI, las modificaciones sinérgicas de otras propiedades fisiológicas celulares que se producen como consecuencia de esta adaptación, pueden conducir también a una modificación favorable para el hospedador de algunas propiedades probióticas de estos microorganismos.

La fermentación de los carbohidratos no digeribles de la dieta por la microbiota del colon conduce a la liberación de ácidos grasos de cadena corta (principalmente acetato, propionato y butirato) en grado y proporción variable según el tipo de substrato. Se precisan más estudios para obtener una confirmación *in vivo* de la llamada “hipótesis del butirato” en la prevención del cáncer de colon y del efecto hipolipidemiante e hipocolesterolemiante atribuido al propionato. Finalmente, podemos decir que los EPS producidos por BAL se perfilan como “nuevos substratos prebióticos” con propiedades funcionales beneficiosas para el hospedador. Es interesante pensar que el origen microbiano de estos polímeros, muchos de ellos producidos por bacterias consideradas como beneficiosas para la salud, puede llegar a plantear el interrogante sobre la adecuada separación entre los conceptos actuales de “probiótico” y “prebiótico”.

Agradecimientos

Agradecemos la financiación de los fondos FEDER de la UE y del Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto AGL2001-2296). Abelardo Margolles fue el beneficiario de un contrato Marie Curie categoría R de la UE (Junio 2000-Mayo 2001). Patricia Ruas Madiedo disfruta actualmente de un contrato postdoctoral I3P cofinanciado por el CSIC y

fondos FEDER de la UE. Damos las gracias a Beatriz Martínez (IPLA-CSIC) por la lectura crítica de este manuscrito.

Referencias

Adamowicz, M., Kelley, P.M. y Nickerson, K.W. (1991). Detergent (sodium dodecyl sulfate) shock proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **173:**229-233.

Ahn, Y.T., Kim, G.B., Lim, K.S., Baek, Y.J. y Kim, H.U. (2003). Deconjugation of bile salts by *Lactobacillus acidophilus* isolates. *Int. Dairy J*. **13:**303-311.

Avivi-Green, C., Polak-Charcon, S., Madar, Z. y Schwartz, B. (2000). Apoptosis cascade proteins are regulated *in vivo* by high intracolonic butyrate concentrarion: correlation with colon cancer inhibition. *Oncol. Res*. **12:**83-95.

Baron, S.F. y Hylemon, P.B. (1997). Biotransformation of bile acids, cholesterol, and steroid hormones. *En Gastrointestinal Microbiology, vol. I. Gastrointestinal Ecosystems and Fermentations*, Mackie, R.I. y White, B.A. (Ed.), p. 470-510. International Thompson Publishing, New York.

Berrada, N., Lemeland, J.F., Laroch, G., Thouvenot, P. y Piaia, M. (1991). *Bifidobacterium* from fermented milks: survival during gastric transit. *J. Dairy Sci.* **74:**409-413.

Buommino, E., Pasquali, D., Sinisi, A.A., Bellastella, A., Morelli, F. y Metafora, S. (2000). Sodium butyrate/retinoic acid costimulation induces apoptosis-independent growth arrest and cell differentiation in normal and *ras*-transformed seminal vesicle epithelial cells unresponsive to retinoic acid. *J. Mol. Endocrinol*. **24:**83-94.

Chabot, S., Yu, H.L., De Léséleuc, L., Cloutier, D., van Calsteren, M.R., Lessard, M., Roy, D., Lacroix, M. y Oth, D. (2001). Exopolysaccharides from *Lactobacillus rhamnosus* RW-9595M stimulate TNF, IL-6 and IL-12 in human and mouse cultured immunocompetent cells, and IFN-γ in mouse splenocytes. *Lait* **81:**683-697.

Chai, F., Evdokiou, A., Young, G.P. y Zalewski, P.D. (2000). Involvement of p21(Waf1/Cip1) and its cleavage by DEVD-caspase during apoptosis of colorectal cancer cells induced by butyrate. *Carcinogenesis* **21:**69-77.

Chen, Z., Herdt, T.H., Liesman, J.S., Ames, N.K. y Emery, R.S. (1995). Reduction of bovine plasma cholesterol concentration by partial interruption of enterohepatic circulation of bile salts: a novel hypocholesterolemic model. *J. Lipid Res*. **36:**1544-1556.

Chikai, T., Nakao, H. y Uchida, K. (1987). Deconjugation of bile acids by human intestinal bacteria implanted in germ-free rats. *Lipids* **22:**669-671.

Chung, H.S., Kim, Y.B., Chun, S.L. y Ji, G.E. (1999). Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol*. **47:**25-32.

Crittenden, R.G. (1999). Prebiotics. *En Probiotics: A Critical Review*, Tannock, G.W. (Ed.), p. 141-156. Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk, England.

Cummings, J.H., Macfarlane, G.T. y Englyst, H.N. (2001). Prebiotic digestion and fermentation. *Am. J. Clin. Nutr*. **73** (2 Suppl.)**:**415-420S.

Dal Bello, F., Walter, J., Hertel, C. y Hammes, W.P. (2001). *In vitro* study of prebiotic properties of levan-type exopolysaccharides from lactobacilli and non-digestible carbohydrates using denaturing gradient gel electrophoresis. *System. Appl. Microbiol*. **24:**232-237.

Dambekodi, P.C. y Gilliland, S.E. (1998). Incorporation of cholesterol into the cellular membrane *of Bifidobacterium longum. J. Dairy Sci*. **81:**1818-1824.

De Rodas, B.Z., Gilliland, S.E. y Maxwell, C.V. (1996). Hypocholesterolemic action of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 and calcium in swine with hypercholesterolemia induced by diet. *J. Dairy Sci*. **79:**2121-2128.

De Smet, I., van Hoorde, L., van de Woestyne, M., Cristiaens, H. y Verstraete, W. (1995). Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *J. Appl. Bacteriol*. **79:**292-301.

Delzenne, N.M. y Kok, N. (2001). Effects of fructans-type prebiotics on lipid metabolism. *Am. J. Clin. Nutr*. **73** (2 Suppl.)**:**456S-458S.

Delzenne, N.M. y Williams, C.M. (2002). Prebiotics and lipid metabolism. *Curr. Opin. Lipidol*. **13:**61-67.

Dietschy, J.M. y Wilson, D.J. (1970). Regulation of cholesterol metabolism. *New England J. Med*. **282:**1179-1241.

Elkins, C.A. y Savage, D.C. (1998). Identification of genes encoding conjugated bile salt hydrolase and transport in *Lactobacillus johnsonii* 100-100. *J. Bacteriol*. **180:**4344-4349.

Flahaut, S., Frere, J., Boutibonnes, P. y Auffray, Y. (1996). Comparison of the bile salts and sodium dodecyl stress responses in *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol*. **62:**2416-2420.

Forsén, R., Heiska, E., Herva, E. y Arvilommi, H. (1987). Immunobiological effects of *Streptococcus cremoris* from cultured milk “viili”; application of human lymphocyte culture techniques. *Int. J. Food Microbiol*. **5:**41-47.

Gibson, G.R. y Roberfroid, M.B. (1995). Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr*. **125:**1401-1412.

Gopal-Srivastava, R. y Hylemon, P.B. (1988). Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Clostridium perfringens*. *J. Lipid Res*. **29:**1079-1085.

Grill, J.P., Cayuela, C., Antoine, J.M. y Schneider, F. (2000). Isolation and characterization of a *Lactobacillus amylovorus* mutant depleted in conjugated bile salt hydrolase activity: relation between activity and bile salt resistance. *J. Appl. Microbiol*. **89:**553-563.

Guarner, F. y Schaafsma, G.J. (1998). Probiotics. *Int. J. Food Microbiol*. **39**:237-238.

Hill, M. J. (1990). Factors controlling the microflora of the health upper gastrointestinal tract. *En Human Microbial Ecology*, Hill, M.J. y Marsh, P.D. (Eds.), p. 57-85. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Hofmann, A.F. (1984). Chemistry and enterohepatic circulation of bile acids. *Hepatology* **4:**4S-14S.

Ibrahim, S.A. y Bezkorovainy, A. (1993). Survival of bifidobacteria in the presence of bile salt. *J. Sci. Food Agric.* **62:**351-354.

Kitazawa, H., Toba, T., Itoh, T., Kumano, N., Adachi, S. y Yamaguchi, T. (1991). Antitumoral activity of slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* isolated from Scandinavian ropy sour milk “viili”. *Anim. Sci. Technol*. **62:**277-283.

Kitazawa, H., Yamaguchi, T. y Itoh, T. (1992). B-cell mitogenic activity of slime products produced from slime-forming, encapsulated *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*. *J. Dairy Sci*. **75:**2946-2951.

Kitazawa, H., Itoh, T., Tomioka, Y., Mizugaki, M. y Yamaguchi, T. (1996). Induction of IFN-γ and IL-2 production in macrophages stimulated with phosphopolysaccharide produced by *Lactococcus lactis* spp. *cremoris*. *Int. J. Food Microbiol.* **31:**99-106.

Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito, T., Kaneko, T. y Itoh, T. (1998). Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus*. *Int. J. Food Microbiol*. **40:**169-175.

Klaver, F.A.M. y van der Meer, R. (1993). The assumed assimilation of cholesterol by Lactobacilli and *Bifidobacterium bifidum* is due to their bile salt-deconjugating activity. *Appl. Environ. Microbiol*. **59:**1120-1124.

Konings, W.N., Lolkema, J.S., Bolhuis, H., van Veen, H.W., Poolman, B. y Driessen, A.J.M. (1998). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **71:**117-128.

Korakli, M., Gänzle, M.G. y Vogel, R.F. (2002). Metabolism by bifidobacteria and lactic acid bacteria of polysaccharides from wheat and rye, and exopolysaccharides produced by *Lactobacillus sanfranciscensis*. *J. Appl. Microbiol*. **92:**958-965.

Kurdi, P., van Veen, H.W., Tanaka, H., Mierau, I., Konings, W.N., Tannock, G., Tomita, F. y Yokota, A. (2000). Cholic acid is accumulated spontaneously, driven by membrane ΔpH, in many lactobacilli. *J. Bacteriol*. **82:**6525-6528.

Kurdi, P., Tanaka, H., van Veen, H.W., Asano, K., Tomita, F. y Yokota A. (2003). Cholic acid accumulation and its diminution by short-chain fatty acids in bifidobacteria. *Microbiology* **149:**2031-2037.

Mallonee, D.H. y Hylemon, P.B. (1996). Sequencing and expression of a gene encoding a bile acid transporter from *Eubacterium* sp. strain VPI 12708. *J. Bacteriol*. **178:**7053-7058.

Margolles, A., García, L., Sánchez, B., Gueimonde, M. y de los Reyes-Gavilán, C.G. (2003). Characterisation of a *Bifidobacterium* strain with acquired resistance to cholate-A preliminary study. *Int. J. Food Microbiol*. **82:**191-198.

Margolles, A. y de los Reyes-Gavilán, C.G. (2003). Purification and functional characterization of a novel α-L-arabinofuranosidase from *Bifidobacterium longum* B667. *Appl. Environ. Microbiol*. **69:**5096-5103.

Marteau, P. y Rambaud, J.C. (1993). Potential of using lactic acid bacteria for therapy and immunomodulation in man. *FEMS Microbiol. Rev*. **12:**207-220.

Moser, S.A. y Savage, D.C. (2001). Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated bile salts are unrelated properties in lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol*. **67:**3476-3480.

Nagaoka, M., Hashimoto, S., Watanabe, T., Yokokura, T. y Mori, Y. (1994). Anti-ulcer effects of lactic acid bacteria and their cell wall polysaccharides. *Biol. Pharm. Bull.* **17:**1012-1017.

Nakajima, H., Suzuki, Y., Kaizu, H. y Hirota, T. (1992). Cholesterol lowering activity of ropy fermented milk. *J. Food Sci*. **57:**1327-1329.

Nakajima, H., Toba, T. y Toyoda, S. (1995). Enhancement of antigen-specific antibody production by extracellular slime products from slime-forming *Lactococcus lactis* subspecies *cremoris* SBT 0459 in mice. *Int. J. Food Microbiol*. **25:**153-158.

Noh, D.O., Kim, S.H. y Gilliland, S.E. (1997). Incorporation of cholesterol into the cellular membrane *of Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *J. Dairy Sci*. **80:**3107-3113.

Noriega, L., Gueimonde, M., Sánchez, B., Margolles, A. y de los Reyes-Gavilán, C.G. (2003). Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol*. (aceptada).

Ouwehand, A.C. y Salminen, S.J. (1998). The health effects of cultured milk products with viable and non-viable bacteria. *Int. Dairy J.* **8:**749-756.

Perdigón, G., Alvarez, S., Rachid, M., Aquero, G. y Gobbato, N. (1995). Probiotic bacteria for humans: clinical system for evaluation of effectiveness. Immune system stimulation by probiotics. *J. Dairy Sci*. **78:**1597-1606.

Pereira, D.I.A. y Gibson, G.R. (2002). Cholesterol assimilation by lactic acid bacteria and bifidobacteria isolated from the human gut. *Appl. Environ. Microbiol*. **68:**4689-4693.

Pigeon, R.M., Cuesta, E.P. y Gilliland, S.E. (2002). Binding of free bile acids by cells of yogurt starter culture bacteria. *J. Dairy Sci*. **85:**2705-2710.

Reyner, M.O., Montet, J.C., Gerolami, A., Marteau, C., Crotte, C., Montet, A.M. y Mathieu, S. (1981). Comparative effects of cholic, chenodeoxycholic and ursodeoxycholic acids on micellar solubilization and intestinal absorption of cholesterol. *J. Lipid Res*. **22:**467-473.

Ruas-Madiedo, P., Hugenholtz, J. y Zoon, P. (2002). An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* **12:**163-171.

Ruijssenaars, H.J., Stingele, F. y Hartmans S. (2000). Biodegradability of food-associated extracellular polysaccharide. *Curr. Microbiol*. **40:**194-199.

Salminen, S., Deighton, M.A., Benno, Y. y Gorbach, S.L. (1998). Lactic acid bacteria in health and disease. En *Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects*, Salminen, S. y von Wright, A. (Eds.), 2ª edición, p. 211-254. Marcel Dekker Inc., New York.

Salminen, S., Ouwehand, A., Benno, Y. y Lee, Y.K. (1999). Probiotics: How should they be defined? *Trends Food Sci. Technol.* **10**:107-110.

Samona, K. y Robinson, R.K. (1994). Effect of yogurt cultures on the survival of bifidobacteria in fermented milks. *J. Soc. Dairy Technol*. **47:**58-60.

Schell, M.A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M.C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R.D. y Arigoni, F. (2002). The

genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99:**14422-14427.

Sjovall, J. (1959). On the concentration of bile acids in the human intestine during absorption of bile acids and steroids 74. *Acta Physiol. Scand*. **46:**339-345.

Stellwag, E.J. y Hylemon P.B. (1976). Purification and characterization of bile salt hydrolase from *Bacteroides fragilis* subsp. *fragilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **452:**165-176.

Tahri, K., Grill, J.P. y Schneider, F. (1996). Bifidobacteria strain behavior toward cholesterol: coprecipitation with bile salts and assimilation. *Curr. Microbiol*. **33:**187-193.

Tanaka, H., Doesburg, K., Iwasaki, T. y Mierau, I. (1999). Screening of lactic acid bacteria for bile salt hydrolase activity. *J. Dairy Sci*. **82:**2530-2535.

Tannock, G. W. (1999). A fresh look at the intestinal microflora. *En Probiotics: A Critical Review*, Tannock, G.W. (Ed.), p. 5-14. Horizon Scientific Press, Wymondham, Norfolk, England.

Taranto, M.P., Medici, M., Perdigon, G., Ruiz Holgado, A.P. y Valdez, G.F. (1998). Evidence for hypocholesterolemic effect of *Lactobacillus reuteri* in hypercholesterolemic mice. *J. Dairy Sci.* **81:**2336-2340.

Thanassi, D.G., Cheng, L.W. y Nikaido, H. (1997). Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol*. **179:**2512-2518.

Usman y Hosono, A. (1999a). Binding of cholesterol to the cells and peptidoglycan of *Lactobacillus gasseri*. *Milchwissenschaft* **54:**495-498.

Usman y Hosono, A. (1999b). Bile tolerance, taurocholate deconjugation and binding of cholesterol by *Lactobacillus gasseri* strains. *J. Dairy Sci*. **82:**243-248.

Wells, J.E. y Hylemon, P.B. (2000). Identification and characterization of a bile acid 7α-dehydroxylation operon in *Clostridium* sp. strain TO-931, a highly active 7α-dehydroxylating strain isolated from human feces. *Appl. Environ. Microbiol*. **66:**1107-1113.

Yokota, A., Veenstra, M., Kurdi, P., van Veen, H.W. y Konings, W.N. (2000). Cholate resistance in *Lactococcus lactis* is mediated by an ATP-dependent multispecific organic anion transporter. *J. Bacteriol*. **182:**5196-5201.

Zubillaga, M., Weill, R., Postaire, E., Goldman, C., Caro, R. y Boccio, J. (2001). Effect of probiotics and functional foods and their use in different diseases. *Nutr. Res*. **21:**569-579.

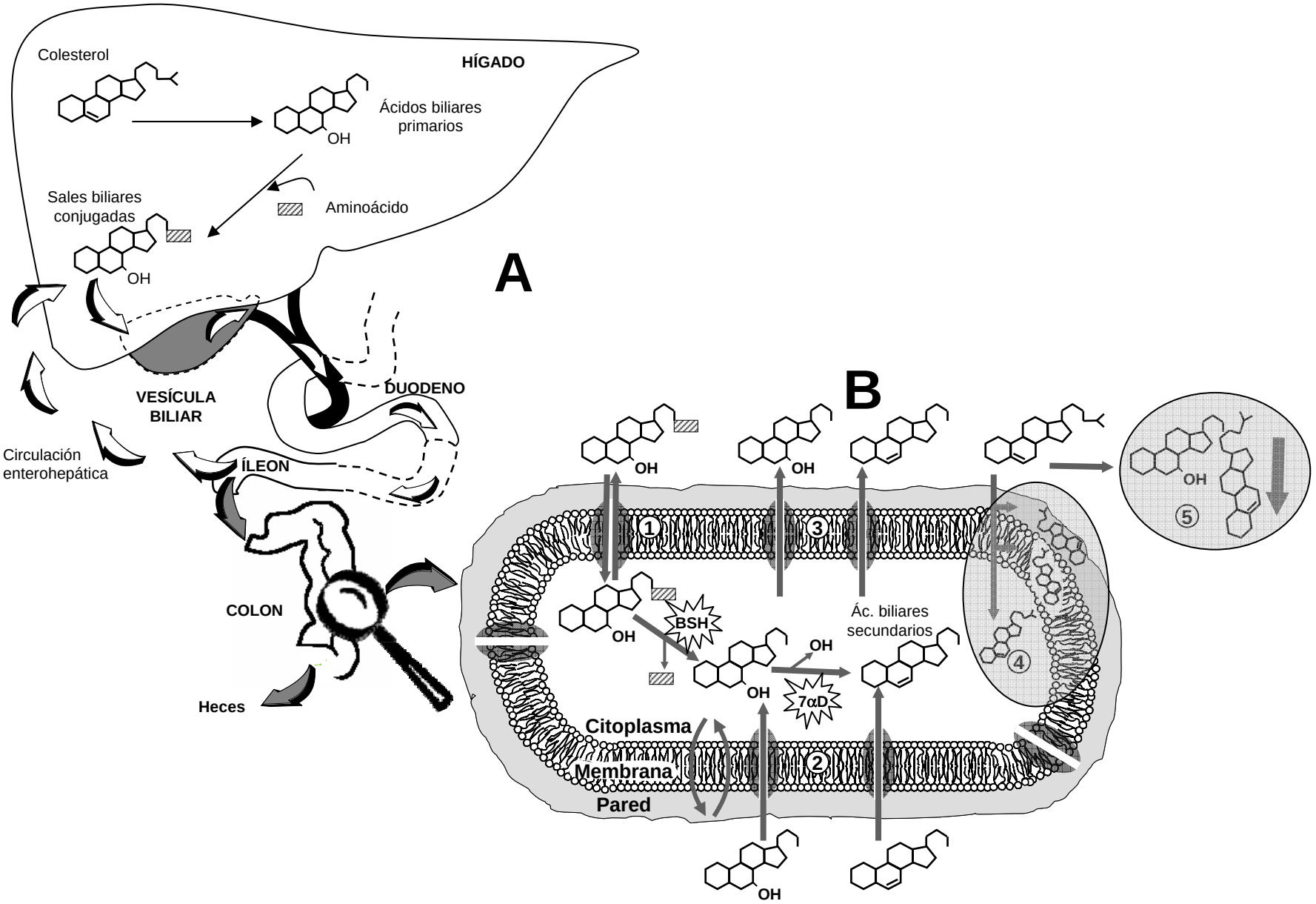


Figura 1. Circulación enterohepática de las sales biliares (A) e interacciones descritas de la microbiota intestinal con las sales biliares y el colesterol (B). , circulación enterohepática; ①, las sales biliares conjugadas entran y salen de las células mediante transporte activo; BSH, hidrolasas de sales biliares; 7αD, 7*α*-deshidroxilasas; ②, los ácidos biliares primarios entran en las células a través de transportadores o bien mediante difusión pasiva, los secundarios utilizan transportadores; ③, proteínas excretoras de ácidos biliares primarios y secundarios; ④, acumulación de colesterol en los distintos compartimentos celulares (pared, membrana y citoplasma); ⑤, formación de complejos colesterol-sales biliares desconjugadas (insolubles) y coprecipitación.

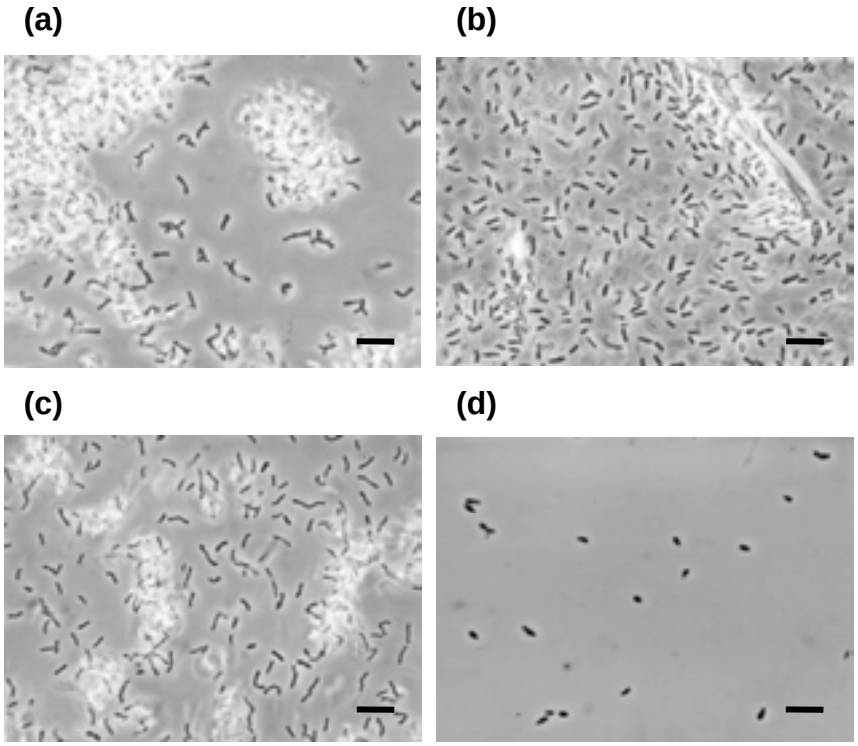


Figura 2. Aspecto microscópico de cultivos en fase estacionaria de dos cepas de bifidobacterias y sus correspondientes derivados resistentes a ox gall (dOx) o colato (dCo). (a) *Bifidobacterium bifidum* A8, (b) *B. bifidum* A8dOx, (c) *Bifidobacterium longum* B667 y (d) *B. longum* B667dCo. Barra, 10 μm

CAPÍTULO 9

SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LACTOBACILOS PARA SU USO EN PRODUCTOS LÁCTEOS PROBIÓTICOS

Raquel Rodríguez, Javier Calzada, Javier Tomillo, Pilar Gaya, Manuel Nuñez, Eva Rodríguez y Margarita Medina

Departamento de Tecnología de Alimentos, INIA, Carretera de La Coruña km 7, 28040 Madrid

En las últimas dos décadas se ha producido un aumento considerable en el consumo de productos lácteos probióticos. A pesar de su atractivo comercial, existe un cierto escepticismo por parte de la comunidad científica sobre los efectos beneficiosos para la salud de determinados alimentos probióticos. En algunos de estos alimentos los microorganismos se encuentran en forma no viable y otros contienen microorganismos que no han sido seleccionados por características beneficiosas concretas o cuyas propiedades carecen de una confirmación científica rigurosa.

Para su empleo en productos lácteos los cultivos probióticos deben cumplir con una serie de características funcionales y tecnológicas, por lo que la selección de bacterias potencialmente probióticas ha de ser muy restrictiva. Los aislados deben ser de origen humano, seguros para el hospedador y capaces de sobrevivir en las condiciones del tracto gastrointestinal. La capacidad de adhesión a la superficie intestinal puede prolongar el tiempo de influencia de la bacteria en el hospedador, por lo que la caracterización *in vitro* de esta propiedad también se considera un criterio de selección importante. Las bacterias probióticas deben mantener su viabilidad y su funcionalidad en condiciones industriales, durante su almacenamiento como cultivos congelados o liofilizados, así como durante la elaboración y almacenamiento de los alimentos a los que se han incorporado (Saarela y col., 2000). Asimismo, deben ser sencillas de cultivar y capaces de multiplicarse con nutrientes de bajo coste y en presencia de otros microorganismos (Collins y col., 1998).

El sistema más generalizado para proporcionar estos microorganismos probióticos al consumidor es su inclusión en leche y leches fermentadas. Las especies más utilizadas para ello pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Entre las bacterias de origen humano más extendidas en productos comerciales se encuentran *Lactobacillus rhamnosus* GG, *Lb. casei* Shirota y *Lb. johnsonii* La1. Por otra parte, en los últimos años se ha ensayado la incorporación de distintos cultivos probióticos de lactobacilos, bifidobacterias y enterococos a queso Cheddar, Cottage y Crescenza, entre otras variedades (Stanton y col.,

2002). En este producto, las bacterias probióticas deben mantener su viabilidad durante la maduración y no afectar negativamente a su composición, textura y sabor. Una de las ventajas del queso como vehículo de probióticos es su pH, más alto que el de las leches fermentadas, lo que proporciona mejores condiciones para la supervivencia de estos microorganismos. La matriz y el alto contenido en grasa pueden además proteger al microorganismo durante su tránsito gastrointestinal.

La viabilidad de las bacterias lácticas y las bifidobacterias en los productos lácteos dependerá de la especie y de la cepa, así como de otros factores como el pH, la concentración de ácidos láctico y acético, la temperatura o el oxígeno (Roy y col., 1997). El grado de adecuación de cada cepa a un producto lácteo determinado debe evaluarse individualmente. Las cepas probióticas deben ser compatibles con las cepas de bacterias lácticas empleadas como cultivos en la elaboración de productos lácteos fermentados. Además, no deben dar lugar a la aparición de sabores o texturas no deseados en los productos lácteos.

