

Los probióticos: ¿cómo una mezcla de microorganismos hacen un gran trabajo?

The probiotics: how a mixture of microorganisms do a great job?

Jorge A. Reyes Esparza, Lourdes Rodríguez Fragoso

Facultad de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Morelos

Resumen

Los probióticos son una mezcla de microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas proporcionan o generan efectos benéficos para la salud del huésped. Los probióticos contienen microorganismos no patógenos que son resistentes a los procedimientos culinarios y de fabricación, y son tolerados por el sistema inmune intestinal. Los mecanismos de acción propuestos para los probióticos incluyen: actividad antibacteriana, protección de la barrera muco-epitelial, desintoxicación y modulación de la respuesta inmune local y sistémica. En esta revisión se describen los mecanismos de acción propuestos y se muestran evidencias de que podrían ser efectivos como profilaxis o tratamiento en ciertas patologías, o enfermedades. La información disponible muestra que los probióticos tienen el potencial para ser usados en una gran variedad de enfermedades.

Abstract

Probiotics are a mix of live microorganisms which when are administered in adequate amounts provide or generate beneficial effects on host health. Probiotics contain non-pathogenic microorganisms that are resistant to cooking and manufacturing processes, and are tolerated by the intestinal immune system. The microorganism-host symbiosis occurs throughout life and should be a balance between them, but when this do not occur leading to the development of a disorder or disease. The mechanism of action for probiotics includes antibacterial activity, protection of the muco-epithelial barrier, detoxification and modulation of local and systemic immune response. This review describes the mechanism of action and show evidence that they could be effective as prophylaxis or treatment of certain diseases. The information available shows that probiotics have the potential to be used in a variety of diseases.

Palabras clave: probióticos, microorganismos, simbiosis, sistema inmune, barrera muco-epitelial.

Key words: probiotics, microorganism, symbiosis, immune system, muco-epithelial barrier.

Correspondencia

Jorge A. Reyes Esparza
Facultad de Farmacia, UAEM
Av. Universidad 1001
Col. Chamilpa, Cuernavaca 62209, Morelos
Tel/Fax: (777) 329 7089
e-mail: jareyes@uaem.mx

Fecha de recepción: 7 de junio de 2011

Fecha de recepción de modificaciones: 1 de septiembre de 2011

Fecha de aceptación: 4 de noviembre de 2011

Introducción

El hombre vive en asociación con un micro-ecosistema de microorganismos presentes en la superficie de piel y mucosas de los tractos digestivo, respiratorio y genitourinario, comúnmente llamada *flora normal*. La mayor cantidad y concentración de microorganismos normalmente se localiza en el tracto gastrointestinal (TGI). La flora intestinal está compuesta por más de 500 especies de bacterias diferentes, las cuales desarrollan importantes funciones como: colaborar en la digestión y desintoxicación de los alimentos, además de estimular el sistema inmune y proteger contra la invasión de bacterias, hongos, virus y protozoarios (Figura 1).

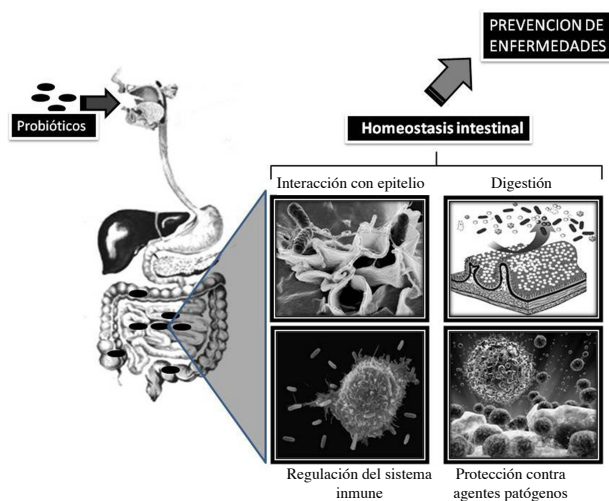


Figura 1. Función de los probióticos en el intestino. Armado con figuras tomadas de <http://biogenmol.blogspot.com/2008/07/el-intestino-delgado.html>

La flora se adquiere inmediatamente después del nacimiento y permanece relativamente estable durante toda la vida, colaborando en la homeostasis.^{1,3} En el caso del TGI humano, la microflora está integrada por anaerobios obligados (90-95 %) y anaerobios facultativos (1-10%). Los anaerobios obligados incluyen *Bifidobacterium*, *Clostridium*, *Eubacterium*, *Fusobacterium*, *Peptococcus*, *Peptostreptococcus* y *Bacteriodes*, mientras que los anaerobios facultativos incluyen *Lactobacillus*, *E. coli*, *Klebsiella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Bacillus*. Cada persona tiene su propia y única colección de microorganismos, principalmente en lo referente a las cepas de bacterias productoras de ácido láctico, tales como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*. De éstas, las bifidobacterias son las predominantes y, representan hasta el 80% de las bacterias cultivables presentes en las heces fecales de niños, y 25 % en las de adultos. El organismo regula el crecimiento y masa de la flora a través de la peristalsis, la secreción de ácido gástrico, y sales biliares; además genera un gradiente de concentración de bacterias mayor en el colon.³

La flora del TGI se ve modificada e influenciada también por el tipo de alimentos consumidos, de ahí que cada persona tenga su propia flora, según su alimentación. Así mismo, la administración enteral o parenteral de algunos fármacos como los antibióticos, la quimioterapia, radioterapia, así como agentes inmunosupresores modifican la composición de la microflora, tanto cuantitativa, como cualitativamente. Los fármacos pueden disminuir la cantidad de todas o algunas cepas o incluso desaparecer algunas y aumentar otras. Ahora se sabe que, los cambios en la composición y cantidad de esta flora, incrementan el riesgo de sufrir alguna infección y causar problemas digestivos. De ahí que, la ingesta de bacterias que normalmente forman parte de este sistema sea benéfico y necesario para que el organismo restablezca el balance, y es una opción profiláctica y terapéutica contra la enfermedad.⁴

Varios estudios epidemiológicos, preclínicos y clínicos en distintas áreas, muestran evidencias de que el desarrollo de algunas enfermedades está directamente relacionado con la interacción flora intestinal-huésped, así mismo, indican que la colonización del tracto gastrointestinal juega un rol muy importante en la prevención de enfermedades, debido a la interacción microbio-huésped. Se ha demostrado que los microorganismos de la flora intestinal y el huésped han co-evolucionado juntos. Cuando el balance es correcto, ambos crecen, se desarrollan y evolucionan en un mutualismo o simbiosis a lo largo de la vida,^{5,6} pero cuando este no lo es, llevan al desarrollo de algún trastorno o enfermedad.

