Vol. 31. Suplemento 1. Febrero 2015
DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8700

Nutrición Hospitalaria

ÓRGANO OFICIAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN PARENTERAL Y ENTERAL
ÓRGANO OFICIAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN
ÓRGANO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN LATINO AMERICANA DE NUTRICIÓN PARENTERAL Y ENTERAL
ÓRGANO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN ESPAÑOLA DE SOCIEDADES DE NUTRICIÓN, ALIMENTACIÓN Y DIETÉTICA

VI Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica

VI Workshop Probiotics, Prebiotics and Health: Scientific Evidence

Oviedo

5 y 6 de febrero de 2015

ISSN 0212-1611

Nutr Hosp. 2015;(Supl.1)31:1-145 • ISSN (Versión papel): 0212-1611 • ISSN (Versión electrónica): 1699-5198 • CODEN NUHOEQ • S.V.R. 318

Incluida en EMBASE (Excerpta Medica), MEDLINE (Index Medicus), Chemical Abstracts, Cinahl, Cochran e plus, Ebsco, Índice Médico Español, preIBECS, IBECS, MEDES, SENIOR, ScIELO, Science Citation Index Expanded (SciSearch), Cancerlit, Toxline, Aidsline y Health Planning Administration

www.nutricionhospitalaria.com

Nutrición Hospitalaria

Vol. 31. Suplemento 1 • Febrero 2015

ISSN (Versión papel): 0212-1611
ISSN (Versión electrónica): 1699-5198

Nutrición Hospitalaria

IMPACT FACTOR 2013: 1,250 (JCR)

www.nutriciónhospitalaria.com

ÓRGANO OFICIAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN PARENTERAL Y ENTERAL

ÓRGANO OFICIAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN

ÓRGANO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN LATINO AMERICANA DE NUTRICIÓN PARENTERAL Y ENTERAL

ÓRGANO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN ESPAÑOLA DE SOCIEDADES DE NUTRICIÓN, ALIMENTACIÓN Y DIETÉTICA

Suplemento 1. Vol. 31. Febrero 2015

Edición y Administración
GRUPO AULA MÉDICA, S.L.

OFICINA
Isabel Colbrand, 10-12
Oficina 140 Planta 5.ª - 28050 Madrid
Tel.: 913 446 554 - Fax: 913 446 586
www.aulamedica.es

Dep. Legal: M-34.850-1982
Soporte válido: 19/05-R-CM
ISSN (Versión papel): 0212-1611
ISSN (Versión electrónica): 1699-5198

Suscripción y pedidos
GRUPO AULA MÉDICA, S.L.

Tarifas de suscripción:
Profesional ..... 232 € + IVA
Institución ..... 248 € + IVA

- **Por teléfono:** 91 344 65 54
- **Por fax:** 91 344 65 86
- **Por e-mail:** consuelo@grupoaulamedica.com

aulamédica
formación en salud

www.aulamedica.es

© SENPE, 2015 - GRUPO AULA MÉDICA, 2015

Reservados todos los derechos de edición. Se prohíbe la reproducción o transmisión, total o parcial de los artículos contenidos en este número, ya sea por medio automático, de fotocopia o sistema de grabación, sin la autorización expresa de los editores.

Visítanos en internet

NUTRICION HOSPITALARIA

www.nutricionhospitalaria.com

Director: J. M. Culebras Fernández.
Redactor Jefe: A. García de Lorenzo.

Esta publicación recoge revisiones y trabajos originales, experimentales o clínicos, relacionados con el vasto campo de la nutrición. Su número extraordinario, dedicado a la reunión o Congreso Nacional de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral, presenta en sus páginas los avances más importantes en este campo.

Esta publicación se encuentra incluida en EMBASE (Excerpta Medica), MEDLINE, (Index Medicus), Chemical Abstracts, Cinahl, Cochrane plus, Ebsco, Índice Médico Español, preIBECS, IBECS, MEDES, SENIOR, SciELO, Science Citation Index Expanded (SciSearch), Cancerlit, Toxline, Aidsline y Health Planning Administration

NUTRICIÓN HOSPITALARIA

Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral

Órgano Oficial de la Sociedad Española de Nutrición

Órgano Oficial de la Federación Latino Americana de Nutrición Parenteral y Enteral

Órgano Oficial de la Federación Española de Sociedades de Nutrición,Alimentación y Dietética

Entra en www.grupoaulamedica.com/web/nutricion.cfm y podrás acceder a:

- **Número actual**
- **Números anteriores**
- **Enlace con la Web Oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral**

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICION *PARENTERAL Y ENTERAL*
SENPE

aulamédica
formación en salud

www.senpe.com
www.grupoaulamedica.com

NORMAS DE PUBLICACIÓN PARA LOS AUTORES DE NUTRICIÓN HOSPITALARIA

Nutrición Hospitalaria

Nutrición Hospitalaria, es la publicación científica oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral (SENPE), de la Sociedad Española de Nutrición (SEN), de la Federación Latino Americana de Nutrición Parenteral y Enteral (FELANPE) y de la Federación Española de Sociedades de Nutrición, Alimentación y Dietética (FESNAD).

Publica trabajos en castellano e inglés sobre temas relacionados con el vasto campo de la nutrición. El envío de un manuscrito a la revista implica que es original y no ha sido publicado, ni está siendo evaluado para publicación, en otra revista y deben haberse elaborado siguiendo los Requisitos de Uniformidad del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas en su última versión (versión oficial disponible en inglés en http://www.icme.org; correspondiente traducción al castellano en: http://www.metodo.uab.es/ enlaces/Requisitos_de_Uniformidad_2006.pdf).

La falta de consideración de estos requisitos e instrucciones producirá, inevitablemente, un retraso en el proceso editorial y en la posible publicación del manuscrito, y también puede ser causa del rechazo del trabajo.

IMPORTANTE: A la aceptación y aprobación definitiva de cada artículo deberá abonarse la cantidad más impuestos vigente en el momento de la aceptación del artículo (que será publicada en un anexo en estas normas) en concepto de contribución parcial al coste del proceso editorial de la revista. El autor recibirá un comunicado mediante correo electrónico, desde la empresa editorial, indicándole el procedimiento a seguir.

1. REMISIÓN Y PRESENTACIÓN DE MANUSCRITOS

Los trabajos se remitirán por vía electrónica a través del portal www.nutricionhospitalaria.com. En este portal el autor encontrará directrices y facilidades para la elaboración de su manuscrito. Los archivos correspondientes a texto se deberán de enviar en formato WORD. Los correspondientes a imágenes se podrán enviar en formato JPG.

Cada parte del manuscrito empezará una página, respetando siempre el siguiente orden:

1.1 Carta de presentación

- Deberá indicar el Tipo de Artículo que se remite a consideración y contendrá:
- Una breve explicación de cuál es su aportación así como su relevancia dentro del campo de la nutrición.
- Declaración de que es un texto original y no se encuentra en proceso de evaluación por otra revista, que no se trata de publicación redundante, así como declaración de cualquier tipo de confl icto de intereses o la existencia de cualquier tipo de relación económica.
- Conformidad de los criterios de autoría de todos los firmantes y su filiación profesional.
- Cesión a la revista Nutrición Hospitalaria de los derechos exclusivos para editar, publicar, reproducir, distribuir copias, preparar trabajos derivados en papel, electrónicos o multimedia e incluir el artículo en índices nacionales e internacionales o bases de datos.
- Nombre completo, dirección postal y electrónica, teléfono e institución del autor principal o responsable de la correspondencia.
- Cuando se presenten estudios realizados en seres humanos, debe enunciarse el cumplimiento de las normas éticas del Comité de Investigación o de Ensayos Clínicos correspondiente y de la Declaración de Helsinki vigente, disponible en: http://www.wma.net/s/ index.htm.

1.2 Página de título

Se indicarán, en el orden que aquí se cita, los siguientes datos: título del artículo (será obligatorio el envío del Título en castellano e inglés por parte de los autores); se evitarán símbolos y acrónimos que no sean de uso común.

Nombre completo y apellido de todos los autores (es obligatorio el envío por parte de los autores del nombre completo y los dos apellidos, no aceptándose el uso de abreviaturas y/o iniciales), separados entre sí por una coma. Se aconseja que figure un máximo de ocho autores, figurando el resto en un anexo al final del texto.

Mediante números arábigos, en superíndice, se relacionará a cada autor, si procede, con el nombre de la institución a la que pertenecen. Deberá volver a enunciar los datos del autor responsable de la correspondencia que ya se deben haber incluido en la carta de presentación.

En la parte inferior se especificará el número total de palabras del cuerpo del artículo (excluyendo la carta de presentación, el resumen, agradecimientos, referencias bibliográficas, tablas y figuras).

Se incluirá la dirección postal y de correo electrónico del/de el autor/a designado para correspondencia.

1.3 Resumen

Será estructurado en el caso de originales, originales breves y revisiones, cumplimentando los apartados de Introducción, Objetivos, Métodos, Resultados y Discusión (Conclusiones, en su caso). Deberá ser comprensible por sí mismo y no contendrá citas bibliográficas.

Se deberá de incluir la versión en castellano e inglés del resumen con idéntica estructuración. Así mismo se incluirán aquí las palabras clave en castellano e inglés. Tanto resumen como palabras claves se deben enviar en los dos idiomas. Debe recordarse que esta información en inglés aparecerá en las bases de datos bibliográficas, y es responsabilidad de los autores/as su corrección ortográfica y gramatical.

1.4 Palabras clave

Debe incluirse al final de resumen un máximo de 5 palabras clave que coincidirán con los Descriptores del Medical Subjects Headings (MeSH): http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=mesh. Como se ha indicado en 1.3 se deben de enviar las palabras clave en castellano e inglés.

1.5 Abreviaturas

Se incluirá un listado de las abreviaturas presentes en el cuerpo del trabajo con su correspondiente explicación. Asimismo, se indicarán la primera vez que aparezcan en el texto del artículo.

1.6 Texto

Estructurado en el caso de originales, originales breves y revisiones, cumplimentando los apartados de Introducción, Objetivos, Métodos, Resultados y Discusión (Conclusiones, en su caso).

Se deben citar aquellas referencias bibliográficas estrictamente necesarias teniendo en cuenta criterios de pertinencia y relevancia.

En la metodología, se especificará el diseño, la población a estudio, los métodos estadísticos empleados, los procedimientos y las normas éticas seguidas en caso de ser necesarias.

Cuando el artículo sea enviado en idioma inglés, antes de su envío a la revista, recomendamos a los autores que lo sometan a la revisión de una persona angloparlante para garantizar la calidad del mismo.

1.7 Anexos

Material suplementario que sea necesario para el entendimiento del trabajo a publicar.

1.8 Agradecimientos

Esta sección debe reconocer las ayudas materiales y económicas, de cualquier índole, recibidas. Se indicará el organismo, institución o empresa que las otorga y, en su caso, el número de proyecto que se le asigna. Se valorará positivamente haber contado con ayudas.

Toda persona física o jurídica mencionada debe conocer y consentir su inclusión en este apartado.

1.9 Bibliografía

Las citas bibliográficas deben verificarse mediante los originales y deberán cumplir los Requisitos de Uniformidad del Comité Internacional de Directores de Revistas Médicas, como se ha indicado anteriormente.

Las referencias bibliográficas se ordenarán y numerarán por orden de aparición en el texto, identificándose mediante números arábigos en superíndice.

Las referencias a textos no publicados ni pendiente de ello, se deberán citar entre paréntesis en el cuerpo del texto.

Para citar las revistas médicas se utilizarán las abreviaturas incluidas en el Journals Database, disponible en: http://www. ncbi.nlm.nih.gov/ entrez/query. fcgi?db=journals. En su defecto en el catálogo de publicaciones periódicas en bibliotecas de ciencias de la salud españolas: http://www.c17.net/c17/.

▶▶▶

1.10 Tablas y Figuras

El contenido será autoexplicativo y los datos no deberán ser redundantes con lo escrito. Las leyendas deberán incluir suficiente información para poder interpretarse sin recurrir al texto y deberán estar escritas en el mismo formato que el resto del manuscrito.

Se clasificarán con números arábigos, de acuerdo con su orden de aparición, siendo esta numeración independiente según sea tabla o figura. Llevarán un título informativo en la parte superior y en caso de necesitar alguna explicación se situará en la parte inferior. En ambos casos como parte integrante de la tabla o de la figura.

Se remitirán en fichero aparte, preferiblemente en formato JPEG, GIFF, TIFF o PowerPoint, o bien al final del texto incluyéndose cada tabla o figura en una hoja independiente.

1.11 Autorizaciones

Si se aporta material sujeto a copyright o que necesite de previa autorización para su publicación, se deberá acompañar, al manuscrito, las autorizaciones correspondientes.

1.12 Conflicto de intereses

Todos los artículos que se envíen a **Nutrición Hospitalaria** deben ir acompañados de una declaración de los posibles conflictos de intereses de cada una de las personas firmantes. De la misma manera, si no hay ningún conflicto de intereses, deberán hacerlo constar explícitamente en el artículo.

2. TIPOS Y ESTRUCTURA DE LOS TRABAJOS

2.1 Original: Trabajo de investigación cuantitativa o cualitativa relacionado con cualquier aspecto de la investigación en el campo de la nutrición.

2.2 Revisión: Trabajo de revisión, preferiblemente sistemática, sobre temas relevantes y de actualidad para la nutrición.

2.3 Notas Clínicas: Descripción de uno o más casos, de excepcional interés que supongan una aportación al conocimiento clínico.

2.4 Perspectiva: Artículo que desarrolla nuevos aspectos, tendencias y opiniones. Sirviendo como enlace entre la investigación y la sociedad.

2.5 Editorial: Artículo sobre temas de interés y actualidad. Se escribirán a petición del Comité Editorial.

2.6 Carta al Director: Observación científica y de opinión sobre trabajos publicados recientemente en la revista, así como otros temas de relevante actualidad.

2.7 Carta Científica: La multiplicación de los trabajos originales que se reciben nos obligan a administrar el espacio físico de la revista. Por ello en ocasiones pediremos que algunos originales se reconviertan en carta científica cuyas características son:

- Título
- Autor (es)
- Filiación
- Dirección para correspondencia
- Texto máximo 400 palabras
- Una figura o una tabla
- Máximo cinco citas

La publicación de una Carta Científica no es impedimento para que el artículo in extenso pueda ser publicado posteriormente en otra revista.

2.8 Artículo de Recensión: Comentarios sobre libros de interés o reciente publicación. Generalmente a solicitud del Comité editorial aunque también se considerarán aquellos enviados espontáneamente.

2.9 Artículo Especial: El Comité Editorial podrá encargar, para esta sección, otros trabajos de investigación u opinión que considere de especial relevancia. Aquellos autores que de forma voluntaria deseen colaborar en esta sección, deberán contactar previamente con el Director de la revista.

2.10 Artículo Preferente: Artículo de revisión y publicación preferente de aquellos trabajos de una importancia excepcional. Deben cumplir los requisitos señalados en este apartado, según el tipo de trabajo. En la carta de presentación se indicará de forma notoria la solicitud de Artículo Preferente. Se publicarán en el primer número de la revista posible.

EXTENSIÓN ORIENTATIVA DE LOS MANUSCRITOS

Tipo de artículo	Resumen	Texto	Tablas y figuras	Referencias
Original*	Estructurado 250 palabras	Estructurado 4.000 palabras	5	35
Original breve	Estructurado 150 palabras	Estructurado 2.000 palabras	2	15
Revisión**	Estructurado 250 palabras	Estructurado 6.000 palabras	6	150
Notas clínicas	150 palabras	1.500 palabras	2	10
Perspectiva	150 palabras	1.200 palabras	2	10
Editorial	–	2.000 palabras	2	10 a 15
Carta al Director	–	400 palabras	1	5

Eventualmente se podrá incluir, en la edición electrónica, una versión más extensa o información adicional.