En la selección y aplicación de las cepas probióticas es fundamental una detallada caracterización taxonómica de las mismas. La identificación debe realizarse a nivel de cepa, ya que los efectos probióticos son específicos para una determinada cepa. Esta identificación permitirá, además, diferenciar entre la cepa consumida y los microorganismos de la misma especie o especies próximas presentes en la microbiota intestinal de un individuo. Los métodos clásicos de identificación bacteriana basados en características fenotípicas, perfiles de fermentación, análisis de proteínas de la pared celular, etc., no son suficientes para discriminar entre cepas; deben ir acompañados de métodos genéticos, ya que un fenotipo idéntico no garantiza un mismo genotipo.

La evaluación de la seguridad de las cepas probióticas debe realizarse a través de la determinación de una serie de características entre las que se incluyen la resistencia a antibióticos, la producción de aminas biógenas, la degradación de mucina y la desconjugación de sales biliares.

Por último, aunque la realización de distintas pruebas *in vitro* permite conocer el potencial probiótico de las cepas, no es suficiente para la completa definición de una cepa como probiótica. La confirmación de su eficacia deberá efectuarse mediante pruebas *in vivo*.

El objetivo del presente trabajo se centró en aumentar los recursos genéticos de interés para la industria láctea en lo que se refiere a la obtención de microorganismos destinados a la elaboración de productos lácteos probióticos. A partir de muestras de heces de 27 lactantes, se han obtenido 500 aislados, de los cuales se han seleccionado un total de 151 aislados pertenecientes a los géneros *Lactobacillus, Bifidobacterium* y *Enterococcus.* A continuación

se expone la caracterización *in vitro* de algunas propiedades probióticas y tecnológicas de interés para la elaboración de productos lácteos de 72 aislados de *Lactobacillu*s spp. de heces de lactantes. Las cepas *Lb. casei* Shirota, *Lb. johnsonii* La1 y *Lb. rhamnosus* GG, aisladas de productos comerciales, se utilizaron como referencia.

Determinación *in vitro* de características potencialmente probióticas

Supervivencia durante el tránsito por el aparato gastrointestinal

La supervivencia en el ecosistema gastrointestinal y la adhesión a la mucosa se consideran requisitos fundamentales para que las bacterias probióticas ejerzan su actividad. Las condiciones gastrointestinales se simularon mediante la exposición de nuestros aislados y de las cepas comerciales a ácido clorhídrico (pH 3, 1 h a 37ºC) y la exposición consecutiva a ácido cólico o bilis bovina (1 h a 37ºC) (Haller y col., 2001). De 72 aislados evaluados, 47 mostraron reducciones inferiores a una unidad logarítmica tras el tratamiento secuencial a pH 3 y al ácido cólico (Fig. 1). Las cepas comerciales tuvieron un comportamiento similar. En cuanto a la tolerancia a las sales biliares, todos los aislados, incluidos los lactobacilos comerciales, crecieron en medio sólido con un 0,3% de los ácidos glicocólico y taurodesoxicólico; 37 aislados, junto con los comerciales, crecieron con ácido taurocólico; y sólo *Lb. johnsonii* La1 mostró crecimiento con ácido glicodesoxicólico. Este aislado fue el único que presentó actividad hidrolítica de sales biliares, determinada según Franz y col. (2001).

Las bacterias probióticas presentes en los alimentos deben resistir la actividad de las enzimas presentes en la cavidad oral. Por ello, la resistencia a la lisozima es una propiedad interesante en la selección de probióticos. Ni nuestros aislados ni las cepas de productos comerciales resultaron afectadas por la exposición a 25 μg ml^{-1} de lisozima durante 5 min.

Adhesión a células intestinales

Diversas bacterias probióticas son capaces de adherirse a la mucosa intestinal, prevenir la adhesión de patógenos y estimular su eliminación. Para evaluar *in vitro* la adhesión de bacterias probióticas y la exclusión competitiva de patógenos del epitelio intestinal se utilizó la línea celular humana Caco-2 (Coconnier y col., 1992). Se observaron diferencias considerables entre los distintos aislados ensayados, aunque con 9 se obtuvieron

valores comparables o superiores a los lactobacilos comerciales con capacidad de adherencia demostrada (Fig. 2).

Actividad antimicrobiana

Las bacterias lácticas producen diversos compuestos metabólicos con actividad antimicrobiana de distinta naturaleza (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, CO_2, diacetilo, reuterina y bacteriocinas). . De todos estos compuestos inhibidores, las bacteriocinas (de naturaleza proteica) tienen un interés considerable en seguridad alimentaria. La actividad antimicrobiana de nuestros cultivos se investigó frente a *Escherichia coli* K12, *Listeria innocua* BL 86/26, *Clostridium tyrobutyricum* NZ8, *Staphylococcus aureus* CECT 4013, *L. monocytogenes* Ohio, *E. coli* CECT 4782 (serotipo O157:H7) y *Lactobacillus buchneri* St2A. De los 72 aislados ensayados, 60 produjeron halos de inhibición frente a *E. coli* y 17 frente a *L. innocua*, 3 frente a *Lb. buchneri* St2A, 2 frente a *C. tyrobutyricum* NZ8 y 1 frente a *L. monocytogenes* Ohio. De las cepas comerciales, solamente una (*Lb. rhamnosus* GG) mostró actividad antimicrobiana, inhibiendo el crecimiento de uno de los microorganismos indicadores, *C. tyrobutyricum* NZ8. La actividad antagonista en la mayoría de los casos posiblemente se deba al ácido láctico o acético producido; cuando se emplearon los sobrenadantes neutralizados, sólo se detectó inhibición de los microorganismos indicadores en 3 de los cultivos analizados, apuntando en estos casos la presencia de sustancias inhibidoras de tipo bacteriocina.

Identificación de los aislados potencialmente probióticos

Los aislados seleccionados por su mayor capacidad para sobrevivir a las condiciones gastrointestinales y/o presentar actividad antimicrobiana se identificaron empleando galerías API 50 CHL. Igualmente, se realizó PCR con cebadores específicos de especie para *Lb. paracasei, Lb. rhamnosus* y *Lb. casei* (Ward y col., 1999), *Lb. reuteri, Lb. fermentum, Lb. plantarum* y *Lb. salivarius* (Chagnaud y col., 2001), *Lb. johnsonii* y *Lb. acidophilus* (Walter y col. 2000) y *Lb. brevis* (Guarneri y col., 2001). De 27 aislados, se identificaron 15 como *Lb. rhamnosus*, 8 como *Lb. paracasei*, 3 como *Lb. salivarius* y 1 como *Lb. brevis* (Tabla 1). Tres aislados, identificados inicialmente como *Lb. rhamnosus* por PCR, fueron posteriormente adscritos a *Lb. casei* mediante secuenciación de su rRNA 16S.

Estudio de la seguridad de los aislados potencialmente probióticos

Sensibilidad a antibióticos

La presencia de genes de resistencia a antibióticos que puedan ser transferidos a bacterias patógenas intestinales es uno de los aspectos importantes de la seguridad de cepas probióticas. Los lactobacilos, en general, poseen resistencia natural a diversos antibióticos, pero en la mayoría de los casos esta resistencia no es transferible. En los lactobacilos aislados y seleccionados en el presente trabajo, se ha estudiado la sensibilidad a 13 antibióticos utilizando discos sobre placas de agar. Los 24 aislados ensayados presentaron resistencia a sulfametoxazol, 23 a vancomicina, 22 a trimetoprín, 20 a gentamicina, 3 a ciprofloxacina y 1 a cefoxitina. Las 3 cepas comerciales analizadas presentaron resistencia a sulfametoxazol, trimetoprín y gentamicina, 1 a ciprofloxacina y penicilina y 1 a vancomicina. La mayoría de los lactobacilos son intrínsecamente resistentes a vancomicina; de hecho, se han utilizado, y se utilizan, como probióticos algunas cepas resistentes a vancomicina, sin que existan antecedentes de la transferencia de esta resistencia a otras bacterias. Sin embargo, dicha resistencia es diferente al mecanismo transferible presente en la mayoría de los enterococos. Temmerman y col. (2002) detectaron en 104 cepas de lactobacilos aislados de productos comerciales probióticos resistencia a tetraciclina (29,5%), cloranfenicol (8,5%) y eritromicina (12%). En general, nuestros aislados fueron sensibles a los antibióticos utilizados con más frecuencia, por lo que no pueden considerarse como una fuente de determinantes de resistencia.

Degradación de mucina

La toxicidad de las bacterias lácticas frente a la mucosa del tracto gastrointestinal se considera un aspecto importante de la seguridad de las cepas. La función de la mucosa es proteger a las células epiteliales, por lo que la degradación de mucus intestinal se emplea como indicador de toxicidad. Las cepas que no degradan mucus intestinal o sus glicoproteínas no serán, en principio, invasivas. Ninguno de nuestros aislados ni las cepas comerciales analizadas presentaron actividad mucolítica, evaluada según Zhou y col. (2001).

Producción de aminas biógenas

La capacidad de producir aminas biógenas en alimentos debido a la actividad descarboxilasa de algunos microorganismos puede tener implicaciones toxicológicas. La producción de aminas biógenas por nuestros aislados y las cepas comerciales se evaluó en placas de agar con los aminoácidos histidina, lisina, ornitina y tirosina según Bover-Cid y Holzapfel (1999). Únicamente *Lb. salivarius* PRO 334 produjo un halo de clarificación de 10 mm de diámetro en el medio con tirosina, lo que indica actividad tirosina descarboxilasa.

Caracterización tecnológica

Crecimiento en leche, actividad acidificante y actividad proteolítica

Estas características tecnológicas se examinaron en 30 lactobacilos aislados y en las 3 cepas comerciales. Veinticinco aislados, así como la cepa *Lb. casei* Shirota, crecieron en leche alcanzando niveles superiores a 5×10^8 ufc ml^{-1}. La actividad acidificante de estos aislados se determinó como el pH de los cultivos en leche inoculados al 1% tras 24 h a 37ºC. Trece aislados dieron lugar a un descenso de pH superior a 1 unidad y dos a un descenso superior a 1,5 unidades. En cuanto a las cepas comerciales, destaca el resultado obtenido con *Lb. casei* Shirota, con el que el pH de la leche a las 24 h fue 1,5 unidades inferior al control (Fig. 3).

La actividad proteolítica en leche se estudió según el método descrito por Church y col. (1983) que determina la concentración de grupos α-amino derivados de la hidrólisis de proteínas de la leche. Los resultados se expresan como el incremento de la absorbancia a 340 nm, con respecto a leche control no inoculada. La actividad proteolítica de los lactobacilos fue variable, con valores superiores a 0,10 en 7 de nuestros aislados (Fig. 4). Estos resultados son comparables a los obtenidos por Shihata y Shah (2000) con *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Lb. acidophilus.* En 3 aislados no se detectó la liberación de grupos amino, considerándose por ello como no proteolíticos

Formación de compuestos volátiles en un sistema modelo

La formación de compuestos volátiles se investigó en un sistema modelo consistente en leche inoculada con la bacteria láctica a la que se añadió cuajo y se incubó durante 18 h. Una vez eliminado el suero por centrifugación, se analizó la fracción volátil del precipitado

mediante GC/MS (cromatografía de gases asociada a espectrometría de masas) tras su extracción en un aparato de purga y trampa (Morales y col., 2003). La calidad e intensidad del olor en el sistema modelo se evaluó por un panel de catadores. Para su cuantificación se seleccionaron, mediante GC/MS, más de 30 compuestos volátiles que tenían un valor alto de abundancia. Los resultados de los compuestos volátiles más abundantes en 18 de nuestros aislados y en las 3 cepas comerciales, junto con las puntuaciones de calidad e intensidad del olor, se recogen en la Tabla 2. Los compuestos más abundantes fueron etanol, acetoína y diacetilo. La valoración sensorial fue satisfactoria en la mayoría de los aislados. Algunos descriptores se correlacionaron positivamente con la calidad del olor, a "mantequilla" o "yogur", aunque no se obtuvieron correlaciones significativas entre estos descriptores y compuestos volátiles concretos. Por otra parte, no fue posible agrupar nuestros aislados por especies según la formación de compuestos volátiles.

Conclusión

La caracterización realizada en nuevos aislamientos de bacterias de origen humano nos ha permitido realizar una selección de cepas con potencial probiótico para su utilización en productos lácteos fermentados. Los métodos *in vitro* utilizados para comprobar la adecuación de estos nuevos aislados a los criterios de selección de cepas probióticas están generalmente aceptados. Los aislados con mejores características se están empleando en la elaboración de productos lácteos probióticos. Las futuras actividades con los lactobacilos seleccionados se centrarán en la investigación de otras características probióticas y la confirmación de sus propiedades *in vivo.*

Agradecimientos

Este trabajo se ha financiado con el proyecto AGL2000-0727-C03-3. Raquel Rodríguez disfruta de una beca predoctoral del INIA.

Referencias

Bover-Cid, S. y Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **53:**33-41.

Coconnier, M.H., Klaenhammer, T.R., Kerneis, S., Bernet, M.F. y Servin, A.L. (1992). Protein-mediated adhesion of *Lactobacillus acidophilus* BG2FO4 on human enterocyte and mucus-secreting cell lines in culture. *Appl. Environ. Microbiol*. **58:**2034-2039.

Collins, J.K., Thornton, K. y Sullivan, G.O. (1998). Selection of probiotic strains for human applications. *Int. Dairy J.* **8:**487-490.

Chagnaud, P., Machinis, K., Coutte, L.A., Marecat, A. y Mercenier, A. (2001). Rapid PCR-based procedure to identify lactic acid bacteria: application to six common *Lactobacillus* species. *J. Microbiol. Meth.* **44:**139-148.

Church, F.C., Swaisgood, H.E., Porter, D.H. y Catignani, G.L. (1983). Spectrophotometric assay using o-phtaldialdehyde for determination of proteolysis in milk and isolated milk proteins. *J. Dairy Sci.* **66:**1219-1227.

Franz, C.M.A.P., Specht, I., Haberer, P. y Holzapfel, W.H. (2001). Bile salt hydrolase activity of enterococci isolated from food: screening and quantitative determination. *J. Food Protect.* **64:**725-729.

Guarneri, T., Rossetti, L. y Giraffa, G. (2001). Rapid identification of *Lactobacillus brevis* using polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol.* **33:**377-381

Haller, D., Colbus, H., Gänzle, M. G., Scherenbacher, P., Code, P.C. y Hammes, W.P. (2001). Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastrointestinal ecosystem: a comparative *in vitro* study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Syst. Appl. Microbiol*. **24:**218-226.

Morales, P., Fernández-García, E., Gaya, P. y Núñez, M. (2003). Formation of volatile compounds by wild *Lactococcus lactis* strains isolated from raw ewes' milk cheese. *Int. Dairy J*. **13:**201-209.

Roy, D., Mainville, I. y Mondou, F. (1997). Selective enumeration and survival of bifidobacteria in fresh cheese. *Int. Dairy J*. **7:**785-793.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J. y Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *J. Biotechnol*. **84:**197-215.

Shihata, A. y Sha, N.P. (2000). Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. *Int. Dairy J*. **10:**401-408.

Stanton, C., Coakley, M., Murphy, J.J., Fitzgerald, G.F., Devery, R. y Ross, R.P. (2002). Development of dairy-based functional foods. *Sci. Aliments* **22:**439-447.

Temmerman, R., Pot, B., Huys, G. y Swings, J. (2002). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol*. **81:**1-10.

Walter, J., Tannock, G.W., Tilsala-Timisjarvi, A., Rodtong, S., Loach, D.M., Munro, K., y Alatossava T. (2000). Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species by using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:**297-303.

Ward, L.J.H. y Timmins, M.J. (1999). Differentiation of *Lactobacillus casei, Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* by polymerase chain reaction. *Lett. Appl. Microbiol*. **29:**90-92.

Zhou, J. S., Gopal, P.K. y Gill, H.S. (2001). Potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019) do not degrade gastric mucin in vitro. *Int. J. Food Microbiol.* **63:**81-90.

Tabla 1. Identificación de lactobacilos aislados de heces de lactantes.

Especie	Nº de aislados
Lb. rhamnosus	12
Lb. paracasei	8
Lb. casei	3
Lb. salivarius	3
Lb. brevis	1

Tabla 2. Principales compuestos volátiles[a] y valoración sensorial[b] de un sistema modelo de queso preparado con aislados de lactobacilos procedentes de heces de lactantes y de productos comerciales.

	Acetaldehído	Etanol	Diacetilo	Acetoína	Acido acético	Calidad	Intensidad
Lb. paracasei 55	2.368	613.927	308.146	64.150	4.899	2.7	2.7
Lb. brevis 126	2.829	2278.552	0.416	1.335	2.140	1.2	2.6
Lb. rhamnosus 234	1.530	330.446	381.721	98.243	19.434	2.6	2.6
Lb. rhamnosus 273	2.227	80.220	1032.495	345.152	10.235	2.6	3.0
Lb. rhamnosus 313	2.248	119.926	1801.512	686.880	63.783	3.0	1.5
Lb. rhamnosus 325	0.000	117.111	1446.645	1069.473	12.504	2.6	2.1
Lb. salivarius 334	11.227	1422.194	288.222	83.376	4.426	2.1	3.0
Lb. salivarius 340	0.000	445.053	442.749	136.430	11.215	2.1	2.6
Lb. rhamnosus 344	2.182	1257.290	537.710	181.716	60.995	2.4	2.7
Lb. salivarius 355	0.000	22.513	19.298	6.557	2.732	1.2	0.6
Lb. rhamnosus 370	2.913	110.127	2134.482	916.601	24.177	2.5	1.5
Lb. rhamnosus 374	3.678	288.490	2131.824	1235.384	63.607	2.1	2.4
Lb. casei 426	2.740	64.911	1377.992	612.485	21.774	2.1	3.0
Lb. paracasei 431	2.008	207.783	728.191	139.646	26.563	1.5	1.5
Lb. paracasei 432	1.425	293.153	689.704	197.749	14.912	1.8	1.8
Lb. rhamnosus 448	0.000	24.427	9.230	2.322	1.200	1.5	0.6
Lb. salivarius 452	0.000	45.170	10.633	3.658	2.344	2.4	1.8
Lb. paracasei 461	2.011	169.782	24.245	3.906	5.583	2.4	1.8
Lb. rhamnosus GG	0.000	574.632	274.509	63.295	3.707	2.1	2.0
Lb. acidophilus LA1	11.538	11.818	127.614	33.546	2.595	2.1	2.0
Lb. casei Shirota	0.000	66.012	237.767	63.178	27.840	0.9	2.6

[a] Abundancia relativa
[b] Según una escala de 0 a 3 puntos

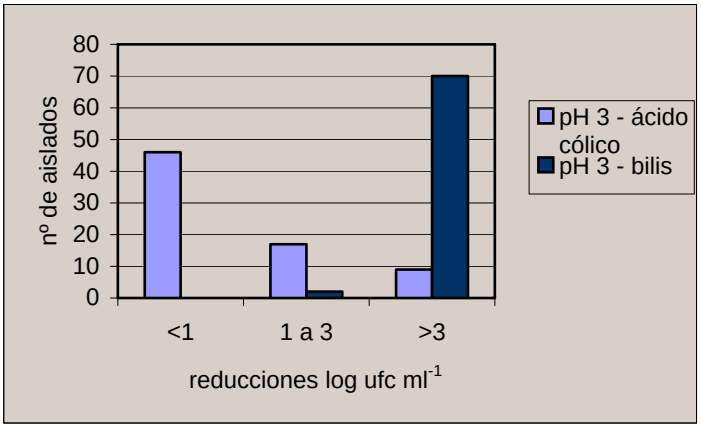


Figura 1. Supervivencia de lactobacilos procedentes de heces de lactantes a las condiciones del tracto gastrointestinal

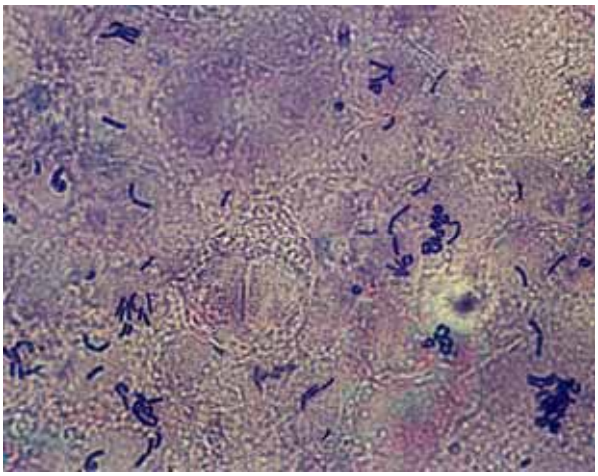


Figura 2. Adherencia de *Lb. rhamnosus* 313 a células Caco-2.

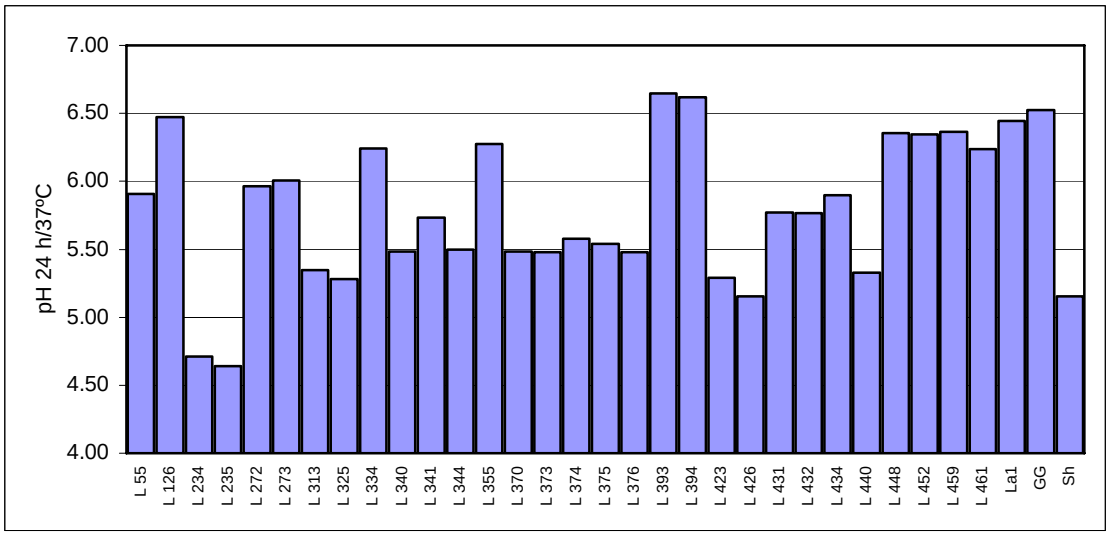


Figura 3. Actividad acidificante en leche de aislados de lactobacilos procedentes de heces de lactantes y de productos comerciales.

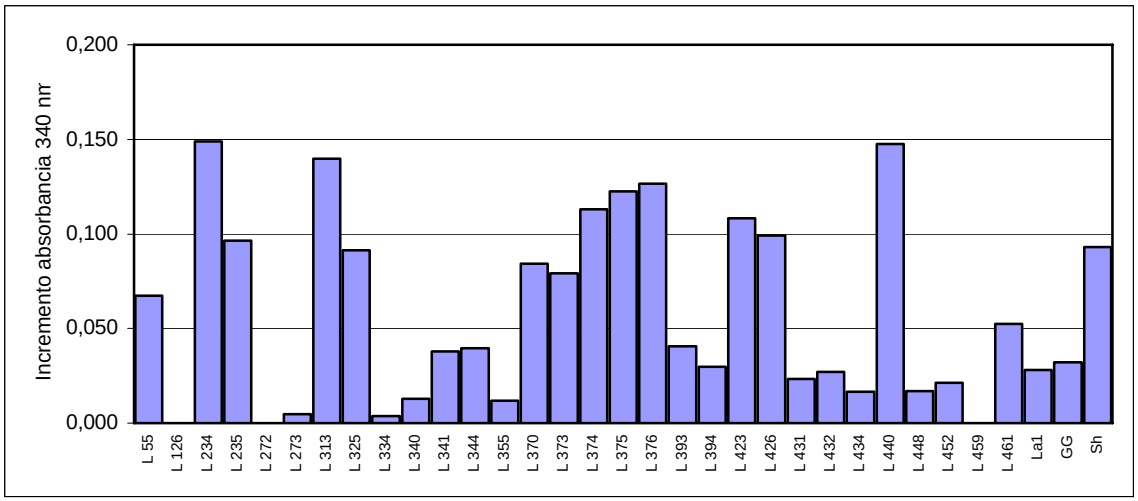


Figura 4. Actividad proteolítica en leche de aislados de lactobacilos procedentes de heces de lactantes y de productos comerciales.

CAPÍTULO 10

Bifidobacterium lactis Y SU EMPLEO EN PRODUCTOS LÁCTEOS FERMENTADOS

Teresa Requena, Carolina Janer y Carmen Peláez

Departamento de Ciencia y Tecnología de Productos Lácteos, Instituto del Frío (CSIC), 28040 Madrid

Las leches fermentadas poseen una gran aceptación social basada en su tradicional reputación como alimentos saludables y en sus excelentes características sensoriales. La diversificación en los últimos años en cuanto a la presentación comercial de estos productos, junto a las tendencias actuales dirigidas al consumo de alimentos saludables, han convertido a las leches fermentadas en componentes idóneos de una dieta funcional y candidatos por excelencia a la incorporación de microorganismos probióticos. Se han llevado a cabo numerosas investigaciones dirigidas a la incorporación de probióticos en diferentes productos lácteos, como leches fermentadas (yogur, kefir), helados (incluido yogur helado) y quesos (Heller, 2001; McBrearty y col., 2001; Haynes y Plaine, 2002). Las bacterias probióticas adicionadas a estos productos pertenecen fundamentalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y dentro de las bifidobacterias, la especie que presenta una mejor aptitud para su incorporación en productos lácteos es *Bifidobacterium lactis*.

Origen y taxonomía de *Bifidobacterium lactis*

Las bifidobacterias son microorganismos anaerobios obligados que no se desarrollan en presencia de oxígeno. Excepcionalmente, *Bifidobacterium lactis* es una especie tolerante al oxígeno hasta una concentración del 10%, lo que resulta tecnológicamente de gran interés para su incorporación en productos fermentados comerciales. Además, presenta una alta tolerancia a valores bajos de pH como los que existen en las leches fermentadas. Ambas propiedades diferencian claramente esta especie del resto de las bifidobacterias.