El proceso de colonización intestinal, la interacción de la microflora tanto con el epitelio intestinal como con el sistema inmune de la mucosa son fundamentales para el desarrollo de la respuesta inmune local y sistémica durante el primer año de vida. La desregulación de la interacción simbiótica entre la flora y la mucosa puede resultar en repercusiones patológicas y clínicas, a mediano y largo plazo. Por tanto, basados en el concepto anterior, en la actualidad se están diseñando estrategias para modular la microflora intestinal con el objetivo de prevenir patologías posteriores. Una forma de modular la flora es mediante la administración de probióticos.⁶

Los probióticos, son definidos por la Organización para la Alimentación y Agricultura (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), como una mezcla de microorganismos vivos que al ser administrados en cantidades adecuadas proporcionan o generan efectos benéficos a la salud del huésped. Además, es importante señalar que estos organismos no deben ser patógenos ni deben producir efectos colaterales adversos.⁷ Desde hace miles de años, los humanos hemos consumido alimentos que contienen probióticos, principalmente bacterias productoras de ácido láctico o algunas levaduras, en alimentos como pan, queso, leche y otras bebidas

fermentadas. Los probióticos deben contener microorganismos no patógenos, y éstos deben ser resistentes a los procedimientos culinarios, a la acidez estomacal, a la alcalinidad duodenal, así como a la bilis. Los probióticos deben tener baja permeabilidad intestinal y deben ser capaces de colonizar el intestino, adherirse a la mucosa intestinal para evitar ser “barridos” por el tránsito intestinal y de esa manera permanecer en él, el mayor tiempo posible. Además deben ser tolerados por el sistema inmune intestinal e interactuar con él, y participar en el metabolismo local.⁸ Por lo general, para preparar probióticos se utilizan dos géneros de bacterias productoras de ácido láctico (LAB), *Lactobacillus* y *Bifidobacterim*; pero también se utilizan *Sacaramices* y *Enterococcus*.⁹

El objetivo del presente trabajo es proporcionar información acerca de los mecanismos de acción propuestos para los probióticos, así como y se muestran algunas evidencias de que podrían ser efectivos como profilaxis o tratamiento en ciertas patologías, o enfermedades lo que puede permitir un acercamiento o rechazo informado a estas alternativas

terapéuticas, ya presentes en la sociedad.

Mecanismo general de acción

En la actualidad se conocen diferentes mecanismos de acción de los probióticos, unos ya han sido demostrados, otros permanecen como hipótesis, y otros más se han comprobado pero son poco entendidos. El primer mecanismo de acción, de los probióticos, demostrado fue la digestión de la lactosa y la presencia de la enzima beta-galactosidasa en los lactobacilos utilizados para la preparación del yogurt, primer bebida producida comercialmente conteniendo probióticos. La digestión de la lactosa disminuye el efecto osmótico producido cuando hay intolerancia primaria o secundaria a ella, o en infecciones como la de rotavirus en la cual la osmolaridad del contenido intestinal juega un papel fisiopatológico.¹⁰ Ahora es claro que diferentes especies, e incluso cepas actúan a través de diferentes mecanismos y que *in vivo* lo que resulta es producto del microsistema en su conjunto y no sólo de una cepa o especie. En la Tabla 1 se muestran los mecanismos de acción propuestos para los probióticos.

Tabla 1. Efecto y mecanismos de acción de los probióticos.

Efecto	Mecanismos
Antimicrobiana ¹¹⁻¹⁵	Previenen la colonización de patógenos Disminuyen el pH intestinal Aumentan la producción de metabolitos Disminuyen la adhesión y traslocación de patógenos Producen enzimas y bacteriocinas
Protección de barrera muco-epitelial ^{9,38-41}	Modifican las uniones estrechas Disminuyen la permeabilidad Alteran el potencial eléctrico Modifican las proteínas de citoesqueleto Producen nutrientes y factores de crecimiento Aumentan la producción de moco y defensinas
Desintoxicación ²⁵⁻²⁸	Disminuyen bacterias pro-carcinogénicas Disminuyen la actividad enzimática procarcinogénica
Eliminación de genobióticos ^{9,29-33}	Atrapan moléculas tóxicas (mutagénicas) Producen enzimas desintoxicantes Disminuyen la producción y absorción de lipopolisacáridos
Producción de agentes antioxidantes ^{2,3,19,34-37}	Aumentan la producción de GST,GSH, GR, SOD, GPX Producen moléculas antioxidantes
Producción de moléculas protectoras ³⁹⁻⁴¹	Producen butirato, propionato y acetato
Estimulación de motilidad intestinal ^{2,3,19,20,42,43}	Aumentan el peristaltismo
Modulación de respuesta inmune ⁴⁵⁻⁷⁴	Modulan la función de e integridad de células epiteliales Modulan la función de células dendríticas Modulan la función de monocitos y macrófagos Modulan la función de células asesinas naturales

GST= glutation-s- transferasa ,GSH= glutation, GR= glutation reductasa, SOD= superóxido dismutasa, GPX= superóxido dismutasa.

a) Actividad antimicrobiana. Los probióticos previenen la colonización intestinal de microorganismos patógenos a través de una inhibición competitiva.¹¹ Los probióticos disminuyen el pH intestinal,⁹ incrementan la producción de metabolitos que inhiben el crecimiento de patógenos, entre los cuales destacan ácidos grasos libres, péptidos antibacterianos, ácido láctico, biosurfactantes y agentes oxidantes como el peróxido de hidrógeno.¹² Los probióticos inhiben la invasión bacteriana y bloquean la adhesión y traslocación de los patógenos al epitelio. Se ha demostrado que el precultivo o co-cultivo de células intestinales con probióticos, disminuye la adhesión e invasión de las células por *E. coli* aislada de pacientes con enfermedad colónica.¹³ Los probióticos liberan agentes protectores como enzimas y bacteriocinas. Las enzimas, por ejemplo, pueden modificar receptores a toxinas y, por tanto, bloquean vías de señalización alteraciones mediadas por estas toxinas. Mientras que, las bacteriocinas, inhiben el crecimiento de otras especies y cepas bacterianas.¹⁴ Estas bacteriocinas pueden ser de “espectro reducido” e inhibir sólo el crecimiento de otros lactobacilos o bacterias Gram positivas, o bien pueden ser de “espectro amplio” e inhibir el crecimiento de bacterias Gram positivas y Gram negativas, así como de levaduras y mohos.¹⁵

b) Protección y/o incremento de la barrera muco-epitelial.