*La extensión total del artículo original, una vez compuesto, con tablas, figuras y referencias, no deberá exceder cinco páginas.

**La extensión total del artículo de revisión, una vez compuesto, con tablas, figuras y referencias, no deberá exceder seis páginas.

3. PROCESO EDITORIAL

El Comité de Redacción acusará recibo de los trabajos recibidos en la revista e informará, en el plazo más breve posible, de su recepción. Todos los trabajos recibidos, se someten a evaluación por el Comité Editorial y por al menos dos revisores expertos.

Los autores pueden sugerir revisores que a su juicio sean expertos sobre el tema. Lógicamente, por motivos éticos obvios, estos revisores propuestos deben ser ajenos al trabajo que se envía. Se deberá incluir en el envío del original nombre y apellidos, cargo que ocupan y email de los revisores que se proponen.

Las consultas referentes a los manuscritos y su transcurso editorial, pueden hacerse a través de la página web.

Previamente a la publicación de los manuscritos, se enviará una prueba al autor responsable de la correspondencia utilizando el correo electrónico. Esta se debe revisar detenidamente, señalar posibles erratas y devolverla corregida a su procedencia en el plazo máximo de 4 días. En el supuesto de no remitirse las correcciones o ser enviadas fuera de plazo, **Nutrición Hospitalaria** publicará el artículo conforme a la prueba remitida para corrección.

Las correcciones solicitadas deben ser mínimas; solamente se admitirán modificaciones en relación con la sintaxis y la comprensión semántica del texto. El comité editorial se reserva el derecho de admitir o no las correcciones efectuadas por los autores en la prueba de impresión. *Aquellos autores que desean recibir separatas deberán de comunicarlo expresamente. El precio de las separatas (25 ejemplares) es de 125 euros + IVA.*

Abono en concepto de financiación parcial de la publicación. En el momento de aceptarse un artículo original o una revisión no solicitada, se facturará la cantidad que se haya estipulado en ese momento + impuestos para financiar en parte la publicación del articulo [vease Culebras JM y A Garcia de Lorenzo. El factor de impacto de Nutrición Hospitalaria incrementado… y los costes de edición también. *Nutr Hosp* 2012; 27(5)].

NOTA

Los juicios y las opiniones expresadas en los artículos y comunicaciones que aparecen en la revista son exclusivamente de las personas que los firman. El comité editorial de **Nutrición Hospitalaria** y Grupo Aula Médica declinan cualquier responsabilidad sobre los contenidos de los trabajos publicados.

El comité editorial de **Nutrición Hospitalaria** y Grupo Aula Médica no garantizan ni apoyan ningún producto que se anuncie en la revista, ni las afirmaciones realizadas por el anunciante sobre dicho producto o servicio.

Nutrición Hospitalaria

Vol. 31. Suplemento 1 • Febrero 2015

ISSN (Versión papel): 0212-1611

ISSN (Versión electrónica): 1699-5198

ISSN (Versión papel): 0212-1611

ISSN (Versión electrónica): 1699-5198

www.nutricionhospitalaria.com

Nutrición Hospitalaria

www.nutricionhospitalaria.com

ÓRGANO OFICIAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN PARENTERAL Y ENTERAL
ÓRGANO OFICIAL DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN
ÓRGANO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN LATINO AMERICANA DE NUTRICIÓN PARENTERAL Y ENTERAL
ÓRGANO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN ESPAÑOLA DE SOCIEDADES DE NUTRICIÓN, ALIMENTACIÓN Y DIETETICA

DIRECTOR

JESÚS M. CULEBRAS

De la Real Academia de Medicina y Cirugía de Valladolid y del Instituto de Biomedicina (IBIOMED). Universidad de León. Ac. Profesor Titular de Cirugía - jesus@culebras.eu

REDACTOR JEFE

A. GARCÍA DE LORENZO Y MATEOS

Jefe del Servicio de Medicina Intensiva. Ac. Catedrático de Universidad. H. U. La Paz. Paseo de la Castellana, 261. 28046 Madrid. Director de la Cátedra UAM-Abbott de Medicina Crítica. Dpto. de Cirugía. Universidad Autónoma de Madrid - agdl@telefonica.net

COORDINADORES DEL COMITÉ DE REDACCIÓN

IRENE BRETÓN LESMES
H. G. U. Gregorio Marañón (Madrid)
lbreton.hgugm@salud.madrid.org

ALICIA CALLEJA FERNÁNDEZ
Complejo Asist. Univ. de León (León)
calleja.alicia@gmail.com

CRISTINA CUERDA COMPES
H. G. Universitario Gregorio Marañón (Madrid)
mcuerda.hgugm@salud.madrid.org

IGNACIO JÁUREGUI LOBERA
Universidad Pablo de Olavide (Sevilla) ignacio-ja@telefonica.net

ROSA ANGÉLICA LAMA MORÉ
H. U. Infantil La Paz (Madrid)
rlama.hulp@salud.madrid.org

DANIEL DE LUIS ROMÁN
H. U. de Valladolid (Valladolid)
dadluis@yahoo.es

LUIS MIGUEL LUENGO PÉREZ
H. U. Infanta Cristina (Badajoz)
luismiluengo@hotmail.com

DAVID MARTÍNEZ GÓMEZ
Instituto del Frío. CSIC (Madrid)
d.martinez@uam.es

J. M. MORENO VILLARES
Hospital 12 de Octubre (Madrid)
jmoreno.hdoc@salud.madrid.org

CONSUELO PEDRÓN GINER
H. I. U. Niño Jesús (Madrid)
consuelocarmen.pedron@salud.madrid.org

MARÍA DOLORES RUIZ LÓPEZ
Universidad de Granada (Granada)
mdruiz@ugr.es

MIGUEL A. MARTÍNEZ OLMOS
C. H. U. de Santiago (Santiago de Compostela)
miguel.angel.martinez.olmos@sergas.es

FRANCISCO J. SÁNCHEZ-MUÑIZ
Universidad Complutense (Madrid)
frasan@ucm.es

CARMINA WANDEN-BERGHE
Univ. CEU Cardenal Herrera (Alicante)
carminaw@telefonica.net

COMITÉ DE REDACCIÓN

Responsable de Casos Clínicos
PILAR RIOBO
Fundación Jiménez Díaz (Madrid)

Responsable para Latinoamérica
DAN L. WAITZBERG
Univ. de São Paulo. São Paulo (Brasil)

Asesor estadístico y epidemiológico
GONZALO MARTÍN PEÑA
Hospital de la Princesa (Madrid)

Asesor para artículos básicos
ÁNGEL GIL HERNÁNDEZ
Universidad de Granada (Granada)

Coordinadora de Alimentos funcionales
M. GONZÁLEZ-GROSS
Univ. Complutense de Madrid (Madrid)

Coordinador con Felanpe
LUIS ALBERTO NIN
Universidad de Montevideo (Uruguay)

J. Álvarez Hernández *(H. U. de Alcalá. Madrid)*
M. D. Ballesteros *(Complejo Asist. Univ. de León. León)*
T. Bermejo Vicedo *(H. Ramón y Cajal. Madrid)*
P. Bolaños Ríos *(Inst. de Ciencias de la Conducta. Sevilla)*
M. Cainzos Fernández *(Univ. de Santiago de Compostela. Santiago de Compostela)*
M. A. Carbajo Caballero *(H. Campo Grande. Valladolid)*
D. Cardona Pera *(H. Santa Creu i Sant Pau. Barcelona)*
S. Celaya Pérez *(H. C. U. Lozano Blesa. Zaragoza)*
A. I. Cos Blanco *(H. U. La Paz. Madrid)*
C. De la Cuerda Compés *(H. G. U. Gregorio Marañón. Madrid)*
D. De Luis *(H. Universitario de Valladolid. Valladolid)*
P. García Peris *(H. G. U. Gregorio Marañón. Madrid)*
C. Gómez-Candela *(H. U. La Paz. Madrid)*
J. González Gallego *(Instituto de Biomedicina (IBIOMED). Universidad de León. León)*
P. González Sevilla *(Universidad de León. León)*
J. Jiménez Jiménez *(H. Virgen del Rocío. Sevilla)*
F. Jorquera *(Complejo Asist. Univ. de León. León)*
M. A. León Sanz *(H. U. 12 de Octubre. Madrid)*
C. Martín Villares *(H. Camino de Santiago. Ponferrada. León)*
A. Miján de la Torre *(Hospital General Yagüe. Burgos)*
J. C. Montejo González *(H. U. 12 de Octubre. Madrid)*
J. M. Moreno Villares *(H. U. 12 de Octubre. Madrid)*
J. Ortiz de Urbina *(Complejo Asist. Univ. de León. León)*
C. Ortiz Leyba *(Hospital Virgen del Rocío. Sevilla)*
P. Pablo García Luna *(H. Virgen del Rocío. Sevilla)*
V. Palacios Rubio *(H. Miguel Servet. Zaragoza)*
J. L. Pereira Cunill *(H. Virgen del Rocío. Sevilla)*
A. Pérez de la Cruz *(Universidad de Granada. Granada)*
M. Planas Vila *(H. Vall D'Hebron. Barcelona)*
I. Polanco Allue *(Univ. Autónoma de Madrid. Madrid)*
N. Prim Vilaro *(Barcelona)*
J. A. Rodríguez Montes *(H. U. La Paz. Madrid)*
M. D. Ruiz López *(Universidad de Granada. Granada)*
I. Ruiz Prieto *(Inst. de Ciencias de la Conducta. Sevilla)*
J. Salas Salvadó *(H. U. de Sant Joan de Reus. Tarragona)*
J. Sánchez Nebra *(Hospital Montecelo. Pontevedra)*
J. Sanz Valero *(Universidad de Alicante. Alicante)*
E. Toscano Novella *(Hospital Montecelo. Pontevedra)*
M.ª Jesús Tuñón *(Instituto de Biomedicina (IBIOMED). Universidad de León. León)*
G. Varela Moreiras *(Univ. CEU San Pablo. Madrid)*
C. Vázquez Martínez *(H. Ramón y Cajal. Madrid)*
C. Wanden-Berghe *(Univ. CEU Cardenal Herrera. Alicante)*

CONSEJO EDITORIAL IBEROAMERICANO

Coordinador
A. GIL
Univ. de Granada (España)

C. Angarita *(Centro Colombiano de Nutrición Integral y Revista Colombiana de Nutrición Clínica.* Colombia)
E. Atalah *(Universidad de Chile. Revista Chilena de Nutrición.* Chile)
M. E. Camilo *(Universidade de Lisboa.* Portugal)
F. Carrasco *(Asociación Chilena de Nutrición Clínica y Metabolismo. Universidad de Chile.* Chile)
A. Criveli *(Revista de Nutrición Clínica.* Argentina)
J. M. Culebras *(Instituto de Biomedicina (IBIOMED). Universidad de León.* España)
J. Faintuch *(Hospital das Clínicas.* Brasil)
M. C. Falçao *(Revista Brasileña de Nutrición Clínica.* Brasil)
A. García de Lorenzo *(Hospital Universitario La Paz.* España)
D. De Girolami *(Universidad de Buenos Aires.* Argentina)
J. Klaasen *(Revista Chilena de Nutrición.* Chile)
G. Kliger *(Hospital Universitario Austral.* Argentina)
L. Mendoza *(Asociación Paraguaya de Nutrición.* Paraguay)
L. A. Moreno *(Universidad de Zaragoza.* España)
S. Muzzo *(Universidad de Chile.* Chile)
F. J. A. Pérez-Cueto *(Universidad de La Paz.* Bolivia)
M. Perman *(Universidad Nacional del Litoral.* Argentina)
J. Sotomayor *(Asociación Colombiana de Nutrición Clínica.* Colombia)
H. Vannucchi *(Archivos Latino Americanos de Nutrición.* Brasil)
C. Velázquez Alva *(Univ. Autónoma Metropolitana. Nutrición Clínica de México.* México)
D. Waitzberg *(Universidad de São Paulo.* Brasil)
N. Zavaleta *(Universidad Nacional de Trujillo.* Perú)

NUTRICIÓN HOSPITALARIA ES PROPIEDAD DE SENPE

Vol. 31. Suplemento 1 • Febrero 2015
ISSN (Versión papel): 0212-1611
ISSN (Versión electrónica): 1699-5198

Nutrición Hospitalaria

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICION *PARENTERAL Y ENTERAL*

SENPE

AGRADECIMIENTOS

La Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral, que tiene como objetivos desde su fundación el potenciar el desarrollo y la investigación sobre temas científicos relacionados con el soporte nutricional, agradece a la SEPyP su colaboración, sin la cual no hubiera sido posible la edición de este suplemento.

Nutrición Hospitalaria

Vol. 31. Suplemento 1 • Febrero 2015

ISSN (Versión papel): 0212-1611
ISSN (Versión electrónica): 1699-5198

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICION *PARENTERAL Y ENTERAL*

SENPE

JUNTA DIRECTIVA DE LA SOCIEDAD ESPAÑOLA DE NUTRICIÓN PARENTERAL Y ENTERAL

Presidente
- MIGUEL LEÓN SANZ

Vicepresidenta
- CARMEN SÁNCHEZ ALVAREZ

Tesorera
- MERCEDES CERVERA PERIS

Secretaria
- ROSA BURGOS PELÁEZ

Vocales
- LORENA ARRIBAS HORTIGÜELA
- ROSANA ASHBAUGH ENGUIDANOS
- MIGUEL ÁNGEL MARTÍNEZ OLMOS
- CARMINA WANDEN-BERGHE LOZANO

Miembros de honor
- A. AGUADO MATORRAS†
- A. GARCÍA DE LORENZO Y MATEOS
- F. GONZÁLEZ HERMOSO
- S. GRISOLÍA GARCÍA
- F. D. MOORE†
- A. SITGES CREUS†
- G. VÁZQUEZ MATAS
- J. VOLTAS BARO†
- J. ZALDUMBIDE AMEZAGA

Coordinador de la página web
- JORDI SALAS SALVADÓ
Jordi.salas@urv.cat

Presidente de honor
- JESÚS CULEBRAS
jesus@culebras.eu

Comité Científico-Educacional

Coordinadora
- CRISTINA DE LA CUERDA COMPÉS

Secretaria
- PILAR MATÍA MARTÍN

Vocales
- CLEOFÉ PÉREZ PORTABELLA
- LAURA FRÍAS SORIANO
- CLARA VAQUERIZO ALONSO
- MARÍA DOLORES RUIZ LÓPEZ

Coordinador Grupo de Trabajo
- GABRIEL OLVEIRA FUSTER

Director de la Revista Nutr Hosp
- JESÚS CULEBRAS FERNÁNDEZ

www.senpe.com

PRESENTACIÓN

La Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP) celebra el ***VI Workshop de Probióticos, Prebióticos y Salud. Evidencia Científica,*** los días 5 y 6 de Febrero de 2015.

Oviedo, ciudad comprometida con la ciencia y la cultura, ha sido el lugar elegido para acoger este encuentro, que nos brinda la oportunidad de compartir conocimientos y experiencias, tanto profesionales como personales, entre científicos, investigadores, doctores y demás expertos en el campo de los probióticos y prebióticos.

El programa que se presenta en esta nueva edición incluye ocho conferencias y 24 comunicaciones orales, que tienen como eje central la aplicación clínica de los probióticos y prebióticos en atención primaria y que cuentan con la presencia de reconocidos profesionales del territorio nacional e internacional que aportan novedades significativas dentro del campo multidisciplinar que caracteriza a nuestra Sociedad.