La identificación de la especie *B. lactis* se realizó por Meile y col. (1997) a partir de un aislamiento de yogur. Los estudios posteriores llevados a cabo para la diferenciación taxonómica de las especies de bifidobacterias reflejan que *B. lactis* presenta la mayor separación filogenética con respecto al resto de bifidobacterias normalmente presentes en el tracto intestinal humano. La Fig. 1 muestra, a modo de ejemplo, un árbol filogenético basado en la secuencia nucleotídica parcial del gen que codifica la enzima transaldolasa y los porcentajes de identidad de esta secuencia entre las especies del género *Bifidobacterium*

presentes habitualmente en el tracto intestinal humano y *B. lactis* (Requena y col., 2002). La especie bacteriana con la que *B. lactis* presenta mayor homología es *B. animalis*, de origen animal; de tal manera que se han llegado a definir como especies sinónimas (Cai y col., 2000). El estudio de diferenciación taxonómica entre estas dos especies de bifidobacterias tan próximas, e incluso la diferenciación de *B. lactis* con el resto de especies de origen humano, se ha realizado fundamentalmente sobre la base del análisis comparativo de secuencias de genes altamente conservados, pero que mantienen dominios variables. En este sentido, el gen más utilizado para la diferenciación taxonómica entre especies bacterianas ha sido el que codifica la subunidad 16S del RNA ribosómico. Sin embargo, entre las especies de bifidobacterias el grado de identidad de este gen es muy alto, situándose entre 93 y 99% (Miyake y col., 1998). Por lo tanto, se han realizado diferentes estudios de investigación encaminados a la selección de otros marcadores genéticos que posibiliten una mejor diferenciación entre las especies de bifidobacterias, como son los que proponen como elemento diferencial la secuencia nucleotídica que codifica la proteína de choque térmico HSP60 (Jian y col., 2001), la lactato deshidrogenasa (Roy y Sirois, 2001) o la ya mencionada transaldolasa (Requena y col., 2002). En el caso de especies tan próximas taxonómicamente como *B. lactis* y *B. animalis*, sólo ha sido posible diferenciarlas con el análisis de la secuencia nucleotídica del espaciador interno transcrito entre los genes que codifican las subunidades de RNA ribosómico 16S y 23S (Ventura y Zink, 2002). Estos autores sugieren que la separación taxonómica entre estos microorganismos sea sólo a nivel de subespecie; aunque destacan una característica fisiológica distintiva entre ambas especies, y de gran importancia práctica, que es la capacidad de *B. lactis* para crecer en medios basados en componentes lácteos, mientras que *B. animalis* crece escasamente en leche.

El empleo de técnicas de biología molecular como la separación de fragmentos de DNA de gran tamaño por electroforesis en campo pulsado, PCR, PCR-ELISA, electroforesis en gel desnaturalizante de productos de PCR, etc., para la rápida y certera identificación de una especie o incluso de una cepa dentro de un complejo ecosistema bacteriano como es el intestino, es una valiosa herramienta para poder evaluar la implantación de una cepa probiótica y consecuentemente su posible actividad beneficiosa en el organismo humano.

Propiedades beneficiosas para la salud de *B. lactis*

Dentro de las características más importantes que deben cumplir los microorganismos probióticos vehiculados en la dieta están la viabilidad en el producto y la capacidad de

mantenerse viables durante su paso a través del tracto gastrointestinal, característica dificultada por las condiciones muy ácidas del estómago, la riqueza en proteasas del medio y el efecto inhibitorio de las sales biliares del intestino. Considerando estas características importantes para la selección *in vitro* de candidatos probióticos, Prasad y col. (1998) llevaron a cabo un estudio sobre 200 cepas bacterianas, de las que seleccionaron cuatro, tres de origen lácteo y una de origen humano, ya que habían respondido favorablemente a las características buscadas: capacidad para estimular la respuesta inmune en ratones y resistencia a la presencia de ácidos y a una alta concentración de sales biliares. De las cuatro cepas seleccionadas tres eran lactobacilos y una se identificó como *B. lactis* HN019. Estudios posteriores realizados por el mismo grupo de investigación con esta cepa, han demostrado que posee un amplio abanico de propiedades probióticas. Entre otras, la capacidad de competir con patógenos intestinales como *E. coli* enterotoxigénico, rotavirus y *Salmonella* y estimular la respuesta inmune natural y adquirida, destacando la capacidad de reforzar las defensas inmunes de la población de edad avanzada (Gill y col., 2001; Shu y col., 2000 y 2001).

Otra de las cepas de *B. lactis* que ha demostrado elevado potencial probiótico es la cepa Bb-12, empleada en la mayoría de productos lácteos y formulaciones infantiles distribuidos comercialmente. Dentro de las características descritas para esta cepa destacan actividad antimutagénica, competencia bacteriana y antirotavirus en el intestino y reducción de reacciones alérgicas infantiles (Juntunen y col., 2001; Kirjavainen y col., 2002; Lo y col., 2002).

Considerando que *B. lactis* no es de origen humano, se han llevado a cabo estudios que demuestran cierta capacidad de *B. lactis* para adherirse a la mucosa intestinal (Juntunen y col., 2001; Matsumoto y col., 2002). Esta característica podría intervenir en los mecanismos de exclusión competitiva de *B. lactis* frente a patógenos, la estimulación de respuesta inmunitaria y, eventualmente, la implantación como microbiota residente del intestino (Gopal y col., 2001). Se ha demostrado en algunas ocasiones la presencia de *B. lactis* en heces de individuos en los periodos previos a los ensayos sobre el efecto de su consumo como probiótico en la dieta, lo que indicaría que esta bacteria podría formar parte de la microbiota intestinal residente (Alander y col., 2001). Contrariamente, en la mayoría de los estudios de intervención llevados a cabo con voluntarios se ha demostrado la presencia de *B. lactis* en heces únicamente durante el período de la ingesta de estos probióticos, desapareciendo al interrumpirse ésta, por lo que la conclusión general de estos estudios es que *B. lactis* sólo coloniza transitoriamente el colon (Satokari y col., 2001; Malinen y col., 2002). No obstante, sería posible mantener una población intestinal transeúnte de *B. lactis*, con los consecuentes

efectos beneficiosos, mediante el consumo habitual de productos que contengan este microorganismo en altos niveles de viabilidad.

Utilización de oligosacáridos y proteínas por *B. lactis*

La secuenciación del genoma de *B. longum* por Schell y col. (2002) ha mostrado la existencia en estos microorganismos de genes que codifican actividades enzimáticas relacionadas con la hidrólisis de una gran variedad de oligosacáridos prebióticos no digeribles por las enzimas del tracto intestinal. Estas actividades enzimáticas les confieren una ventaja competitiva frente a otros microorganismos intestinales y explica su adaptación a este medio. Con el fin de analizar si *B. lactis* utiliza los mismos mecanismos competitivos que *B. longum,* hemos llevado a cabo un estudio del crecimiento de la cepa *B. lactis* DSM10140 en presencia de oligosacáridos derivados de fructosa, cuyo representante más utilizado comercialmente como prebiótico es la inulina. La Fig. 2 muestra los resultados de descenso de pH durante 24 horas de crecimiento a 37°C de *B. lactis* en presencia de diferentes carbohidratos. Los resultados indicaron un alto crecimiento de *B. lactis* en presencia de fructo-oligosacáridos de bajo peso molecular como Raftilose® (grado de polimerización medio de 5), similar al encontrado en presencia de glucosa, sacarosa o rafinosa. La tasa de crecimiento de *B. lactis* disminuía con el aumento del grado de polimerización de la molécula ensayada, como es el caso de la inulina de bajo peso molecular (Raftiline® LS; grado de polimerización medio 10) y no se registró crecimiento en presencia de inulina de alto peso molecular (Raftiline® HP; grado de polimerización medio 23). Es interesante destacar que *B. lactis* puede crecer en presencia de polímeros de fructosa, pero no crece en presencia de fructosa como única fuente de carbono, lo cual sugiere que este microorganismo está dotado de mecanismos específicos para el transporte de azúcares que son más eficaces en el transporte de oligosacáridos que de los monómeros que lo componen. De igual manera, se ha descrito la capacidad de *B. lactis* para crecer en presencia de galacto- y xilo-oligosacáridos, mientras que no lo hace en presencia de galactosa ni xilosa (Crittenden y col., 2001).

Una de las enzimas encargadas de la hidrólisis de polímeros de fructosa es la β-fructofuranosidasa. Esta enzima presente en *B. lactis* ha sido caracterizada en nuestro laboratorio (Janer y col., 2003a). Es intracelular y posee un tamaño molecular de 59,4 kDa. La Tabla 1 muestra los resultados de especificidad de sustrato de la enzima, de los que se puede destacar que su actividad es específica para los enlaces β(2-1) entre residuos de fructosa y que su capacidad de hidrólisis disminuye conforme aumenta la longitud de la cadena. La enzima

presenta una baja afinidad por la sacarosa, que es el dímero que se sitúa en el extremo de estos fructo-oligosacáridos. Durante los estudios de actividad de la enzima sobre Raftiline® LS empleando cromatografía de gases e identificación de los productos de hidrólisis por espectrometría de masas, observamos que el mecanismo de hidrólisis de la enzima consistía en la liberación de monómeros de fructosa a partir del extremo no reductor de la cadena y daba lugar a la acumulación de sacarosa y fructosa como productos finales de la reacción enzimática. *B. lactis* probablemente hidroliza la sacarosa por una sacarosa fosforilasa, que se induce en presencia de sacarosa, rafinosa y oligofructosas (Trindade y col., 2003). La incapacidad de *B. lactis* para crecer en presencia de inulina de alto peso molecular (Raftiline® HP; Fig. 2) estaría relacionada tanto con la ausencia de fructosidasas extracelulares en este microorganismo como con la falta de mecanismos de transporte especializados en moléculas de alto tamaño molecular.

La Tabla 2 muestra los resultados de otras actividades glicolíticas y de actividades proteolíticas de *B. lactis* en función del medio de crecimiento en el que se ha realizado el cultivo del microorganismo. En todos los casos, los resultados obtenidos reflejan una escasa actividad cuando las células se han crecido en un medio muy rico en nutrientes de bajo peso molecular (MRS), mientras que aumentaban en un medio más rico en proteínas como es la leche. El análisis del genoma de *B. longum* (Schell y col., 2002) revela la presencia en estos microorganismos de un elevado número de genes (>20) que codifican actividades peptidásicas, indicando la capacidad de estos microorganismos para crecer en presencia de medios ricos en sustratos proteicos como es el contenido intestinal. Comparando los resultados de actividad con otras bacterias lácticas como *Lactococcus lactis* y *Lactobacillus casei*, más ampliamente estudiados, cabe destacar que *B. lactis* posee una elevada actividad prolina aminopeptidasa, siendo la prolina el aminoácido que se encuentra en mayor proporción en las proteínas lácteas.

Viabilidad de *B. lactis* en productos lácteos

Como se ha mencionado anteriormente, las bifidobacterias muestran una baja tasa de crecimiento y viabilidad en leches fermentadas debido a su naturaleza anaeróbica. De todas las especies de bifidobacterias estudiadas, *B. lactis* muestra los mayores valores de crecimiento y supervivencia en productos lácteos fermentados debido a su resistencia a tensiones medias de oxígeno y bajo pH. Se han descrito recuentos elevados de este

microorganismo durante la fabricación y maduración de queso Cheddar (McBrearty y col., 2001).

La capacidad de implantación en el intestino de bifidobacterias o, cuando menos, la capacidad de ejercer una actividad metabólica beneficiosa como microbiota transeúnte, depende en gran medida de su ingestión en cantidades significativas. De ahí la gran importancia del mantenimiento de unos niveles altos de viabilidad en los productos fermentados adicionados con estos microorganismos. En nuestro laboratorio se han llevado a cabo trabajos para analizar el potencial de componentes derivados del suero de quesería, como son el caseinmacropéptido (CMP) y el concentrado de proteínas de suero (WPC), para mejorar el crecimiento de *B. lactis* en leche (Janer y col., 2003b). La realización de estos estudios con subproductos de quesería tiene el valor añadido de contribuir al aprovechamiento de los mismos a la vez que se reduce el riesgo de contaminación ambiental. El CMP es un glicopéptido hidrofílico derivado de la hidrólisis de la κ-caseína por acción del cuajo durante la elaboración del queso. Contiene aminoazúcares como ácido siálico y N-acetilgalactosamina que pueden ser fermentados por bifidobacterias (Idota y col., 1994). Otros componentes de la leche que pueden estimular el crecimiento de las bifidobacterias son péptidos procedentes de la hidrólisis proteica de la lactoferrina (Liepke y col., 2002).

Dentro de los estudios de mejora del crecimiento de *B. lactis* en leche, hemos analizado el efecto de añadir a la leche un concentrado de proteínas de suero (WPC), con un contenido en proteína del 35%, y los CMPs procedentes de suero de vaca y de mezcla de leche de oveja y cabra. La Fig. 3 muestra los resultados obtenidos de viabilidad de *B. lactis* durante su incubación en leche sin adicionar y adicionada con los CMPs o con WPC. Como puede observarse, tanto los CMPs como el WPC mejoraron el crecimiento de *B. lactis* en leche, aunque el efecto fue superior con WPC, con el que se alcanzaron niveles de 1×10^9 ufc ml^{-1} después de incubar 24 horas a 37°C.

Teniendo en cuenta que el WPC es un suplemento lácteo de bajo coste y que hemos comprobado su efecto bifidogénico, se elaboraron leches fermentadas empleando como cultivo iniciador *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* y *B. lactis*, suplementando además la leche con WPC con el objeto de incrementar los recuentos de bifidobacterias (Martín-Diana y col., 2003). La Fig. 4 muestra los resultados obtenidos de los recuentos de bifidobacterias al final de la elaboración y después de 21 días de conservación en refrigeración (4°C) de leche fermentada sin adición de WPC (A), WPC añadido al 3% (B) y al 5% (C). Cuando no se añadió WPC no se detectó incremento en el recuento de *B. lactis* durante el proceso de fermentación a 44°C (alrededor de 8 horas), manteniéndose al nivel del

inóculo que fue del orden de 3×10^6 ufc g^{-1}. Durante el almacenamiento en refrigeración, se observó un descenso de recuentos, pero se mantuvieron siempre por encima de 10^7 ufc g^{-1} en las leches fermentadas suplementadas con WPC. Este es el límite mínimo de bacterias viables en el producto en el momento de la ingesta que se acepta como necesario para conseguir los beneficios en salud asociados a las bacterias probióticas (Stanton y col., 2001).

Conclusiones

La demanda creciente de productos lácteos fermentados adicionados de bacterias probióticas que aumenten el valor añadido de su papel funcional, es una realidad actual y una apuesta de futuro para la innovación empresarial y la investigación y desarrollo en el campo de la alimentación. Las bifidobacterias forman parte de la microbiota intestinal y sus posibles propiedades beneficiosas en la salud han sido el foco de atención en los últimos años, dando lugar a numerosos trabajos de investigación y estudios de intervención en humanos. De todas ellas, la especie *B. lactis* presenta la mejor potencialidad tecnológica para su incorporación en productos lácteos fermentados debido a una cierta tolerancia al oxígeno y a valores bajos de pH en relación con otras especies de bifidobacterias. Su relativa separación filogenética del resto de los miembros del género facilita su identificación por técnicas moleculares en ecosistemas complejos como el intestino humano. El posible efecto beneficioso de *B. lactis* en la salud humana depende en gran medida de su capacidad de adaptación a las condiciones presentes en el tracto gastrointestinal, para lo que se sirve eventualmente de mecanismos de interacción con la mucosa intestinal y de un sistema enzimático que hidroliza competitivamente oligosacáridos prebióticos presentes en la dieta. Además, su presencia en el intestino, bien como microbiota implantada o como microbiota transeúnte, requiere obligatoriamente de su ingesta en elevadas cantidades. Este hecho puede conseguirse aumentando la capacidad de crecimiento y viabilidad de *B. lactis* en productos fermentados mediante la adición de sustancias con efecto bifidogénico.

Referencias

Alander M., Mättö, J., Kneifel, W., Johansson, M., Kögler, B., Crittenden, R., Mattila-Sandholm, T. y Saarela, M. (2001). Effect of galacto-oligosaccharide supplementation on human faecal microflora and on survival and persistence of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in the gastrointestinal tract. *Int. Dairy J.* **11:**817–825.

Cai, Y., Matsumoto, M. y Benno, Y. (2000). *Bifidobacterium lactis* Meile et al. 1997 is a subjective synonym of *Bifidobacterium animalis* (Mitsuoka 1969) Scardovi and Trovatelli 1974. *Microbiol Immunol*. **44:**815–820.

Crittenden, R.G., Morris, L.F., Harvey, M.L., Tran, L.T., Mitchell, H.L. y Playne, M.J. (2001). Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a synbiotic yoghurt. *J. Appl. Microbiol.* **90:**268–278.

Gill, H.S., Rutherfurd, K.J., Cross, M.L. y Gopal, P.K. (2001). Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am. J. Clin. Nutr.* **74:**833-839.

Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J. y Gill, H.S. (2001). *In vitro* adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* **67:**207–216.

Haynes, I.N. y Plaine, M.J. (2002). Survival of probiotic cultures in low-fat ice-cream. *Aust. J. Dairy Technol.* **57:**10–14.

Heller, K.J. (2001). Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. *Am. J. Clin. Nutr.* **73:**374S–379S.

Idota, T., Kawakami, H. y Nakajima, I. (1994). Growth-promoting effects of N-acetylneuraminic acid-containing substances on bifidobacteria. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **58:**1720–1722.

Janer, C., Rohr, L., Peláez C., Laloi, M., Cleusix, V., Requena, T. y Meile, L. (2003a). Hydrolysis of oligofructoses by the β-fructofuranosidase of *Bifidobacterium lactis*. *Syst. Appl. Microbiol.* (enviado).

Janer, C., Peláez, C. y Requena, T. (2003b). Caseinomacropeptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. *Food Chem.* (en prensa)

Jian, W., Zhu, L. y Dong, X. (2001). New approach to phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* based on partial HSP60 gene sequences. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51:**1633–1638.

Juntunen, M., Kirjavainen, P.V., Ouwehand, A.C., Salminen, S.J. e Isolauri, E. (2001). Adherence of probiotic bacteria to human intestinal mucus in healthy infants and during rotavirus infection. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8:**293–296.

Kirjavainen, P.V., Arvola, T., Salminen, S.J. e Isolauri, E. (2002). Aberrant composition of gut microbiota of allergic infants: a target of bifidobacterial therapy at weaning? *Gut* **51:**51–55.

Liepke, C., Adermann, K., Raida, M., Magert, H.J., Forssmann, W.G. y Zucht, H.D. (2002). Human milk provides peptides highly stimulating the growth of bifidobacteria. *Eur. J. Biochem.* **269:**712–718.

Lo, P.R., Yu, R.C., Chou, C.C. y Tsai, Y.H. (2002). Antimutagenic activity of several probiotic bifidobacteria against benzo[a]pyrene. *J. Biosci. Bioeng.* **94:**148–153.

Malinen, E., Matto, J., Salmitie, M., Alander, M., Saarela, M. y Palva, A. (2002). PCR-ELISA II: Analysis of *Bifidobacterium* populations in human faecal samples from a consumption trial with *Bifidobacterium lactis* Bb-12 and a galacto-oligosaccharide preparation. *Syst. Appl. Microbiol.* **25:**249–258.

Martín-Diana, A.B., Janer, C., Peláez, C. y Requena, T. (2003). Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *Int. Dairy J.* **13:** (en prensa).

Matsumoto, M., Tani, H., Ono, H., Ohishi, H. y Benno, Y. (2002). Adhesive property of *Bifidobacterium lactis* LKM512 and predominant bacteria of intestinal microflora to human intestinal mucin. *Curr. Microbiol.* **44:**212–215.

McBrearty, S., Ross, R.P., Fitzgerald, G.F., Collins, J.K., Wallace, J.M. y Stanton, C. (2001). Influence of two commercially available bifidobacteria cultures on Cheddar cheese quality. *Int. Dairy J.* **11:**599–610.

Meile, L., Ludwig, W., Rueger, U., Gut, C., Kaufmann, P., Dasen, G., Wenger, S. y Teuber, M. (1997). *Bifidobacterium lactis* sp. nov., a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. *Syst. Appl. Microbiol.* **20:**57–64.

Miyake, T., Watanabe, K., Watanabe, T. y Oyaizu H. (1998). Phylogenetic analysis of the genus *Bifidobacterium* and related genera based on 16S rDNA sequences. *Microbiol. Immunol.* **42:**661–667.

Prasad, J., Gill, H., Smart, J. y Gopal, P.K. (1998). Selection and characterisation of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains for use as probiotics. *Int. Dairy J.* **8:**993–1002.

Requena, T., Burton, J., Matsuki, T., Munro, K., Simon, M.A., Tanaka, R., Watanabe, K. y Tannock, G.W. (2002). Identification, detection, and enumeration of human bifidobacterium species by PCR targeting the transaldolase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:**2420–2427.

Roy, D. y Sirois, S. (2001). Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the ldh gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **191:**17–24.

Satokari, R.M., Vaughan, E.E., Akkermans, A.D., Saarela, M. y de Vos, W.M. (2001). Polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis monitoring of

fecal bifidobacterium populations in a prebiotic and probiotic feeding trial. *Syst. Appl. Microbiol.* **24:**227–231.

Schell, M.A., Karmirantzou, M., Snel, B., Vilanova, D., Berger, B., Pessi, G., Zwahlen, M-C., Desiere, F., Bork, P., Delley, M., Pridmore, R.D. y Arigoni, F. (2002). The genome sequence of *Bifidobacterium longum* reflects its adaptation to the human gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99:**14422–14427.

Shu, Q., Lin, H., Rutherfurd, K.J., Fenwick, S.G., Prasad, J., Gopal, P.K. y Gill, H.S. (2000). Dietary *Bifidobacterium lactis* (HN019) enhances resistance to oral *Salmonella typhimurium* infection in mice. *Microbiol. Immunol.* **44:**213–222.

Shu, Q., Qu, F. y Gill, H.S. (2001). Probiotic treatment using *Bifidobacterium lactis* HN019 reduces weanling diarrhoea associated with rotavirus and *Escherichia coli* infection in a piglet model. *J. Pediatr. Gastr. Nutr.* **33:**171–177.

Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P.B. y Ross, R.P. (2001). Market potential for probiotics. *Am. J. Clin. Nutr.* **73:**476S–483S.

Trindade, M.I., Abratt, V.R. y Reid, S.J. (2003). Induction of sucrose utilisation genes from *Bifidobacterium lactis* by sucrose and raffinose. *Appl. Environ. Microbiol.* **69:**24–32.

Ventura, M. y Zink, R. (2002). Rapid identification, differentiation, and proposed new taxonomic classification of *Bifidobacterium lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:**6429–6434.

Tabla 1. Especificidad de sustrato de la β-fructofuranosidasa de *Bifidobacterium lactis*

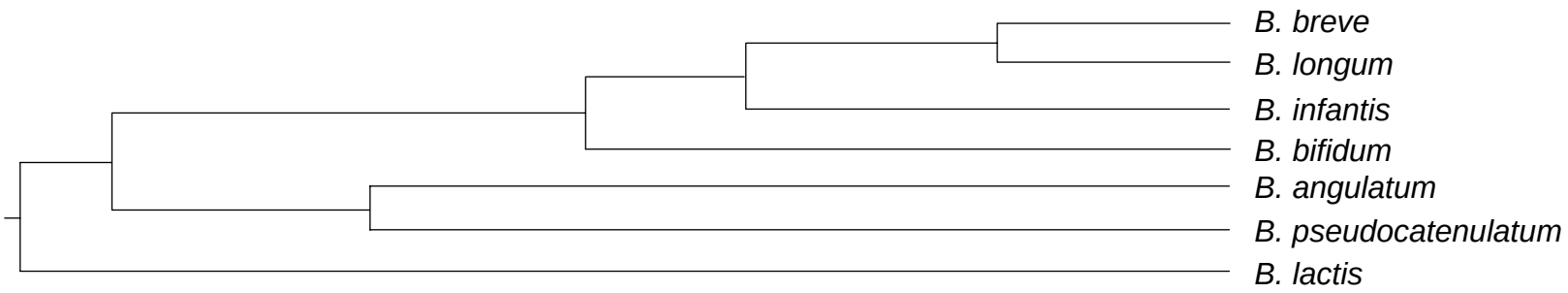
Sustrato	Actividad[1] (%)
Melezitosa (α-D-Glc-(1→3)-β-D-Fru-(2→1)-α-D-Glc)	–
Levano (β-D-Fru-(2→6)-(β-D-Fru)$_n$	2,5 ± 0,1
Rafinosa (α-D-Gal-(1→6)-α-D-Glc-(1→2)-β-D-Fru)	0,3 ± 0,1
Sucrosa (α-D-Glc-(1→2)-β-D-Fru)	5,9 ± 1,5
Raftiline® HP (α-D-Glc-(1→2)-(β-D-Fru)$_n$ [n ≅ 23])	9,8 ± 1,5
Raftiline® LS (α-D-Glc-(1→2)-(β-D-Fru)$_n$ [n ≅ 10])	29 ± 0,8
Raftilose® (β-D-Fru-(1→2)-(β-D-Fru)$_n$ [n ≅ 5])	100

[1]Actividad relativa a la actividad frente a Raftilose® (100%); –, actividad no detectada; nd, actividad no determinada. Glc, glucosa; Fru, fructosa; Gal, galactosa.

Tabla 2. Actividades glicolíticas y proteolíticas de *Bifidobacterium lactis*

Actividad[1]	MRS	Leche
α-galactosidasa	0,004	0,350
β-galactosidasa	0,019	2,421
α-Nac-galactosaminidasa	–	–
β-Nac-galactosaminidasa	–	–
Neuraminidasa	–	–
Leucina aminopeptidasa	–	0,060
Lisina aminopeptidasa	–	0,026
Prolina aminopeptidasa	–	0,129
PepX	–	0,057
PepO	–	–

[1]Actividad expresada en µmol de sustrato liberado por minuto y por mg de proteína del extracto intracelular libre de células.
–: Actividad no detectada.



		1	2	3	4	5	6	7
1	*B. infantis*	100	94,4	92,1	92,4	82,8	87,1	85,1
2	*B. longum*		100	92,7	96,7	84,1	87,7	85,4
3	*B. bifidum*			100	90,1	84,4	88,1	85,8
4	*B. breve*				100	81,8	85,8	83,1
5	*B. pseudocatenulatum*					100	88,1	83,8
6	*B. angulatum*						100	84,8
7	*B. lactis*							100

Figura 1. Dendograma y porcentajes de identidad entre bifidobacterias basados en la secuencia nucleotídica parcial del gen que codifica la enzima transaldolasa.

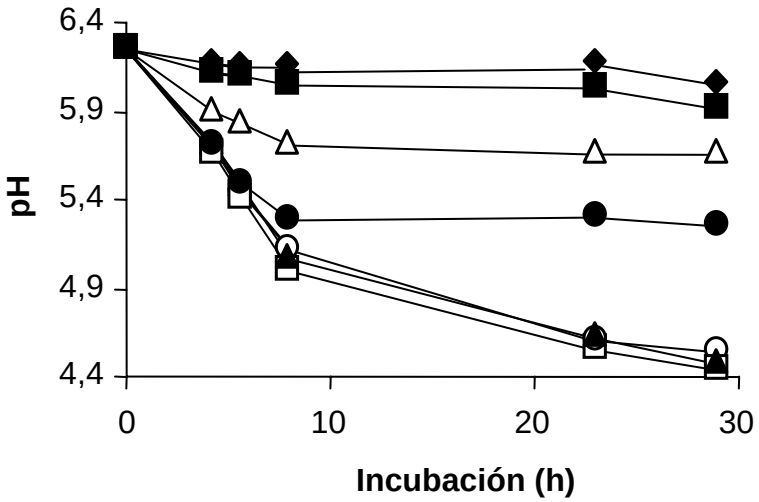


Figura 2. Crecimiento de *B. lactis* en presencia de diferentes fuentes de carbono: glucosa (○), fructosa (■), sacarosa (▲), rafinosa (□), Raftilose® (●), Raftiline® LS (△) y Raftiline® HP (◆).