Las uniones estrechas entre las células de la mucosa son fundamentales para evitar la entrada de patógenos a la circulación. Son estructuras celulares dinámicas, sujetas a cambios estructurales que modifican su estado funcional.¹⁶⁻¹⁸ La modificación en la expresión y la redistribución de las uniones estrechas reduce la permeabilidad intestinal limitando la absorción de moléculas nocivas.¹⁹ Se ha observado en cultivos de células intestinales que el probiótico VSL#3, fue capaz de disminuir la permeabilidad a manitol y de mantener la diferencia de potencial eléctrico transepitelial. Además, la bacteria probiótica *L. brevis* tuvo un efecto similar en estudios realizados en intestino de rata. Se ha sugerido que estos efectos son a través de la fosforilación de proteínas de las uniones estrechas y/o acciones sobre proteínas del citoesqueleto como actina, evitando su re-arreglo o incrementándolo.²⁰

Se ha comprobado que los patógenos son capaces de modificar las proteínas del citoesqueleto. Por ejemplo, se ha observado que la proteína de la unión estrecha presente en la zona ocluyens-1 (ZO-1) se redistribuye en presencia de bacterias patógenas como *S. dublín*, en cultivos de células intestinales. El co-cultivo de las células en presencia del patógeno, *S. dublín*, y el probiótico VSL#3 evita la redistribución de ZO-1 y evita el incremento de la permeabilidad al manitol producida por el patógeno.²¹ Se ha demostrado que los probióticos liberan vitamina K, nutrientes y factores de crecimiento, ayudando estos últimos a la homeostasis del epitelio intestinal.³

Por otro lado, se sabe que los probióticos incrementan la producción de moco. Algunos probióticos disminuyen la secreción de cloro y agua inducida por *E. coli* enteroinvasiva. Se ha propuesto que esto lo realizan a través de modificar la expresión de proteínas de las uniones estrechas.²² Se ha demostrado, que los probióticos reducen las lesiones producidas por cepas patógenas de *E. coli* en cultivos de células intestinales, mediante la inhibición de la inyección de factores de virulencia en las células epiteliales o la alteración de las uniones estrechas intercelulares.²³ Los probióticos incrementan la secreción de defensinas, péptidos antimicrobianos que participan en la respuesta inmune innata. Se ha observado que las células Caco-2, de epitelio intestinal, incrementan la expresión de beta-defensina 2 humana (hBD-2) cuando es co-cultivada con probióticos, lo cual podría limitar el acceso de patógenos entéricos.^{3,24}

b) Desintoxicación. En el contenido intestinal se encuentran presentes sustancias mutagénicas, carcinogénicas y tóxicas en general. En la Tabla 2 se muestran los mecanismos de desintoxicación propuestos para los probióticos. Disminución de la carga bacteriana procarcinogénica (producción de bacterias y actividad enzimática). Se ha demostrado en sujetos sanos que los probióticos suprimen el crecimiento de bacterias que convierten procarcinógenos en carcinógenos. Esto lo hacen a través de disminuir la actividad de las enzimas nitroreducta y β -glucuronidasa, enzimas que participan en la generación de agentes carcinógenos, mutagénicos y agentes promotores tumorales, o en la hidrólisis de glucoronidos formados en el hígado, lo que devuelve a las moléculas su capacidad carcinogénica.²⁵ Se ha planteado que los ácidos biliares secundarios producidos por las bacterias, son agentes carcinogénicos los cuales producen proliferación de las células intestinales.²⁶ Se cree que la grasa en la dieta, considerada un factor de riesgo para el cáncer de colon, actúa incrementando la secreción de bilis y por tanto de ácidos biliares secundarios en el intestino. La ingesta de probióticos durante 10 días disminuye la actividad de la glucuronidasa, así como de la nitroreductasa y azoreductasa, efecto que se pierde entre 10 y 30 días después de suspender la ingesta; lo que sugiere que es necesario el consumo continuo de los lactobacilos para mantener el efecto.^{9, 27, 28}

Tabla 2. Detoxificación

Disminución de la carga bacteriana procarcinogénica (producción de bacterias y actividad enzimática) ^{9,25-28}
Fijación y eliminación de genobióticos provenientes de los alimentos ^{9,29-33}
Producción de agentes antioxidantes ^{2,3,19,34-37}
Producción de moléculas que tienen un efecto protector sobre el epitelio ^{9,38-41}
Estimulación de la movilidad intestinal ^{2,3,19,20,42,43}

• *Fijación y eliminación de genobióticos provenientes de los alimentos.*

En la dieta "occidental", rica en carne, se encuentran agentes mutagénicos como pirolizatos e índoles. Se ha demostrado que algunos lactobacilos son capaces de fijar estas moléculas, evitando que entren en contacto con el epitelio intestinal y/o sean absorbidas y se distribuyan en forma sistémica.^{29,30} En sujetos que consumen probióticos se han encontrado menos agentes mutagénicos presentes, no sólo en heces, sino también en orina.³⁰

Los lactobacilos liberan enzimas que son capaces de degradar nitrosaminas y aminos aromáticas heterocíclicas, las cuales, se ha demostrado en modelos animales que son carcinogénicas. La degradación de estas moléculas reduce su presencia en heces,³¹ y con ello reduce su genotoxicidad.³² Por otro lado, también se ha encontrado que los probióticos disminuyen la producción o absorción de liposacáridos en el intestino. Se sabe que esas moléculas producen inflamación generalizada de bajo grado la cual, se sugiere, predispone a enfermedades autoinmunes e incluso al síndrome metabólico.^{9,33}