Como gran novedad de este año, se presenta oficialmente el consenso de los prebióticos, que ha estado elaborando un grupo de trabajo que se formó en la pasada edición del Workshop. Este documento, junto con el Consenso Científico sobre Probióticos publicado en 2009, supone la confirmación de nuestra perseverancia por la investigación y el estudio clínico de una especialidad que cada vez está ganando más reconocimiento entre los foros científicos internacionales.

Gracias al interés y la participación de todos vosotros, la SEPyP cuenta a día de hoy con más de 450 socios. No podemos estar más satisfechos con la trayectoria de esta Sociedad científica, que año a año ha conseguido difundir y fomentar el interés y conocimiento en torno al estudio y aplicación clínica de nuestra especialidad.

Esperamos que encuentres de interés este encuentro y que tengas la oportunidad de intercambiar opiniones y ampliar conocimientos. A la espera de poder saludarnos en esta nueva edición del Workshop Probióticos Prebióticos y Salud: Evidencia Científica, te saluda atentamente,

Dr. Francisco Guarner
Presidente de la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos

VI Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica

COMITÉ ORGANIZADOR

PRESIDENCIA

• Francisco Guarner
Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

VICEPRESIDENCIA

• Ascensión Marcos
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición, ICTAN-CSIC.

SECRETARÍA

• Teresa Requena
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM).

TESORERÍA

• Evaristo Suárez
Universidad de Oviedo.

VOCALÍA 1

• Fernando Azpiroz
Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

VOCALÍA 2

• Abelardo Margolles
Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC.

VOCALÍA 3

• Mónica de la Fuente
Universidad Complutense de Madrid.

VOCALÍA 4

• Gaspar Pérez
Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, IATA-CSIC.

VOCALÍA 5

• Guillermo Álvarez
Hospital Gregorio Marañón, Madrid.

VOCALÍA 6

• Juan Miguel Rodríguez
Universidad Complutense de Madrid.

PROGRAMA CIENTÍFICO

Jueves, 5 de febrero de 2015

8.45 a 9.00 h.

Bienvenida e Inauguración
Vicente Gotor Santamaría. Rector de la Universidad de Oviedo.
Agustín Iglesias Caunedo. Alcalde de Oviedo.
Francisco Guarner. Servicio de Gastroenterología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. Presidente de la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos.

9.00 a 10.30h.

Simposio: Microbiota y Obesidad
Moderador: **Carlos Bousoño.** Servicio de Gastroenterología Infantil. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo.

Conferencias

- *La microbiota autóctona.*
  Evaristo Suárez. Área de Microbiología. Universidad de Oviedo.
- *Microbiota intestinal y obesidad.*
  Mª Carmen Collado. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC) Valencia.
- *Probióticos y obesidad.*
  Ascensión Marcos. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) Madrid.

10.30 a 11.00 h. Pausa café

11.00 a 12.30 h.

Mesa redonda: Aplicaciones Clínicas de los Probióticos y Prebióticos en Atención Primaria
Moderador: **Francisco Guarner.** Servicio de Gastroenterología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona.

Conferencias

- *Aplicaciones en Gastroenterología.*
  Juan José Díaz Martín. Servicio de Gastroenterología Infantil. Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.
- *Aplicaciones en Ginecología.*
  Antonio Cano. Servicio de Ginecología. Hospital Clínico. Valencia.

Debate

12.30 a 14.30h.

Sesión de Usos Clínicos
Moderador: **Gonzalo Solís.** Servicio de Neonatología. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo.

Conferencia

- *Del laboratorio a la farmacia.*
  Juan Miguel Rodríguez. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid

Comunicaciones orales

- *Urinary metabolomic fingerprinting after consumption of a probiotic strain in women with mastitis.*
  Cristina Andrés Lacueva. Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia-Universidad de Barcelona.
- *Adaptación metabólica de la microbiota del colon a la dieta.*
  Marianela Mego Silva. Hospital Universitari Vall d' Hebrón. Barcelona.
- *La preparación para colonoscopia puede inducir cambios persistentes en la microbiota intestinal.*
  Virginia Robles. Servicio de Gastroenterología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona.

- *La gastroenteritis de los niños y su tratamiento por los fermentos (etiología y patogenia).*
  Guillermo Alvarez-Calatayud. Servicio de Gastroenterología Pediátrica. Hospital Gregorio Marañón. Madrid.
- *Functionalized foods with prebiotics as colon cancer prevention in an animal model.*
  Javier Fernández Fernández. Universidad de Oviedo.
- *Beneficial changes in gastrointestinal microbial communities associated with the consumption of an infant formula supplemented with the probiotic bacteria Bifidobacterium longum subsp. Infantis CECT7210: a metagenomic approach.*
  José Antonio Moreno. Laboratorios Ordesa Group. Barcelona.

14.30 a 15.30 h. Almuerzo

15.30 a 16.30 h. **Presentación posters**
Visita guiada y turno de preguntas.

16.30 a 18.30 h. **Sesión de Inmunonutrición**
Moderador: **Patricia Rúas Madiedo.** Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC) Villaviciosa.

Conferencia
- *Probiotics in Atopic Disease.*
  Erika Isolauri. Department of Pediatrics. Turku University Hospital, Finland.

Comunicaciones orales
- *Are polyphenol rich foods associated with specific intestinal microorganisms in systemic lupus erythematosus patients?*
  Sonia González Solares. Universidad de Oviedo.
- *Comparative study of the effects of Escherichia coli Nissle 1917 and Lactobacillus salivarius ssp. salivarius CECT5713 on intestinal microbiota composition and micro-RNA expression in the DSS model of mouse colitis.*
  Francesca Algieri. CIBM-Universidad de Granada.
- *Capacidad inmunomoduladora de cepas de bifidobacterias productoras de exopolisacáridos. Estudio in vivo con ratas Wistar.*
  Nuria Salazar. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC).
- *Prebiotic suplementation during suckling modulates the course of rotavirus gastroenteritis in rats.*
  Maria del Mar Rigo. Departamento de Fisiología. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
- *Efecto de lactobacillus plantarum 3547 en el restablecimiento de la respuesta inflamatoria asociada a obesidad.*
  María Tabernero Urbieta. Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ). Madrid.
- *Immunomodulatory properties of Lactobacillus fermentum CECT5716 in DSS-colitis: impact on micro-RNA expression and bacterial diversity.*
  Alba Rodríguez-Nogales. Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada.

18.30 a 19.00 h. Pausa café

16.30 a 18.30 h. **Talleres: Empleo de Probióticos y Prebióticos en Atención Primaria**
Moderadores:
Guillermo Álvarez Calatayud. Servicio de Gastroenterología Pediátrica. Hospital Gregorio Marañón. Madrid.
Fernando Azpiroz. Servicio de Gastroenterología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona.

Sesión 1: Pediatría
- *Diarrea aguda y asociada al uso de antibióticos.*
  Carlos Pérez. Servicio de Pediatría. Hospital de Cabueñes. Gijón.

- *Enterocolitis necrotizante*.
  Marta Suárez. Servicio de Neonatología.
  Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo.
- *Fórmulas lácteas infantiles*.
  Venancio Martínez. Centro de Salud del Llano. Gijón.
- *Cólico del lactante*.
  Luz Taboada. Servicio de Pediatría. Hospital San Rafael;
  Jimena Pérez Moreno. Sección de Gastroenterología Pediátrica.
  Hospital Gregorio Marañón. Madrid.

Sesión 2: Adultos

- *Síndrome del intestino irritable*.
  Rafael Tojo. Servicio de Gastroenterología. Hospital de Cabueñes, Gijón.
- *Enfermedad inflamatoria intestinal.*
  Virginia Robles. Servicio de Gastroenterología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona.
- *Vaginosis y vaginitis*.
  Silvia González. Servicio de Ginecología. Gabinete Médico Velázquez. Madrid.
- *Mastitis infecciosa: una nueva solución para un viejo problema.*
  David Beltrán. Centro de Diagnóstico Médico. Ayuntamiento de Madrid.

19.00 a 19.45 h. **Asamblea de socios de SEPyP**

Viernes, 6 de febrero de 2015

8.45 a 9.15 h. **Consenso Científico sobre Prebióticos**

Nieves Corzo. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM), Madrid.

9.15 a 11.15h **Sesión de Microbiología y Veterinaria**

Moderador: **Teresa Requena.** Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM), Madrid.

Conferencia

- *Impact of Diet on Gut Microbes in the Elderly.*
  Colin Hill. Biosciences Institute. University College Cork, Ireland.

Comunicaciones orales:

- *Síntomas y cambios en la colonización microbiana intestinal en pacientes con síndrome del intestino irritable*.
  Marta Pozuelo. Vall d'Hebron Institut de Recerca (VHIR), Barcelona.
- *Internalización de vesículas de membrana externa de cepas probióticas y comensales en células de epitelio intestinal.*
  María Alexandra Cañas Pacheco. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad de Barcelona.
- *Papel de los exopolisacáridos producidos por Bifidobacterium animalis subsp. lactis en las interacciones bacteria-hospedador.*
  Claudio Hidalgo. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias.
- *Estudio de la evolución de la microbiota fecal durante la ingesta de isoflavonas de soja mediante metagenómica filogenética.*
  Susana Delgado. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias.
- *Estudio de los efectos inmunomoduladores del (1-3)-β-D-glucano sustituido en posición O-2 en modelos in vitro y ex vivo.*
  Sara Notararigo. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC), Madrid.

- *Participación de proteínas bacterianas multifuncionales en la regulación de la inflamación de las células epiteliales.*
  Gaspar Pérez Martínez. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC), Valencia.

11.15 a 11.45 h. Pausa café

11.45 a 13.45 h. **Sesión de Microbiología y Veterinaria (continuación)**
Moderador: **Miguel Gueimonde,** Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Villaviciosa.

Conferencia

- *ISAPP consensus on the scope and use of the probiotic concept.*
  Colin Hill, Biosciences Institute, University College Cork, Ireland.

Comunicaciones orales

- *Transposon mutagenesis in Bifidobacterium breve: construction and characterization of a Tn5 transposon mutant library in Bifidobacterium breve UCC2003.*
  Lorena Ruiz García. School of Microbiology & Alimentary Pharmabiotic Centre. Cork, Ireland.
- *Análisis proteómico de las interacciones de exopolisacáridos aislados de bifidobacterias con Bacteroides fragilis.*
  David Ríos Covián. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias.
- *Aplicación de gradientes de densidad en el aislamiento de microbiota fecal.*
  Arancha Hevia González. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias.
- *Aprovechamiento de subproductos de la industria láctea y de soja para la obtención de oligosacáridos prebióticos.*
  Marta Corzo Martínez. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM), Madrid.
- *Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead seabream (Sparus aurata) on gastrointestinal microbiota by pyrosequencing the 16S rRNA gene.*
  Gaspar Pérez Martínez. Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (IATA-CSIC), Valencia
- *Actividad probiótica de la bacteria ácido láctica Lactobacillus pentosus LB-31 en pollos de ceba.*
  Tania Pérez-Sánchez. Facultad de Veterinaria. Universidad de Zaragoza.

13.45 a 14.00 h. **Clausura**

Nutrición Hospitalaria

Vol. 31. Suplemento 1 • Febrero 2015

ISSN (Versión papel): 0212-1611
ISSN (Versión electrónica): 1699-5198

SUMARIO

VI WORKSHOP PROBIÓTICOS, PREBIÓTICOS Y SALUD: EVIDENCIA CIENTÍFICA

Oviedo, 5 y 6 de febrero de 2015

VI WORKSHOP PROBIOTICS, PREBIOTICS AND HEALTH: SCIENTIFIC EVIDENCE

Oviedo, 5 and 6 February, 2015

EDITORES CIENTÍFICOS/SCIENTIFIC PUBLISHERS

Ascensión Marcos
Guillermo Álvarez-Calatayud
Juan Evaristo Suárez

Simposio: microbiota y obesidad/*Symposium: microbiota and obesity*
Moderador/Moderator: Carlos Bousoño

- Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos 3
  Autochthonous microbiota, probiotics and prebiotics
  Juan Evaristo Suárez
- El papel de los probióticos en el manejo de la obesidad 10
  Role of probiotics in obesity management
  Andreu Prados-Bo, Sonia Gómez-Martínez, Esther Nova y Ascensión Marcos

Mesa redonda: aplicaciones clínicas de los probióticos y prebióticos en atención primaria/
Round table: clinical aplications of probiotics and prebiotics in healthcare
Moderador/Moderator: Francisco Guarner

- Aplicaciones en Gastroenterología 21
  Uses in Gastroenterology
  Juan J. Díaz Martín y David González Jiménez
- Papel de los probióticos en Obstetricia y Ginecología 26
  Role of probiotics in Obstetrics and Gynecology
  A. Castro, M. González, J. J. Tarín y A. Cano

Sesión de usos clínicos/*Clinical Uses*
Moderador/Moderator: Carlos Bousoño

- Probióticos: del laboratorio al consumidor 33
  Probiotics: from the lab to the consumer
  J. M. Rodríguez

Comunicaciones orales

- Urinary metabolomic fingerprinting after consumption of a probiotic strain in women with mastitis 48
- Adaptación metabólica de la microbiota del colon a la dieta 48

continuación ►►►

Vol. 31. Suplemento 1 • Febrero 2015
ISSN (Versión papel): 0212-1611
ISSN (Versión electrónica): 1699-5198

Nutrición Hospitalaria

SUMARIO (continuación)

- La preparación para colonoscopia puede inducir cambios persistentes en la microbiota intestinal 48
- La gastroenteritis de los niños y su tratamiento por los fermentos (etiología y patogenia) 49
- Functionalized meat foods with prebiotics as colon cancer prevention in an animal model 49
- Beneficial changes in gastrointestinal microbial communities associated with the consumption of an infant formula supplemented with the probiotic bacteria *Bifidobacterium longum subsp; Infantis* CECT7210: a metagenomic approach 50

Sesión de inmunonutrición / *Immunonutrition*
Moderador/Moderator: Patricia Rúas Madiedo

Comunicaciones orales

- Are polyphenol rich foods associated with specific intestinal microorganisms in systemic lupus erythematosus patients? 53
- Comparative study of the effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 and *Lactobacillus salivarius ssp; Salivarius* CECT5713 on intestinal microbiota composition and mirna expression in the DSS model of mouse colitis 53
- Capacidad inmunomoduladora de cepas de bifidobacterias productoras de exopolisacáridos: estudio *in vivo* con ratas wistar 53
- Prebiotic suplementation during suckling modulates the course of rotavirus gastroenteritis in rats 54
- Efecto de *Lactobacillus plantarum* 3547 en el restablecimiento de la respuesta inflamatoria asociada a obesidad 54
- Immunomodulatory properties of *Lactobacillus fermentum* ECT5716 in DSS-colitis: impact on micro-RNA expression and bacterial diversity 54

Talleres: empleo de probióticos y prebióticos en atención primaria /
Workshop: use of probiotics and prebiotics in healthcare
Moderadores/Moderator: Guillermo Álvarez Calatayud y Fernando Azpiroz

- Empleo de probióticos y prebióticos en atención primaria 59
  Use of probiotics and prebiotics in primary care
  Guillermo Álvarez Calatayud y Fernando Azpiroz
- Probióticos en la diarrea aguda y asociada al uso de antibióticos en pediatría 64
  Probiotics for the treating acute diarrhea and preventing antibiotic-associated diarrhea in children
  Carlos Pérez
- Empleo de probióticos en la prevención de la enterocolitis necrotizante en recién nacidos prematuros 68
  Use of probiotics in the prevention of necrotizing enterocolitis in premature newborns
  Marta Suárez Rodríguez y G. Solís Sánchez
- Uso de probióticos y prebióticos en las fórmulas infantiles 72
  Use of probiotics and prebiotics in infant formulas
  Venancio Martínez Suárez

continuación ►►►

Nutrición Hospitalaria

Vol. 31. Suplemento 1 • Febrero 2015

ISSN (Versión papel): 0212-1611
ISSN (Versión electrónica): 1699-5198

SUMARIO (continuación)