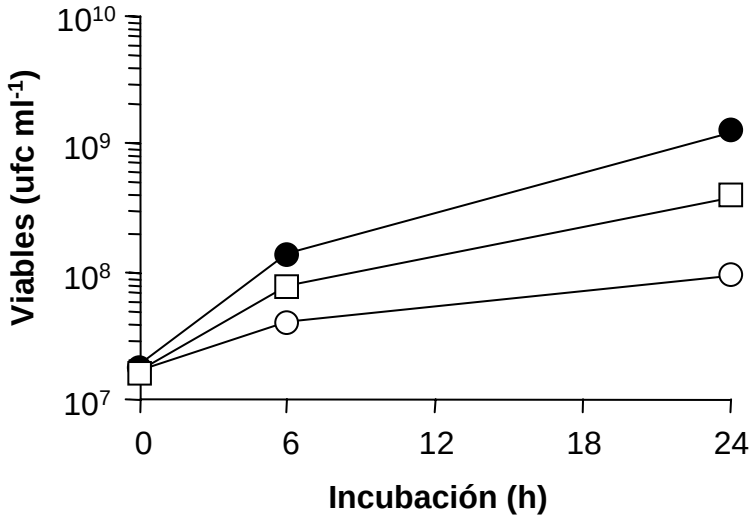


Figura 3. Crecimiento de *B. lactis* en leche (○), leche suplementada con caseinmacropéptido (CMP; □) o concentrado de proteínas de suero (WPC; ●).

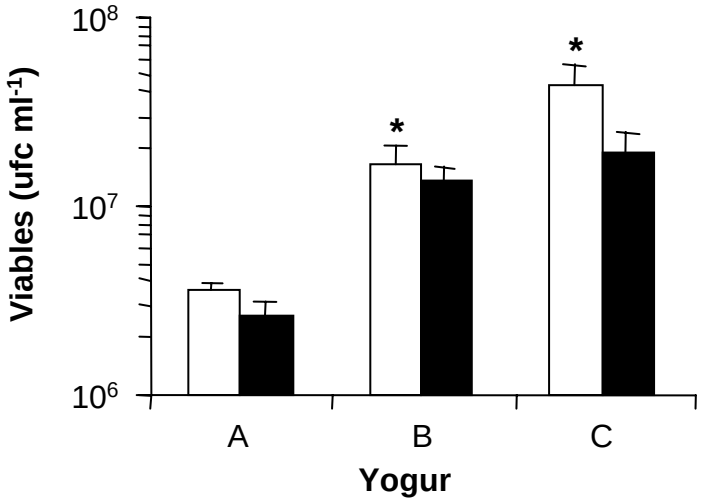


Figura 4. Recuentos (ufc g^{-1}) de *B. lactis* en leches fermentadas a partir de (A) leche sin adición de concentrado de proteínas de suero (WPC), (B) leche suplementada con 3% de WPC y (C) con 5% WPC, al principio (1 día; columnas blancas) y al final (21 días; columnas negras) de la conservación a 4°C.

CAPÍTULO 11

BACTERIAS LÁCTICAS COMO PROBIÓTICOS EN POLLOS

Margarita Garriga y Marta Hugas

Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaries (IRTA), Centro de Tecnología de la Carne, 17121 Monells, Girona

1. Introducción

La microbiota intestinal constituye el reservorio bacteriano más importante en los animales. Formando parte de esta microbiota, que se instaura rápidamente después del nacimiento siguiendo un orden más o menos determinado según la especie animal, encontramos dos tipos de microorganismos: aquellos que colonizan el tracto intestinal de forma permanente y los que lo hacen de forma transitoria.

Aunque cada especie animal presenta una compleja microbiota intestinal con una composición distinta y específica, son las bacterias lácticas las que se encuentran en mayor cantidad y regularidad y, por lo tanto, su estudio presenta un interés especial. Las funciones de la microbiota intestinal son diversas y entre ellas cabe destacar: la mejora del tránsito gastrointestinal, la síntesis de vitaminas del grupo B y vitamina K, la influencia en las secreciones digestivas y hormonales, la degradación de glúcidos y proteínas, la hidrólisis de lípidos o la producción de substancias antimicrobianas.

En condiciones de salud, la microbiota intestinal tiende a mantener un estado de equilibrio en el que todos los microorganismos se encuentran presentes en una proporción determinada; no obstante, ciertos factores (privación de comida y/o agua, desplazamientos, estrés, administración de antibióticos...) pueden desestabilizar el sistema permitiendo a los patógenos colonizar el tracto intestinal. Esta colonización oportunista puede acabar desembocando en una infección.

En aves, *Campylobacter*, *Escherichia coli* y *Salmonella* son los principales microorganismos patógenos que colonizan el tracto gastrointestinal. Aunque su presencia no causa, por lo general, problemas de salud en los propios animales, sí pueden representar un riesgo para la seguridad alimentaria humana. *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium* y *S. heidelberg* han estado implicadas en aproximadamente el 50% de las salmonelosis registradas

en Estados Unidos. Muchas de las intoxicaciones fueron provocadas por huevos contaminados por *S. enteritidis* (Mishu y col. 1994). Generalmente, es difícil conocer el número exacto de casos, porque no todas las toxiinfecciones alimentarias son enfermedades de declaración obligatoria y, en este sentido, los datos son siempre estimativos.

El uso continuado de antibióticos en las explotaciones animales con el fin de aumentar el índice de conversión y prevenir infecciones intestinales conlleva un desequilibrio de la microbiota intestinal beneficiosa y la aparición de bacterias multirresistentes y agresivas, a la vez que facilita la transmisión de microorganismos peligrosos entre los animales, estabulados en poco espacio y que se encuentran en situación de estrés. Como alternativa, se está investigando el desarrollo de probióticos, especialmente después de que en la Unión Europea se haya prohibido recientemente el uso de determinados antibióticos frecuentemente incluidos en piensos como promotores de crecimiento.

Es muy importante mantener en orden la microbiota intestinal para estabilizar o reforzar la barrera protectora contra los microorganismos patógenos. Ésta es la misión que pretenden llevar a cabo los probióticos. Un probiótico es un cultivo de microorganismos vivos que se administra al animal con la intención inicial de prevenir enfermedades infecciosas reforzando la barrera de la microbiota intestinal o mediante un estimulación inespecífica del sistema immunitario (Sögaard y Suhr-Jessen, 1990). Un probiótico debe cumplir una serie de requisitos, como por ejemplo: ser un habitante normal del tracto gastrointestinal de la especie a la que se pretende sea administrado, debe ser capaz de adherirse al epitelio intestinal, resistir el ambiente agresivo intestinal (que supone un pH bajo en el estómago y sales biliares en el intestino) y competir con otros microorganismos presentes.

Desde que Nurmi y Rantala (1973) observaron que administrando suspensiones o cultivos de materia fecal procedente de pollos adultos sanos se reducía el número de animales infectados por *Salmonella* (efecto Nurmi o de exclusión competitiva), han ido surgiendo en el mercado varios productos. Según diversos autores, los productos de composición indefinida parecen ser los más efectivos en la prevención de la colonización cecal por *Salmonella*; sin embargo, se debe valorar el riesgo de transmisión de patógenos mediante este sistema.

La utilización de probióticos como suplementos alimenticios para animales de granja se practica desde hace 30 años. Durante este tiempo han aparecido en el mercado muchas preparaciones de composición diversa, aunque con resultados variables y muchas veces

inconsistentes. Dicha inconsistencia puede ser atribuida a diferentes factores, como escasa viabilidad, administración inapropiada o utilización de organismos erróneos para el animal y para el trastorno u enfermedad que se está previniendo o tratando. El conocimiento de los factores que determinan una respuesta probiótica óptima haría posible la utilización de las preparaciones que consigan el máximo efecto y el descarte de aquellas con actividad baja o nula.

Una viabilidad elevada es de crucial importancia en la expresión del efecto probiótico, pero ¿cuál es la mínima dosis efectiva y cómo y cuándo debe ser administrada esta dosis: de forma continua, periódica...? Una situación ideal sería esperar que después de una dosis única, el probiótico fuera capaz de establecerse de forma permanente en el tracto digestivo del animal y allí persistir durante toda la vida del mismo. En este sentido, y asignando a la capacidad de colonización un papel de vital importancia, factores como la adhesión y la resistencia al ambiente intestinal del hospedador son factores a tener en cuenta.

Los probióticos actúan a través de mecanismos de exclusión competitiva, fijándose en lugares específicos del epitelio intestinal y, en consecuencia, disminuyendo la colonización por patógenos. Aunque el mecanismo de exclusión competitiva no está del todo claro, varios investigadores apuntan diversas formas de actuación (Fox, 1988; Jin y col., 1997):

(1) En el intestino, los microorganismos probióticos metabolizan de forma rápida diversos substratos (carbohidratos, aminoácidos, proteínas...), convirtiéndolos en inaccesibles para los microorganismos patógenos y, en consecuencia, previenen su proliferación

(2) A través de la producción de ácido láctico provocan la reducción del pH intestinal, convirtiendo el ambiente en inapropiado para la multiplicación de los patógenos

(3) Pueden secretar péptidos y proteínas con efecto antimicrobiano frente a determinadas bacterias

(4) Las bacterias lácticas pueden estimular la producción de anticuerpos y la actividad fagocítica contra patógenos, en el intestino y en otros tejidos del cuerpo

(5) Las bacterias beneficiosas incrementan la actividad enzimática en el tracto gastrointestinal.

La interacción entre estos mecanismos favorece el equilibrio de la microbiota intestinal, lo que comporta diversos beneficios para el animal. Las bacterias lácticas han sido

utilizadas ampliamente como probióticos porque forman parte de la microbiota natural de la mayoría de los animales, son seguras (GRAS) y poseen actividad antagonista frente a patógenos.

La experiencia del IRTA

En un proyecto realizado en el IRTA y a partir de pollitos, de diversas edades y procedencias, se aislaron 296 cepas de lactobacilos, de las que se investigó sus propiedades antagonistas, su capacidad de adhesión y su resistencia a sales biliares y a pH 3,0. El 26% de las cepas aisladas produjo inhibición de dos cepas enteropatógenas utilizadas como indicadoras en los ensayos *in vitro* (Fig. 1). Cuando se investigó la capacidad de adhesión y agregación de las cepas antagonistas, se detectaron 14 cepas con una elevada capacidad tanto de agregarse entre sí como de adherirse a células epiteliales del buche de pollo (Fig. 2). En general, las cepas toleraron bien las condiciones ácidas y las sales biliares.

De entre todas las cepas investigadas, se seleccionaron ocho por cumplir *in vitro* todas aquellas características que las convertían en potenciales probióticos. Todas ellas se clasificaron como *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* y el análisis plasmídico reveló perfiles distintos por lo que se concluyó que eran cepas distintas. Finalmente la cepa *Lb. salivarius* CTC2197 fue seleccionada como la más idónea, por sus propiedades antagonistas *in vitro* frente a *Salmonella*, por su elevada adherencia y por su capacidad de colonizar el tracto gastrointestinal de pollitos (Garriga y col., 1998).

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio en granja para valorar la competitividad de dicha cepa preseleccionada como probiótico y su capacidad de minimizar la colonización por *S. enteritidis* durante el engorde de pollos. En los dos ensayos efectuados, los pollitos fueron alojados en jaulas Petersime con seis niveles y cuatro compartimentos en cada nivel, donde cada tratamiento ocupaba un nivel. La inoculación de los animales con *S. enteritidis* y/o *Lb. salivarius* CTC2197 por vía oral se realizó al día de vida mediante una cánula introducida directamente en el proventrículo. A los 14 y 21 días, se sacrificaron 4 (primer ensayo) y 6 animales (segundo ensayo) y a partir de los ciegos se determinó el recuento de lactobacilos y la presencia o ausencia de *Salmonella*.

La trazabilidad de *S. enteritidis* y *Lb. salivarius* CTC2197 en una población microbiana tan numerosa fue realizada por la resistencia al ácido nalidíxico y al cloruro mercúrico, que presentaba la cepa de *Salmonella* inoculada, y por la resistencia a la rifampicina, que portaba de forma natural *Lb. salivarius* CTC2197. Los resultados obtenidos se reflejan en la Tabla 1. Como puede observarse, aquellos animales que habían recibido la cepa probiótica, en forma oral (ensayo 1) y además suplementada en el pienso y agua del primer día (ensayo 2), no estaban colonizados por *Salmonella* a los 21 días. Ensayos posteriores para estudiar la viabilidad en el pienso de la cepa probiótica evidenciaron que una dosis única de 10^5 ufc g^{-1} en el pienso del primer día resultaba suficiente para asegurar la colonización intestinal de los animales después de una semana. Sin embargo, entre los 21 y 28 días de engorde no se detectó la cepa probiótica en algunos broilers, lo que sugiere que serían necesarias dosis periódicas para asegurar su colonización hasta el final.

Conclusiones

En el mercado existen diversos probióticos, compuestos únicamente por una cepa de microorganismos, como por ejemplo Gaia (*Lactobacillus reuteri*), o preparaciones con muchas cepas como Protexin, que además de bacterias lácticas contiene mohos y levaduras. Mientras que los probióticos bacterianos han sido efectivos en pollos y cerdos, los probióticos fúngicos como Yeasacc (*Saccharomyces cerevisiae*) y Amaferm (*Aspergillus oryzae*) han dado mejores resultados en rumiantes adultos.

El uso de un probiótico que contenga más de una cepa puede estar justificado si se espera que sea activo en varias especies animales diferentes y en un rango de condiciones adversas, incluyendo infecciones microbianas. El tipo de probiótico tendría que estar también relacionado con la edad del animal; un animal recién nacido es mucho más receptivo a un probiótico que un animal adulto con una microbiota más estable y, en consecuencia, más difícilmente influenciable.

Mucha de la información sobre el uso de probióticos en animales de granja deriva de ensayos experimentales desarrollados por organizaciones comerciales productoras de probióticos, que pocas veces ven la luz en publicaciones científicamente reconocidas, por lo que es difícil valorar los resultados. Algunas veces, las interpretaciones son más que

optimistas y ayudan a crear una mística de los probióticos carente de una valoración adecuada y real (Barrow, 1992). Sin embargo también existen publicaciones científicas de la probada eficacia de los probióticos en animales de granja.

Puede concluirse que si se suministra el probiótico adecuado en el momento apropiado y a la dosis correcta, ejercerá un efecto significativo en la salud del animal y/o en su crecimiento, que se reflejará en una mejora económicamente significativa para el ganadero y en una mayor garantía sanitaria para el consumidor. Actualmente, la Unión Europea prohibe que substancias activas utilizadas como aditivos alimentarios puedan ser comercializadas como materias primas o como alimentos dietéticos. La normativa actual permite la utilización de probióticos como aditivos alimentarios y según la Directiva 94/40/CEE del 22 de Julio de 1994 (DOCE nº L208-11/8/94), en la que se fijan las directrices para la evaluación de los aditivos en alimentación animal, para homologar un aditivo alimentario es necesario depositar, en un país de la Unión Europea, un dossier que contenga: la identificación del producto, las características y condiciones de uso, estudios sobre la probada eficacia del mismo en animales de la especie en la que se pretende utilizar, así como estudios toxicológicos que determinen la seguridad de su utilización, tanto para el propio animal como para el hombre que manipule o consuma los productos derivados.

Como conclusión final, podemos destacar que aunque el uso de probióticos en avicultura no debe interpretarse como algo “milagroso”, puede contribuir a la solución de problemas de diversa índole, además de no dejar residuos indeseables en las canales.

Referencias

Barrow, P.A. (1992). Probiotics for chicken. En *Probiotics. The Scientific Basis*, Fuller, R. (Ed.), p. 225-257. Chapman and Hall, London.

Fox, S.M. (1988). Probiotics: Instestinal inoculants for production animals. *Veterinary Medicine* **83:** 806-829.

Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J.M. y Hugas, M. (1998). Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *J. Appl. Microbiol*. **84:** 125-132.

Jin, L.Z., Ho., T.W., Abdullah, N. y Jalaludin, S. (1997). Probiotics in poultry: modes of action. *World’s Poultry Science Journal* **53:** 351-368.

Mishu, B., Koehler, J., Lee, L.A., Rodrigues, D., Brenner, F.H., Blake, P. y Tauxe, R.V. (1994). Outbreaks of *Salmonella enteritidis* infection in the United States, 1985-1991. *J. Infect. Dis.* **169:**547-552.

Nurmi, E.V. y Rantala, M. (1973). New aspects of *Salmonella* infection in broiler production. *Nature* **241:**210-211.

Pascual, M., Hugas, M., Badiola, J.I., Monfort, J.M. y Garriga, M. (1999). *Lactobacillus salivarius* CTC2197 prevents *Salmonella enteritidis* colonization in chickens. *App. Environ. Microbiol*. **65:**4981-4986.

Sögaard, H. y Suhr-Jessen, T. (1990). Beyond lactic acid bacteria. *Feed International* **April:**32-37.

Tabla 1. Medias marginales del recuento de lactobacilos y lactobacilos Rif^r en ciegos y porcentaje de animales colonizados por *Salmonella.*

Tratamiento	Recuento en ciegos (log_{10} ufc g^{-1})*						% animales colonizados por *Salmonella*	
	Bacterias lácticas totales			*Lb. salivarius* CTC2197				
	Día 14	Día 21	*P*	Día 14	Día 21	*P*	Día 14	Día 21
Control (A; ensayo 1)	8.76 ± 0.28^{a}	8.60 ± 0.12^{a}	NS	<2.00	<2.00	NS	0	0
Inoculación de *S. enteritidis* C-114								
B (ensayo 1)	9.04 ± 0.12^{a}	7.76 ± 0.24^{b}	<0.001	2.21 ± 0.31^{b}	<2.00	NS	90	70
B' (ensayo 2)	$8.54 \pm 0.29^{a'}$	$8.90 \pm 0.31^{a'}$	NS	<2.00	<2.00	NS	100	100
Inocul. de *Lb. salivarius* CTC2197								
C (ensayo 1)	ND	ND		6.75 ± 0.72^{a}	6.10 ± 0.71^{a}	NS	50	0
C' (ensayo 2)	$6.00 \pm 1.31^{b'}$	$7.81 \pm 0.32^{b'}$	<0.05	$4.18 \pm 1.23^{a'}$	$5.64 \pm 1.56^{a'}$	NS	0	0
Inoculación de *S. enteritidis* C-114 y *Lb. salivarius* CTC2197								
D (ensayo 1)	ND	ND		6.29 ± 0.74^{a}	6.15 ± 0.54^{a}	NS	100	0
D' (ensayo 2)	$6.62 \pm 0.51^{b'}$	$8.36 \pm 0.82^{a',b'}$	<0.01	$5.51 \pm 1.11^{a'}$	$6.25 \pm 1.02^{a'}$	NS	100	0

*Los valores son medias ± desviaciones estándar. El nivel mínimo de detección es 2 log_{10} ufc g^{-1}. Dentro del mismo ensayo se comparan las medias de los distintos tratamientos. Valores en una misma columna con distinto superíndice (p. ej., a y a') difieren significativamente (P<0,05). La significación de las diferencias entre el día 14 y el día 21 después de la inoculación para cada tratamiento se muestra en las filas. NS, no significativo. ND, no determinado.

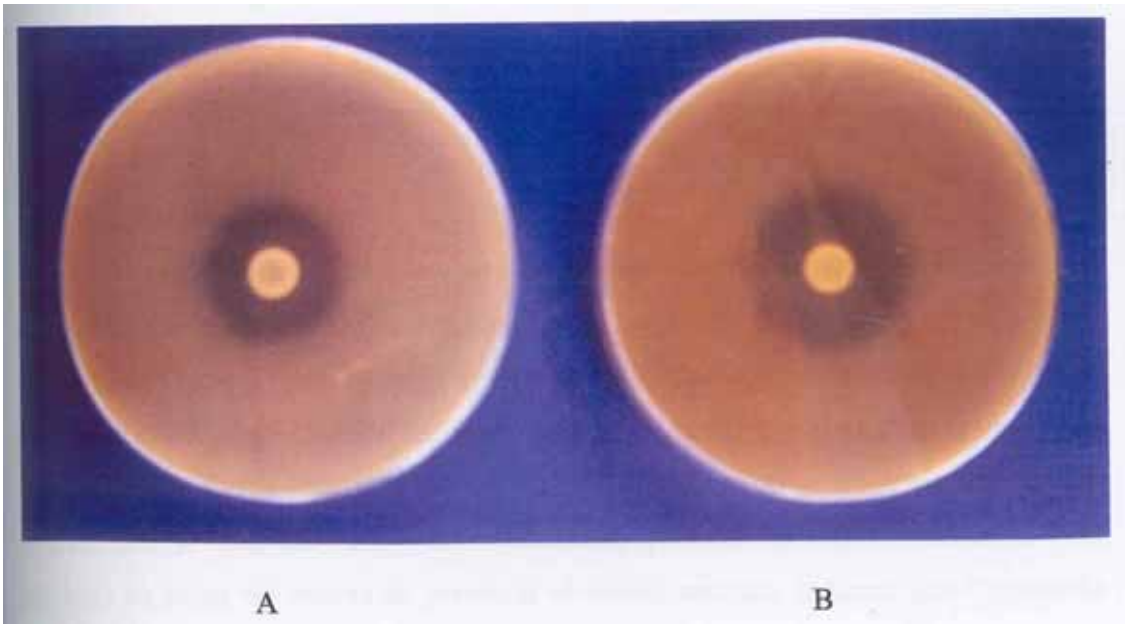


Figura 1. Inhibición de *Escherichia coli* CTC1028 (A) y *Salmonella enteritidis* CTC1026 (B) por parte de *Lactobacillus salivarius* CTC2197 por el método de la gota en agar.

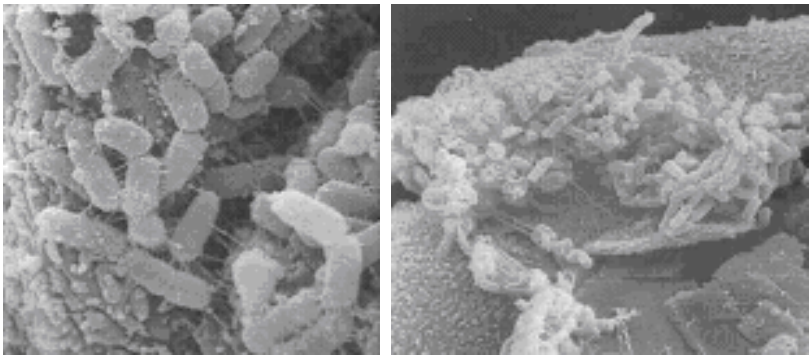


Figura 2. *Lactobacillus salivarius* CTC2197. Fotografía al microscopio electrónico de barrido de bacterias agregadas y adheridas a células epiteliales del buche de pollito.

CAPÍTULO 12

CARACTERIZACIÓN DE CEPAS DE ENTEROCOCOS PARA SU POSIBLE USO COMO PROBIÓTICOS EN CONEJOS

Raquel Linaje, Gaspar Pérez Martínez y Manuel Zúñiga

Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Polígono de la Coma s/n, Apartado de Correos 73, 46100 Burjassot, Valencia

Introducción

El intestino constituye un complejo ecosistema microbiano densamente poblado (hasta 10^{11} bacterias por gramo de contenido intestinal) por numerosas especies bacterianas y extremadamente variable, incluso entre individuos de la misma especie. Edad, alimentación, estrés, entorno, la existencia de posibles enfermedades y la ingestión de medicamentos son algunos de los factores que contribuyen a esta diversidad. Incluso dentro de un mismo individuo la composición de la población microbiana es diferente en cada tramo del intestino. Los microorganismos que se encuentran en el intestino establecen complejas interacciones con el huésped y entre sí, debidas tanto a la transformación de las sustancias que ingieren del entorno (procedentes de la alimentación del huésped) como a la producción de muy diversas moléculas señal que pueden modular la actividad fisiológica del huésped y de otros microorganismos. Esta red de interacciones constituye un equilibrio dinámico muy frágil, que puede ser alterado tanto positivamente mediante la introducción o incremento de bacterias beneficiosas, como lactobacilos y bifidobacterias, como negativamente cuando proliferan microorganismos patógenos. Esta posibilidad de alterar el ecosistema intestinal por introducción de microorganismos beneficiosos es el principio en el que se sustenta el empleo de probióticos.

Se denomina probiótico a un cultivo de uno o varios microorganismos vivos que, aplicados a un hombre o animal, ejercen un efecto beneficioso para su salud, mediante diversos mecanismos. Así, la administración de probióticos influye sobre la microbiota endógena, pues éstos deben prevalecer sobre bacterias potencialmente patógenas y pueden ejercer una acción directa sobre el huésped modulando su respuesta inmune, degradando

sustancias tóxicas o produciendo metabolitos beneficiosos para éste. Esta amplia definición incluye a los probióticos intestinales, así como los que pueden ejercer su acción sobre otras mucosas del huésped, como las del tracto respiratorio o urogenital.

Probióticos en alimentación animal

Durante muchos años se ha recurrido en las explotaciones ganaderas a la administración sistemática de antibióticos para prevenir la aparición de enfermedades y fomentar el engorde de los animales. Pero numerosos estudios han puesto de manifiesto que esta práctica conlleva serios riesgos para la salud. Los antibióticos son sustancias extrañas que no deben estar presentes en la cadena alimentaria, pero en ocasiones pueden encontrarse trazas en la carne, lo que puede producir efectos secundarios indeseables en el consumidor, como la aparición de alergias y desórdenes intestinales. Además, el empleo sistemático de antibióticos fomenta la aparición de cepas resistentes. Estas resistencias pueden diseminarse a otras bacterias, entre ellas patógenas humanas. Este riesgo ha llevado a la comunidad europea a limitar severamente el uso de antibióticos en alimentación animal y se ha planteado su total prohibición en un futuro próximo.

Es pues necesario idear nuevas estrategias para limitar el impacto de enfermedades sobre la producción animal. En este sentido se ha propuesto el uso de probióticos como una alternativa natural y segura a la utilización de antibióticos, ya que pueden estimular el sistema inmune, mantener el balance microbiano (Gouet y col., 1976; Canganella y col., 1992) y prevenir la invasión por microorganismos patógenos por exclusión competitiva y producción de sustancias antimicrobianas (Salminen y col., 1996; Dunne y col., 1999). De esta forma ayudarán a prevenir desórdenes digestivos y a mejorar las defensas naturales del animal. Otros argumentos a favor del uso de probióticos como una alternativa a los antibióticos son, por ejemplo, que se trata de cepas bacterianas habitualmente presentes en los alimentos, o que han sido aisladas del propio intestino de animales sanos, y son por ello consideradas como GRAS. Los probióticos más utilizados pertenecen al grupo de las bacterias lácticas, principalmente lactobacilos, pero también se emplean enterococos y bifidobacterias.