• *Producción de agentes antioxidantes.*

Los probióticos son capaces generar compuestos con actividad anti-oxidante, para neutralizar moléculas tóxicas,^{2,3,19} este efecto antioxidante no solo ocurre a nivel intestinal, sino también a nivel sistémico. Existen reportes de que los probióticos pueden incrementar los niveles sanguíneos de agentes antioxidantes como glutatión-S-transferasa, glutatión, glutatión reductasa, glutatión peroxidasa, superóxido dismutasa y catalasa, en sujetos que los consumen.³⁴ En pacientes con enfermedad hepática, los probióticos reducen los niveles de amonio en sangre, así como también, las endotoxinas y la inflamación, lo que ayuda no solo a una mejoría hepática sino general del paciente. Por otra parte, se ha observado, un incremento en la producción de genisteína, molécula con actividad hepatoprotectora, en sujetos que reciben probióticos.³⁵ En estudios *in vitro*, se ha observado que algunos probióticos son capaces de producir agliconas bioactivas con un efecto antihipertensivo.³⁵⁻³⁷ Esta actividad de los probióticos tiene repercusiones sistémicas, de tal manera que la administración de probióticos podría reducir la incidencia hipertensión.³⁴

• *Producción de moléculas que tienen un efecto protector sobre el epitelio.*

Los probióticos favorecen la producción de ácidos grasos de cadena corta, como butirato, propionato y acetato, los cuales influyen en el metabolismo, proliferación y apoptosis de las células epiteliales. Se ha demostrado, en experimentos *in vitro* que estas moléculas inhiben la proliferación celular e incrementan la apoptosis de células malignas.^{38,39}

Se ha observado que los lactobacilos inhiben el crecimiento de células tumorales de mama en cultivo, directamente o a través de ese tipo de moléculas,⁴⁰ además de que pueden inducir la diferenciación de células normales de los cilios intestinales.^{9,41}

• *Estimulación de la movilidad intestinal.*

Los probióticos estimulan la motilidad intestinal, facilitando con ello la expulsión de bacterias, enzimas, y moléculas procarcinogénicas, favoreciendo condiciones saludables y reduciendo el riesgo de padecer infecciones y cáncer.^{2,3,19} Por otra parte, una teoría que explica la colitis crónica es la presencia de un "desequilibrio ecológico". Esta teoría sugiere que la pérdida del balance entre las especies de bacterias benéficas y perjudiciales produce inflamación crónica. Con esta teoría se ha explicado la inflamación intestinal crónica en la cual se ha observado un incremento en bacteroides y *E. coli* adherente o invasiva y, una disminución de especies de bifidobacterias y lactobacilos.^{20,42,43}

c) Modulación de la respuesta inmune. Los probióticos ejercen una modulación del sistema inmune, tanto a nivel local como sistémico (Figura 2). Se ha observado que los probióticos reducen la producción de antígenos e incrementan la producción de IgA localmente en el TGI.⁴⁴ Por otro lado, algunos componentes de los lactobacilos actúan a nivel sistémico como potentes adyuvantes y afectan la respuesta celular y humoral. Los probióticos activan el sistema reticuloendotelial, incrementan la producción de algunas citocinas (IFN- γ e IL-10) y factores de crecimiento (TNF- α) e influyen en diversos tipos celulares que participan en la respuesta inmune, como células epiteliales, dendríticas, monocitos/macrófagos, linfocitos B, linfocitos T, incluyendo los Treg y células NK.^{20,45} En la Tabla 3 se muestran los mecanismos propuestos para la modulación de la respuesta inmune local y sistémica por los probióticos.

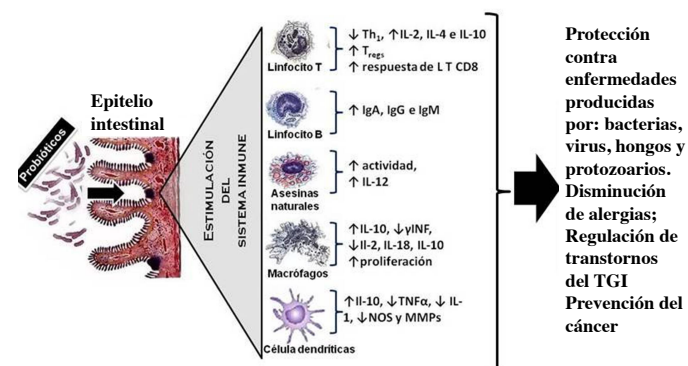


Figura 2. Efecto de los probióticos sobre el sistema inmune. Los probióticos a través de la regulación de la función del sistema inmune pueden evitar el desarrollo de una gran variedad de enfermedades. Elaborado con figuras tomadas de Abbas AK⁷⁸ y <http://biogenmol.blogspot.com/2008/07/el-intestino-delgado.html>.

Tabla 3. Modulación de la respuesta inmune local y sistémica

Efectos sobre las células epiteliales ^{21,46-49}
Efectos sobre las células dendríticas ⁵⁰⁻⁶¹
Efectos sobre monocitos y macrófagos ⁶²⁻⁶⁴
Efecto sobre células asesinas naturales (NK) ^{65,66}
Efectos sobre linfocitos ^{57,67-73}
Efectos anti-inflamatorios sistémicos ^{56,74}

• *Efectos sobre las células epiteliales.*

Las células del epitelio intestinal de alguna manera distinguen entre bacterias "protectoras" (flora normal y/o probióticos) y las bacterias comensales o patógenas. Cuando se co-cultivan células epiteliales con bacterias patógenas como *E. coli enteropatogénica*, *Salmonella dublin*, *Shigella dysenteriae*, y *Listeria monocytogenes*, las células producen IL-8, lo cual no ocurre cuando se co-cultivan con probióticos. Además, cuando las células se co-cultivan con una bacteria patógena y una mezcla de probióticos, la producción de IL-8 es menor.^{21,46} La disminución en la producción de IL-8, se debe al bloqueo de la degradación del factor contra regulador I-B.⁴⁷ También se ha visto que es posible que los probióticos induzcan la salida del núcleo del factor de transcripción NF- κ B, lo que resulta en una disminución de la inflamación mediada por este factor.⁴⁸

Cuando existe alguna lesión intestinal los probióticos incrementan la recuperación del epitelio y disminuyen la apoptosis inducida por citocinas, mediante la activación de la Akt/proteína cinasa B antiapoptótica y la inhibición de la activación de la proteína proapoptótica p38/proteína cinasa activada por mitógenos, TNF- α , IL-1, e IFN- γ .⁴⁹

• *Efectos sobre las células dendríticas.*

Las células dendríticas se ubican en la intersección entre la inmunidad innata y la adquirida, tienen la habilidad de reconocer y responder a componentes bacterianos. Estas células son capaces de iniciar una respuesta inmune primaria, debido a que son células presentadoras de antígenos y son importantes en el reconocimiento temprano de bacterias, además de que activan células B y T, lo que las hace muy importantes para la comprensión de las diferentes respuestas a células patógenas y no patógenas.