- Probioticoterapia en el cólico del lactante: caso clínico 78
  Probiotics for the treatment of infant colic: a clinical case
  Jimena Pérez-Moreno, Luz Taboada Castro, Mar Tolín Hernani, César Sánchez Sánchez y Guillermo Álvarez-Calatayud

- Síndrome de Intestino Irritable; papel de la microbiota y probiótico-terapia 83
  Irritable Bowel Syndrome; gut microbiota and probiotic therapy
  Rafael Tojo González, Adolfo Suarez Gonzalez, Patricia Rúas Madiedo, Alejo Mancebo Mata, María Pipa Muñiz, Eva Barreiro Alonso, Francisco Javier Roman Llorente, María Carmen Moro Villar, Marta María Arce González, María Francisca Villegas Diaz, Eugenia Mosquera Sierra y Mónica Ruiz Ruiz

- Mastitis infecciosa: nueva solución para un viejo problema 89
  Infectious mastitis: a new solution for an old problem
  David A. Beltrán Vaquero, Ana E. Crespo Garzón, Tomás C. Rodriguez Bravo y Ángel Garcia Iglesias

Consenso científico sobre prebióticos/*Scientific consensus on prebiotics*

- Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos 99
  Prebiotics: concept, properties and beneficial effects
  N. Corzo, J. L. Alonso, F. Azpiroz, M. A. Calvo, M. Cirici, R. Leis, F. Lombó, I. Mateos-Aparicio, F. J. Plou, P. Ruas-Madiedo, P. Rúperez, A. Redondo-Cuenca, M. L. Sanz y A. Clemente

Sesión de microbiología y veterinaria/*Microbiology and veterinary medicine*
Moderador/Moderator: Teresa Requena

Microbiología

- Aprovechamiento de subproductos de la industria láctea y de soja para la obtención de oligosacáridos prebióticos 121
- Análisis proteómico de las interacciones de exopolisacaridos aislados de bifidobacterias con *bacteroides fragilis* 121
- Internalización de vesículas de membrana externa de cepas probióticas y comensales en células de epitelio intestinal 121
- Estudio de los efectos inmunomoduladores del (1-3)-β-D-glucano sustituido en posición *O*-2 en modelos *in vitro* y *ex vivo* 121
- Papel de los exopolisacáridos producidos por *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* en las interacciones bacteria-hospedador 122
- Síntomas y cambios en la colonización microbiana intestinal en pacientes con síndrome del intestino irritable .. 122
- Aplicación de gradientes de densidad en el aislamiento de microbiota fecal 122
- Estudio de la evolución de la microbiota fecal durante la ingesta de isoflavonas de soja mediante metagenómica filogenética 123
- Transposon mutagenesis in *Bifidobacterium breve*: construction and characterization of a tn5 transposon mutant library in *Bifidobacterium breve* UCC2003 123

continuación ►►►

Vol. 31. Suplemento 1 • Febrero 2015
ISSN (Versión papel): 0212-1611
ISSN (Versión electrónica): 1699-5198

Nutrición Hospitalaria

SUMARIO (continuación)

• Participación de proteínas bacterianas multifuncionales en la regulación de la inflamación de las células epiteliales 123

Veterinaria

• Actividad probiótica de la bacteria ácido láctica *Lactobacillus pentosus* LB-31 en pollos de ceba 124

• Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) on gastrointestinal microbiota by pyrosequencing the 16S rRNA gene 124

Presentación posters/*Posters presentation*

Inmunonutrición

• Association between lipid peroxidation marker, C-reactive protein, serum trace elements and fecal microbiota in lupus 127

• Intestinal effects after the consumption of *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 strain by healthy adults 127

• El consumo de una leche fermentada con la presencia de bacterias probióticas por un corto período de tiempo mejora la función conductual e inmunitaria de ratones viejos 127

• A pea (*Pisum sativum L.*) Seed extract exhibits intestinal anti-inflammatory effect in the DSS model of mouse colitis 127

• Optimización del análisis de carbohidratos prebióticos por cromatografía líquida y detector evaporativo de luz difusa 128

• Modulación de la producción de citokinas *in vivo* por *Lactobacillus plantarum* C4 128

• La suplementación con proteínas de plasma animal reduce la respuesta inflamatoria en un modelo murino de inflamación pulmonar e intestinal 128

• La suplementación dietética con proteínas plasmáticas modula la respuesta inmunitaria intestinal frente a la enterotoxina B de *Staphyloccus aureus* en un modelo murino 129

• Eficacia de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 frente a una inoculación oral con *Salmonella typhimurium* o ETEC K88 en lechones 129

Microbiología y veterinaria

• Microbiota, microbioma y proteoma de origen bacteriano de la bilis y vesícula biliar porcina 129

• Evaluación de propiedades probióticas de *Lactobacillus paraplantarum* LC29, una cepa aislada a partir de leche humana, para su aplicación en el tratamiento de mastitis 130

• *In vitro* evaluation of the effect of glycosyl inositols on human gut microbiota 130

• Estudio de la resistencia gastrointestinal *in vitro* de un Simbiótico y su capacidad de modulación de la microbiota Intestinal 130

• Changes in fecal microbiota composition and prebiotic effect of cocoa fiber in wistar rats 131

• Análisis de los genes implicados en la utilización de L-fucosa en *Lactobacillus rhamnosus* GG 131

• Influencia del prebiótico FOS G como aditivo en crías porcinas 131

continuación ►►►

Nutrición Hospitalaria

Vol. 31. Suplemento 1 • Febrero 2015

ISSN (Versión papel): 0212-1611
ISSN (Versión electrónica): 1699-5198

SUMARIO (continuación)

- Intestinal epithelial barrier function disrupted by *Salmonella* dublin is protected by salmosan 131
- Intestinal infection by *Salmonella* enteritidis is prevented by salmosan 132
- ¿Puede convertirse la aceituna de mesa en un alimento simbiótico? 132
- El modelo *in vivo* pez cebra para evaluar las propiedades probioticas de bacterias en acuicultura 132
- Evaluación del efecto probiótico de un cultivo concentrado de *Lactobacillus casei* CECT 4043 en lechones destetados, durante los períodos de administración y postadministración 133
- Efecto de las vesículas de membrana externa de *Escherichia coli* comensal y probiótic sobre la regulación de la respuesta inmunitaria en PBMCs 133
- Prevalencia del gen Sat en aislados naturales de *Escherichia coli* de origen intestinal 133
- Prueba de campo de nuevo producto probiótico experimental para lechones lactantes 134
- Cambios en la expresión génica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* productoras de EPS inducidos por la presencia de células epiteliales humanas 134
- Obtención de cepas recombinantes de *B. animalis* subsp. *Lactis* productoras de exopolisacáridos 134
- Pectins and pectic oligosaccharides derived from Lemon peel wastes and sugar beet pulp: comparative *in vitro* evaluation of the prebiotic effects 135
- *In vitro* evaluation of the effects of pectic oligosaccharides obtained from orange peel wastes on the human microbiota 135
- Protective effects of Lactococci strains delivering either IL-10 protein or cDNA in a TNBS-induced chronic colitis model 135
- Purificación a escala semi-preparativa de lacto/galacto-N-biosa y su evaluación *in vitro* como potenciales prebióticos 135
- The use of multiple restriction enzymes in T-RFLP analysis and identification of performance-related cecal bacterial groups in growing broiler chickens 136
- The fecal and sputum microbiota of cystic fibrosis patients 136
- Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus* pentosus MP-10 for the identification of key proteins involved in antibiotic resistance 136
- Simulación colónica del efecto microbiológico causado por el empleo de oligosacáridos de lactulosa en la transición entre dietas con diferente contenido energético 137
- Aislamiento de lactobacilos de nasofaringe humana y caracterización preliminar de su potencial probiótico 137
- Distribución de la adhesina OppA en cepas de *Lactobacillus* de origen humano 137
- Estudio de la interacción virus-probiótico. Uso de partículas p como modelo de norovirus 138
- *Akkermansia muciniphila* y *Faecalibacterium prausnitzii* como bacterias reguladoras. En el contenido intestinal de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal 138

continuación ►►►

Vol. 31. Suplemento 1 • Febrero 2015
ISSN (Versión papel): 0212-1611
ISSN (Versión electrónica): 1699-5198

Nutrición Hospitalaria

SUMARIO (continuación)

- Colonización del tracto gastrointestinal de lechones por *Megasphaera elsdenii*: evaluación temporal 138
- Caracterización de moléculas inhibidoras producidas por *Streptoccocus dentisani sp. Nov,* como potencial probiótico 139
- Dieta alta en mantequilla y modificaciones en la microbiota intestinal. Papel en el desarrollo del síndrome metabólico 139
- Efecto del aceite de oliva virgen extra sobre el desarrollo de la hipertensión en ratas SHR. Implicaciones de los cambios en la microbiota intestinal 139
- Beneficial modulation of the gut microbiota by a hypersaline sodium-rich naturally sparkling mineral water in fructose-fed ovariectomized female sprague-dawley rats 140

Usos clínicos

- Estudio clínico piloto tipo prueba de concepto en la fortificación con un probiótico y su eficiencia en la modificación del perfil lipídico 140
- *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 induce la repolarización de macrófagos de pacientes con cirrosis y un descenso de su actividad proinflamatoria 140
- Selección de probióticos para contrarestar el efecto de las toxinas de *Clostridium difficile* 141
- Cardiovascular protective effects of probiotics in spontaneoulsy hypertensive rats 141
- *Lactobacillus salivarius* CECT5713 inhibe la adhesión de *Streptococcus mutans* a hidroxiapatita 141
- Effect of phenolic compounds-enriched olive oils on human gut microbial populations and metabolites. Possible influence on lipid profile 142
- *Lactobacillus salivarius* CECT5713 reduce la carga de *Streptococcus mutans* en saliva 142
- Establecimiento del microbioma intestinal durante los primeros meses de vida e impacto de la vacunación frente a rotavirus 142
- Creación de una plataforma online para la difusión de conocimiento acerca del uso de probióticos y prebióticos en la práctica clínica (el probiótico.com) 143
- Comprimidos matriciales de liberación modificada con microorganismos probióticos 143
- Microencapsulación de microorganismos probióticos 143
- Actividad diamino-oxidasa (DAO) en probióticos 143
- The Human Milk Strain *Bifidobacterium* breve CECT7263 is safe in infants from 1 to 12 months and might improve symptoms of infant colic 144
- Probióticos como nuevos adyuvantes en el tratamiento de la dermatitis atópica 145
- Simbióticos multicepas como nuevos adyuvantes en el tratamiento de la rinitis alérgica 145

VI Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica

Oviedo 5 y 6 de febrero de 2015

SIMPOSIO: MICROBIOTA Y OBESIDAD

VI Workshop Probiotics, Prebiotics and Health: Scientific Evidence

Oviedo, 5 and 6 February, 2015

SYMPOSIUM: MICROBIOTA AND OBESITY

Moderador/Moderator: Carlos Bousoño

Nutrición Hospitalaria

Nutr Hosp. 2015;31(Supl. 1):3-9
ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ
S.V.R. 318

Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos

Juan Evaristo Suárez

Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España.

Resumen

La microbiota autóctona es el conjunto de microorganismos que colonizan la piel y las mucosas. La simbiosis es habitualmente mutualista pero puede hacerse parasitaria debido a disfunciones de la respuesta inmune. La microbiota de la piel incluye bacterias (95%), hongos lipofílicos y ácaros. En el aparato digestivo cada cavidad tiene su microbiota característica que alcanza su órgano diana en el periodo perinatal, dando lugar a comunidades complejas y muy estables (homeostasis). La microbiota vaginal varía con la actividad endocrina, aumentando muy significativamente durante el periodo fértil y, sobre todo, durante el embarazo, en los que suele estar dominada por *Lactobacillus spp*. Los efectos beneficiosos de la microbiota autóctona pueden resumirse en cuatro: a) suministro de nutrientes esenciales, como vitaminas y algunos aminoácidos, b) aprovechamiento de nutrientes no digeribles, la microbiota colónica degrada glúcidos complejos que no podemos digerir, proporcionándonos casi el 20% de las calorías de la ingesta diaria, c) desarrollo del sistema inmunitario: el contacto continuo con el sistema inmune sirve de entrenamiento que lo mantiene en forma para repeler con eficacia a los agentes infecciosos y d) antagonismo microbiano: impide el asentamiento de microorganismos patógenos sobre nuestras mucosas. Se manifiesta de tres maneras: interferencia con la colonización, producción de compuestos antimicrobianos y coagregación con los patógenos potenciales. La microbiota también puede producir perjuicios, principalmente, infecciones endógenas, de carácter claramente oportunista y generación de compuestos carcinogénicos.

Los probióticos son "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del consumidor". Los prebióticos son glúcidos no digeribles, que estimulan el crecimiento o la actividad de los microorganismos autóctonos, resultando en un beneficio para la salud. Los simbióticos son mezclas de probióticos y prebióticos que generan una acción saludable sinérgica.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):3-9)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8701

Palabras clave: Microbiota autóctona. Probiótico. Prebiótico. Simbiótico.

Correspondencia: Juan Evaristo Suárez.
Área de Microbiología.
Universidad de Oviedo.
E-mail: evaristo@uniovi.es

AUTOCHTHONOUS MICROBIOTA, PROBIOTICS AND PREBIOTICS

Abstract

The autochthonous microbiota is the community of microorganisms that colonizes the skin and mucosal surfaces. The symbiosis is, generally, mutualistic but it can become parasitic due to immune response alterations. The skin microbiota includes bacteria (95%), lipophilic fungi and mites. In the digestive apparatus, each cavity presents its own microbiota, which reaches its target organ during the perinatal period, originating complex and stable communities (homeostasis). The vaginal microbiota varies with the endocrine activity, significantly increasing during the fertile and pregnancy periods, when lactobacilli are the most abundant organisms. Four are the main benefits of the autochthonous microbiota: i) delivery of essential nutrients, such as vitamins and some amino acids; ii) utilization of undigestible diet components, the colonic microbiota degrades complex glycans and fulfils almost 20% of the calories present in a normal diet; iii) development of the immune system: the continuous contact with the immune system maintains it alert and in good shape to repel pathogens efficaciously and iv) microbial antagonism, hinders colonization of our mucosal surfaces by alochthonous, potentially pathogenic, organisms. This works through three mechanisms: colonization interference, production of antimicrobials and co-aggregation with the potential pathogens. The microbiota can, sporadically, produce damages: opportunistic endogenous infections and generation of carcinogenic compounds.

Probiotics are "live microorganisms that when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the consumer". Prebiotics are undigestible glycans that enhance the growth or activity of the intestinal microbiota, thus generating a health benefit. Synbiotics are mixes of probiotics and prebiotics that exert a synergistic health effect.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):3-9)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8701

Key words: Autochthonous microbiota. Probiotic. Prebiotic. Synbiotic.

La microbiota autóctona está constituida por el conjunto de microorganismos que colonizan establemente la superficie epidérmica y la de las mucosas. La microbiota juega un papel esencial en nuestra vida, hasta el punto de que ésta sería imposible en su ausencia; por tanto, la relación es, generalmente, mutualista (beneficiosa para los dos socios de la simbiosis). Los microorganismos que la componen son muy abundantes, su número supera en unas diez veces al de células de nuestro propio organismo y, por ejemplo, la mitad del volumen de nuestras heces está constituido por microorganismos que habitan en nuestro aparato digestivo y que han sido arrastrados al exterior. Ahora bien, la simbiosis puede convertirse en parasitaria si concurren circunstancias especiales, principalmente disfunciones de la respuesta inmune.