La evaluación de numerosos estudios ha llevado a proponer unos criterios elementales para seleccionar cepas probióticas (Dunne y col., 1999) que son, entre otros:

1. Preferiblemente haber sido aislados de individuos sanos pertenecientes a la especie en la que se van a utilizar.
2. Sobrevivir a la barrera gástrica y ser resistentes a las sales biliares para llegar viables al intestino, lugar donde ejercen su acción.
3. Es deseable que sean capaces de adherirse a las células del intestino y colonizar el tracto intestinal del huésped. Ello favorecerá la colonización, el efecto de exclusión competitiva sobre los patógenos intestinales y su interacción con células linfoides del sistema inmune.
4. Las cepas deben estar perfectamente identificadas y no deben haber sido descritas como patógenos.

Además, deberán considerarse otras propiedades que condicionarán su uso, pues deberán alcanzar el intestino en un estado fisiológico tal que puedan ejercer su acción beneficiosa. Por tanto, si van a incorporarse a un alimento, deberán resistir el procesado al que se someterá éste. De forma que, al seleccionar probióticos para animales de granja deberán considerarse, además de los expuestos anteriormente, factores como: condiciones de almacenamiento y manipulación (para que se mantenga la viabilidad o no se produzca una proliferación incontrolada de la bacteria) y que la forma de administración sea cómoda para el granjero. Éste último aspecto es de gran importancia en granjas de cría de animales de pequeño tamaño, como las avícolas y cunícolas.

Probióticos en conejos

El interés por la investigación sobre conejos radica en su importancia económica, ya que son animales utilizados tanto para la alimentación humana, como en investigación.

Los conejos son animales monogástricos y hervívoros, en los que la digestión de los materiales vegetales ocurre principalmente en el ciego, que es un tramo del intestino característicamente grande y densamente poblado por bacterias. Los conejos ayudan a mantener en equilibrio su microbiota intestinal con la práctica de la cacotrofia: reciclan parte de sus propias heces. En su intestino encontramos una microbiota variada en la que predominan microorganismos anaerobios estrictos del género *Bacteroides* (Forsythe y Parker, 1985; Zomborszky-Kovács y col., 2000). En menor número se encuentran anaerobios facultativos Gram-positivos, de los géneros *Bacillus, Enterococcus y Staphylococcus*, y

Gram-negativos, como *Enterobacter* y *Escherichia* (Forsythe y Parker, 1985; Canganella y col., 1992). Raramente se encuentran lactobacilos.

En estos animales, los desórdenes digestivos son una de las principales causas de mortandad. Tradicionalmente este problema se ha tratado de forma efectiva mediante la administración de antibióticos, cuyo uso indiscriminado va a prohibirse en explotaciones ganaderas. Sin embargo, la incidencia de estas enfermedades en las condiciones de cría de la mayoría de las granjas cunícolas es tal, que se impone la necesidad de buscar soluciones alternativas al tratamiento con antibióticos para mantener la viabilidad de estas explotaciones.

Como hemos visto, los probióticos pueden ser una alternativa eficaz y segura al uso de antibióticos. Sin embargo, existen pocos estudios sobre el uso de probióticos en conejos. Y aunque se comercializan diversos preparados supuestamente probióticos para conejos, éstos se dirigen a la alimentación de mascotas. Por ello, no se ha tenido en cuenta el problema de la administración en granjas. En granjas cunícolas existen dos opciones viables de administración: la inclusión del probiótico en el pienso o en el agua de bebida. En el pienso la bacteria debería soportar una extrusión a alta temperatura, que ejerce un efecto combinado de desecación y tratamiento a temperatura alta, y permanecer viable durante el almacenamiento del pienso a temperatura ambiente. Si ha de administrarse en el agua de bebida, naturalmente deberá sobrevivir allí el tiempo suficiente.

En consecuencia, nos planteamos iniciar un programa de selección de cepas probióticas para conejos para su uso en granjas. Los objetivos que nos fijamos fueron los siguientes:

- Estudio de la microbiota intestinal de conejos de granja
- Identificación y caracterización de cepas de enterococos teniendo en cuenta dos aspectos: sus propiedades fisiológicas y sus propiedades tecnológicas
- Selección de cepas con potenciales propiedades probióticas
- Seguimiento de la persistencia en el intestino de las cepas seleccionadas.

Determinación de la microbiota intestinal de conejos

El primer paso para la selección de cepas probióticas consistió en la caracterización de las poblaciones existentes en el intestino. Atendiendo a las exigencias tecnológicas citadas

anteriormente, el estudio se centró en las bacterias anaerobias facultativas presentes en heces y en el contenido intestinal, usando para ello medios de cultivo selectivos. Para este objeto se muestrearon 10 conejos sanos de 25 a 30 días es decir, al final de la fase de destete.

En ambos tipos de muestras se encontraron fundamentalmente estafilococos. Los recuentos fueron similares en heces y contenido intestinal, variando entre 8×10^3 y 2×10^5 ufc g^{-1} según los individuos. Sólo se detectaron enterobacterias en tres de los diez conejos estudiados: en las heces del conejo 6 y el contenido intestinal de los conejos 3 y 5. Los recuentos de enterococos en heces variaron enormemente de un conejo a otro: no se detectaron en los conejos 5 y 9, pero los recuentos ascendieron a 5×10^5 ufc g^{-1} en el conejo 6. En el contenido intestinal solamente se pudieron aislar enterococos en el conejo 7, encontrándose además un recuento muy bajo. Finalmente, en ningún caso se consiguieron aislar lactobacilos. En resumen, los resultados obtenidos muestran una notable diferencia con los de otros animales estudiados, como cerdos, ratones y humanos, donde es típico encontrar una importante población de lactobacilos. Esto probablemente es un reflejo de su distinto régimen alimenticio y sistema digestivo (los tres ejemplos citados son animales omnívoros) y cuestiona seriamente el uso de lactobacilos como probióticos para conejos adultos.

Aislamiento y selección de posibles probióticos

Aislamiento e identificación de cepas de enterococos: tipado molecular por RAPD

Así pues, una vez identificadas las especies mayoritarias en el intestino, nos centramos en el estudio de los enterococos por dos razones fundamentales: primero, porque existen antecedentes del uso de enterococos como probióticos en animales (Jin y col., 2000; Benyacoub y col., 2003), y en segundo lugar, son organismos singularmente resistentes a condiciones adversas.

Para estudiar la diversidad de la población de enterococos utilizamos una técnica denominada RAPD, que consiste en una amplificación por PCR utilizando oligonucleótidos de pequeño tamaño y condiciones de reacción ajustadas de tal manera que se obtiene un patrón de fragmentos amplificados característico de cada cepa. Se analizó el perfil de RAPD de un número representativo de colonias aisladas de heces en medio selectivo para

enterococos. Posteriormente se aisló y almacenó un representante de cada patrón de bandas, resultando un total de 24 cepas aisladas.

A continuación procedimos a su identificación mediante galerías API20strep®. En aquellos casos en que no se obtuvieron resultados concluyentes, se procedió a su identificación por secuenciación del RNA ribosómico 16S y comparación de las secuencias obtenidas con las depositadas en las bases de datos. Los resultados obtenidos mostraron que el grupo mayoritario de cepas pertenecían a la especie *Enterococcus faecalis* (14 cepas), el segundo en importancia es *E. faecium* (8 cepas) y minoritariamente *E. durans* (2 cepas). Observamos además que existía una gran variabilidad en la composición de la población de enterococos entre distintos individuos: mientras que en el caso del conejo 10 todas los aislamientos correspondieron a un único patrón de *E. durans*, en otros conejos hay una mayor variedad, como el caso del conejo 8 en el que se encuentran cepas de *E. faecalis* y *E. faecium*, o el caso del conejo 2, donde de las cuatro cepas aisladas dos han sido identificadas como *E. faecium*, una como *E. faecalis* y otra como *E. durans*.

Selección de enterococos probióticos

Para seleccionar un probiótico de entre las cepas aisladas, estudiamos algunas características tecnológicas y microbiológicas.

Dentro de las características tecnológicas se determinó su supervivencia en medio ácido, frente a una alta concentración de sales biliares, frente a alta temperatura y desecación y en condiciones oligotróficas. Todas las cepas aisladas pudieron resistir hasta 4 horas en un medio con pH ácido y crecer en un medio que contiene hasta un 40% de sales biliares.

Si las bacterias probióticas van a administrarse juntamente con el pienso, será necesario que puedan tolerar el proceso de fabricación del mismo, cuyo paso crítico consiste en una desecación a alta temperatura. En el laboratorio se reprodujeron condiciones equivalentes, sometiendo discos de papel embebidos en un cultivo de bacterias a un tratamiento a 80ºC, de modo que se produzca la desecación de los mismos, y almacenándolos posteriormente a temperatura ambiente. Las cepas 2C, 2F, 3C, 3D, 8B, 8C, 8D, 8F y 8G permanecieron vivas 4 semanas después de ese tratamiento.

Se determinó también si estas cepas son capaces de sobrevivir en el agua de bebida, obteniéndose que incluso 24 horas después de suspenderlas en agua permanecen viables sin disminuir los recuentos.

Además se estudiaron algunas características microbiológicas que serían deseables en un probiótico. Algunas bacterias producen exopolisacáridos, que favorecen la adhesión de la bacteria en el intestino y tienen la capacidad de estimular el sistema inmune. Por esta razón se determinó la capacidad de las cepas aisladas para producir exopolisacáridos, encontrándose que la mayor parte de las cepas de *E. faecalis* tienen esta característica, mientras que de las cepas de *E. faecium* solamente 8G tiene esta capacidad. La hidrólisis de caseína es otra propiedad deseable en un probiótico, porque su capacidad para segregar enzimas proteolíticas da una idea de su posible contribución en los procesos de digestión de los materiales encontrados en el intestino, lo que mejoraría la digestión y el aprovechamiento del pienso. Nueve cepas de *E. faecalis* son capaces de hidrolizar la caseína, mientras que de los *E. faecium* solamente una cepa, la 8G, tiene esta característica.

Algunos enterococos pueden ser patógenos oportunistas (Eaton y Gasson, 2001; Franz y col., 2001). Entre los factores de virulencia determinados en las cepas patógenas está la actividad β-hemolítica. Con el objetivo de descartar las cepas con esta actividad, se llevaron a cabo ensayos *in vitro* para determinar cuáles de ellas son β-hemolíticas, encontrándose solamente cuatro cepas con esta característica, que pertenecen a las especies *E. faecium* (2A, 3C y 8B) y *E. durans* (10C).

La producción de sustancias antimicrobianas es también un factor importante para la selección de un probiótico, puesto que ayudarían a la bacteria probiótica a imponerse en el intestino frente a patógenos y a otras bacterias. Dentro de estas sustancias antimicrobianas destacan las bacteriocinas, que son péptidos de pequeño tamaño y espectro de actividad variable (Nes y col., 2000). Las bacteriocinas producidas por las bacterias del género *Enterococcus* se denominan enterocinas. Se determinó la capacidad de las cepas aisladas para producir enterocinas por la capacidad que tiene el sobrenadante concentrado de un cultivo de cada cepa aislada para inhibir el crecimiento de una cepa indicadora. La naturaleza peptídica de la sustancia inhibitoria se confirmó mediante su inactivación tras digestión del sobrenadante con pronasa. Se encontró que la mayoría de la cepas de *E. faecium* y la cepa 2F de *E. durans* inhibieron el crecimiento de esa bacteria indicadora, mientras que entre las

cepas de *E. faecalis* solamente la cepa 6C y las aisladas del conejo 7 (7A, 7B, 7C y 7D) mostraron actividad antibacteriana bajo las condiciones del ensayo. Para estimar su espectro de actividad, se efectuaron ensayos similares con el sobrenadante concentrado de las cepas productoras de enterocinas y cepas pertenecientes a los géneros *Clostridium*, *Escherichia*, *Listeria* y *Staphylococcus*. Ninguna de las cepas ensayadas fue capaz de inhibir el crecimiento de *Escherichia* o *Staphylococcus.* Los resultados obtenidos con el resto de las cepas están reflejados en la Tabla 1. Además, también puede obtenerse información interesante, en relación con la naturaleza de las bacteriocinas producidas y la compatibilidad entre cepas, estudiando la capacidad de cada una de las enterocinas producidas para inhibir el crecimiento del resto de cepas de enterococos aisladas. Los resultados de estos ensayos quedan reflejados en la Tabla 1, donde puede verse que las cepas de *E. faecalis* inhibieron a la mayoría de los *E. durans* y *E. faecium*, así como a *C. subterminale*, pero no inhibieron el crecimiento de las cepas de *E. faecalis*, *Listeria* o *C. bifermentans*. Sin embargo, las cepas de *E. faecium* y *E. durans* productoras de bacteriocinas muestran un espectro de inhibición mucho más amplio, ya que son capaces de inhibir a la mayoría de las cepas de *Enterococcus* ensayadas, a *C. subterminale* y a *Listeria*. Además, las cepas 2F y 3D también inhibieron a *C. bifermentans*.

Seguimiento de la implantación en el intestino de una cepa de *Enterococcus*

Puesto que una de las características más deseables que ha de tener una cepa que va a usarse como probiótico es su capacidad de colonizar el intestino de animal al que va a administrarse, se seleccionó una de las cepas de *Entercococcus* aisladas para seguir su implantación en el intestino de conejos vivos. Entre todas, se eligió la cepa de *E. faecium* 8G, puesto que tiene capacidad de producir exopolisacáridos, hidroliza la caseina y produce bacteriocinas que tienen un amplio espectro de inhibición, ya que inhiben el crecimiento de *Listeria* y *Clostridium* así como el de la mayoría de los demás enterococos. De este modo, se tomaron 5 conejos sanos recién destetados, de los cuales 3 (conejos 44, 46 y 48) tomaron durante tres días una suspensión en agua de la cepa 8G (5×10^6 ufc ml^{-1}), mientras que los dos conejos restantes fueron usados como controles. Las heces de cada animal se recogieron por separado cada dos días, haciéndose recuentos de enterococos en un medio selectivo y

estudiando el patrón de RAPD de un número representativo de colonias. Los recuentos totales de enterococos en heces variaron entre 5×10^2 y 5×10^3 ufc g^{-1} en todos los conejos, excepto en los conejos 43 y 45 en los que los recuentos descendieron por debajo del nivel de detección (10 ufc g^{-1}) después de seis días. Como se puede observar en la Fig. 1, en las heces de cada individuo se aisló un grupo de enterococos distinto y solo en contadas ocasiones se pudo encontrar el mismo patrón de RAPD en diferentes conejos. El seguimiento a lo largo del tiempo de la evolución de los perfiles de RAPD nos muestra dos tendencias principales: en los conejos 44 y 46, una sola cepa de enterococos dominó durante todo el experimento, mientras que en los conejos restantes cada aislamiento mostró una colección diferente de cepas. En los conejos 43 y 45 no se aislaron enterococos en el día sexto después de la inoculación. Estos resultados sugieren que, dependiendo del individuo, la población intestinal de enterococos puede consistir en un grupo persistente, con unas pocas cepas residentes dominantes y cepas minoritarias transitorias, o en un patrón inestable de enterococos formado por un surtido de cepas transitorias. Además, este patrón de cepas puede tener un efecto importante sobre la implantación de una cepa introducida, a la vista de las diferencias en la evolución de la cepa 8G entre el conejo 44 y los conejos 45 y 48. En las heces del conejo 44, la cepa 8G representa el 7,5% de la población de enterococos en el momento en el que se retiró el suministro del inóculo (día 0), y esta proporción descendió gradualmente hasta que se hizo indetectable después de seis días. Por otro lado, en los conejos 45 y 48 la cepa 8G representa el 64% y el 100% de los enterococos aislados el día 0, desciende hasta niveles indetectables dos días después, pero vuelve a encontrarse en niveles significativos el día 4. Estos resultados sugieren que se requiere una administración continuada de una cepa exógena para asegurar su permanencia en el intestino de los conejos.

Puede concluirse, por tanto, que el patrón de cepas de enterococos presentes en el intestino y su evolución en el tiempo parece ser característico de cada individuo: en algunos casos una cepa predomina durante todo el experimento, mientras que en otros se ve un recambio rápido de las cepas. Así, a pesar de que se considera a los enterococos como miembros de la microbiota intestinal normal de conejos (lo que significa que no siempre están presentes), algunas cepas de enterococos pueden considerarse como autóctonas, es decir asociadas permanentemente al huésped. Además, la composición de la población de enterococos parece afectar a la capacidad de colonización de una cepa exógena introducida

en el ecosistema intestinal. Nuestros resultados sugieren que la implantación es mucho más eficaz en individuos que no poseen una población de enterococos estable, si bien se precisa una administración continuada de la cepa exógena para asegurar su permanencia.

Conclusiones

En este estudio hemos caracterizado parcialmente la microbiota anaerobia facultativa de las heces y el contenido intestinal de conejos, mostrando que es característica de cada individuo. El estudio de las propiedades fisiológicas y tecnológicas de las cepas aisladas nos ha permitido una selección preliminar de cepas potencialmente probióticas. Sin embargo, aún queda mucho por hacer hasta llegar al diseño de un probiótico con efectos demostrados. Finalmente, los estudios de implantación de una cepa exógena nos ha permitido poner a punto el sistema de administración así como constatar la necesidad de mantener una administración continuada y el seguimiento de la implantación.

Referencias

Benyacoub, J., Czarnecki-Maulden, G.L., Cavadini, C., Sauthier, T., Anderson, R.E., Schiffrin, E.J. y von der Weid, T. (2003). Supplementation of food with *Enterococcus faecium* (SF68) stimulates immune functions in young dogs. *J. Nutr.* **133:**1158-1162.

Canganella, F., Zirletta, G., Gualterio, L., Massa, S. y Trovatelli, L.D. (1992). Anaerobic facultative bacteria isolated from the gut of rabbits fed different diets. *Zentralbl. Mikrobiol.* **147:**537-540.

Dunne, C., Murphy, L., Flynn, S., O'Mahony, L., O'Halloran, S., Feeney, M., Morrissey, D., Thornton, G., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., Quigley, E.M., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. y Collins, J. K. (1999). Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek* **76:**279-292.

Eaton, T.J. y Gasson, M.J. (2001). Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* **67:**1628-1635.

Forsythe, S. J. y Parker, D.S. (1985). Nitrogen metabolism by the microbial flora of rabbit cecum. *J. Appl. Bacteriol.* **58:**363-369.

Franz, C., Holzapfel, W. H. y Stiles, M. (1999). Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* **47:**1-24.

Gouet, P., Fonty, G. y Riou, Y. (1976). La microflore digestive du lapin: variations avec l'age et l'aliment d'allaitement. In *Proceedings of the 1st World Rabbit Congress: Section Pathology.* Communication Nº 49. Dijon, France.

Jin, L.Z., Marquardt, R.R. y Zhao, X. (2000). A strain of *Enterococcus faecium* (18C23) inhibits adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 to porcine small intestine mucus. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:**4200-4204.

Nes, I. F. y Holo, H. (2000). Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. *Biopolymers* **55:**50-61.

Salminen, S., Isolauri, E. y Salminen, E. (1996). Clinical uses for stabilizing the gut mucosal barrier: successful strains and future challenges. *Antonie van Leeuwenhoek* **70:**347-358.

Zomborszky-Kovács, M., Gyarmati, T., Párizs, T., Szendrö, Z.S., Kametler, L. y Tóth, Á. (2000). Some physiological properties of the digestive tract in traditionally reared and exclusively milk-fed young rabbits. In *7th World Rabbit Congress, Nutrition and digestive physiology short papers.* Valencia, Spain.

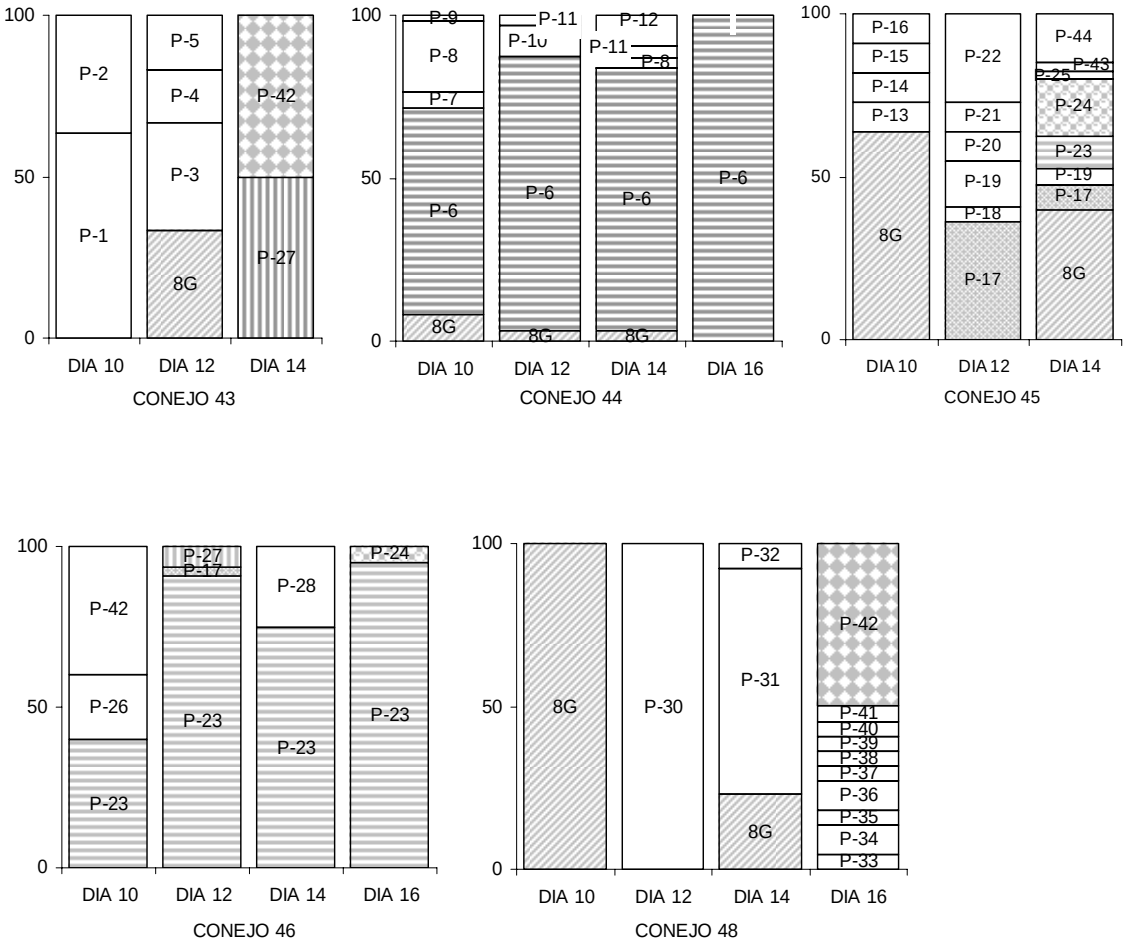


Figura 1. Cepas de enterococos detectadas en muestras de heces de 5 conejos. La cepa *Enterococcus faecium* 8G fue administrada a los conejos 44, 45 y 48. Las heces se recogieron el mismo día que se retiró la suspensión de bacterias y dos, cuatro y seis días después. Los sombreados muestran cepas que fueron comunes a más de una muestra.

Tabla 1. Rango de actividad antibacteriana de los sobrenadantes concentrados de diez cepas de enterococos aisladas de heces de conejos*.

Sobrenadante	2F	6C	7A	7B	7C	7D	3D	8B	8C	8G
Cepa indicadora										
Enterococcus durans										
2F	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
10C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
E. faecalis										
1A	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
3A	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
2E	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
3B	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
4A	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
4C	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
6B	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
6C	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
7A	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
7B	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
7C	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
7D	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
8A	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+
8F	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
E. faecium										
2A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3C	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
3D	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
8B	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
8C	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
8D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8G	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Listeria monocytogenes	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
L. innocua	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
L. ivanovi	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+
Clostridium subterminale	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C. bifermentans	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-

* +, sensible al sobrenadante concentrado ensayado; -, resistente al sobrenadante concentrado

CAPÍTULO 13

MEJORA DE LAS PROPIEDADES TECNOLÓGICAS Y SENSORIALES DE *Lactobacillus casei* POR INGENIERÍA DE RUTAS METABÓLICAS

Gaspar Pérez-Martínez, Mª José Gosalbes, Rosa Viana, Carlos D. Esteban, José Luis Galán, Mª Jesús Yebra y Vicente Monedero

Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Polígono de la Coma s/n, Apartado de Correos 73, 46100 Burjassot, Valencia

Introducción: propiedades tecnológicas de los probióticos

Las bacterias del ácido láctico (BAL) son unos microorganismos que participan en procesos de elaboración de alimentos fermentados, principalmente de origen lácteo. La principal característica metabólica de las BAL es la producción de ácido láctico como resultado de la fermentación de carbohidratos. El ácido láctico presenta varios efectos beneficiosos en la elaboración de un alimento fermentado: por un lado, junto al bajo pH posee efecto bacteriostático y bactericida sobre bacterias patógenas o alterantes, mejorando la seguridad y alargando la vida media del producto; por otro lado, contribuye a las características organolépticas finales, como la textura o el sabor. Los probióticos son microorganismos vivos que suministrados, principalmente en forma de preparado alimenticio, pueden ayudar a mejorar la salud o reducir el riesgo de padecer enfermedad en el consumidor. Entre los muchos efectos beneficiosos atribuidos a las BAL probióticas figuran su contribución al equilibrio de la microbiota intestinal, con el consiguiente beneficio en la lucha contra infecciones entéricas, la estimulación del sistema inmune tanto al nivel de mucosas como sistémico, la reducción de los niveles de colesterol, la regulación de la tensión arterial o la prevención del cáncer.

El principal vehículo para la ingestión de bacterias probióticas lo suelen constituir los alimentos, entre los cuales los derivados de la fermentación de la leche son los más importantes. Con el fin de adecuarse a los hábitos y gustos de los consumidores, las bacterias probióticas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* suelen incluirse en productos lácteos que les resultan familiares como el yogur, resultado de la fermentación de la leche por las bacterias *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. No obstante, por el hecho de estar vivas, las bacterias probióticas no se muestran inertes en el alimento, sino que se multiplican y son metabólicamente activas, pudiéndole

aportar nuevas cualidades. Por tanto, para el diseño de un alimento que contenga probióticos se deben tener en cuenta los aspectos tecnológicos y sensoriales de éste, de forma que la inclusión del probiótico proporcione al producto características organolépticas agradables para el consumidor, al tiempo que se mantengan las propiedades beneficiosas para la salud, la concentración deseada y viabilidad del probiótico en el alimento.

Nosotros estamos interesados en el estudio del metabolismo fermentativo de *Lactobacillus casei,* como modelo de BAL. Numerosas cepas de esta especie se consideran como probióticos, encontrándose actualmente disponibles en diferentes preparados comerciales (Actimel®, Yakult®, etc.). En este capítulo se describirá cómo los estudios básicos sobre la genética y biología molecular en *Lb. casei* pueden ayudar a proporcionar las herramientas genéticas necesarias para la mejora de sus cualidades tecnológicas o sensoriales. Estas mejoras se consiguieron en experimentos que respondían a actuaciones muy diferentes mediante herramientas genéticas: mediante la alteración puntual de uno o varios pasos en las rutas de utilización de azúcares, por la que se acumulan uno o varios compuestos de interés (ingeniería metabólica); o bien, por mutación de un gen regulador que afecta de forma global a numerosos pasos en las rutas de asimilación y catabolismo de azúcares, como CcpA o HPr, implicados en la ruta general de regulación por compuestos de carbono.