Las células dendríticas contribuyen a la inducción y tolerancia oral generando células T reguladoras (Treg) y células B productoras de IgA, a través de la producción de IL-10 y TNF-alfa, en el intestino.^{50,51} Estas células interactúan directamente con las bacterias lumenales pasando sus dendritas entre las uniones estrechas hacia la luz intestinal.^{52,53}

Se ha observado que la interacción de probióticos con células sanguíneas y de la lámina propia, induce la producción de IL-10 *in vitro* e *in vivo*.^{54,55} El uso de una combinación de probióticos en pacientes con divertículos incrementó los niveles de IL-10, y disminuyó los niveles de TNF- α e IL-1, además inhibió la sintasa inducible de óxido nítrico y la metaloproteinasas.⁵⁶

Se ha observado que células dendríticas derivadas de monocitos, al ser maduras en presencia de cepas de probióticos estimularon la diferenciación de células T naive hacia células T hiporreactivas tanto en proliferación como producción de IL-2, IL-4, IL-10.⁵⁷ Esos hallazgos explican, en parte, el efecto benéfico de algunos probióticos en varias enfermedades inflamatorias, incluyendo la dermatitis atópica y enfermedad de Crohn.⁵⁸ Sin embargo, se ha observado también, que otras cepas de probióticos tienen una actividad pro-inflamatoria, dado que incrementan la producción de IL-12 e inducen la activación de células T.⁵⁹ Estas diferencias pueden deberse a los diferentes modelos experimentales utilizados, pero también a las diferencias en las cepas de probióticos utilizadas.^{57,60,61}

• *Efectos sobre monocitos y macrófagos.*

Los monocitos y macrófagos son células presentadoras de antígenos y también son blanco de los efectos de los probióticos. Se ha demostrado que algunos probióticos incrementan la producción de IL-10 por macrófagos obtenidos de colon inflamado,⁶² mientras que, otros promueven la producción de IFN-gamma, IL-12, IL-18 y IL-10.⁶³ Lo anterior muestra también que los efectos pueden variar entre una cepa y otra, así como el modelo estudiado. Por otro lado, en estudios realizados en pollos infectados con *S. enteritidis* y tratados con una mezcla de probióticos, se observó que los probióticos incrementaron la cantidad de macrófagos presentes en la pared intestinal, y que esos macrófagos fagocitaron mayor cantidad de *S. enteritidis*.⁶⁴

• *Efecto sobre células asesinas naturales (NK).*

Se ha descrito que *L. casei Shirota* es capaz de incrementar, *in vivo* e *in vitro*, la actividad de las células NK en humanos, y que este efecto es dependiente de IL-12.⁶⁵ Se ha mostrado que la administración simultánea de un probiótico y un prebiótico (dextran) incrementó la actividad de células mononucleares obtenidas de bazo de ratón, mientras que en sujetos sanos indujo un incremento de la actividad de células NK y la producción de IL-12.⁶⁶

• *Efectos sobre linfocitos.*

Los probióticos incrementan de manera no específica la respuesta inmune humoral, incrementando la producción de IgA, IgG e IgM.⁶⁷ Se ha observado que algunas cepas de

probióticos son capaces de incrementar la respuesta específica, mediante la producción de IgA, por ejemplo contra la toxina del cólera.⁶⁸ En base a lo anterior, los probióticos se han utilizado como adyuvante en la vacunación contra rotavirus y bacterias (como *Salmonella sp*), observando mayores niveles de IgA específicos cuando se administró la vacuna conjuntamente con el probiótico.⁶⁹

La respuesta inmune de tipo celular está controlada principalmente por la interacción entre las células dendríticas y los linfocitos T. En humanos, algunos probióticos inducen la secreción de IL-10 por las células dendríticas, y el co-cultivo de éstas con probiótico y células Th0 produce una disminución en la cantidad de células Th1 originadas. Además, se ha observado que cuando se cultivan linfocitos T con células dendríticas derivadas de monocitos y probióticos se produjo una disminución en la proliferación y producción de interleucinas por los linfocitos T, particularmente IL-2, IL-4 e IL-10.⁵⁷

Evidencias experimentales han mostrado que los probióticos inducen la generación de T_{reg} en un modelo de dermatitis de contacto en ratones, el cual es mediado por linfocitos T CD8 y controlado por T_{reg} . El tratamiento con probióticos llevó a la disminución de la respuesta específica al antígeno por parte de linfocitos T CD8. Cuando se repitió el modelo en ratones deficientes de células Th, no se observó la mejoría, lo que sugiere que el efecto se da a través de las células Th.⁷⁰ Por otro lado, en un modelo animal de colitis inducida con ácido sulfonitróbenzeno (TNBS), el tratamiento con una mezcla de probióticos disminuyó la inflamación, a través de T_{regs} , dependientes de IL-10.^{71,72} Se ha reportado que los probióticos incrementan la capacidad de las células endoteliales linfáticas, para atrapar células T, lo cual hace que estas disminuyan en el colon, pero incrementen en los ganglios linfáticos mesentéricos.⁷³

• Efectos anti-inflamatorios sistémicos.

Se ha mostrado que los efectos anti-inflamatorios de los probióticos no solo son locales, sino también sistémicos. En un estudio utilizando co-cultivos de explantes de mucosa intestinal proveniente de pacientes con dermatitis atópica se observó una reducción de la respuesta inflamatoria en respuesta a bacterias patógenas cuando se utilizaron probióticos. Además, se observó que también hubo una disminución en la producción de citocinas proinflamatorias (TNF- α), el número de linfocitos CD4, así como la expresión de TNF- α en los linfocitos infiltrantes. Lo anterior sugiere que el efecto anti-inflamatorio es sistémico, más que localizado.⁷⁴

En pacientes con dermatitis atópica se ha observado que *L. rhamnosus* hace que las células dendríticas estimulen la proliferación de linfocitos T cooperadores (CD4+), pero con

una producción baja de IL-4, IFN- γ y IL-2.⁵⁶ Esto muestra que los probióticos son capaces de estimular tanto linfocitos Th1, como Th2.