El conocimiento de la existencia de una microbiota asociada a nuestro organismo es muy antiguo. Así, en la década de 1880 Theodor Escherich realizó extensos estudios sobre la microbiota de las heces y su relación con la fisiología de la digestión, mientras que Albert Döderlein descubrió, en 1892, los lactobacilos vaginales y su papel preponderante en la protección de esta cavidad frente a las infecciones.

Siendo esto así ¿cómo se explica el enorme interés que despierta la microbiota de ocupación desde hace unos 10-15 años? Básicamente por dos razones:

- Se han introducido nuevas metodologías que han incrementado extraordinariamente nuestra percepción de su diversidad y funciones,
- Se ha puesto el foco sobre los efectos beneficiosos que produce y su posible utilización en la prevención y tratamiento de procesos infecciosos, autoinmunes y metabólicos.

Clásicamente, el estudio de la microbiota comprendía la toma de muestras (orina, heces, esputos, diversos fluidos, etc.) su siembra en medios de cultivo, el aislamiento de los organismos presentes a partir de las colonias que aparecían en dichos medios y la identificación, basada en la determinación del tipo de estructura celular (observación y tinciones) y las propiedades fisiológicas (utilización de diferentes substratos, resistencia a sustancias microbiocidas, etc.). El procedimiento es extremadamente útil, de hecho lo aplicamos desde que Robert Koch lo ideó en la década de 1870 y es una de las razones fundamentales por la que la mortalidad asociada a procesos infecciosos pasó de ser más del 75% en su época a menos del 5% actual en los países desarrollados. Sin embargo, tiene una limitación importante. Es imprescindible que los organismos presentes en la muestra de partida se multipliquen en los medios de aislamiento inicial. Habitualmente, dichos medios son muy ricos en nutrientes, por lo que ausencia de elementos esenciales no suele ser un problema. Ahora bien, muchos microorganismos son anaerobios estrictos, es decir, el oxígeno del aire les resulta venenoso. Esto también es conocido y, por ello, se introdujo la incubación en atmósferas enriquecidas en CO_2 e incluso, con ausencia total de O_2. Ahora bien, algunos organismos son tan susceptibles que se mueren con solo trazas de O_2 (por ejemplo durante la toma de las muestras) y, por eso, nos han pasado desapercibidos.

Hacia el año 2000 se inició el uso de lo que llamamos técnicas genotípicas de identificación. En este caso, el trabajo se centra en determinados genes que son universales en un grupo microbiano y cuya secuencia aparece conservada en las distintas especies del grupo. Ahora bien, en dichos genes hay algunas variaciones que permiten diferenciar a unas especies de otras, de manera que si determinamos la secuencia de un determinado gen, podremos adscribirlo a una especie concreta. El ejemplo más representativo de gen universal es el correspondiente al ARN ribosómico 16S (16 rRNA), que se encuentra en la subunidad menor del ribosoma de la célula bacteriana, pero que no aparece en ningún otro tipo de organismo. En esta metodología se extrae el ADN presente en las muestras, de manera que obtendremos el ADN de nuestras propias células y el de los microorganismos presentes, incluyendo a los protozoos y a los virus. Nos da igual que dichos microorganismos se mueran al contacto con el O_2, porque sus cadáveres aún albergan su material genético. A continuación procedemos a amplificar la secuencia correspondiente al 16S rRNA mediante PCR (un procedimiento que permite obtener millones de réplicas de cualquier segmento de ADN si conocemos la secuencia de los nucleótidos que lo limitan). En este proceso, el ADN humano, el de los protozoos y el de los virus no se amplifica, porque no poseen el gen del 16S rRNA; por tanto, este procedimiento es, a la vez, un sistema de limpieza del ADN no bacteriano. Así obtenemos una mezcla de los genes del 16S rRNA de todas las bacterias de nuestra muestra. Secuenciamos dichos genes y comparamos las secuencias obtenidas con las presentes en una base de datos que contiene las de todas las bacterias conocidas. Así podremos ir adscribiendo cada gen de nuestra muestra a una especie bacteriana concreta. Esta metodología ha permitido descubrir microorganismos nuevos, nos ha revelado que su abundancia en el organismo es mucho mayor de lo que pensábamos y ha detectado bacterias concretas en cavidades donde no se sabía que vivían, debido a que son poco abundantes allí.

Así pues, nuestra visión de la microbiota autóctona y de lo que representa ha cambiado mucho y, sin duda, lo hará mucho más porque aún estamos en los inicios de la aplicación de las tecnologías genómicas a su estudio. Esto es lo que sabemos en el momento actual:

La microbiota de la piel: La piel es la capa más externa del cuerpo; por lo tanto es fácilmente colonizable por los microorganismos ambientales. Sin embargo está, en general, seca, es ácida, sufre abrasiones continuas y los nutrientes son escasos, todo lo cual limita mucho los microorganismos que pueden establecerse

Tabla I
La diversidad taxonómica de los microorganismos que conforman la microbiota autóctona

Dominio	*Reino*	*Filo*	*Clase*	*Ejemplo*
Archaea	Archaea	A.II. Euryarcheota	Methanobacteria	Metanógenos intestinales
Bacteria	Bacteria	B.XII. Proteobacteria	Gammaproteobacteria	*Escherichia* (intestino grueso)
			Epsilonproteobacteria	*Helicobacter* (estómago)
		B.XIII. Firmicutes	Clostridia	*Lachnospira*, *Faecalibacterium*, *Roseburia* (intestino grueso)
			Bacilli	*Lactobacillus* (vagina, intestino delgado), *Staphylococcus* (piel), *Streptococcus* (boca)
		B.XIV. Actinobacteria	Actinobacteria	*Bifidobacterium* (intestino grueso), *Propionibacterium* (piel, intestino grueso), *Corynebacterium* (piel), *Gardnerella* (vagina)
		B. XX. Bacteroidetes	Bacteroidetes	*Bacteroides*, *Prevotella* (intestino grueso)
Eukaryota	Protista	Protozoa	Rhizopoda	Amebas comensales (boca, intestino)
			Mastigophora	*Giardia* (duodeno)
	Fungi	Ascomycota	Saccharomycetes	*Candida* (vagina, boca, intestino grueso)
		Basidiomycota	Exobasidiomycetes	*Malassezia* (piel)
	Animalia	Arthropoda	Arachnida	*Demodex* (ácaros de la piel)

sobre ella. Estas condiciones tan inhóspitas se atenúan en las glándulas sudoríparas y sebáceas y en los folículos pilosos, en los que hay más humedad y nutrientes.

Las bacterias constituyen alrededor del 95% de la microbiota de la piel, predominando las pertenecientes a los Filos Actinobacteria (60% del total) y Firmicutes (25%). Las primeras están representadas por corinebacterias y propionibacterias, mientras que *Staphylococcus epidermidis* sería el representante casi exclusivo de las segundas. También aparecen hongos, principalmente del género *Malassezia* (que, como veremos, son beneficiosos, pero cuya proliferación excesiva es el origen de la caspa) y ácaros (arácnidos microscópicos) que viven en los folículos pilosos (Tabla I).

La colonización de la piel no es uniforme. En las zonas más secas, como los antebrazos, la parte anterior de las piernas y el dorso de las manos, hay pocos microorganismos y, paradójicamente, la mayor diversidad, lo que sugiere contaminación continuada más que residencia estable. Los pliegues (ingles, axilas, espacios interdigitales, etc.) son las zonas más húmedas de la piel y en ellos predominan las corinebacterias y los estafilococos. En ellas existen unas glándulas especiales que segregan, además de sudor, un lubricante que evita el rozamiento entre los dos lados del pliegue. Esta secreción es utilizada como alimento por las bacterias predominantes en cada zona, siendo los productos de desecho resultantes, los responsables de su olor peculiar. Por último, en las regiones sebáceas (el cuero cabelludo, detrás de las orejas, la cara, la espalda, etc.) predominan las propionibacterias y *Malassezia*, que degradan los lípidos presentes en el "sebum" y liberan ácidos grasos, contribuyendo decisivamente al pH ácido de la piel y en su protección frente al establecimiento de organismos patógenos.

El aparato digestivo presenta multitud de conductos y cavidades, en cada uno de los cuales encontramos una microbiota característica:

Boca: Multitud de bacterias, protozoos y levaduras. El papel mutualista de muchas de ellas es discutible; así, los estreptococos y algunas otras bacterias causan caries y otros problemas dentales, debido a que producen ácido que ataca el esmalte de los dientes. Las levaduras son responsables de las aftas que aparecen, con frecuencia, en la mucosa de las personas inmunodeprimidas.

Esófago: No existe colonización permanente; el esófago es un conducto virtual (está colapsado por la musculatura que lo rodea para evitar regurgitaciones), por lo que la comida se abre paso a su través y arrastra a los posibles microorganismos que pudieran intentar establecerse en él.

Estómago: Fundamentalmente lactobacilos. La acidez estomacal es una barrera casi infranqueable para los microorganismos que ingerimos con la comida y la bebida, protegiendo así al intestino frente a las infecciones. La concentración de lactobacilos es tan baja que no se sabe si ejercen algún efecto mutualista significativo. Por otra parte, aproximadamente el 40% de la población alberga *Helicobacter pylori*, que se asocia a la producción de gastritis, úlceras pépticas e incluso algunos tipos de cáncer gástrico.

Intestino delgado: En duodeno la microbiota es escasa, aún permanece parte de la acidez estomacal y en él desembocan los conductos biliar y pancreá-

tico. La bilis es tóxica para muchas bacterias y el fluido pancreático contiene una serie de enzimas que podrían, literalmente, digerir a las bacterias que se establecieran allí. En yeyuno se va incrementando la concentración bacteriana, que está formada principalmente por lactobacilos. En íleon la concentración y diversidad de los microorganismos residentes aumenta rápidamente y va reflejando paulatinamente la que tendremos en el intestino grueso.

Intestino grueso: La densidad microbiana es enorme; está dominada por bacterias, pero también hay arqueas, hongos (levaduras) y protozoos (Tabla I). Además de una enorme densidad, existe una gran diversidad; se calcula que hay más de 500 especies ocupando ese hábitat, de manera que, en su conjunto, dan lugar a un ecosistema extraordinariamente maduro y, por tanto, resistente a la inducción de cambios desde el exterior; es lo que se denomina la homeostasis intestinal. Dentro de los grupos bacterianos que habitan en el intestino grueso, los más abundantes son los Firmicutes y los Bacteroidetes, que constituyen aproximadamente el 35% del total en cada caso, seguidos por las Actinobacterias, que serían algo menos del 10%. Los géneros más abundantes dentro de los Firmicutes son *Faecalibacterium* y *Roseburia*; al grupo de los Bacteroidetes pertenecen las bacterias de los géneros *Bacteroides* y *Prevotella*, que son los más abundantes en el hábitat intestinal, siendo las Actinobacterias más frecuentes las encuadradas dentro del género *Bifidobacterium*. La inmensa mayoría de estas bacterias son anaerobias estrictas; es decir, obtienen la energía que necesitan a través de la fermentación o de la respiración anaerobia, siendo extremadamente susceptibles al oxígeno. Esta limitación las mantuvo en el anonimato hasta que se desarrollaron los métodos independientes de cultivo, que identifican a los microorganismos a través del análisis de la secuencia de nucleótidos de sus genomas.

¿Cómo se produce la colonización del aparato digestivo? Inicialmente durante el parto, como consecuencia del contacto del niño con la microbiota vaginal y la propia de la zona perineal. Esta colonización se ve favorecida por el pH gástrico relativamente elevado y la secreción atenuada de bilis, típicas de los recién nacidos. La evolución posterior de la microbiota va a estar muy ligada al régimen alimenticio del niño. Así, durante los primeros meses solo tomará leche, que promoverá el establecimiento de lactobacilos y bifidobacterias; los primeros, porque metabolizan la lactosa muy eficazmente y las segundas, debido a que en la leche humana se encuentran una serie de oligosacáridos complejos que utilizan muy bien. Dichos oligosacáridos no se encuentran en la leche de otros mamíferos y no son asimilables por nosotros, por lo que parece que su función sería precisamente favorecer el establecimiento de las bifidobacterias en nuestro intestino. A los 5-6 meses de edad se inicia la toma de papillas de frutas, lo que supone el aporte de otros azúcares y de polisacáridos y promueve la colonización por bacterias de la división Firmicutes y la diversificación del ecosistema intestinal. Entre unas dos semanas y un mes después se inicia la alimentación con purés de verduras, que contienen multitud de polisacáridos complejos y facilitan la llegada de los Bacteroidetes y el asentamiento definitivo de los Firmicutes. La adición paulatina de carne, yema de huevo y pescado a los purés provocaría la colonización por *Escherichia coli* y otras proteobacterias, de manera que en el momento del cambio a una dieta adulta ya estarían en el intestino todos los actores que determinarán el asentamiento de una microbiota madura y compensada, lo que ocurre, más o menos, a partir de los dos años de edad.

Microbiota del aparato genitourinario: Las diferencias anatómicas y fisiológicas del aparato urogenital de hombres y mujeres, obliga a que los tratemos por separado.

Hombre: La microbiota es escasa debido a que la orina lava la uretra periódicamente y a que el orificio de salida está muy separado del ano, que es la principal fuente de contaminación del aparato excretor. Por eso las infecciones urinarias son infrecuentes en los hombres, salvo que haya circunstancias predisponentes como el uso de pañales; así, son relativamente comunes en ancianos y en niños pequeños, siendo éste el único tramo de la vida en que la infección urinaria es más frecuente en varones que en mujeres.

Mujer: Debido a la separación entre la uretra y la vagina, la orina no lava esta última cavidad, permitiendo así el establecimiento de una microbiota estable en ella. Esto la hace, al mismo tiempo, susceptible a la infección, fundamentalmente desde el tracto entérico, debido a la proximidad de la vulva y el ano. La vagina es, además, una estación intermedia que facilita el acceso de la microbiota intestinal a la uretra, hasta el punto de que, casi invariablemente, la infección de la vejiga urinaria viene precedida por la presencia del agente causal en la vagina. La corta longitud de la uretra facilita también la llegada de microorganismos indeseables a la vejiga y la producción de cistitis y otras afecciones renales.

Ahora bien, los microorganismos predominantes en la vagina cambian con la edad y la actividad endocrina. Así, en las niñas premenárquicas el epitelio vaginal es fino y está bastante seco, lo que determina que la microbiota predominante sea la de la piel más un reflejo de la intestinal que contamina la zona perineal. Esta microbiota es transitoria, de forma que la colonización es permanente porque hay una fuente continua de nuevos microorganismos. La llegada a la pubertad, provocada por el inicio de la producción de estrógenos, va a generar un aumento del espesor del epitelio vaginal y la secreción de un exudado que favorece la colonización por lactobacilos y, en menor medida, por *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans* y otros, que pueden convertirse en patógenos si proliferan demasiado. Las especies de lactobacilos más habituales en la mucosa vaginal son *L. crispatus*, *L.*

jensenii, *L. gasseri* y *L. iners*. Los lactobacilos producen ácido láctico y agua oxigenada que eliminan a los microorganismos de origen intestinal y controlan la densidad de los patógenos potenciales. Durante el embarazo se induce una cierta inmunosupresión para evitar el rechazo del embrión, que expresará antígenos paternos y, por tanto, extraños para el sistema inmunitario materno. Este efecto se ve compensado por el incremento de la concentración de IgA y de células fagocíticas y la disminución del pH vaginal. Este último efecto es debido al incremento de la concentración de lactobacilos y de la acidez que producen, sobre todo durante el tercer trimestre del embarazo. La razón de estos cambios sería doble; por un lado, la protección de la mucosa vaginal y del feto frente al desarrollo de procesos infecciosos por vía ascendente y, por otro, la eliminación de posibles agentes nocivos que pudieran inducir patología en la madre (fiebres puerperales) o en el recién nacido (por ejemplo, meningitis por *Streptococcus agalactiae*), derivadas de la infección en el momento del parto. La menopausia provoca una gran disminución del exudado vaginal, de la densidad de los microorganismos residentes y el cambio de la microbiota predominante, que pasa a estar constituida por bacterias intestinales y de la piel, como ocurría durante la infancia. Como consecuencia, disminuyen las infecciones vaginales típicas y aumenta la patología urinaria, causada fundamentalmente por bacterias entéricas. Este efecto puede revertirse parcialmente con terapia hormonal, que mimetizará las condiciones de la vagina durante la edad fértil y conducirá, de nuevo, a la dominancia de los lactobacilos en la cavidad.