Ingeniería metabólica en *Lb. casei*: alteración deliberada de pasos concretos en el catabolismo de carbohidratos para la obtención de ácido L-láctico y diacetilo

Por su naturaleza fermentativa, las bacterias lácticas producen compuestos reducidos a partir del piruvato, un producto intermedio de la glucólisis. Los compuestos producidos son característicos de las bacterias lácticas, como los ácidos D,L-láctico y acético y numerosos compuestos volátiles de gran interés en la industria alimentaria, entre ellos, el acetaldehído o el diacetilo (Fig. 1). Las proporciones en que estos compuestos son producidos varían en función de las condiciones ambientales, pero sobre todo de la cepa utilizada, de forma que aquellas especies o cepas que más eficazmente metabolizan carbohidratos, no son necesariamente las que más compuestos de interés producen. A continuación se describen dos estrategias utilizadas en nuestro laboratorio para cambiar las proporciones de metabolitos producidos por *Lb. casei* a partir de azúcares como glucosa o lactosa: mediante la inactivación de enzimas clave para desviar la ruta hacia compuestos deseados; o bien, por producción abundante de una determinada enzima, responsable de la síntesis del compuesto deseado.

***Inactivación del gen que codifica la enzima lactato deshidrogenasa de* Lb. casei**

La última etapa de la fermentación por la ruta glucolítica en las BAL es la conversión del piruvato en ácido láctico por la acción de la enzima lactato deshidrogenasa (LDH). Sin embargo, existen rutas alternativas para el metabolismo del piruvato, que se activan dependiendo de diversos factores: disponibilidad de azúcares, presencia de oxígeno, pH, temperatura. Este metabolismo alternativo del piruvato genera diversos compuestos diferentes al ácido láctico, por lo que se dice que en esas condiciones la fermentación deja de ser homoláctica (aprox. 100% producción de ácido láctico) para pasar a ser ácido mixta (producción de ácido láctico más acetato, diacetilo, acetaldehído, etc.). Estos compuestos tienen un importante valor tecnológico ya que poseen un fuerte aroma. Por tanto, la manipulación de las rutas metabólicas que parten del piruvato mediante la aplicación de herramientas genéticas (ingeniería metabólica) puede dar lugar a modificaciones sustanciales en la producción de los metabolitos finales. Como se ha descrito, existen dos formas sencillas de redirigir el metabolismo hacia la producción de moléculas de interés: bien bloquear una ruta metabólica específica (generalmente mediante la mutación del gen de la enzima pertinente), o bien, sobreproducir una actividad enzimática nueva o ya existente. Se han descrito ejemplos de la aplicación de ambas estrategias en *Lactococcus lactis*, una BAL empleada en la elaboración de queso que ha servido de modelo en numerosos estudios genéticos y metabólicos. La expresión en *L. lactis* de la enzima alanina deshidrogenasa hace que esta bacteria canalice parte del piruvato, que normalmente sería convertido a ácido láctico por la LDH, hacia la producción de L-alanina, que posee poder edulcorante (Hugenholtz y col., 2002) (Fig. 1). El principal papel de la enzima LDH es regenerar NAD por oxidación del exceso de NADH acumulado durante la glucólisis. Otro ejemplo de la manipulación de los flujos metabólicos se obtuvo produciendo en *L. lactis* una NADH oxidasa (codificada por *nox2*) que regenera el NAD a partir del oxígeno (Fig. 1). En este caso, la LDH dejó de ser necesaria para regenerar NAD y por tanto cesó la acumulación de ácido láctico, observándose la formación de nuevos metabolitos a partir del piruvato (Kleerebezem y col., 2002).

En las BAL el ácido láctico es sintetizado a partir de piruvato como sus dos posibles isómeros, L- y D-lactato. El ácido D-láctico es el isómero denominado no fisiológico, ya que no puede ser asimilado por los mamíferos y se le atribuye cierta toxicidad. Por lo tanto, la obtención de L-lactato puro a partir de BAL es de gran importancia industrial, y tiene aplicaciones en farmacología y cosmética. Para sintetizar L- y D-lactato, diferentes especies de BAL pueden utilizar las enzimas L-LDH, D-LDH y D-hidroxicaproato deshidrogenasa (D-

HCD), además de una enzima o complejo enzimático que cataliza la interconversión de los isómeros, a la que se denomina racemasa del ácido láctico. En *Lb. casei* la formación de ácido láctico está determinada por una L-LDH y una D-HCD. En nuestro laboratorio, hemos obtenido cepas de *Lb. casei* en las que se ha inactivado el gen que codifica la D-HCD y que, por tanto, producen exclusivamente el isómero L-lactato. Estas cepas serán evaluadas en planta piloto para el reaprovechamiento biotecnológico de lactosuero.

También hemos obtenido cepas en las que hemos eliminado el gen *ldhL,* que codifica la L-LDH, es decir, la enzima más activa en la conversión de piruvato a lactato. En estas cepas disminuye notablemente la producción de ácido láctico, aunque se sigue detectando la formación de isómero L, lo cual sugiere la existencia de otras actividades L-LDH no caracterizadas en este microorganismo. Sin embargo, la disminución de la producción de ácido láctico es suficiente para que estas cepas necesiten recanalizar el piruvato acumulado, pues en ellas se observa un aumento en la producción de otros compuestos derivados de éste, como el diacetilo, ácido acético, etanol o CO_2 (manuscrito en preparación). Los cultivos de esta cepa son mucho más aromáticos que los de la cepa silvestre parental.

Construcción de una cepa de grado alimentario en la que la enzima acetohidroxiácido sintetasa es inducida por lactosa

La segunda estrategia descrita para alterar el patrón de metabolitos en una bacteria se basa en la expresión de nuevas enzimas. En este caso, hemos utilizado las propiedades del operón de la lactosa (grupo de genes que codifican las enzimas del metabolismo de la lactosa) de *Lb. casei* para construir cepas en las que parte del piruvato que es convertido en ácido láctico es dirigido hacia la formación de otras moléculas responsables del aroma. Nuestro sistema hace uso de las propiedades del operón de la lactosa. Este operón, denominado *lacTEGF*, consta de los genes que codifican los componentes de un sistema denominado fosfotransferasa dependiente de fosfoenolpiruvato o PTS para el transporte de lactosa (*lacE* y *lacF*), la enzima fosfo-β-galactosidasa encargado del metabolismo de la lactosa (*lacG*) y una proteína (antiterminadora; LacT) que regula la expresión de los genes *lac*, activándolos únicamente cuando existe lactosa en el medio de cultivo (Gosalbes y col, 1997). Además, estos genes están sometidos a una fuerte represión por catabolito, es decir, que son inactivos en presencia de glucosa o azúcares de rápida utilización (Monedero y col, 1997). Por técnicas de biología molecular hemos desarrollado vectores que pueden ser utilizados para insertar un gen de interés en el operón *lac*, de tal manera que su expresión esté regulada de forma similar

a los genes *lac* (Gosalbes y col., 2000). Es decir, que se exprese sólo en presencia de lactosa, con lo cual su producción puede regularse a voluntad (Fig. 2A). Mediante esta técnica se han insertado en el operón *lac* los genes *ilvBN* de *L. lactis*, que codifican las dos subunidades de la enzima acetohidroxiácido sintetasa encargada de la síntesis de los aminoácidos isoleucina y valina. Al igual que la α-acetolactato sintetasa (ALS), esta enzima puede convertir el piruvato en α-acetolactato, poseyendo mayor afinidad por el piruvato que la ALS. La expresión de *ilvBN* en presencia de lactosa hace que parte del piruvato, que normalmente sería canalizado por la LDH hacia ácido láctico, pase a α-acetolactato. El α-acetolactato puede ser convertido en diacetilo mediante una descarboxilación que ocurre espontáneamente en presencia de oxígeno. Por tanto, una cepa que porte los genes *ilvBN* y se cultive en presencia de lactosa, produce más diacetilo y otros compuestos como acetoína que la cepa silvestre (Fig. 2B).

Aunque el presente ejemplo muestra cómo se puede redirigir el metabolismo mediante la expresión de actividades enzimáticas específicas, el sistema de integración en los genes *lac* puede ser utilizado para la producción de cualquier proteína de interés de una manera regulada. Además, las cepas obtenidas de este modo son de grado alimentario, ya que sólo incorporan en su genoma el nuevo gen a expresar.

Mutagénesis de elementos reguladores como estrategia para generar cambios metabólicos

Introducción a la regulación del metabolismo de carbohidratos en Lb. casei

El primer paso en el metabolismo de carbohidratos lo constituye su entrada en el interior celular. Éste es un proceso que llevan a cabo diferentes sistemas de entrada, específicos de cada carbohidrato, situados en la membrana celular bacteriana. El principal de estos mecanismos es el sistema PTS. El PTS es un sistema multienzimático complejo que consta de proteínas transportadoras situadas en la membrana (denominadas EII) y otras proteínas presentes en el citoplasma que catalizan la transferencia de un fosfato (P) desde una molécula de fosfoenolpiruvato (PEP) hasta el carbohidrato transportado. Las proteínas del PTS presentes en el citoplasma, denominadas EI y HPr, son modificadas en ciertos aminoácidos de su secuencia (histidinas) por la adición de este fosfato de manera transitoria y participan en la cadena de transferencia del fosfato desde el PEP hasta el azúcar siguiendo la siguiente secuencia: PEP > EI-P > HPr-P > EII-P > azúcar-P (Fig. 3A). El azúcar-fosfato

internalizado en la célula es metabolizado por la ruta metabólica denominada glucólisis para producir piruvato, que es más tarde convertido a ácido láctico por la acción de la enzima LDH. En nuestro laboratorio se han aislado y caracterizado los genes que codifican las proteínas citoplásmicas del PTS (denominados *ptsH* y *ptsI*) de *Lb. casei* (Viana y col., 2000); además de los componentes de membrana de diversos PTS, como el específico para lactosa, glucosa, sorbosa o sorbitol (Gosalbes y col., 1997; Yebra y col., 2000; 2002) (Fig. 3A). El control del funcionamiento del metabolismo fermentativo se produce tanto a nivel genético como bioquímico. Cuando *Lb. casei* metaboliza un azúcar de rápida utilización, como la glucosa, la activación de una enzima denominada HPr quinasa, produce que la proteína HPr se modifique por adición de un fosfato en un aminoácido serina de su secuencia (la serina en posición 46). Esta HPr modificada (P-Ser-HPr) puede interaccionar con una proteína denominada CcpA, formando un complejo que se une al DNA de diversos genes. La unión de CcpA/P-Ser-HPr al DNA bloquea la expresión de ciertos grupos genes (el proceso denominado represión por catabolito) o activa la de otros (Titgemeyer y Hillen, 2002) (Fig. 3A).

Mutagénesis de proteínas reguladoras en Lb. casei

El conocimiento de los mecanismos moleculares que regulan el metabolismo hace posible el diseño de estrategias más racionales en la obtención de cepas que aporten nuevas características al producto final, lo hagan más atractivo para el consumidor o mejoren sus características tecnológicas. La proteína CcpA y las proteínas del PTS son unas excelentes dianas para manipular los flujos de carbono de una manera global. En este contexto hemos construido mutantes de *Lb. casei* en los que los genes para EI (*ptsI*), HPr (*ptsH*), HPr quinasa (*hprK*) y CcpA (*ccpA*) han sido eliminados por técnicas de biología molecular (Dossonnet y col., 2000; Viana y col., 2000; Monedero y col., 1997). Estas mutaciones han sido introducidas tanto en cepas de *Lb. casei* de laboratorio como en cepas utilizadas para la fermentación de alimentos. Un importante requerimiento al realizar estas manipulaciones fue el de obtener cepas denominadas de *grado alimentario*, es decir, que no incorporen DNA exógeno resultado del proceso de manipulación, como por ejemplo genes de resistencia a antibióticos.

Hemos producido cepas de *Lb. casei* con mutaciones en el gen *ptsH* que producen una proteína HPr en la que el aminoácido serina 46 ha sido reemplazado por otros aminoácidos que no pueden ser fosforilados, como la alanina (Ala). Las cepas con mutaciones Ser-46-Ala

tienen la característica de poseer una falta de represión por catabolito similar a la causada por la mutación *ccpA*. La fosforilación de HPr en la posición Ser-46 por la HPr quinasa también juega un importante papel en los fenómenos de regulación de la entrada de azúcares al interior celular. P-Ser-HPr participa en el proceso denominado exclusión del inductor, por el que la presencia de glucosa inhibe la incorporación de otras fuentes de carbono. En experimentos de incorporación de maltosa marcada con ^{14}C, pudimos comprobar que la presencia de la mutación Ser-46-Ala o *hprK* en *Lb. casei*, que imposibilita la formación de P-Ser-HPr, da lugar a células en las que la incorporación de maltosa no se ve inhibida por la presencia de glucosa (Fig. 3B). De esta manera, las bacterias pueden utilizar el disacárido maltosa aún en presencia de azúcares que causan represión como la glucosa.

Las cepas obtenidas también han sido ensayadas en fermentaciones lácteas con buenos resultados (Deutscher y col., 2001). Por ejemplo, los mutantes *ccpA* de *Lb. casei*, como consecuencia de la falta de represión por catabolito, pueden utilizar el citrato diez veces más rápidamente que la cepa silvestre. El citrato es un compuesto a partir del cual se pueden derivar moléculas responsables del aroma. Probablemente como consecuencia de esto, la producción de acetoína en una cepa con la mutación *ccpA* es seis veces mayor. Un mutante en *ptsI* de *Lb. casei* sigue siendo capaz de fermentar la lactosa presente en la leche debido a la existencia de otros sistemas para la incorporación de este azúcar, diferentes al PTS, presentando una correcta acidificación del sustrato. Sin embargo, la fermentación con esta cepa da lugar a un producto con aroma más cremoso, posiblemente debido a la mayor producción de ácidos grasos de los tipos C4, C6, C8, C12, C14 y C16. Además, el producto fermentado obtenido es más elástico, conservando una mejor textura tras el tratamiento industrial.

Un importante problema en la fermentación de productos lácteos lo constituye la acidificación del producto durante el almacenamiento. Este fenómeno es debido a la fermentación a baja temperatura de la lactosa residual presente, con la consiguiente producción de mayor cantidad de ácido láctico. Los mutantes en *ccpA* y en *ptsI* presentan una menor capacidad de acidificación durante el almacenamiento, que no es debida a la pérdida de viabilidad de las bacterias presentes en el cultivo (Fig. 4).

Nuevas perspectivas

El relativamente sencillo metabolismo de las BAL favorece su manipulación para la producción de metabolitos de interés. Este potencial puede explotarse no sólo para la síntesis

de compuestos responsables del aroma en productos fermentados, sino para la producción de otras moléculas de interés. Los nutracéuticos son sustancias beneficiosas para la salud que pueden ser añadidas a los alimentos, como las vitaminas o los azúcares bajos en calorías. Las BAL pueden ser manipuladas para producir nutracéuticos y utilizadas de dos maneras diferentes: 1) como "factorías celulares" para la síntesis industrial de nutracéuticos, o 2) como cultivos iniciadores en las fermentaciones, con la consiguiente producción del nutracéutico en el propio alimento. Una vez más es *Lactococcus lactis* la BAL dónde más se han explorado estas posibilidades. Se han diseñado cepas de *L. lactis* en las que la fermentación puede desviarse hacia la producción de sorbitol o manitol, compuestos que pueden utilizarse como edulcorantes de bajo contenido calórico y anticariogénicos (Hugenholtz y col., 2002). De igual manera, mediante técnicas de ingeniería genética pueden diseñarse cepas de *L. lactis* con un incremento en la producción de ácido fólico (Sybesma y col., 2003) o de los denominados exopolisacáridos, que pueden actuar como fibra dietética. Recientemente se ha descubierto que algunos lactobacilos pueden sintetizar vitaminas tan importantes como la vitamina B_{12} (Taranto y col., 2003).

Referencias

Deutscher, J., Pérez-Martínez, G., Monedero, V., Viana, R., Benbadis, L., Pierson, A. y Faurie, J. (2001). Mutants in *Lactobacillus casei* defective in carbon catabolism regulation. Patente PCT/EP01/03951. CSIC/CNRS/Danone

Dossonnet, V., Monedero, V., Zagorec, M., Galinier, A., Pérez-Martínez, G. y Deutscher, J. (2000). Phosphorylation of HPr by the bifunctional HPr Kinase/P-ser-HPr phosphatase from *Lactobacillus casei* controls catabolite repression and inducer exclusion but not inducer expulsion. *J. Bacteriol.* **182:**2582-2590.

Gosalbes, M.J., Monedero, V., Alpert, C.A. y Pérez-Martínez, G. (1997). Establishing a model to study the regulation of the lactose operon in *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiol. Lett.* **148:**83-89.

Gosalbes, M.J., Esteban, C.D., Galán, J.L. y Pérez-Martínez, G. (2000). Integrative food-grade expression system based on the lactose regulon of *Lactobacillus casei*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66:**4822-4828.

Hugenholtz, J., Sybesma, W., Groot, M.N., Wisselink, W., Ladero, V., Burgess, K., van Sinderen, D., Piard, J.C., Eggink, G., Smid, E.J., Savoy, G., Sesma, F., Jansen, T.,

Hols, P. y Kleerebezem, M. (2002). Metabolic engineering of lactic acid bacteria for the production of nutraceuticals. *Antonie van Leeuwenhoek* **82:**217-235.

Kleerebezem, M., Boels, I.C., Groot, M.N., Mierau, I., Sybesma, W. y Hugenholtz, J. (2002). Metabolic engineering of *Lactococcus lactis*: the impact of genomics and metabolic modelling. *J. Biotechnol.* **98:**199-213.

Monedero, V., Gosalbes, M.J. y Pérez-Martínez, G. (1997). Catabolite repression in *Lactobacillus casei* ATCC 393 is mediated by CcpA. *J. Bacteriol.* **179:**6657-6664.

Sybesma, W., Starrenburg, M., Kleerebezem, M., Mierau, I., de Vos, W.M. y Hugenholtz, J. (2003). Increased production of folate by metabolic engineering of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **69:**3069-3076.

Taranto, M.P., Vera, J.L., Hugenholtz, J., De Valdez, G.F. y Sesma, F. (2003). *Lactobacillus reuteri* CRL1098 produces cobalamin. *J. Bacteriol.* **185:**5643-5647.

Titgemeyer, F. y Hiller, W. (2002). Global control of sugar metabolism: a gram-positive solution. *Antonie van Leeuwenhoek* **82:**59-71.

Viana, R., Monedero, V., Dossonnet, V., Vadeboncoeur, C., Pérez-Martínez, G. y Deutscher, J. (2000). Enzyme I and HPr from *Lactobacillus casei*: their role in sugar transport, carbon catabolite repression and inducer exclusion. *Mol. Microbiol.* **36:**570-584.

Yebra, M.J., Veyrat, A., Santos, M. y Pérez-Martínez, G. (2000). Genetics of L-sorbose transport and metabolism in *Lactobacillus casei*. *J. Bacteriol.* **182:**155-163.

Yebra, M.J. y Pérez-Martínez, G. (2002). Cross-Talk between L-sorbose and D-sorbitol (D-glucitol) metabolic pathways in *Lactobacillus casei*. *Microbiology* **148:**2351-2359.

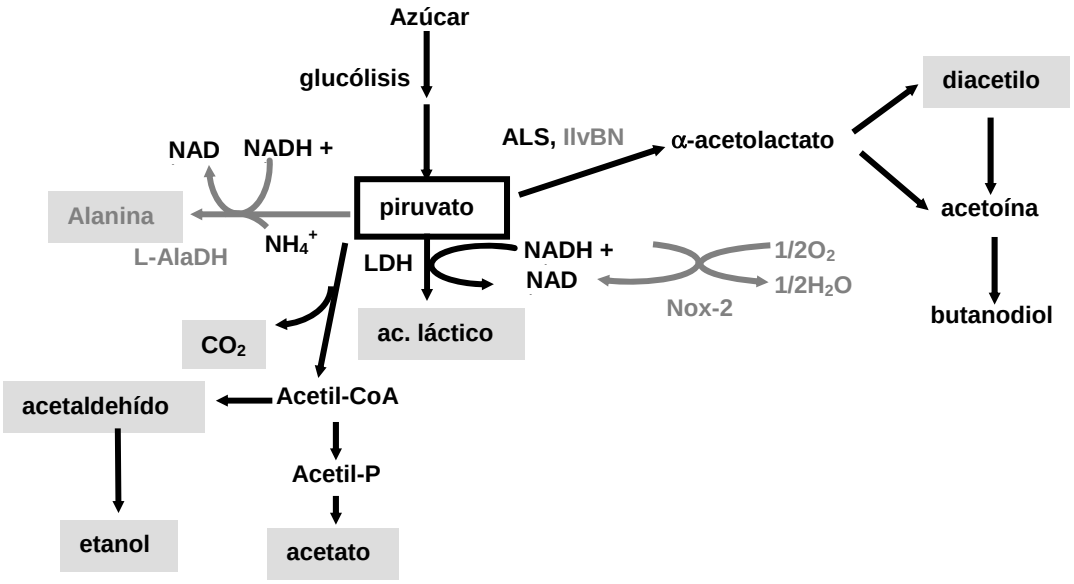


Figura 1. Metabolismo alternativo del piruvato en las bacterias lácticas y posibles estrategias de modificación.

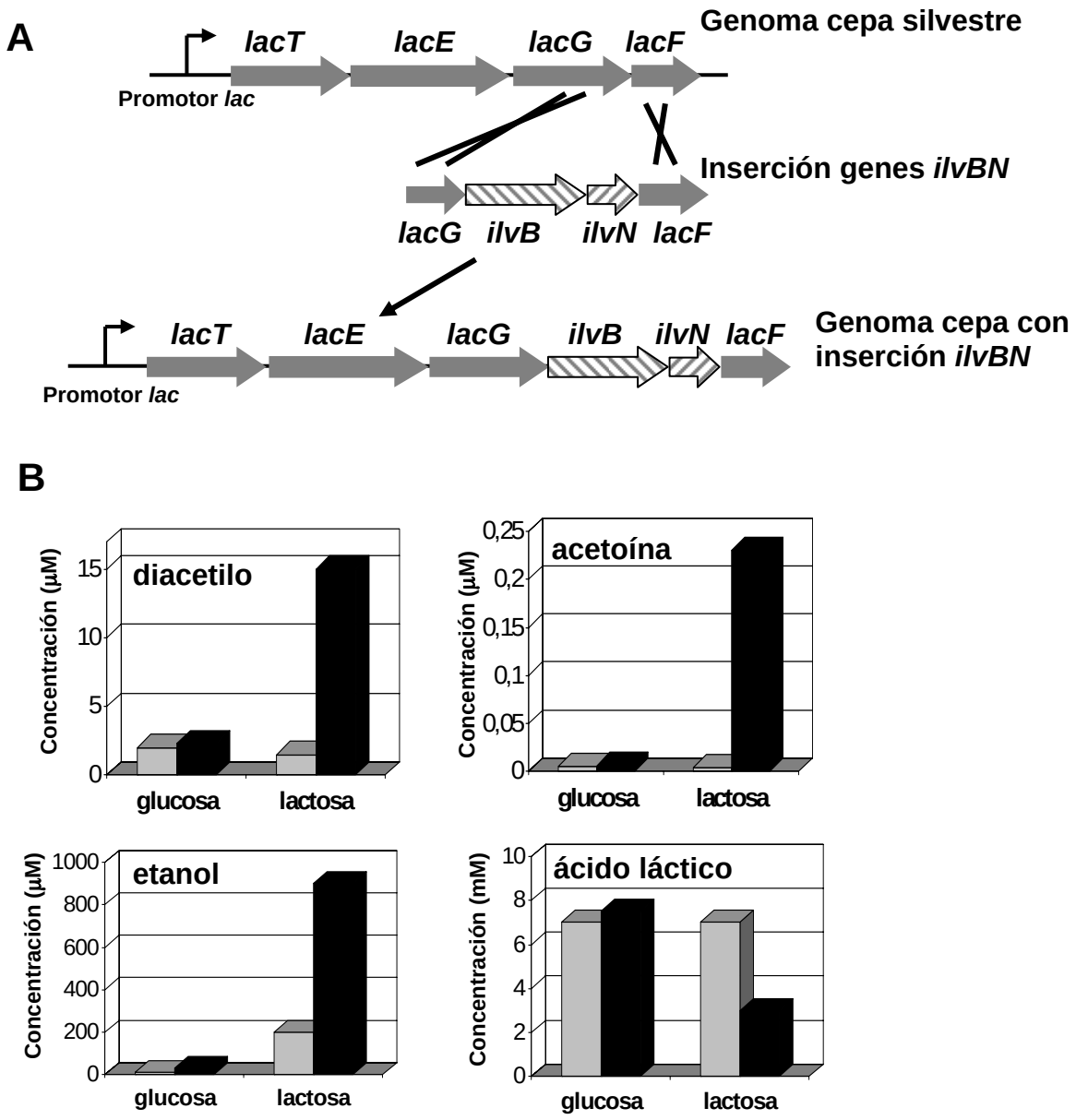


Figura 2. A) Esquema de la organización de los genes *lac* en *Lactobacillus casei* y estrategia para insertar los genes *ilvBN* en su genoma. B) Producción de metabolitos por células de *Lb. casei* silvestre (en gris) y una cepa con los genes *ilvBN* integrados en el operón *lac* (negro), tras su cultivo con glucosa o lactosa. La inducción de los genes *ilvBN* tras el cultivo con lactosa da lugar al incremento de la producción de diversos metabolitos (diacetilo, acetoína, etanol). Se observa una disminución de la producción de ácido láctico debida probablemente al desvío del piruvato hacia la producción de otros metabolitos diferentes.

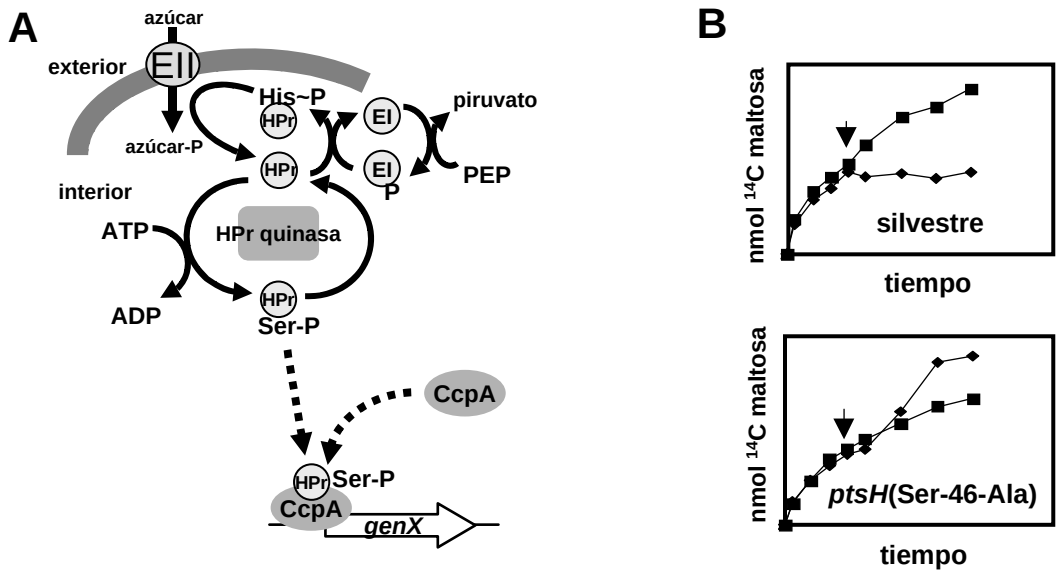


Figura 3. A) Esquema del mecanismo de incorporación de azúcares por el PTS y su regulación en *Lactobacillus casei*. Los genes correspondientes a cada una de las proteínas representadas han sido clonados y caracterizados. B) Incorporación de ^{14}C-maltosa por la cepa silvestre de *Lb. casei* y su mutante en HPr (Ser-46-Ala) en función del tiempo. En el punto determinado por la flecha se añadió glucosa. Esto produce una parada de la incorporación de maltosa en la cepa silvestre, pero no en la cepa Ser-46-Ala.