Seguridad en el consumo de probióticos.

En lo general las bacterias utilizadas en los probióticos (lactobacilos y bifidobacterias) se consideran seguras (GRAS), existen reportes de asociación entre infecciones sistémicas y el consumo de probióticos son se recomienda, particularmente en pacientes inmunosuprimidos. El estudio de la seguridad de una cepa debe incluir patogenicidad, infectividad, y factores de virulencia que comprende la toxicidad, la actividad metabólica, y las propiedades intrínsecas de los microbios; Donohue and Salminen (19) provided some methods for assessing the safety of lactic acid bacteria through the use of *in vitro* studies, animal studies, and human clinical studies and indicated that some current probiotic strains are reported to fulfill the required safety standards. Por lo que se recomienda que las cepas que se vayan utilizar como probióticos sean sometidas a las siguientes pruebas de caracterización: a) resistencia a antibióticos, verificando la ausencia de genes de resistencia transferibles⁷⁵; b) actividades metabólicas perjudiciales (p. ej., producción de ácido D-láctico); c) estudios epidemiológicos sobre posibles efectos adversos en los consumidores; d) determinación de la producción de toxinas y capacidad hemolítica, si la cepa pertenece a una especie potencialmente productora, y e) ausencia de infectividad en animales inmunodeprimidos.^{75, 76}

Conclusiones

La co-evolución ha generado una simbiosis entre eucariotes y procariontes. Cada vez hay más evidencias de que los animales libres de gérmenes son enfermizos, tiene un peristaltismo alterado y, su epitelio y tejido linfóide son hipoplásicos. La reintroducción de flora en ellos restaura la función, el epitelio y tejido linfóide intestinal, lo que nos indica que esta flora no solo nos protege por competición, sino que se ha desarrollado un sistema de dependencias tróficas con el epitelio y tejido linfóide intestinal. Sin embargo, el optimismo acerca de la funcionalidad de los probióticos como medicamentos es balanceado por el escepticismo.

Aunque mucho se ha publicado acerca de los probióticos y sus diferentes efectos, tanto *in vitro* como *in vivo*, no hay un consenso acerca de su utilidad. Los análisis y meta-análisis generalmente concluyen que es necesario realizar más estudios, incluir más pacientes y homologar esquemas de tratamiento. Consideramos que la falla no está en los estudios, está en los análisis y su interpretación. Cuando se lee o habla de probióticos hay que recordar algo que es evidente pero que se olvida fácilmente, no hay dos probióticos que sean exactamente

iguales, entonces ¿por qué esperamos resultados iguales y reproducibles de estudios que emplean diferentes especies o cepas bacterianas, diferentes formulaciones y diferentes esquemas de dosificación? Sería como esperar resultados iguales cuando empleamos diferentes antibióticos, diferentes productos naturales o fitoquímicos, con el argumento que todos son antibióticos, productos naturales o fitoquímicos, sin considerar las diferencias en las propiedades químicas, fisicoquímicas y biológicas de cada uno de ellos. Los estudios que se han realizado con probióticos muestran resultados coherentes: especies y cepas específicas son efectivas como profilaxis o tratamiento en ciertas patologías, o enfermedades. De manera similar, cada especie y cepa utiliza un mecanismo particular.

Los cambios demográficos, de la esperanza de vida, actividad física, la dieta y la globalización están generando cambios adaptativos (bioquímicos, metabólicos y fisiológicos) en nuestro micro-ecosistema para los cuales pareciera que no estamos preparados. Estos cambios, seguramente producirán variaciones en la flora intestinal, por lo que es conveniente tratar de conservarla y preservarla, pero además aprender a utilizar esta herramienta profiláctica y terapéutica que la naturaleza y la evolución nos proporcionaron.

Los probióticos entraron al mercado, ya se están consumiendo por la población como suplementos alimenticios solos o en alimentos, como yogures, como resultado de la influencia del consumo de alimentos “saludables” y “funcionales”. La OMS define a los probióticos como benéficos e incluso los recomienda como alternativa al uso de antibióticos en el tratamiento de diarreas. Por tanto, es tiempo de revisar los paradigmas, seguir el mínimo de normas que la OMS ha sugerido para garantizar la seguridad en el uso de los probióticos y realizar un análisis de los resultados de los efectos y mecanismos de acción, desde una perspectiva más amplia. Los probióticos tienen el potencial para ser usados en una gran variedad de enfermedades, sin embargo es necesario e importante realizarles pruebas de seguridad antes de comercializarlos.

Referencias:

1. Gupta V., Garg R. Probiotics. *Indian J Med Microbiol.* 2009; 27(3):202-209.
2. Bosscher D., Breynaert A., Pieters L., Hermans N. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. *J Physiol Pharmacol.* 2009; 60(Suppl 6):5-11.
3. Singhi S.C., Baranwal A. Probiotic use in the critically ill. *Indian J Pediatr.* 2008; 75(6):621-627.
4. Vanderhoof J.A., Young R.J. Use of probiotics in childhood gastrointestinal disorders. *Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1998; 27(3):323-332.
5. Vael C., Desager K. The importance of the development of the intestinal microbiota in infancy. *Curr Opin Pediatr.* 2009; 21(6):794-800.
6. Ruemmele F.M., Bier D., Marteau P., Rechkemmer G., Bourdet-Sicard R., Walker W.A., Goulet O. Clinical evidence for immunomodulatory effects of probiotic bacteria. *Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2009; 48(2):126-41.
7. F.A.O., O.M.S. Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics. *FAO and OMS Expert Consultation Report. Working group Report (online).* 2001.
8. F.A.O., O.M.S. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. *FAO and OMS Working Group Report (online).* 2002.
9. Fotiadis C.I., Stoidis C.N., Spyropoulos B.G., Zografos E.D. Role of probiotics, prebiotics and synbiotics in chemoprevention for colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2008; 14(42):6453-6457.
10. Mcfarlane G.T., Cummings J.H. Probiotics and prebiotics: Can regulating the activities of intestinal bacteria benefit health? *BMJ.* 1999; 318(7189):999-1003.
11. Mack D.R., Michail S., Wei S., McDougall L., Hollingsworth M.A. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherent in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 1999; 276(4 Pt 1):G941-G950.
12. Vandenbergh P. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. *FEMS Microbiol Rev.* 1993; 12:221-228.
13. Rembacken B.J., Snelling A.M., Hawkey P.M., Chalmers D.M., Axon A.T. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomized trial. *Lancet* 1999; 354(9179):635-639.
14. Pothoulakis C., Kelly C.P., Joshi M.A., Gao N., O'Keane C.J., Castagliuolo I., Lamont J.T. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology.* 1993; 104(4):1108-1115.
15. Flynn S., van Sinderen D., Thornton G.M., Holo H., Nes I.F., Collins J.K. Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118. *Microbiology.* 2002; 148:(Pt. 4):973-984.
16. Schmitz H., Barmeyer C., Fromm M, et al. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology,* 1999; 116:301-309.
17. Sakaguchi T., Kohler H., Gu X., McCormick B.A., Reinecker H.C. *Shigella flexneri* regulates tight junction-associated proteins in human intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 2002; 4(6):367-381.