Funciones de la microbiota autóctona. Las principales son cuatro y actúan constantemente, razón por la cual, paradójicamente, pasan desapercibidas,

Suministro de nutrientes esenciales, como las vitaminas y algunos aminoácidos, cuya necesidad de ingestión se modera gracias a los producidos por la microbiota indígena.

Aprovechamiento de nutrientes no digeribles: De los múltiples glúcidos complejos que se incluyen en nuestra dieta, solamente tres, la sacarosa, la lactosa (no siempre) y el almidón, son digeribles por nuestras propias enzimas. El resto, como la celulosa y las pectinas de origen vegetal y los glicosaminoglicanos de la carne (heparán y condroitín sulfato entre otros) llegan al intestino grueso casi intactos. Allí son degradados por la microbiota autóctona que genera H_2, CO_2 y ácidos grasos de cadena corta. Estos últimos inhiben el crecimiento de organismos patógenos, son una fuente de energía fundamental para los enterocitos (principalmente el ácido butírico) y neutralizan los grupos amonio generados por desaminación de los aminoácidos y otros nutrientes. Por otro lado, incrementan la presión osmótica luminal, induciendo la secreción de agua y, junto a los gases generados, aumentan el volumen de las heces, todo lo cual estimula el peristaltismo intestinal. Por último, los ácidos acético y propiónico van al hígado; allí, el primero es convertido en acetil coenzima A y se integra en el ciclo de Krebs y en las rutas de síntesis de lípidos, mientras que el ácido propiónico se incorpora a las rutas del catabolismo glucídico. Se postula que la microbiota colónica contribuye con más de 500 kcal diarias a nuestro metabolismo, siendo esencial su actividad en los países subdesarrollados, en los que la dieta suele ser muy rica en glúcidos complejos.

Desarrollo del sistema inmunitario: Las bacterias en general y las de la microbiota de ocupación en particular, presentan en su superficie componentes que contribuyen a la puesta a punto de nuestras defensas frente a la infección. Por tanto, el contacto continuo entre ellas y el sistema inmunitario es una especie de entrenamiento que lo mantiene en buena forma para poder repeler con eficacia a los agentes infecciosos.

Antagonismo microbiano: Se refiere a la capacidad de impedir el asentamiento de microorganismos foráneos, potencialmente patógenos, sobre nuestras mucosas.

Mecanismos implicados en el antagonismo microbiano. Existen tres principales, la interferencia con la colonización de las mucosas, la producción de compuestos antimicrobianos y la coagregación con los patógenos potenciales.

Interferencia con la colonización: El establecimiento de un microorganismo en una cavidad depende de su capacidad de adherirse al epitelio y de aprovechar las condiciones ambientales de la misma. La adherencia depende del reconocimiento entre moléculas superficiales del microorganismo (adhesinas) y del hospedador (receptores). El aprovechamiento del ambiente incluye la utilización eficaz de los nutrientes disponibles y la adaptación a las condiciones del mismo (pH, pO_2, etc). La microbiota de ocupación está perfectamente adaptada a vivir en nuestras cavidades, lo que explica que el establecimiento de patógenos solo ocurra cuando se ha eliminado la microbiota normal (por ejemplo, tras un tratamiento con antibióticos por vía oral) o se produce una invasión extraordinariamente numerosa (caso del cólera o de las toxiinfecciones por *Salmonella*).

Producción de compuestos antimicrobianos: Las bacterias de la microbiota generan multitud de sustancias con capacidad antibiótica como los ácidos y el agua oxigenada, que se obtienen por fermentación de los glúcidos, y las bacteriocinas, que son péptidos que forman poros en las membranas y/o inhiben la síntesis de la pared bacteriana, siendo, por ello, bactericidas.

Coagregación con los patógenos: Algunos miembros de la microbiota se pegan a los organismos extraños e impiden su unión a la mucosa; al mismo tiempo, la vecindad de ambos aumenta la efectividad de los compuestos antimicrobianos que pudiera producir el mutualista.

Perjuicios achacables a la microbiota de ocupación: Son fundamentalmente dos:

Infecciones endógenas: Los microorganismos autóctonos pueden comportarse como patógenos si pe-

netran al medio interno o si se hacen muy abundantes. Así, *Bacteroides* es beneficioso en el intestino grueso, pero se convierte en un patógeno muy peligroso si invade la cavidad peritoneal. Una situación de descompensación es la que conduce a la vaginitis causada por *C. albicans*. Esta levadura forma parte de la microbiota vaginal y en condiciones normales no es patógena, pero sí, si se hace predominante en dicha cavidad.

Generación de sustancias carcinogénicas: El metabolismo de los nutrientes y los ácidos biliares por la microbiota indígena conduce, en ocasiones, a la generación de sustancias que pueden transformar a las células intestinales en tumorales. Por eso es importante que los residuos permanezcan poco tiempo en el organismo: habrá menor oportunidad de que se generen moléculas nocivas y de que estas interaccionen con las células de la mucosa del colon.

Organismos probióticos. La Organización Mundial de la Salud los define como "microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio a la salud del consumidor". En principio, cualquier componente de la microbiota de ocupación podría ser candidato a convertirse en probiótico, ya que todos ellos contribuyen, potencialmente, a generar los beneficios que otorga el conjunto. Sin embargo, en la práctica pertenecen fundamentalmente a dos grupos microbianos: los **lactobacilos** y las **bifidobacterias.** La razón de esto es que son probablemente los únicos, dentro de los que colonizan nuestras mucosas, que son inocuos bajo (casi) cualquier circunstancia y que, por ello, han sido reconocidos como organismos GRAS (Generally Regarded As Safe) y QPS (Qualified Presumption of Safety) por la Food and Drug Administration de los Estados Unidos y la European Food Safety Authority, respectivamente. Ahora bien, la falta de virulencia es una condición necesaria pero no suficiente para considerar a un microorganismo como probiótico. Dentro de las características deseables que deben cumplir, está la adaptación a las condiciones de la cavidad diana y una buena adherencia al epitelio que la recubre (por eso se prefieren organismos con ese mismo origen), la generación de sustancias antimicrobianas, la ausencia de resistencias transmisibles a antibióticos y, sobre todo, que existan ensayos clínicos que certifiquen que las expectativas derivadas de sus buenas propiedades *in vitro*, se cumplen tras su administración a voluntarios, previniendo la aparición de cuadros concretos o coadyuvando a su resolución.

Beneficios asociados a la administración de organismos probióticos: Aquellos para los que hay una mayor evidencia se dividen en tres categorías:

Reversión de sintomatologías de mala digestión. El ejemplo típico es la resolución de la intolerancia a la lactosa. Los lactobacilos la degradan e impiden así que llegue sin digerir al intestino grueso y ocasione flatulencia, distensión abdominal y diarrea, entre otros síntomas.

Reposición de la microbiota después de que la residente haya sido eliminada por cualquier causa. Los casos mejor demostrados son la reversión de la diarrea causada por tratamiento con antibióticos y la de las diarreas infantiles producidas por rotavirus. En ambos casos el organismo probiótico viene a ocupar la superficie mucosa que ha quedado desierta, constituyendo así una solución de emergencia que atenúa los síntomas y facilita la recolonización por los microorganismos indígenas.

En este apartado se englobaría también la prevención de recidivas de vaginosis y de vaginitis mediada por lactobacilos probióticos, administrados tras el tratamiento específico con los antibióticos apropiados.

Prevención de la mastitis durante la lactancia. La secreción de leche aumenta la humedad de los conductos galactóforos y crea condiciones apropiadas para el establecimiento de organismos patógenos en ellos. Recientemente se ha demostrado de manera fehaciente que lactobacilos administrados por vía oral pueden colonizar los conductos e impedir el asentamiento de bacterias indeseables, previniendo e incluso curando, las mastitis.

Otros: Existen otras afecciones en las que los microorganismos probióticos parecen ejercer un efecto beneficioso, aunque la evidencia no es tan sólida como en los casos ya descritos; entre ellas podemos citar por orden de mayor a menor evidencia, la enterocolitis necrotizante (una afección típica de niños prematuros que, al ser poco frecuente, dificulta la obtención de datos con significación estadística), la enfermedad inflamatoria intestinal y la colitis pseudomembranosa.

Prebióticos: Se denomina así a compuestos no digeribles, presentes en la dieta, que estimulan el crecimiento o la actividad de los microorganismos autóctonos, resultando en un beneficio para la salud. Estructuralmente son oligo o polisacáridos de fructosa (FOS e inulina respectivamente) o de galactosa (GOS). También se usa la lactulosa (un disacárido de galactosa y fructosa) y el lactitol (galactosa y un polialcohol derivado de la glucosa). Su objetivo es doble; por un lado, promover la proliferación de la microbiota indígena y, con ella, el antagonismo frente a la colonización por microorganismos foráneos y, por otro, potenciar los efectos positivos asociados al metabolismo de los glúcidos complejos. De hecho, estos compuestos ya tienen un lugar en el Vademecum, aunque su acción terapéutica no se asocie, comúnmente, con la microbiota autóctona. Así, se utilizan como agentes laxantes debido a su capacidad de aumentar el peristaltismo (véase el apartado "funciones de la microbiota autóctona") y en la prevención y tratamiento de la encefalopatía hepática; en este caso, los ácidos grasos derivados de la digestión de los prebióticos por la microbiota del colon, neutralizan los grupos amonio resultantes de la degradación de los alimentos nitrogenados, evitando su paso a la sangre y la aparición del cuadro neuropsiquiátrico que se asocia a la incapacidad de los enfermos hepáticos para eliminarlos.

Simbióticos: Se denomina así a la mezcla de uno o más organismos probióticos con uno o varios compuestos prebióticos. Su objetivo es favorecer el desarrollo/actividad de los probióticos y prebióticos componentes para potenciar sus propiedades saludables, generando un efecto sinérgico entre ellos. Esto implica que un producto solo puede ser denominado simbiótico si ha demostrado inducir un efecto beneficioso superior al de la suma de los generados, separadamente, por sus integrantes. Adicionalmente, se espera que esta mejora se acompañe de un incremento de la densidad de los probióticos componentes o de las actividades saludables a que dan lugar.

Referencias

1. Chen YE, Tsao H. 2013. The skin microbiome: current perspectives and future challenges. *J. Am. Acad. Dermatol* 69: 143-155.
2. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología. 2011. Probióticos y probióticos. http://www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.
3. Binns N. 2013. Probiotics, prebiotics and the gut microbiota. ILSI Europe Monograph Series. http://www.sepyp.es/es/sabermas.
4. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. 2014. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 11:506-514.
5. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, Angenent LT, Ley RE. 2011. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 108 Suppl 1: 4578-4585.
6. Martínez-Cuesta MC, Peláez C, Requena T. 2012. Probióticos en la salud humana. http://www.sepyp.es/es/sabermas.
7. Sommer F, Bäckhed F. 2013. The gut microbiota--masters of host development and physiology. *Nat. Rev. Microbiol* 11: 227-238.
8. Srinivasan S, Liu C, Mitchell CM, Fiedler TL, Thomas KK, Agnew KJ, Marrazzo JM, Fredricks DN. 2010. Temporal variability of human vaginal bacteria and relationship with bacterial vaginosis. *PLoS One* 5: e10197.
9. Suárez JE, Beltrán DA, Daza M, González SP, Guerra JA, Jurado AR, Ojeda D, Rodríguez JM. 2012. La microbiota vaginal: composición y efectos beneficiosos. Consenso sobre usos de los probióticos en Ginecología. http://www.sepyp.es/es/sabermas.

Nutrición Hospitalaria

Nutr Hosp. 2015;31(Supl. 1):10-18
ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ
S.V.R. 318

El papel de los probióticos en el manejo de la obesidad

Andreu Prados-Bo[1], Sonia Gómez-Martínez[1], Esther Nova[1] y Ascensión Marcos[1]

[1]Grupo de Inmunonutrición, Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). España.

Resumen

La obesidad es un importante problema de salud pública, ya que está relacionada con varias enfermedades crónicas, incluyendo diabetes tipo 2, hipertensión arterial, dislipemia, enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otras. La microbiota intestinal se considera uno de los nuevos factores que participan en la obesidad y los trastornos metabólicos. Animales y seres humanos obesos tienen alteraciones en la composición de la microbiota intestinal en comparación con sus homólogos delgados. Además, se ha observado en ratones libres de gérmenes que el trasplante de la microbiota procedente de ratones bien obesos o delgados influye en el peso corporal, lo que sugiere que el ecosistema intestinal juega un papel importante en el control ponderal. Asimismo, determinadas cepas de probióticos podrían regular el peso corporal al influir en las funciones metabólicas, neuroendocrinas e inmunológicas del hospedador. Con todo ello, nuestro conocimiento sobre la influencia que la microbiota intestinal tiene sobre la obesidad va avanzando, por lo que cabe considerar que la modulación de su composición mediante probióticos podría ofrecer una nueva vía para el tratamiento del sobrepeso y la obesidad.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):10-18)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8702

Palabras clave: *Microbiota intestinal*. *Probióticos*. *Obesidad*.

ROLE OF PROBIOTICS IN OBESITY MANAGEMENT

Abstract

Obesity is a major public health issue as it is related to several chronic disorders, including type-2 diabetes, high blood pressure, dyslipemia, cardiovascular diseases and cancer, among others. Novel research shows that the gut microbiota is involved in obesity and metabolic disorders, revealing that obese animal and human subjects have alterations in the composition of the gut microbiota compared to their lean counterparts. Moreover, it has been observed in germ-free mice that transplantation of the microbiota of either obese or lean mice influences body weight, suggesting that the gut ecosystem is a relevant target for weight management. Certain strains of probiotics may regulate body weight by influencing the host's metabolic, neuroendocrine and immune functions. Taken together, our knowledge about the influence of gut microbiota on obesity is progressing. Therefore, modulation of its composition through probiotics may provide new opportunities to manage overweight and obesity.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):10-18)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8702

Key words: *Gut microbiota*. *Probiotics*. *Obesity.*

Abreviaturas presentes en el cuerpo del trabajo

FAO: Organización de Alimentación y Agricultura.
OMS: Organización Mundial de la Salud.
GALT: sistema inmunitario asociado al tubo digestivo (del inglés *Gut-Associated Lymphoid Tissue*).
HMP: *Human Microbiome Project*.
SNC: sistema nervioso central.
SEPyP: Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos.
ufc: unidades formadoras de colonias.
GABA: ácido gamma-aminobutírico.
IMC: Índice de Masa Corporal.
PBS: solución salina (*phosphate buffered saline*).
LGG: *Lactobacillus rhamnosus* GG.
LPL: lipoproteínlipasa.
Fiaf: *Fasting-Induced Adipocyte Factor*.
Colesterol-LDL: colesterol transportado por lipoproteínas de baja densidad (LDL, *low-density lipoprotein*).
FISH: hibridación fluorescente *in situ* (del inglés *fluorescence in situ hybridization*).
PCR: reacción en cadena de la polimerasa (del inglés *polymerase chain reaction*).
LPS: lipopolisacárido.