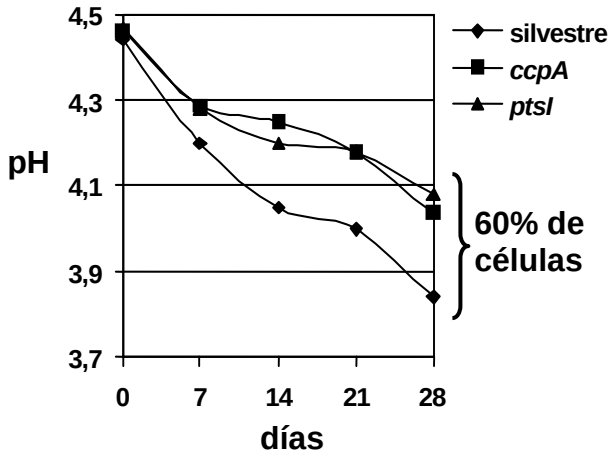


Figura 4. Efecto de las mutaciones en *ccpA* y *ptsI* de *Lactobacillus casei* en la acidificación de leche fermentada mantenida 28 días a 4ºC. Se observa una reducción en la acidificación durante el almacenamiento sin que exista pérdida de viabilidad.

CAPÍTULO 14

DISEÑO DE PROBIÓTICOS COMO VECTORES DE VACUNAS ORALES Y OTRAS MOLÉCULAS TERAPÉUTICAS

Vicente Monedero[1], Isabel Pérez-Arellano[2], Rosa Viana[1], Manuel Zúñiga[1], Javier Buesa[3], Rebeca Montava Vilaplana[3], Jesús Rodríguez-Díaz[3], Paulo Lee Ho[4], Leonor Sarno de Oliveira[4] y Gaspar Pérez-Martínez[1]

[1]Departamento de Biotecnología de Alimentos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Polígono de la Coma s/n, Apartado de Correos 73, 46100 Burjassot, Valencia. [2]Instituto de Investigaciones Citológicas, Amadeo de Saboya 2, 46010 Valencia. [3]Facultad de Medicina, Departamento de Microbiologia, Avenida Blasco Ibañez 17, 46010 Valencia. [4]Centro de Biotecnologia, Instituto Butantan, 05503-900, São Paulo, SP, Brasil

Introducción: producción de proteínas bioactivas en bacterias lácticas

Cada vez existe un mayor interés por el posible uso de las bacterias del ácido láctico (BAL) como vectores para la producción y presentación en las mucosas de proteínas con posible uso terapéutico. Este interés viene suscitado por dos características fundamentales de las BAL: por un lado, son organismos denominados GRAS por su intervención en múltiples fermentaciones de alimentos y, en segundo lugar, son constituyentes habituales de la microbiota del tracto intestinal, donde pueden colonizar las mucosas e interaccionar con las células epiteliales e inmunitarias. Se cree que de esta manera las BAL juegan un papel importante en la regulación del sistema inmune (Perdigón y col., 2002). La mucosa intestinal es el mayor órgano linfoide del organismo y en ella existen regiones especializadas denominadas placas de Peyer que contienen las llamadas células M, encargadas de captar, procesar y presentar los antígenos ingeridos y presentes en el contenido intestinal a los linfocitos del sistema inmune (Fig. 1). Estos linfocitos activados pueden desplazarse a través del sistema linfático y promover la producción de anticuerpos en diversas localizaciones diferentes al lugar de inducción.

La existencia actual de herramientas genéticas para la manipulación de las BAL hace posible la clonación y expresión en estas bacterias de genes que codifican proteínas de interés en usos terapéuticos (enzimas, antígenos, anticuerpos), ampliando así el espectro de efectos beneficiosos, más allá de sus capacidades probióticas. Una de las posibles ventajas de producir proteínas bioactivas en las BAL es la de poder alargar su vida media en el organismo al ser sintetizadas *in situ*, bien en la mucosa o en el intestino. De esta manera también se

podría evitar la posible toxicidad de la administración sistémica en dosis altas. Adicionalmente existen las ventajas de la reducción de los costes y la falta de dependencia de la cadena de frío, lo cual puede ser importante para su utilización en países en vías de desarrollo. Sin embargo, este campo de trabajo está en sus inicios y todavía quedan importantes cuestiones por resolver, como el control de la dosis de las moléculas producidas.

Además, nuestro conocimiento de la biología molecular de las BAL, y de las bacterias Gram-positivas en general, nos permite decidir de antemano el compartimento celular al que se pueden dirigir las nuevas proteínas, esto es, si éstas van a ser secretadas, ancladas a la pared celular o si simplemente se quedarán en el interior celular (Fig. 1). La gran mayoría de proteínas de secreción son sintetizadas inicialmente como precursores que contienen una extensión en el extremo NH_2-terminal, necesaria para su exportación y que debe ser eliminada proteolíticamente en el proceso. Estas “secuencias señal” tienen un perfil hidrofóbico conservado y un sitio de reconocimiento para la peptidasa señal, esto es, la enzima que la separa de la proteína madura (von Heijne y Abrahamsen, 1989). Por tanto, los genes que codifican las proteínas que se desea secretar deben ser fusionados a una región que codifica una secuencia señal, normalmente seleccionada de una proteína secretada del propio microorganismo huésped. Así mismo, para dirigir la proteína deseada a la pared celular, además de la secuencia señal debemos fusionar a su DNA codificante una secuencia de anclaje (Maassen y col, 1999). En el trabajo que aquí se describe, se utilizarán principalmente tanto la secuencia señal como la de anclaje de la proteinasa de pared PrtP propia de *Lactobacillus casei* (Holck y Naes, 1992).

Expresión de una proteína marcadora en *Lactobacillus casei*: GFP

Lactobacillus casei es una especie de BAL utilizada en fermentaciones lácteas, de la cual existen cepas con cualidades probióticas. Para que una bacteria probiótica muestre sus cualidades saludables, se cree que debe ser capaz de desarrollarse y ser activa en el intestino, para lo cual debe competir con el resto de microorganismos presentes, tanto por los nutrientes como por los sitios de adhesión en las células del epitelio intestinal. La investigación básica sobre estas características de las BAL requiere el disponer de herramientas para poder "marcar" a las bacterias objeto de estudio y diferenciarlas, por ejemplo, del resto de bacterias presentes en el intestino. De esta manera se simplifican los estudios de colonización y persistencia de una bacteria después de ser ingerida, al disponer de una manera fácil de detectarla. La proteína verde fluorescente o GFP (*green flourescent protein*) es un buen

marcador para este tipo de ensayos. Esta proteína proviene de la medusa *Aequorea victoria* y produce fluorescencia verde al ser iluminada con luz ultravioleta. En nuestro laboratorio hemos modificado *Lb. casei* introduciéndole el gen de la proteína GFP y hemos determinado las condiciones para la obtención de la máxima cantidad de GFP en esta bacteria. La producción de GFP en *Lb. casei* da lugar a células fluorescentes, fácilmente identificables por técnicas de microscopía (Pérez-Arellano y Pérez-Martínez, 2003).

Prevención y terapia de diarreas virales

Síntesis y secreción de antígenos de rotavirus

La seguridad de las BAL, así como su interacción con las células del sistema inmune de la mucosa, como ya se ha mencionado, las hace especialmente idóneas para su uso como vectores vivos para la producción y presentación al sistema inmune de diversos antígenos. Las BAL pueden ser modificadas para la producción de antígenos tanto de origen vírico como bacteriano. La administración de estas bacterias por vía oral llevaría a la producción y presentación de los antígenos a las células del sistema inmune, dando lugar a una vacunación a nivel de la mucosa. Este tipo de vacunación conduce a la producción de anticuerpos no sólo secretados en las mucosas (inmunoglobulinas A), sino también a nivel sistémico (inmunoglobulinas G).

Se han utilizado diversas BAL para producir antígenos, consiguiéndose inmunizar animales de laboratorio tras suministrar las bacterias por la ruta oral o nasal. En *Lactobacillus plantarum* o *Lactococcus lactis* se han expresado antígenos modelo, como el fragmento C de la toxina tetánica (TTFC), en diversas localizaciones celulares: producidos y mantenidos intracelularmente, secretados al exterior o secretados y anclados a la superficie de la bacteria. Tanto las células de *Lb. plantarum* como de *L. lactis* productoras de TTFC, suministradas oral o nasalmente, son capaces de inducir inmunoglobulinas contra el TTFC y de proteger a ratones contra la toxina tetánica (Mercenier y col., 2000).

Uno de nuestros modelos de trabajo lo constituyen los rotavirus, los principales agentes virales productores de gastroenteritis en la infancia. Estos virus causan aproximadamente 500.000 fallecimientos anuales, principalmente en países en vías de desarrollo, por la intensa deshidratación que pueden llegar a provocar (Miller y McCann, 2000). Por el momento no existe ninguna vacuna comercializada para prevenir estas infecciones, lo que justifica el desarrollo de diferentes vías de inmunización y de terapias

antivíricas. Nosotros hemos construido cepas de *Lb. casei* que son capaces de sintetizar proteínas antigénicas de rotavirus. Una de estas proteínas, denominada VP8*, puede inducir la formación de anticuerpos bloqueantes de la infección en modelos animales (Gil y col., 2000). Por medio de la fusión del gen de la proteína VP8* a secuencias de DNA denominadas secuencias de secreción se pueden producir cepas de *Lb. casei* que sinteticen el antígeno VP8* y lo transporten al exterior celular, lo cual puede mejorar la presentación del antígeno a las células del sistema inmune. En la Fig. 2A se muestra la producción de VP8* por células de *Lb. casei* utilizando la secuencia de secreción denominada Usp45. La proteína se produce en *Lb. casei* bajo la forma de una fusión Usp45-VP8*. Esta proteína fusionada es liberada al medio de cultivo, eliminándose en el proceso los aminoácidos correspondientes a la secuencia Usp45. Las cepas de *Lb. casei* productoras de antígenos de rotavirus están siendo ensayadas para determinar su capacidad de inducción de anticuerpos contra rotavirus en modelos de experimentación animal.

Producción de anticuerpos antirotavirus en *Lb. casei*

La expresión de proteínas bioactivas en las BAL puede ampliarse al campo de los anticuerpos clonados (versiones simplificadas de las inmunoglobulinas que pueden ser producidas en microorganismos), posiblemente útiles para proporcionar la llamada inmunidad pasiva. Se han expresado anticuerpos contra el antígeno I/II de *Streptococcus mutans*, el principal causante de las caries, en *Lactobacillus zeae*. Las células de *Lb. zeae* que producen estos anticuerpos en su superficie celular son capaces de unirse a las células de *S. mutans* y reducir la formación de caries en ratas al ser inoculadas conjuntamente (Kruger y col., 2002). *Streptococcus gordonii*, una bacteria inocua capaz de desarrollarse en las mucosas de mamíferos, ha sido modificada para producir un anticuerpo que presenta actividad contra la levadura patógena *Candida albicans*. En experimentos llevados a cabo en ratas, se ha demostrado que la inoculación de cepas de *S. gordonii* que producen este anticuerpo puede impedir la proliferación de *Candida* en la vagina de ratas. El grado de protección que se alcanza mediante esta estrategia es similar al de drogas antifúngicas utilizadas clínicamente para el tratamiento de candidiasis (Beninati y col., 2000).

Nuestro laboratorio ha aislado y caracterizado varios anticuerpos clonados que son capaces de unirse a la proteína VP8* e inhibir la infección por rotavirus en cultivos celulares (Fig. 3A). Estos anticuerpos están en la actualidad siendo producidos en *Lb. casei*. Hemos diseñado cepas que son capaces de sintetizar y secretar los anticuerpos al medio de cultivo al

fusionar el gen del anticuerpo a diversas secuencias de secreción, como la denominada PrtP (Fig. 3B). *Lb. casei* tiene particular interés en el caso del tratamiento de diarreas por rotavirus, ya que se ha demostrado que esta bacteria posee capacidades probióticas antirotavirus intrínsecas. La ingesta de leche fermentada por ciertas cepas de *Lb. casei* puede ayudar a disminuir el tiempo de duración de los episodios de diarrea (Pedone y col, 2000). Por esta razón, el uso de cepas de *Lb. casei* capaces de producir anticuerpos contra los rotavirus en la propia mucosa intestinal, el lugar de infección de los rotavirus, podría resultar una interesante terapia alternativa para estas infecciones.

Diseño de sistemas para la producción de antígenos de neumococo

La bacteria *Streptococcus pneumoniae* es la causante de importantes enfermedades infecciosas en humanos como otitis, neumonías o meningitis. Debido a su importancia como patógeno humano se han desarrollado numerosas vacunas, aunque siempre con un espectro de acción restringido. Esto ha llevado a los investigadores a la búsqueda de nuevas proteínas de la superficie celular de *S. pneumoniae* que pudiesen servir como antígenos para vacunación. Entre estas proteínas figuran la PsaA (*pneumococcal surface antigen A*; antígeno A de superficie en neumococos) y dos variantes de la PspA (*pneumococcal surface protein A*; proteína A de superficie en neumococos): PspA'1 y PspA'3, consideradas factores de patogenicidad y que son capaces de inducir la producción de anticuerpos protectores contra la infección por *S. pneumoniae*. Hemos utilizado a *Lb. casei* como huésped para la producción de PsaA, PspA'1 y PspA'3 de *S. pneumoniae* (Oliveira y col., 2003). Se emplearon para ello sistemas de expresión basados en los genes *lac* de utilización de lactosa de *Lb. casei*. Fusionando, mediante técnicas de biología molecular, los genes de los antígenos a secuencias promotoras de los genes *lac* se puede lograr una producción controlada de las proteínas mediante la adición de lactosa al medio de cultivo (Fig. 2B). De igual manera que para el antígeno VP8*, la fusión de los genes de PsaA y PspA a secuencias de secreción como PrtP tiene como consecuencia que el antígeno sintetizado se secrete al medio de cultivo. Las diferentes cepas de *Lb. casei* que sintetizan PsaA, PspA'1 y PspA'3 están siendo ensayadas en ratones para determinar si promueven la protección contra la infección por *S. pneumoniae*.

Perspectivas

Las posibilidades de expresión de moléculas bioactivas en BAL no se reduce a antígenos para vacunación. Existen otras interesantes aplicaciones en el campo del tratamiento de trastornos metabólicos. Se han construido cepas de *L. lactis* que producen una enzima denominada lipasa, implicada en el metabolismo de las grasas. La ingesta de estas bacterias en cerdos con insuficiencia pancreática produce una mejor absorción de los lípidos en el intestino (Drouault y col., 2002). Las BAL también pueden ser utilizadas para producir interleuquinas (IL), unas proteínas de comunicación de las células del sistema inmune. En *L. lactis* se ha producido la IL-10, que tiene propiedades antiinflamatorias. El suministro oral de las células productoras a ratones en los que se ha inducido una colitis con agentes químicos, da como resultado la curación en un 50%, con el restablecimiento de la integridad del epitelio intestinal. La colitis inducida químicamente en ratones es un buen modelo de experimentación animal para graves enfermedades inflamatorias del intestino en humanos, como la enfermedad de Crohn (Steidler, 2002). Esto ha hecho que se hayan diseñado las primeras cepas de *L. lactis* de grado alimentario que expresan la IL-10 humana para su uso como terapia en la enfermedad de Crohn (Steidler y col., 2003). En este aspecto nosotros estamos trabajando en la producción en *Lb. casei* de la IL-12, que podría ser utilizada como potenciador del sistema inmune en estrategias de vacunación.

Las técnicas de ingeniería genética y la disponibilidad cada vez mayor de herramientas moleculares adaptadas a las BAL abren las puertas para la mejora de las capacidades de unas bacterias que, aunque ya beneficiosas de por sí, poseen un gran potencial para mejorar sus características y aplicaciones.

Referencias

Beninati, C., Oggioni, M.R., Boccanera, M., Spinosa, M.R., Maggi, T., Conti, S., Magliani, W., De Bernardis, F., Teti, G., Cassone, A., Pozzi, G. y Polonelli, L. (2000). Therapy of mucosal candidiasis by expression of an anti-idiotype in human commensal bacteria. *Nat. Biotechnol.* **18:**1060-1064.

Drouault, S., Juste, C., Marteau, P., Renault, P. y Corthier, G. (2002). Oral treatment with *Lactococcus lactis* expressing *Staphylococcus hyicus* lipase enhances lipid digestion in pigs with induced pancreatic insufficiency. *Appl. Environ. Microbiol.* **68:**3166-3168.

Gil, M.T., De Souza, C.O., Asensi, M. y Buesa, J. (2000). Homotypic protection against rotavirus-induced diarrhea in infant mice breast-fed by dams immunized with the recombinant VP8* subunit of the VP4 capsid protein. *Viral Immunol.* **13:**187–200.

Holck, A. y Naes, H. (1992) Cloning, sequencing and expression of the gene encoding the cell envelope associated proteinase from *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* NCDO151. *J. Gen. Microbiol.* **138:**1353-1364.

Kruger, C., Hu, Y., Pan, Q., Marcotte, H., Hultberg, A., Delwar, D., van Dalen, P.J., Pouwels P.H., Leer, R.J., Kelly, C.G., van Dollenweerd, C., Ma, J.K. y Hammarstrom, L. (2002). In situ delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat. Biotechnol.* **20:**702-706.

Maassen, C.B., Laman, J.D., den Bak-Glashouwer, M.J., Tielen, F.J., van Holten-Neelen, J.C., Hoogteijling, L., Antonissen, C., Leer, R.J., Pouwels, P.H., Boersma, W.J. y Shaw, D.M. (1999) Instruments for oral disease-intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine* **17:** 2117-2128.

Mercenier, A., Muller-Alouf, H. y Grangette, C. (2000). Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2:**17-25.

Miller, M.A., y McCann, L. (2000). Policy analysis of the use of hepatitis B, *Haemophilus influenzae* type b-, *Streptococcus pneumoniae*-conjugate and rotavirus in national immunization schedules. *Health Economics* **9:**19-36.

Oliveira, M.L.S., Monedero, V., Miyaji, E. N., Leite L.C.C., Ho, P.L. y Pérez-Martínez, G. (2003). Expression of *Streptococcus pneumoniae* antigens, PsaA (Pneumococcal Surface Antigen A) and PspA (Pneumococcal Surface Protein A) by *Lactobacillus casei. FEMS Microbiol. Lett.* **227:**25-31.

Pedone, C.A., Arnaud, C.C., Postaire, E.R., Bouley, C.F. y Reinert, P. (2000). Multicentric study of the effect of milk fermented by *Lactobacillus casei* on the incidence of diarrhoea. *Int. J. Clin. Pract.* **54:**568-571.

Perdigón, G., Maldonado-Galdeano, C., Valdez, J.C. y Medici, M. (2002). Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56:** 21-26.

Pérez-Arellano, I. y Pérez-Martínez, G. (2003) Optimization of the green fluorescent protein (GFP) expression from a lactose-inducible promoter in *Lactobacillus casei*. *FEMS Microbiol Lett*. **222:**123-127.

Steidler, L. (2002). In situ delivery of cytokines by genetically engineered *Lactococcus lactis*. *Antonie van Leeuwenhoek* **82:**323-331.

Steidler L., Neirynck, S., Huyghebaert, N., Snoeck, V., Vermeire, A., Goddeeris, B., Cox, E., Remon, J.P. y Remaut, E. (2003). Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. *Nat Biotechnol.* **21:**785-789.

von Heijne, G. y Abrahamsen, L. (1989). Species specific variation in signal peptide design. Implication for protein secretion in foreign hosts. *FEBS Lett.* **244:**439-446.

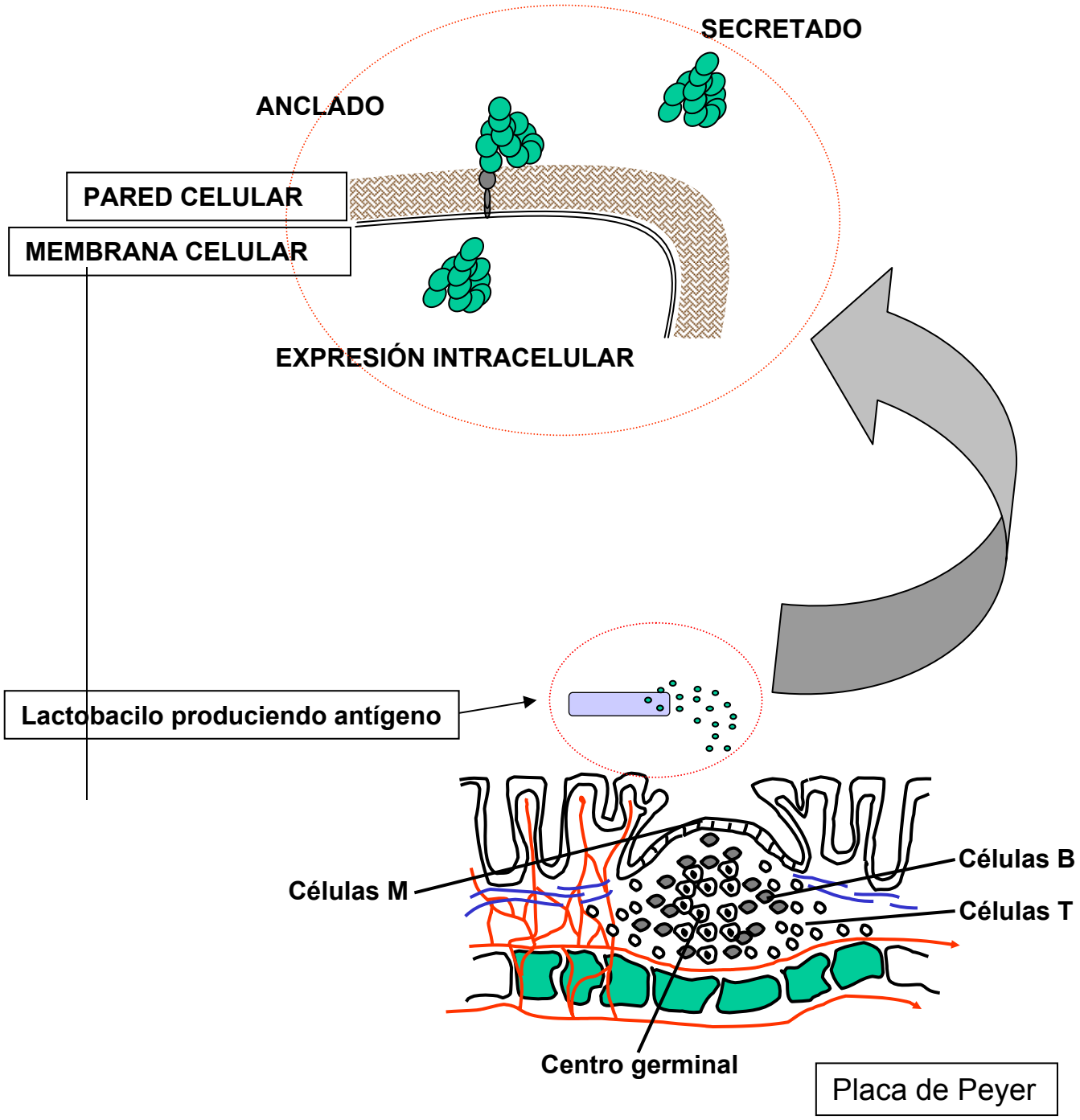


Figura 1. Esquema de una placa de Peyer y modelos de expresión de antígenos por lactobacilos para su entrega en la mucosa intestinal.

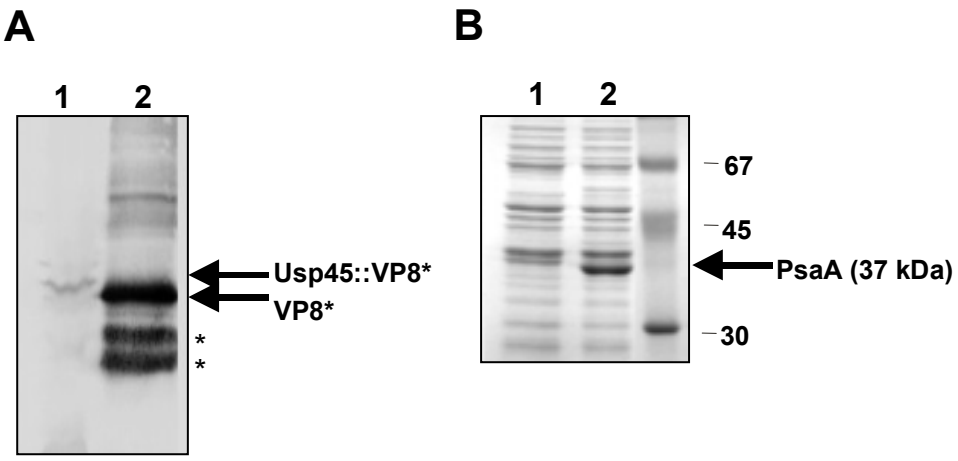


Figura 2. Producción de antígenos de patógenos en *Lactobacillus casei* para su uso como vacuna oral. A) Secreción al medio de cultivo del antígeno VP8* de rotavirus por *Lb. casei*. Las proteínas celulares (1) y las del medio de cultivo (2) se separaron por su peso molecular y la proteína VP8* se detectó mediante anticuerpos. En el interior celular sólo se detecta una pequeña cantidad de VP8* fusionada a la secuencia de secreción Usp45. La proteína VP8* secretada al medio es parcialmente degradada dando lugar a formas de menor tamaño molecular (*). B) Producción controlada en *Lb. casei* del antígeno PsaA de *Streptococcus pneumoniae*. Las células se cultivaron en presencia de glucosa (1) o lactosa (2) y las proteínas de extractos celulares se separaron por su peso molecular. Se detecta la producción de PsaA (14 % del total de proteína) tras la inducción por lactosa.