18. Watts T., Berti I., Sapone A., et al. Role of the intestinal tight junction modulator zonulin in the pathogenesis of type I diabetes in BB diabeticprone rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:2916-2921.
19. Ramakrishna B.S. Probiotic-induced changes in the intestinal epithelium: implications in gastrointestinal disease. *Trop Gastroenterol* 2009; 30(2):76-85.
20. Ng S.C., Hart A.L., Kamm M.A., Stagg A.J., Knight S.C. Mechanisms of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis*. 2009; 15(2):300-310.
21. Otte J.M., Podolsky D.K. Functional modulation of enterocytes by Grampositive and Gram-negative microorganisms. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 286:G613-G626.
22. Resta-Lenert S., Barrett K.E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). *Gut*. 2003; 52(7):988-997.
23. Sherman P.M., Johnson-Henry K.C., Yeung H.P., et al. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect Immun*. 2005; 73:5183-5188.
24. Pool-Zobel B.L., Neudecker C., Domizlaff I., Ji S., Schillinger U., Rumney C., Moretti M., Vilarini I., Scassellati-Sforzolini R., Rowland I. Lactobacillus- and bifidobacterium-mediated antigenotoxicity in the colon of rats. *Nutr Cancer*. 1996; 26(3):365-80.
25. Goldin B.R., Gorbach S.L. The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Am J Clin Nutr* 1984; 39:756-761.
26. Bruce W.R. Recent hypotheses for the origin of colon cancer. *Cancer Res*. 1987; 47:4237-4242.
27. Sengupta S., Muir J.G., Gibson P.R. Does butyrate protect from colorectal cancer? *J Gastroenterol Hepatol*. 2006; 21:209-218.
28. Wong C.S., Sengupta S., Tjandra J.J., Gibson P.R. The influence of specific luminal factors on the colonic epithelium: high-dose butyrate and physical changes suppress early carcinogenesis events in rats. *Dis Colon Rectum*. 2005; 48: 549-559.
29. Orrhage K.M., Annas A., Nord C.E., Brittebo E.B., Rafter J.J. Effects of lactic acid bacteria on the uptake and distribution of the food mutagen Trp-P-2 in mice. *Scand J Gastroenterol*. 2002; 37:215-221.
30. Hayatsu H., Hayatsu T. Suppressing effect of Lactobacillus casei administration on the urinary mutagenicity arising from ingestion of fried ground beef in the human. *Cancer Lett*. 1993; 73:173-179.
31. Rowland I.R., Grasso P. Degradation of N-nitrosamines by intestinal bacteria. *Appl Microbiol*. 1975; 29:7-12.
32. Geier M.S., Butler R.N., Howarth G.S. Probiotics, prebiotics and synbiotics: a role in chemoprevention for colorectal cancer? *Cancer Biol Ther*. 2006; 5(10):1265-1269.
33. Gratz S.W., Mykkanen H., El-Nezami H.S. Probiotics and gut health: a special focus on liver diseases. *World J Gastroenterol* 2010; 16(4):403-410.
34. Kumar M., Kumar A., Nagpal R., Mohania D., Behare P., Verma V., Kumar P., Poddar D., Aggarwal P.K., Henry C.J., Jain S., Yadav H. Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. *Int J Food Sci Nutr*. 2010; 61(5):473-96.
35. Siok-Koon Y., Min-Tze L. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity and bioconversion of isoflavones by probiotics in soymilk supplemented with prebiotics. *Int J Food Sci Nutr*. 2010; 61(2):161-181.
36. Leija Salas A., Díaz Moctezuma T., Garrido Fariña G., Reyes-Esparza J., Rodríguez-Fragoso L. Genistein modifies the liver fibrosis and improves liver function by inducing uPA expression and proteolytic activity in CCl4- treated rats. *Pharmacology*. 2008; 81(1):41-49.
37. Leija Salas A., Ocampo G., Garrido Fariña G., Reyes-Esparza J., Rodríguez-Fragoso L. Genistein decreases liver fibrosis and cholestasis induced by prolonged biliary obstruction in the rat. *Annals of Hepatology*. 2007; 6(1):45-47.
38. Pool-Zobel B.L. Inulin-type fructans and reduction in colon cancer risk: review of experimental and human data. *Br J Nutr*. 2005; 93 (Suppl 1):S73-S90.
39. Jan G., Belzacq A.S., Haouzi D, Rouault A., Metivier D., Kroemer G., Brenner C. Propionibacteria induce apoptosis of colorectal carcinoma cells via short-chain fatty acids acting on mitochondria. *Cell Death Differ*. 2002; 9:179-88.
40. Biffi A., Coradini D., Larsen R., Riva L., Di Fronzo G. Antiproliferative effect of fermented milk on the growth of a human breast cancer cell line. *Nutr Cancer*. 1997; 28:93-99.
41. Baricault L., Denariáz G., Hourí J.J., Bouley C., Sapin C., Trugnan G. Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis*. 1995; 16:245-252.
42. Tamboli C.P., Neut C., Desreumaux P., Colombel J.F. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut*. 2004; 53(1):1-4.
43. Swidsinski A., Ladhoff A., Pernthaler A., Swidsinski S., Loening-Baucke V., Ortner M., Weber J., Hoffmann U., Schreiber S., Dietel M., Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*. 2002; 122(1):44-54.
44. Martin F.P., Wang Y., Sprenger N., et al. Probiotic modulation of symbiotic gut microbial-host metabolic interactions in a humanized microbiome mouse model. *Mol Syst Biol*. 2008; 4(157):1-15.