Correspondencia: Ascensión Marcos.
E-mail: amarcos@ictan.csic.es

Introducción: papel de la microbiota intestinal en la salud y en la enfermedad

Los probióticos han sido definidos por la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO, *Food and Agriculture Organization*) de las Naciones Unidas y por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como "microorganismos vivos que proporcionan un bene-

ficio a la salud del hospedador cuando son ingeridos en las cantidades adecuadas"[1]. El término probiótico fue utilizado por primera vez en 1965 para describir microorganismos vivos no patógenos, como bacterias mutualistas del intestino, con efectos beneficiosos para el huésped, prevención o tratamiento de enfermedades[2]. En los últimos 15 años su consumo se ha universalizado gracias a su inclusión, entre otros, en numerosos productos lácteos fermentados. Los probióticos pueden representar una forma directa de optimizar la relación entre la microbiota y el organismo. La microbiota intestinal se define como el conjunto de comunidades de microorganismos vivos que colonizan el intestino. Juntamente con las estructuras propias del tubo digestivo, la microbiota intestinal contribuye de modo importante a las dos funciones principales del tracto gastrointestinal: nutrición, por la digestión y absorción de nutrientes; y defensa, por desarrollo de sistemas de prevención y rechazo de posibles agresiones desde el mundo exterior[3]. Las funciones principales de la microbiota intestinal o bien sus componentes o sus metabolitos se resumen en la tabla I.

La microbiota intestinal podría considerarse un órgano más, integrado en la fisiología del individuo[4]. Se ha llegado a considerar que en el cuerpo humano hay 10 bacterias por cada célula humana[5]. Se estima que el tracto gastrointestinal está colonizado por unos 10^{14} microorganismos pertenecientes a más de 1.000 especies de tres Dominios –*Eukarya, Archaea* y *Bacteria*–, en su mayoría pertenecientes al Dominio *Bacteria*[6]. Durante los últimos años dos grandes proyectos llevan a cabo la tarea de descifrar la estructura y funcionalidad de la microbiota intestinal humana así como su relación con enfermedades. Por un lado, el Proyecto MetaHIT (http://www.metahit.eu) financiado por la Unión Europea, y, en segundo lugar, el *Human Microbiome Project (HMP)* (http://hmpdacc.org), subvencionado por el *National Institute of Health* de los Estados Unidos. El genoma colectivo de las especies microbianas que viven asociadas al ser humano (microbioma), principalmente en el hábitat intestinal, tiene una capacidad codificante aproximadamente unas 150 veces mayor a la del genoma humano, aportando funciones metabólicas adicionales al huésped[9]. Cuando el microbioma se agrupa por genomas pertenecientes a diversas especies, se denomina metagenoma. El metagenoma intestinal de individuos sanos de diferentes poblaciones humanas se puede clasificar en tres enterotipos, según posean la microbiota significativamente enriquecida en *Ruminococcus*, *Bacteroides* o *Prevotella*[10]. Otros trabajos han relacionado directamente los enterotipos con la dieta, concretamente el enterotipo *Bacteroides* se relaciona con dietas ricas en proteína y grasa animal y el enterotipo *Prevotella* con una dieta rica en carbohidratos[11].

En los últimos años se están produciendo grandes avances que aportan una nueva perspectiva al papel de la microbiota intestinal en la función digestiva y de su relación con enfermedades gastrointestinales crónicas. Además, también se ha puesto de manifiesto que diversas enfermedades que tienen poca relación aparente con el intestino conllevan cambios notables en la microbiota, como la obesidad, la diabetes tipo 2, la enfermedad cardiovascular, la enfermedad atópica, la encefalopatía hepática y más recientemente la esquizofrenia y el autismo, debido a que se han encontrado interacciones entre la microbiota intestinal y el sistema nervioso central (SNC)[12]. En estas enfermedades caracterizadas por un desequilibrio (disbiosis) en la composición bacteriana de la microbiota intestinal en comparación con el patrón considerado normal, los probióticos son una estrategia prometedora.

Tabla I

Funciones principales de la microbiota intestinal[7,8]

1. Funciones nutritivas y metabólicas:
• Fermentación de los carbohidratos de la dieta no digeribles (polisacáridos y oligosacáridos) y del moco endógeno. Constituye una fuente de energía importante para la proliferación bacteriana y produce ácidos grasos de cadena corta que el huésped puede absorber, con lo que se favorece la recuperación y absorción de iones como el calcio, hierro y magnesio.
• La diversidad genética de la comunidad microbiana proporciona enzimas y actividades metabólicas que no están presentes en el genotipo humano.
• Síntesis de ciertas vitaminas (K, B_{12}, biotina, ácido fólico y pantoténico).
• Síntesis de aminoácidos a partir del amoníaco o la urea.
• Modulación del metabolismo de la grasa.
2. Funciones de protección:
• Efecto "barrera": a través de diferentes mecanismos la microbiota intestinal previene la invasión de microorganismos patógenos.
3. Funciones tróficas:
• Control de la proliferación y diferenciación de las células epiteliales.
• Desarrollo y modulación del sistema inmunitario asociado al tubo digestivo o GALT (*Gut-Associated Lymphoid Tissue*). El 80% de las células inmunocompetentes del organismo están alrededor de la luz del tubo digestivo y la producción más importante de inmunoglobulinas tiene lugar en la mucosa gastrointestinal. Además, existe una comunicación bidireccional entre el cerebro y el sistema gastrointestinal y la microbiota, a través de diferentes péptidos.

En relación a la interacción de la microbiota intestinal con el sistema nervioso, desde hace algún tiempo los neurobiólogos han explorado el posible impacto de la microbiota intestinal en la función del cerebro y cómo esto podría modular el comportamiento (eje microbiota intestinal-sistema gastrointestinal-SNC). Por ejemplo, se sabe que al menos dos tipos de bacterias de la microbiota del intestino humano producen ácido gamma-aminobutírico (GABA), un neurotransmisor inhibitorio del SNC que está involucrado en depresión, ansiedad y trastornos cardiovasculares[13]. La investigación emergente sugiere que las alteraciones en la microbiota intestinal pueden tener manifestaciones inmunes y no inmunes más allá del medio gastrointestinal. En estudios recientes se afirma que los probióticos pueden ser utilizados en los estados de estrés y en la enfermedad crónica. Diversos trabajos realizados tanto en humanos como en animales apoyan la idea del efecto inmunomodulador de los probióticos en general. Concretamente en este sentido, se han estudiado con mayor profundidad dos modelos de estrés psicológico como son el asociado con exámenes académicos y la anorexia nerviosa, observándose que en ambas situaciones el consumo de estos productos permite modular la inmunocompetencia, mediante la regulación de las concentraciones de citoquinas, inmunoglobulinas y la función linfocitaria. También están bien documentados los efectos inmunomoduladores beneficiosos de los probióticos en modelos físicos de estrés como cáncer, diarrea, deporte, llegando incluso a veces a aconsejarse el consumo de estos productos para paliar en cierta medida los perjuicios producidos por dichas situaciones. Bajo condiciones de estrés los probióticos pueden jugar un papel importante en la regulación de la homeostasis. Sin embargo, los mecanismos de inmunomodulación que mitigan los cambios causados por el estrés deben ser aclarados, para lo cual es necesario seguir investigando[14-16].

La mayoría de los probióticos comerciales son principalmente bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Para la selección de probióticos se buscan cepas no patogénicas del contenido intestinal o de heces de individuos sanos que cumplan las características que se esquematizan en la tabla II.

El uso de los probióticos ocupa un lugar cada vez más importante en la Medicina Clínica. Según se desprende de las declaraciones consensuadas del *Workshop* "Probióticos y salud. Evidencia científica", la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP) apuntó ya en 2010[17] que los efectos beneficiosos para la salud deben demostrarse mediante estudios realizados en población humana con metodología científica adecuada. Por otro lado, los efectos saludables demostrados para una cepa microbiana específica no son extrapolables o atribuibles a otras cepas de la misma especie y dependen del número de unidades formadoras de colonias (ufc). Además, una cepa microbiana con categoría de probiótico por haber demostrado eficacia en una indicación concreta no es necesariamente válida para otras indicaciones.

Microbiota intestinal y su relación con la obesidad

La obesidad es el resultado de un aumento de la grasa corporal y, según la OMS[18], en adultos se define a partir de un valor de Índice de Masa Corporal (IMC) igual o superior a 30 kg/m^2. La prevalencia de la obesidad ha aumentado en las últimas dos décadas y se ha convertido actualmente en una crisis mundial de salud pública por sus comorbilidades asociadas tales como diabetes tipo 2, hipertensión arterial, dislipemia, enfermedades cardiovasculares y cáncer, entre otras[19].

El desarrollo de la obesidad en una persona está determinado por una compleja interacción entre factores genéticos, ambientales, culturales, sociales y el gasto energético, el cual está altamente influenciado por el nivel de actividad física de cada individuo. Recientemente, la microbiota intestinal se considera uno de los nuevos factores que participan en la obesidad y los trastornos metabólicos asociados. Animales y seres humanos obesos parecen presentar alteraciones en la composición de la microbiota intestinal en comparación con sus homólogos delgados[20]. Sin embargo, por prometedora y atractiva que resulte esta hipótesis hay que tomarla aún con cautela, puesto que no todos

Tabla II
Características que debe cumplir un probiótico (adaptado de FAO/OMS 20061)

– Seguro (no patógeno, ni inflamatorio y sin resistencia a antibiótico).
– Resistente al pH del estómago, jugos pancreáticos y ácidos biliares.
– Adhesión a mucus o a células epiteliales.
– Proliferación/colonización en el tracto digestivo (temporal).
– Actividades deseables (inmunoestimulación, actividad anticarcinogénica,…).
– Con efectos beneficiosos validados clínicamente para condiciones específicas. El probiótico debe mantener activa su capacidad beneficiosa cuando alcanza los lugares donde interacciona con el hospedador.
– Estabilidad y viabilidad durante la vida útil del producto en el que se administra, el cual debe contener la cantidad de microorganismos necesarios para proporcionar el beneficio.

los resultados de investigación son consistentes. Recientemente se han buscado las relaciones entre IMC y composición taxonómica del microbioma intestinal utilizando las bases de datos o la información extraída de los grandes proyectos metagenómicos HMP y MetaHit y algunos otros más pequeños, y los autores llegan a la conclusión de que la variabilidad entre estudios es mucho más grande que la variabilidad entre sujetos obesos y delgados, y no es posible identificar una "firma" taxonómica única para la obesidad en el microbioma intestinal[21,22]. En consecuencia, aún queda mucho por hacer en esta materia. Con todo ello en perspectiva, cabe considerar que la modulación de la composición de la microbiota intestinal mediante el uso de probióticos podría ofrecer una nueva vía para el tratamiento del sobrepeso y la obesidad[20].

Microbiota intestinal y obesidad: evidencia a partir de estudios con ratones

La hipótesis de que la microbiota intestinal podría actuar como un factor favorecedor del almacenamiento de grasa en el organismo surge a partir de la observación de Bäckhed y col.[23] en 2004 de que los ratones sin microbiota intestinal (ratones axénicos), a pesar de consumir un 30% más de alimento que los ratones convencionales (colonizados con microbiota intestinal) de la misma edad y peso, tenían un 42% menos de grasa corporal total. El trasplante de la microbiota intestinal de ratones convencionales donantes al tubo digestivo de ratones axénicos receptores (convencionalización) produjo en tan solo 10 días un aumento del 57% de su grasa corporal total, y a las 2 semanas habían desarrollado resistencia a la insulina, todo ello pese a la disminución del consumo de alimentos y al aumento de actividad. El mecanismo implicado se basa en el hecho que la actividad de la lipoproteínlipasa (LPL), una enzima implicada en la captación celular de ácidos grasos a partir de las lipoproteínas y en la acumulación de triglicéridos en los adipocitos, aumenta en los animales convencionalizados. Esta mayor actividad LPL se debe a la inhibición por la microbiota intestinal de la hormona Fiaf (*Fasting-Induced Adipocyte Factor*), que se expresa constitutivamente en la mucosa intestinal de los ratones axénicos y que actúa como inhibidor circulante de la LPL. La hormona Fiaf sería, por lo tanto, un mediador clave en la capacidad de la microbiota de promover el almacenamiento de grasa en los adipocitos del huésped. Como consecuencia, los ratones axénicos se ven protegidos de la ganancia de peso cuando reciben durante 8 semanas una dieta hipercalórica.

Por otra parte, se ha observado un aumento en la concentración relativa de *Firmicutes* y una reducción de *Bacteroidetes* asociado a la obesidad, al comparar la microbiota intestinal distal de ratones genéticamente obesos *ob*/*ob* (deficientes en leptina) con sus compañeros de camada delgados (*ob*/+ o +/+)[24]. El consumo de una dieta alta en grasa se asocia a una inflamación crónica sistémica de bajo grado y altera la microbiota intestinal. Mujico y col.[25] pusieron de manifiesto que en un modelo en ratones de obesidad inducida por una dieta alta en grasa (21,3% de carbohidratos, 18,4% de proteínas, 60,3% de grasas y 6,5% de fibra), la suplementación con 1500 mg/kg/día de un compuesto derivado del ácido oleico (BTSA-Biotecnologías Aplicadas S.L.) contrarrestó la disbiosis intestinal inducida por el alto contenido en grasa en la alimentación de los ratones de este grupo y se asoció a una reducción significativa del peso corporal. Estos resultados ponen de manifiesto el papel de determinados ácidos grasos de la alimentación en la prevención de la obesidad, un efecto mediado por cambios en la composición de la microbiota intestinal.

El impacto que ejerce el consumo de probióticos sobre diferentes parámetros relacionados con la obesidad se ha estudiado administrando diferentes cepas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en ratones. Se han llevado a cabo múltiples estudios con metodologías bastante similares que han mostrado reducción de peso corporal en ratones alimentados con dieta alta en grasa a los que se les administraba o suplementaba la dieta con una o varias cepas probióticas. En general estos ensayos mostraban también un menor peso del tejido graso de diversas localizaciones abdominales. Sin embargo, estos estudios han puesto de manifiesto diferencias entre especies y cepas en cuanto a su efecto anti-obesidad, así como en cuanto a los que parecen ser los mecanismos implicados en los hallazgos descritos. Estos mecanismos incluyen la modulación de la absorción y excreción de grasa, la reducción de la endotoxemia y la inflamación y la modulación de numerosos genes implicados en la lipogénesis hepática y/o la lipolisis de tejido adiposo. Sin ánimo de ser exhaustivos, éstos que se describen a continuación serían algunos de los trabajos publicados en modelos animales de obesidad.