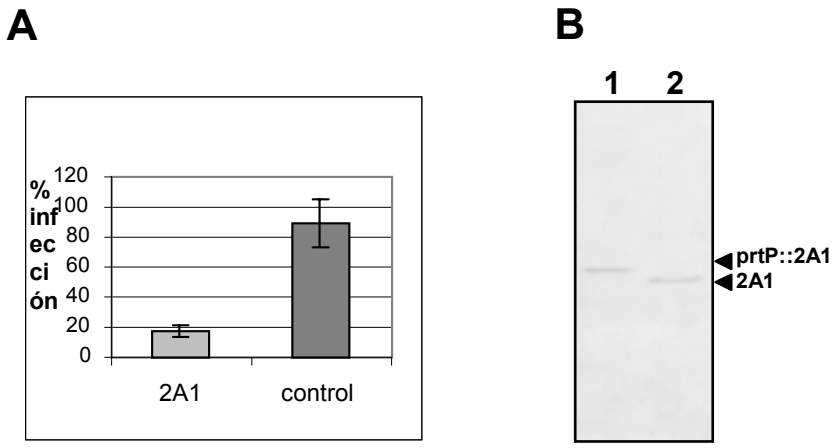


Figura 3. A) Reducción de la infectividad de rotavirus en un cultivo celular al incubar con un anticuerpo antiVP8* denominado 2A1, frente a otro anticuerpo que no reconoce ninguna proteína de rotavirus (control). B) Producción y secreción al medio de cultivo del anticuerpo 2A1 en *Lactobacillus casei*. Las proteínas celulares (1) y las del medio de cultivo (2) se separaron por su peso molecular y se detectó la presencia del anticuerpo 2A1.

CAPÍTULO 15

LACTOBACILLUS, VEHÍCULOS PRESENTADORES DE ANTÍGENOS

Beatriz Martínez

Instituto de Productos Lácteos de Asturias, CSIC, Carretera de Infiesto s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias

Introducción

Las bacterias lácticas y, en particular, el género *Lactobacillus* son un grupo de microorganismos de gran relevancia industrial ya que participan en la elaboración y maduración de una gran variedad de alimentos fermentados. Estas bacterias están ligadas íntimamente al ser humano ya que han sido consumidas desde tiempos inmemoriales a través de dichos alimentos fermentados sin que se les haya asociado con ningún proceso patológico. Más aún, algunas cepas de *Lactobacillus* forman parte de la microbiota endógena del tracto gastrointestinal y genitourinario del hombre y de los animales. En este ecosistema se les ha asociado a numerosas funciones beneficiosas para la salud o propiedades probióticas como por ejemplo: prevención de la colonización por patógenos, reducción de los niveles de colesterol y modulación del sistema inmune. La capacidad de estas bacterias de adherirse y colonizar la mucosa intestinal ha abierto la posibilidad de utilizarlas como vehículos para la administración de compuestos de interés (fármacos, enzimas) directamente en su lugar de acción, en este caso, la mucosa intestinal.

En este capítulo se describirá el potencial de los lactobacilos como entidades presentadoras de antígenos para el diseño de vacunas de administración oral, capaces de desencadenar una respuesta inmune local y/o sistémica y conferir así protección frente a la infección.

Inmunización vía oral y *Lactobacillus*

El éxito inicial de las primeras vacunas diseñadas ya en los siglos XVIII y XIX por Jenner y Pasteur con patógenos atenuados o inactivados, junto con el descubrimiento de la penicilina por Fleming, indujo a pensar que la erradicación de las enfermedades infecciosas era cuestión de tiempo. Sin embargo, la aparición de nuevos agentes infecciosos y de cepas resistentes a los antibióticos ha hecho necesario continuar con el desarrollo de nuevas estrategias de vacunación.

Teniendo en cuenta que muchos de los agentes patógenos penetran en el organismo humano a través de las mucosas (intestinal y respiratoria), nuestra primera línea de defensa se apoya, inicialmente, en la activación del sistema de inmunidad innato y en la producción de inmunoglobulina A secretora (sIgA), anticuerpo mayoritario sintetizado en la mucosa (inmunidad adquirida). Por esta razón, los esfuerzos se dirigen a diseñar vacunas que activen, al menos inicialmente, una respuesta inmune local debido a que la administración por vía parenteral raramente consigue este objetivo. La inmunización por vía oral ofrece otras ventajas como su fácil administración dado que no requiere personal sanitario cualificado y, además, reduce la probabilidad de contagio a individuos no inmunizados ya que, idealmente, neutralizaría la infección inicial y la replicación del agente infeccioso (Ryan y col., 2001).

El principal problema de la inmunización por vía oral es que la mayoría de los antígenos proteicos son poco inmunogénicos cuando se administran en forma soluble por esta vía. Para superar este inconveniente se han seguido, básicamente, dos estrategias diferentes: 1) proteger el antígeno en micropartículas y liposomas y 2) utilizar bacterias o virus atenuados que sinteticen el antígeno de interés. En este último caso, se investigan como vectores cepas atenuadas de microorganismos patógenos: *Salmonella*, *Listeria*, *Vibrio* y *Mycobacterium bovis* BCG. Sin embargo, no es fácil obtener mutantes atenuados que conserven una capacidad inmunogénica suficiente sin que supongan una amenaza para poblaciones de riesgo tales como niños, individuos inmunodeprimidos o de avanzada edad y que, además, sean estables con una frecuencia de reversión al fenotipo salvaje muy baja o nula. Una alternativa muy interesante es la utilización de bacterias Gram-positivas consideradas como "seguras" o GRAS como, por ejemplo, *Lactobacillus*. Se minimizan así posibles riesgos como los anteriormente mencionados y la ausencia de lipopolisacárido evitaría el shock endotóxico. El desarrollo de herramientas moleculares adecuadas que permiten la modificación genética de este grupo de bacterias ha contribuido, en gran medida, a que la utilización de *Lactobacillus* en el diseño de vacunas de administración oral sea una alternativa real.

El género *Lactobacillus* ofrece numerosas ventajas como entidad presentadora de antígenos. Experimentos realizados en la década de los 90 ya habían puesto de manifiesto el efecto adyuvante o inmunoestimulador de numerosas cepas de *Lactobacillus* al ser administradas conjuntamente con determinados antígenos (Gerritse y col. 1991). Por lo tanto, sería posible combinar en un mismo sistema dos de los aspectos cruciales en el diseño de una vacuna eficaz: correcta presentación del antígeno en la mucosa y efecto inmunoestimulador (Seegers, 2002). Además, algunas cepas son capaces de sobrevivir en las condiciones adversas del tracto gastrointestinal (acidez, motilidad, sales biliares), colonizar

transitoriamente la mucosa intestinal y sintetizar el antígeno *in vivo*. Por último, dado el uso industrial de cepas de *Lactobacillus* en la industria alimentaria existen ya en funcionamiento sistemas de producción a escala industrial y métodos de conservación adecuados.

Diseño de vacunas

La obtención de cepas de *Lactobacillus* presentadoras de antígenos conlleva, en esencia, la clonación del DNA que codifica el antígeno de interés en la cepa receptora y su síntesis en el compartimento elegido: citoplasma, asociado a la superficie celular o secretado.

Las diferentes etapas que se describirán a continuación se esquematizan en la Fig. 1. Éstas están sujetas al tipo de respuesta inmune deseada y han de optimizarse en cada caso en particular. La mayoría de los experimentos a los que se hará mención se han realizado utilizando como antígeno modelo el fragmento C de la toxina tetánica (TTFC), ya que ha sido con éste con el que se han obtenido los resultados más prometedores. Este polipéptido, no tóxico, de 47 kDa es inmunogénico y existe un modelo experimental en ratones para comprobar el nivel de protección adquirido. Además, dicha protección radica fundamentalmente en una respuesta inmune humoral sistémica (mediada por IgG), indicando la capacidad de la administración oral para inducir tal respuesta.

Selección de cepas

El género *Lactobacillus* está constituido por más de 60 especies que varían tanto en su genotipo, con % de G+C entre 32-52%, como en sus actividades metabólicas y propiedades probióticas. Esta heterogeneidad ofrece un amplio abanico de posibilidades a la hora de seleccionar una determinada cepa como presentadora de antígenos. Los experimentos realizados hasta el momento han utilizado habitualmente cepas de *Lactobacillus plantarum* y *Lb. casei* dada la disponibilidad de herramientas genéticas adecuadas.

Uno de los aspectos más controvertidos es la elección o no de cepas con tiempos de residencia más o menos largos en el intestino. Esto conllevaría una expresión continuada del antígeno que podría desencadenar una tolerancia al mismo no deseable pero, por otra parte, no sería necesario obtener niveles muy altos de expresión *in vivo*, ni serían necesarias sucesivas dosis para conseguir una respuesta eficaz (Pouwels y col., 1998; Mercenier y col., 2000). Una mayor supervivencia en el tracto gastrointestinal se ha asociado a propiedades como la

adherencia, resistencia al ácido y sales biliares y producción de compuestos antagonistas que favorecen la competitividad de la cepa frente a las ya presentes (Holzapfel y col., 1998).

Se ha comprobado, a su vez, que el poder adyuvante varía en gran medida de una especie a otra. Por ejemplo, células irradiadas de *Lb. casei* indujeron la síntesis del factor de necrosis tumoral (TNF-α), mientras que las de *Lb. reuteri* favorecían la síntesis de IL-10. Además, la combinación de distintas especies puede cambiar el espectro de citoquinas inducidas (Christensen y col., 2002). Sería posible, por tanto, modular la expresión de citoquinas para inducir un determinado tipo de respuesta inmune humoral o celular.

Herramientas genéticas

La disponibillidad de las herramientas genéticas adecuadas y un sistema de transformación eficiente son los requisitos indispensables para construir los vehículos presentadores de antígenos. Muchas de las cepas de *Lactobacillus* que se presentan como buenas candidatas por su carácter adyuvante o capacidad de colonizar la mucosa intestinal son muy reticentes a la aceptación de DNA exógeno y es necesario desarrollar protocolos de transformación eficientes.

Los vectores de clonación más habituales en *Lactobacillus* están basados en replicones independientes o plásmidos con diferente número de copias por célula. Se han desarrollado también sistemas de integración basados en transposones e integrasas de fagos atemperados que son mucho más estables y, en algunos casos, permiten la ausencia de resistencias a antibióticos utilizadas como marcadores de selección u otro DNA de grado no alimentario (Mercenier y col., 2000). Sin embargo, su uso es más restringido ya que se ha comprobado que los bajos niveles de expresión debidos a la existencia de una copia única del gen heterólogo no son suficientes para provocar una respuesta inmune.

La variabilidad genética dentro del grupo de los lactobacilos es la causa de que muchos de los sistemas de expresión desarrollados sean específicos de especie. En la Fig. 2 se representa un esquema de uno de los vectores de expresión desarrollados en el TNO (Holanda) para la expresión de genes heterólogos en *Lb. casei* y *Lb. plantarum.* Básicamente, estos vectores constan de un promotor fuerte, una secuencia de iniciación de la traducción, las señales de secreción y anclaje necesarias para dirigir el antígeno al compartimento celular deseado (ver siguiente apartado) y un terminador de la transcripción (Pouwels y col., 2001). Este bloque de expresión está delimitado por secuencias de reconocimiento de enzimas de restricción únicas que permiten su transferencia a diferentes replicones con facilidad. Se han

utilizado con éxito promotores inducibles como el sistema NICE basado en el promotor de la nisina, diseñado inicialmente para *Lactococcus*, el promotor de la α-amilasa o de enzimas implicados en el metabolismo de la xilosa, sujetos a represión por catabolito, para expresar algunos antígenos que resultan ser muy tóxicos para la cepa recombinante.

Presentación del antígeno

Los antígenos pueden localizarse en el citoplasma, estar asociados a la superficie celular o bien ser secretados al exterior (Fig. 3). En un estudio comparativo, la cepa recombinante de *Lb. plantarum* NCIMB8826 que producía el antígeno TTFC intracitoplasmáticamente dio lugar a títulos de IgG específicos superiores a los conseguidos con las otras cepas recombinantes debido, probablemente, a la mayor cantidad de antígeno sintetizado. Sin embargo, a igual nivel de expresión, el TTFC presentado en superficie resultó ser más inmunogénico (Reveneau y col., 2002).

Existen diferentes mecanismos para anclar los antígenos a la superficie celular (Fig. 3). Para ello, se utilizan estructuras celulares de las bacterias Gram-positivas como la membrana plasmática (proteínas integrales de membrana y lipoproteínas) o la pared celular donde las uniones pueden ser covalentes o no (Leenhouts y col., 1999). La complejidad estructural de las proteínas de membrana permite tan sólo la inserción de pequeños péptidos. La estrategia más utilizada es generar híbridos mediante la fusión traduccional con el extremo C-terminal de proteínas de superficie que se anclan al peptidoglicano (proteinasas de *Lactobacillus*, proteína A de *Staphylococcus* y proteína M6 de *Streptococcus pyogenes*). La unión covalente se produce a través de un enlace amida entre el aminoácido treonina del motivo conservado LPXTG con los aminoácidos que entrecruzan las subunidades del peptidoglicano. Se ha estimado que el número de moléculas de TTFC producidas en superficie por una cepa de *Lb. casei* recombinante era de, aproximadamente, 4×10^3 moléculas por célula (Maassen y col., 1999). Con esta cepa sólo se obtuvieron altos niveles de anticuerpos cuando se administró por vía parenteral. Sin embargo, utilizando como huésped *Lb. plantarum*, esta misma construcción provocó una respuesta sistémica adecuada tras la inmunización de ratones por vía intragástrica e intranasal.

En la construcción de muchas de estas cepas recombinantes se utilizan técnicas de ingeniería genética que generan cepas modificadas no consideradas de grado alimentario, razón por la cual su uso podría verse restringido. En este aspecto, la asociación de los antígenos a la superficie celular a través de dominios de unión no covalente es una estrategia

muy atractiva. La proteína híbrida (antígeno + dominio de unión a pared celular) sería producida por una cepa recombinante y, una vez aislada y purificada, se asociaría con la cepa de *Lactobacillus* adecuada para la inmunización. Hasta el momento se han descrito dos posibles candidatos: la autolisina mayoritaria de *Lactococcus lactis* AcmA y la capa S.

La capa S es una estructura supramolecular constituida por una única entidad proteica, la proteína S, que rodea por completo la superficie celular más externa de los microorganismos que la sintetizan como es el caso de algunos lactobacilos: *Lb. acidophilus* (SlpA), *Lb. crispatus* (CbsA) y *Lb. brevis* (SlpA-brevis) (Fig. 4). Esta proteína es capaz de autoensamblarse y formar cristales bidimensionales *in vitro* e interacciona, no covalentemente, con componentes no identificados de la pared celular. La proteína S supone el 10 – 15% de la proteína total, estimándose que una sola célula porta unas 10^5 moléculas. Por lo tanto, se aseguraría un nivel de producción muy alto de aquellos antígenos fusionados a estas proteínas.

Otra de las ventajas que presentan algunas proteínas S como moléculas presentadoras de antígenos es que también pueden actuar como adhesinas y mediar la interacción de las células con el epitelio intestinal. Por ejemplo, CbsA y SlpA-brevis reconocen específicamente al colágeno tipo IV y la fibronectina, respectivamente, ambos componentes de la matriz extracelular. Por otro lado, la síntesis de CbsA y SlpA-brevis ancladas en la pared celular de *Lb. casei* y *L. lactis* confiere los fenotipos adherentes a las cepas receptoras (Martínez y col., 2000; Åvall-Jääskeläinen y col., 2002).

La disponibilidad de secuencias de distintas proteínas S del grupo de *Lb. acidophilus* ha permitido estudiar la relación entre la estructura y la función de estas proteínas y seguir una estrategia racional para generar mutantes de inserción sin alterar su capacidad de autoensamblarse y unirse a la pared celular (Smit y col., 2002). Estas proteínas S (40-45 kDa) tienen una homología muy alta en el último tercio del extremo carboxilo terminal donde abundan aminoácidos cargados positivamente a través de los cuales se establece la interacción con los componentes de la pared celular (Smit y Pouwels, 2002). En el extremo amino terminal existen, sin embargo, sólo tres regiones conservadas que estarían implicadas en la interacción entre monómeros para formar la capa S. Sólo en las regiones variables se ha logrado insertar pequeños péptidos sin alterar la funcionalidad de la proteína S, es decir, su capacidad de autoensamblarse. Además, se ha comprobado con técnicas de inmunofluorescencia que los péptidos insertados se encontraban expuestos al exterior (Smit y col., 2002).

La utilización de las proteínas S se encuentra todavía en fase de experimentación. Hasta el momento, se han fusionado pequeños epítopos modelo como VP1 (10 aa; virus de la polio) y c-Myc (19 aa; protooncogen humano *c-myc*). A su vez, ha sido posible reemplazar el gen original de la proteína S por el híbrido, dando lugar a células completamente "cargadas" con el antígeno ($>10^5$ moléculas por célula). En la actualidad se están llevando a cabo experimentos de inmunización por vía oral en modelos animales.

Síntesis *in vitro* y eficacia *in vivo*

Se ha observado una relación clara entre el nivel de expresión del antígeno y la respuesta inmune obtenida. Factores como el número de copias del gen heterólogo, el uso preferencial de codones, la actividad del promotor y la toxicidad del producto en la cepa recombinante afectan seriamente a los niveles de expresión. Con diferentes antígenos se ha conseguido producir en el citoplasma entre 1-5% de la proteína total, hasta 13 mg l^{-1} en el sobrenadante de cultivo y entre 10^4 y 10^5 moléculas por célula en los sistemas de anclaje en la pared celular (Mercenier y col., 2000; Pouwels y col., 2001). Pueden obtenerse altos niveles de expresión *in vitro* y de producción del antígeno incluyendo la región 5' del RNAm de la proteína S de *Lb. acidophilus* lo que favorece la estabilidad del transcrito.

Uno de los factores a tener en cuenta en el diseño de cepas presentadoras de antígenos es que los niveles de expresión observados *in vitro* pueden ser totalmente diferentes a los que ocurran *in vivo.* Por esta razón, se están seleccionando promotores que sean activos en el ecosistema intestinal. Para ello, una herramienta muy eficaz es la utilización de GFP (*green fluorescent protein*; proteína fluorescente verde) cuya producción *in situ* puede visualizarse fácilmente por microscopía de fluorescencia.

Los ensayos de inmunización vía oral en animales con lactobacilos recombinantes están supeditados a la obtención de las cepas recombinantes adecuadas y la mayoría están en fase de realización. Los resultados preliminares obtenidos hasta el momento con lactobacilos que sintetizan TTFC son prometedores, pero aún estamos lejos de un futuro "alimento vacuna". La capacidad inmunogénica de estas cepas ha quedado demostrada ya que con ellas se inducen anticuerpos específicos en la mucosa (IgA) y sistémicos (IgG) al ser suministrados por varias vías, incluida la oral, y confieren protección en los casos analizados. Sin embargo, no se conocen con exactitud los niveles de expresión *in* vivo de los antígenos, ni qué mecanismos moleculares son responsables de la inducción de la respuesta inmune específica. Por otro lado, apenas hay datos sobre la capacidad de los lactobacilos de inducir una respuesta

inmune celular, como la desencadenada frente a patógenos intracelulares, aunque se ha observado que los lactobacilos que colonizan el intestino y presentan el antígeno en superficie inducen tanto los linfocitos T_{H1} (respuesta celular) como los T_{H2} (respuesta humoral) (Seegers, 2002).

Perspectivas futuras

Existen todavía muchas incógnitas sobre el futuro de los lactobacilos como entidades presentadoras de antígenos. Sin embargo, ya se están investigando otras posibilidades de explotación de los lactobacilos para combatir las enfermedades a través de su interacción con el sistema immune. Se plantea, por ejemplo, combinar la producción de determinados antígenos con la síntesis de moléculas inmunomoduladoras (citoquinas) por la propia cepa y mejorar así la respuesta inmune. Esta estrategia ya se ha aplicado con éxito en el género *Lactococcus* (Steidler y col., 1998). Los lactobacilos también pueden ser utilizados en procesos de inmunización pasiva mediante la producción de fragmentos de anticuerpos de una sola cadena (scFv). De este modo, se ha conseguido reducir el desarrollo de caries en ratas mediante la producción de scFv que antagonizan la adhesina de *Streptococcus mutans* (Kruger y col., 2002). Por último, la imunización por vía oral puede perseguir otros fines como la inducción de tolerancia para el tratamiento de enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple (Maassen y col., 1999) o el tratamiento de diferentes alergias.

No se puede descartar, por lo tanto, que el conocimiento más detallado de las bases moleculares que subyacen al efecto inmunoestimulador de los lactobacilos y del complejo funcionamiento de nuestro sistema inmune permita aún desarrollar nuevas estrategias para modular la respuesta inmune y conferir la protección adecuada.

Agradecimientos

Quiero agradecer al Prof. Peter H. Pouwels, al Dr. E. Smit y al Dr. F. Tielen su apoyo en el trabajo realizado con CbsA. Beatriz Martínez ha disfrutado un contrato postdoctoral financiado por la Unión Europea (ERBFMBICT 961758) en el TNO Voeding, Zeist, Holanda.

Referencias

Åvall-Jääskeläinen, S., Kylä-Nikkilä, K., Kahala, M., Miikkulainen-Lahti, T. y Palva, A. (2002). Surface display of foreign epitopes on the *Lactobacillus brevis* S-layer. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 5943-5951.

Christensen, H.R., Frokiaer, H. y Pestka, J.J. (2002). Lactobacilli diferentially modulate expression of cytokines and maduration surface markers in murine dendritic cells. *J. Immunol.* **168:**171-178.

Gerritse, K., Posno, M., Fasbender, M.J., Schellekens, M.M., Boersma, W.J.A. y Claassen, E. (1991). Mucosal immune responses and systemic immunological memory after oral administration of trinitrophenyl *Lactobacillus* conjugates in mice. En *Lymphatic Tissues and In Vivo Immune Response*, Imhof, B., Berrih-Aknin, S., Ezine, S. (Eds.), p. 497-504. Marcel Dekker, New York.

Holzapfel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U. y Huis in´t Veld, J.H.J. (1998). Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol*. **41:**85-101.

Kruger, C., Hu, Y., Pan, Q., Marcotte, H., Hultberg, A., Delward, D., van Dalen, P.J., Pouwels, P.H., Leer, R.J., Kelly, C.G., van Dollenweerd, C., Ma, J.K. y Hammarstrom, L. (2002). In situ delivery of passive immunity by lactobacilli producing single-chain antibodies. *Nat. Biotech.* **20:**702-706.

Leenhouts, K., Buist, G. y Kok, J. (1999). Anchoring of proteins to lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **76:**367-376.

Maassen, C.B.M., Laman, J.D., Heijne den Bak-Glashouwer, M.J., Tielen, F.J., van Holten-Neelen, J.C.P.A., Hoogteijling, L., Antonissen, C., Leer, R.J., Pouwels, P.H., Boersma, W.J.A. y Shaw, D.M. (1999). Instruments for oral disease-intervention strategies: recombinant *Lactobacillus casei* expressing tetanus toxin fragment C for vaccination or myelin proteins for oral tolerance induction in multiple sclerosis. *Vaccine* **17:**2117-2128.

Martínez, B., Sillanpää, J., Smit, E., Korhonen, T.K. y Pouwels, P.H. (2000). Expression of the collagen-binding S-protein gene of *Lactobacillus crispatus* JCM5810 in *L. casei* ATCC393^{T}. *J. Bacteriol.* **182:**6857-6861.

Mercenier, A., Müller-Alouf, H. y Grangette, C. (2000). Lactic acid bacteria as live vaccines. *Curr. Issues Mol. Biol*. **2:**17-25.

Pouwels, P. H., Vriesema, A., Martínez, B., Tielen, F.J., Seigers, J.F., Leer, R.J., Jore J. y Smit, E. (2001). Lactobacilli as vehicles for targeting antigens to the mucosal tissues by surface exposition of foreign antigens. *Methods Enzymol.* **336:**369-389.

Pouwels, P.H., Leer, R.J., Shaw M., Heijne den Bak-Glashouwer, M.J., Tielen, F.D., Smit, E., Martínez, B., Jore, J. y Conway, P.L. (1998). Lactic Acid Bacteria as antigen delivery vehicles for oral immunization purposes. *Int. J. Food Microbiol*. **41:**155-167.

Reveneau, N., Geoffroy, M.C., Locht, C., Chagnaud, P. y Mercenier, A. (2002). Comparison of immune responses induced by local immunizations with recombinant *Lactobacillus plantarum* producing tetanus toxin fragment C in different cellular locations. *Vaccine* **20:**1769-1777.

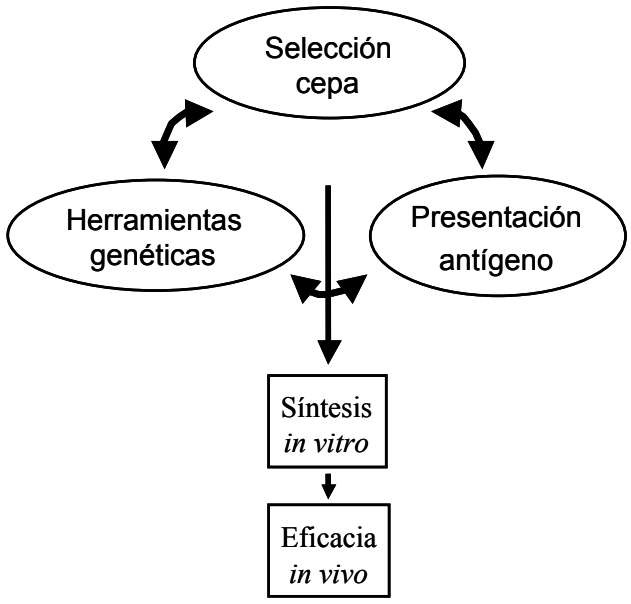
Ryan, E.J., Daly, L.M. y Mills, K.H.G. (2001). Inmunomodulators and delivery systems for vaccination by mucosal routes. *Trends Biotech.* **19:**293-304.

Seegers, J.F.M.L. (2002). Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotech.* **20:**508-515.

Smit, E. y Pouwels, P.H. (2002). One repeat of the cell wall binding domain is sufficient for anchoring the *Lactobacillus acidophilus* surface layer protein. *J. Bacteriol*. **184:**4617-4619.

Smit, E., Jager, D., Martinez, B., Tielen, F.J. y Pouwels, P.H. (2002). Structural and functional analysis of the S-layer protein crystallisation domain of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356: evidence for protein-protein interaction of two subdomains. *J. Mol. Biol.* **324:**953-964.

Steidler, L., Robinson, K., Chamberlain, L., Schofield, K.M., Remaut, E., Le Page, R.W. y Wells, J.M. (1998). Mucosal delivery of murine interleukin-2 (IL-2) and IL-6 by recombinant strains of *Lactococcus lactis* coexpressing antigen and cytokine. *Infect. Immun*. **66:**3183-3189.


Selección
cepa
Herramientas
genéticas
Presentación
antígeno
Síntesis
in vitro
Eficacia
in vivo

Abreviaturas

AFLP: Acrónimo de *Amplified Fragment Length Polymorphism*; análisis del polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados

BAL: Bacterias lácticas o bacterias del ácido láctico

GRAS: Acrónimo de *Generally Recognized As Safe;* reconocidos generalmente como seguros

PCR: Acrónimo de *Polymerase Chain Reaction;* reacción en cadena de la polimerasa

PCR-DGGE: Acrónimo de *PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis;* electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante de productos de PCR

PFGE: Acrónimo de *Pulsed Field Gel Electrophoresis;* electroforesis en gel de campo pulsado

RAPD: Acrónimo de *Random Amplification of Polymorphic DNA;* análisis del polimorfismo del DNA amplificado con cebadores arbitrarios