45. Arvola T., Laiho K., Torkkeli S., Mykkänen H., Salminen S., Maunula L., Isolauri E. Prophylactic *Lactobacillus GG* reduces antibiotic-associated diarrhea in children with respiratory infections: A randomized study. *Pediatrics*. 1999; 104(5):(1-4).
46. Lammers K.M., Helwig U., Swennen E., et al. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am J Gastroenterol*. 2002; 97:1182-1186.
47. Neish A.S., Gewirtz A.T., Zeng H., et al. Prokaryotic regulation of epithelial responses by inhibition of I κ B- α ubiquitination. *Science*. 2000; 289:1560-1563.
48. Kelly D., Campbell J.I., King T.P., et al. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- γ and RelA. *Nat Immunol*. 2004; 5:104-112.
49. Yan F., Polk D.B. Probiotic bacterium prevents cytokine-induced apoptosis in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem*. 2002; 277:50959-50965.
50. Iwasaki A., Kelsall B.L. Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *J Exp Med*. 1999; 190:229-239.
51. Williamson E., Bilsborough J.M., Viney J.L. Regulation of mucosal dendritic cell function by receptor activator of NF- κ B (RANK)/RANK ligand interactions: impact on tolerance induction. *J Immunol*. 2002; 169:3606-3612.
52. Rescigno M., Urbano M., Valzasina B., et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol*. 2001; 2:361-367.
53. Stagg A.J., Hart A.L., Knight S.C., et al. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut*. 2003; 52:1522-1529.
54. Hart A.L., Lammers K., Brigidi P., et al. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut*. 2004; 53:1602-1609.
55. Young S.L., Simon M.A., Baird M.A., et al. Bifidobacterial species differentially affect expression of cell surface markers and cytokines of dendritic cells harvested from cord blood. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2004; 11:686-690.
56. Ulisse S., Gionchetti P., D'Alo S., et al. Expression of cytokines, inducible nitric oxide synthase, and matrix metalloproteinases in pouchitis: effects of probiotic treatment. *Am J Gastroenterol*. 2001; 96:2691-2699.
57. Braat H., van den B.J., van Tol E., et al. *Lactobacillus rhamnosus* induces peripheral hyporesponsiveness in stimulated CD4⁺ T cells via modulation of dendritic cell function. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80:1618-1625.
58. Smits H.H., Engering A., van der K.D., et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells *in vitro* by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol*. 2005; 115:1260-1267.
59. Mohamadzadeh M., Olson S., Kalina W.V., et al. *Lactobacilli* activate human dendritic cells that skew T cells toward T helper 1 polarization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005; 102:2880-2885.
60. Karlsson H., Larsson P., Wold A.E., et al. Pattern of cytokine responses to Gram-positive and Gram-negative commensal bacteria is profoundly changed when monocytes differentiate into dendritic cells. *Infect Immun*. 2004; 72:2671-2678.
61. Veckman V., Miettinen M., Pirhonen J., et al. *Streptococcus pyogenes* and *Lactobacillus rhamnosus* differentially induce maturation and production of Th1-type cytokines and chemokines in human monocytederived dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2004; 75:764-771.
62. Pathmakanthan S., Li C.K., Cowie J., et al. *Lactobacillus plantarum* 299: beneficial *in vitro* immunomodulation in cells extracted from inflamed human colon. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004; 19:166-173.
63. Miettinen M., Matikainen S., Vuopio-Varkila J., et al. *Lactobacilli* and streptococci induce interleukin-12 (IL-12), IL-18, and gamma interferon production in human peripheral blood mononuclear cells. *Infect Immun*. 1998; 66:6058-6062.
64. Higgins SE, Erf GF, Higgins JP, Henderson SN, Wolfenden AD, Gaona-Ramirez G, Hargis BM. Effect of probiotic treatment in broiler chicks on intestinal macrophage numbers and phagocytosis of *Salmonella enteritidis* by abdominal exudate cells. *Poult Sci*. 2007; 86(11):2315-2321.
65. Takeda K., Suzuki T., Shimada S.I., et al. Interleukin-12 is involved in the enhancement of human natural killer cell activity by *Lactobacillus casei* Shirota. *Clin Exp Immunol*. 2006; 146:109-115.
66. Ogawa T., Asai Y., Tamai R., et al. Natural killer cell activities of synbiotic *Lactobacillus casei* ssp. *casei* in conjunction with dextran. *Clin Exp Immunol*. 2006; 143:103-109.
67. Kaila M., Isolauri E., Soppi E., et al. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res*. 1992; 32:141-144.
68. Tejada-Simon M.V., Lee J.H., Ustunol Z., et al. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *J Dairy Sci*. 1999; 82:649-660.

69. Fang H., Elina T., Heikki A., et al. Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2000; 29:47-52.
70. Chapat L., Chemin K., Dubois B., et al. *Lactobacillus casei* reduces CD8+ T cell-mediated skin inflammation. *Eur J Immunol.* 2004 ; 34:2520-2528.
71. Di Giacinto C., Marinaro M., Sanchez M., et al. Probiotics ameliorate recurrent Th1-mediated murine colitis by inducing IL-10 and IL-10-dependent TGF-beta-bearing regulatory cells. *J Immunol.* 2005;174:3237-3246.
72. Nakamura K., Kitani A., Fuss I., et al. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4_CD25_ regulatory T cell activity in both humans and mice. *J Immunol.* 2004; 172:834-842.
73. Dalmaso G., Cottrez F., Imbert V., et al. *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. *Gastroenterology.* 2006; 131:1812-1825.
74. Borruel N., Carol M., Casellas F., et al. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohn's disease can be downregulated *ex vivo* by probiotic bacteria. *Gut.* 2002; 51:659-664.
75. Y. Sanz Y., Collado MC, Dalmau J. Probióticos: criterios de calidad y orientaciones para el consumo. *Acta Pediatr Esp* 2003; 61: 476-482.
76. Isibashi N., Yamazaki S. Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr.* 2001; 73(2 Suppl):465S-470S.
77. OMS, FAO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002.
78. Abul K. Abbas and Andrew H. Lichtman. *Basic Immunology.* Second edition. Editorial Saunders 2004, pp 1-20.