En un estudio con ratones, el grupo al que se le administraron $1x10^8$ bacterias viables del probiótico *Lactobacillus sakei* NR28 durante 3 semanas mostró una reducción significativa en el peso corporal total, debido a que la ganancia de peso durante el experimento y el contenido de grasa epididimal fueron menores, en comparación con el grupo control de ratones alimentados únicamente con 10 mL de solución salina (PBS, *phosphate buffered saline*). A diferencia del grupo tratado con *L. sakei* NR28, al grupo al que se le administraron $1x10^8$ bacterias viables del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), mostró una reducción significativa solo en el contenido de grasa epididimal[26]. En otro estudio[27], en ratones con obesidad inducida por una dieta alta en grasas (45% de grasas, 35% de carbohidratos y 20% de proteínas), se evaluó el efecto de la administración durante 8 semanas de 10^8 y 10^9 unidades formadoras de colonias (ufc)/día de la cepa probiótica *Bifidobacterium breve* B-3 sobre el peso corporal y la microbiota intestinal. Tanto el grupo

de ratones al que se le administraron 10^8 ufc/día como al que se le administraron 10^9 ufc/día de la cepa *B. breve* B-3, mostraron una reducción significativa en el contenido de grasa epididimal de la yema de los dedos, en comparación con el grupo control de ratones que solo recibió la dieta alta en grasas con las mismas características que los grupos experimentales y utilizando como vehículo leche desnatada. Es de destacar que la cepa *B. breve* B-3 mejoró los niveles séricos de colesterol total, glucosa basal (en ayuno) e insulina, siendo los efectos dosis-dependientes. Por otro lado, la cepa *B. breve* B-3 aumentó tanto a nivel de colon como de la grasa epididimal la expresión de los genes de proglucagón y adiponectina, ambos relacionados con el metabolismo lipídico y la sensibilidad a la insulina. Finalmente, el contenido en bacterias del género *Bifidobacterium* en el contenido cecal y en heces aumentó significativamente con la administración de la cepa *B. breve* B-3, en comparación con el grupo control. Los resultados de este experimento ponen de manifiesto el potencial de la cepa estudiada *B. breve* B-3 en la reducción del riesgo de obesidad. Por otro lado, Bomhof y col.[28] observaron que el efecto beneficioso de la cepa probiótica *Bifidobacterium animalis* subespecie *lactis* BB-12 sobre el perfil metabólico de ratas obesas solo se manifestaba cuando se administraba conjuntamente con el prebiótico oligofructosa. Este resultado pone de manifiesto que la combinación en conjunto de un probiótico junto al prebiótico puede tener un papel potencial en el manejo de la obesidad.

Microbiota intestinal y obesidad: evidencia a partir de estudios con humanos

Varios estudios ecológicos han revelado la asociación entre la composición de la microbiota intestinal y el peso corporal y el importante papel desempeñado por la dieta en estas interacciones[29].

Estudios observacionales realizados en humanos establecen asociaciones entre determinados componentes de la microbiota intestinal, la obesidad y la regulación del peso corporal[30]. Se ha observado que los adultos humanos obesos sometidos a una dieta hipocalórica (tanto baja en grasa como baja en hidratos de carbono) muestran incrementos significativos en las proporciones fecales del *phylum Bacteroidetes* o subgrupos del género *Bacteroides*, junto a una paralela pérdida de peso, acompañados en algunos casos de reducciones del *phylum Firmicutes* o sus subgrupos (*Clostridium*)[30]. Asimismo, se ha asociado con la obesidad una menor proporción de *Bacteroidetes* y una mayor proporción de *Actinobacteria*, tras comparar la microbiota fecal de sujetos obesos y delgados en gemelos humanos[31].

El estudio multicéntrico EVASYON[32] (Desarrollo, implantación y evaluación de la eficacia de un programa terapéutico para adolescentes con sobrepeso/obesidad; www.estudioevasyon.com) ha probado que tanto una dieta baja en calorías como el aumento de la actividad física inducen cambios en la estructura de la microbiota intestinal de los adolescentes obesos, que se correlaciona con la reducción del *z-score* de la pérdida de peso y del IMC[33,34]. Las proporciones de *Clostridium histolyticum*, *Clostridium lituseburense* y *Eubacterium rectale*/*Clostridium coccoides* disminuyeron significativamente, mientras que las proporciones entre los grupos de *Bacteroides-Prevotella* aumentaron, después de la intervención en adolescentes que experimentaron una reducción significativa de peso (8,1% de su peso corporal) según se determinó por hibridación fluorescente *in situ* (FISH)[33]. Cuando se analizó la microbiota mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa en tiempo real, se detectó un aumento en el número de grupos *Bacteroides fragilis* y *Lactobacillus* y una reducción del grupo *Clostridium coccoides* y de los números de *Bifidobacterium longum* en aquellos adolescentes que experimentaron una importante pérdida de peso tras la intervención. La eficacia de las intervenciones sobre el estilo de vida en las pérdidas de peso parece estar influenciada por la composición de la microbiota de cada individuo. No obstante, también existen estudios contradictorios y no se conoce con certeza qué grupos bacterianos son los realmente relevantes en la obesidad[35].

Además de asociarse a cambios específicos de *phylum* y grupo en la microbiota, la obesidad también se correlaciona con una menor diversidad bacteriana. Las personas poco activas y obesas tienden a presentar una menor diversidad microbiana, que se acompaña de mayor adiposidad, resistencia a la insulina y un fenotipo inflamatorio más pronunciado comparado con aquellos individuos que presentan una alta diversidad microbiana[36,37].

Hasta la fecha, han sido pocos los estudios que se han llevado a cabo en humanos para examinar el efecto de los probióticos sobre el peso corporal. Comparado con los resultados mayoritariamente favorables de los estudios realizados con animales, los ensayos clínicos con humanos presentan poca evidencia para recomendar el papel de los probióticos contra la obesidad (Tabla III).

Conclusiones

Cada vez hay mayor evidencia sobre el hecho de que la microbiota intestinal puede ejercer un alto impacto sobre el estado nutricional y la salud del hospedador, a través de la modulación neuroinmunoendocrina. De hecho, actualmente se considera uno de los nuevos factores que participan en la etiología de la obesidad (Fig. 1). En modelos animales, las modificaciones de la microbiota intestinal inducidas por probióticos han conducido a una mejora del proceso inflamatorio en paralelo a la mejora de la sensibilidad a la insulina y disminución de la adiposidad, así como de marcadores de riesgo cardiovascular. No hay demasiados ensayos

Tabla III
*Estudios de intervención en humanos con probióticos y simbióticos y relación con ganancia de peso y biomarcadores metabólicos**

Probiótico y dosis	*Diseño del estudio*	*Número de sujetos*	*Duración*	*Medidas antropométricas y biomarcadores metabólicos*	*Referencia bibliográfica*
Yogur convencional (200 g/día) Yogur con *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (LG2055) (200 g/día)	Simple ciego, controlado con placebo, intra-sujeto	Sujetos con hipertrigliceridemia, n = 20 (15 hombres y 5 mujeres), edad: 51,1 ± 6,6 años, IMC: 24,2 ± 2,5 kg/m^2 (hombres) y 25,5 ± 1,4 kg/m^2 (mujeres) Periodo control: yogur sin LG2055 (4 semanas) Periodo de lavado (4 semanas) Periodo experimental: yogur con LG2055	4 semanas	Reducción de los niveles séricos postprandiales y en ayuno de ácidos grasos libres. No se observó ningún cambio en el peso corporal, IMC ni en la circunferencia de la cintura.	38
Yogur probiótico con *Lactobacillus gasseri* SBT2055 (200 g/día) vs. yogur convencional (200 g/día) (control)	Aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, multicéntrico	Sujetos sanos con sobrepeso: IMC entre 24.2-30.7 kg/m^2 y área de grasa visceral abdominal entre 81.2-178.5 cm^2 Grupo *L. gasseri* SBT2055: n = 43 (29 hombres y 14 mujeres), edad: 48.3 ± 9,3 años, IMC: 27.5 ± 1,7 kg/m^2, área de grasa visceral abdominal: 127.3 ± 24.6 cm^2 Grupo control: n = 44 (30 hombres y 14 mujeres), edad: 49,2 ± 9,1 años, IMC: 27,2 ± 1,7 kg/m^2, área de grasa visceral abdominal: 119,3 ± 21,4 cm^2	12 semanas	Reducción hasta un 4,6% de las áreas de grasa visceral abdominal y subcutánea; reducción del peso corporal total (1,4%), IMC (1,5%) y circunferencia de cintura (1,8%) y cadera (1,5%) en el grupo tratado con el yogur probiótico con *L. gasseri* SBT2055. Aumento de la adiponectina de alto peso molecular tanto en el grupo experimental como en el grupo control.	39
Yogur con 10 g de 1,39x10^9 ufc/mL de *Lactobacillus amylovorus* (LA) (110 g/día) Yogur con 10 g de 1,08x10^9 ufc/mL de *Lactobacillus fermentum* (LF) (110 g/día) Yogur convencional (control) (100 g/día)	Aleatorizado, doble ciego, cruzado	Sujetos sanos con sobrepeso, n = 28 (10 hombres y 18 mujeres), edad: 46,3 ± 2,4 años, IMC inicial: 31,6 ± 0,7 kg/m^2	43 días	Reducción de la masa grasa corporal después del tratamiento con *L. amylovorus* y *L. fermentum*, sin cambios en el peso corporal.	40
Leche fermentada con: Grupo 1: *Streptococcus thermophilus*, 10^7 ufc/mL y *Lactobacillus acidophilus*, 10^7 ufc/mL (~10^9 ufc/día) Grupo 2: *S. thermophilus*, 10^8 ufc/mL y *L. rhamnosus*, 10^8 ufc/mL (~10^{10} ufc/día) Grupo 3: *Enterococcus faecium*, 10^7 ufc/mL (~10^9 ufc/día) y *S. thermophilus*, 10^9 ufc/mL (~10^{11} ufc/día) Grupo 4: leche fermentada químicamente Grupo 5: dos cápsulas placebo	Aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, intervención en paralelo	Grupo 1, n = 16 (4 hombres y 12 mujeres), edad: 38,6 ± 8,40 años, IMC: 30,2 ± 2,80 kg/m^2 Grupo 2, n = 14 (4 hombres y 10 mujeres), edad: 37,9 ± 8,98 años, IMC: 30,2 ± 2,62 kg/m^2 Grupo 3, n = 16 (4 hombres y 12 mujeres), edad: 37,8 ± 8,00 años, IMC: 30,1 ± 2,40 kg/m^2 Grupo 4, n = 14 (5 hombres y 9 mujeres), edad: 39,4 ± 7,86 años, IMC: 30,0 ± 2,37 kg/m^2 Grupo 5, n = 10 (3 hombres y 7 mujeres), edad: 38,3 ± 10,12 años, IMC: 29,9 ± 3,48 kg/m^2	8 semanas	Reducción del colesterol-LDL y niveles aumentados de fibrinógeno en el grupo 3. Sin efectos sobre el peso corporal ni la masa grasa.	41

Tabla III (*cont.*)
*Estudios de intervención en humanos con probióticos y simbióticos y relación con ganancia de peso y biomarcadores metabólicos**

Probiótico y dosis	*Diseño del estudio*	*Número de sujetos*	*Duración*	*Medidas antropométricas y biomarcadores metabólicos*	*Referencia bibliográfica*
Probiótico (*L. acidophilus* NCFM, ~10^{10} ufc/mL/día) vs. SiO_2/lactosa (placebo)	Aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, intervención en paralelo	Hombres y mujeres sanos con intolerancia a la glucosa y/o diabetes mellitus. Grupo probiótico, n = 21, edad: 55 ± 15,2 años, IMC: 28,1 ± 7,0 kg/m^2 Grupo placebo, n = 24, edad: 60 ± 12,9 años, IMC: 28,7 ± 6,1 kg/m^2	4 semanas	Sensibilidad a la insulina conservada en el grupo probiótico y disminuida en el grupo placebo. Sin efectos en marcadores inflamatorios plasmáticos. La estimulación mediante lipopolisacárido (LPS) indujo inflamación sistémica en ambos grupos.	42
Yogur probiótico con *B. lactis* Bb12 y *L. acidophilus* La5 (~10^7 ufc) Yogur convencional (control) Sin yogur (control)	Aleatorizado, triple ciego, controlado, intervención en paralelo	Mujeres sanas, Grupo probiótico, n = 30, edad: 60,7 ± 7,0 años, IMC: 24,0 ± 2,4 kg/m^2 Grupo convencional, n = 30, edad: 58,5 ± 6,8 años, IMC: 23,0 ± 2,4 kg/m^2 Grupo sin yogur n = 30, edad: 59,3 ± 7,3 años, IMC: 23,8 ± 3,0 kg/m^2	6 semanas	Sin efecto sobre el peso corporal, IMC y niveles de lípidos séricos.	43
Yogur probiótico con *B. lactis* Bb12 y *L. acidophilus* La5 (10^6 ufc/g, ~10^8 ufc/día) vs. yogur convencional (control)	Aleatorizado, doble ciego, controlado, intervención en paralelo	Pacientes con diabetes tipo 2, Grupo probiótico, n = 30 (12 hombres y 18 mujeres), edad: 51,00 ± 7,32 años, IMC: 29,14 ± 4,30 kg/m^2 Grupo control, n = 30 (11 hombres y 19 mujeres), edad: 50,87 ± 7,68 años, IMC: 28,95 ± 2,65 kg/m^2	6 semanas	Reducción de la glucosa basal (en ayuno) y hemoglobina A1c. Incremento de la actividad de la superóxido dismutasa y glutatión peroxidasa de los eritrocitos y del estado antioxidante total; disminución de la concentración sérica de malondialdehído. Sin efectos sobre la insulina y la actividad catalasa de los eritrocitos.	44
Yogur probiótico con *L. casei* Shirota (10^8 ufc/mL, ~10^{10} ufc/día) Tratamiendo estándar con yogur/no placebo Control sano con yogur/no placebo	Aleatorizado, controlado, intervención en paralelo	Pacientes con síndrome metabólico, grupo probiótico, n = 13, edad: 51,5 ± 11,4 años, IMC: 35,4 ± 5,3 kg/m^2 Pacientes con síndrome metabólico, grupo tratamiento estándar, n = 15, edad: 54,5 ± 8,9 años, IMC: 31,6 ± 3,6 kg/m^2 Grupo control sano, n = 10, edad: 40,6 ± 15,2 años, IMC: 25,2 ± 2,6 kg/m^2	3 meses	Sin efectos en ninguno de los parámetros estudiados.	45
Simbiótico con *L. acidophilus* y *B. bifidum*: 10^8 ufc/mL, ~10^{10} ufc/día; fructooligosacáridos: 2 g/día y placebo	Aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, intervención en paralelo	Mujeres con diabetes tipo 2 Grupo simbiótico: n = 9, edad: 55,47 ± 2,0 años, IMC: 27,70 ± 0,78 kg/m^2 Grupo placebo, n = 9, edad: 56,89 ± 1,7 años, IMC: 28,21 ± 0,85 kg/m^2	30 días	Incremento del colesterol-HDL sérico y reducción de la glicemia basal (en ayuno) en el grupo simbiótico.	46

*La edad de los sujetos y el IMC se reproducen como media ± desviación estándar. A no ser que se especifique lo contrario, los sujetos del estudio estaban clínicamente sanos.

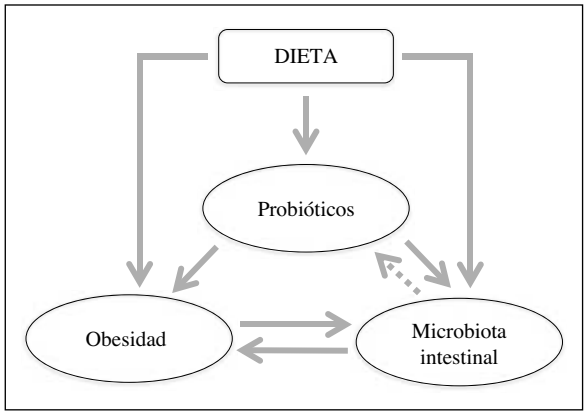

Fig. 1.—Resumen esquemático de las relaciones entre dieta, obesidad y microbiota intestinal.

realizados en humanos con el fin de investigar si la administración de probióticos ejerce efectos protectores sobre las disfunciones metabólicas e inmunes asociadas con la obesidad. Sin embargo, los hallazgos indican que la modulación de la composición de la microbiota intestinal podría ser de utilidad como estrategia de intervención para tratar y prevenir la obesidad, así como los trastornos metabólicos asociados. Es necesario continuar avanzando en la identificación de las bacterias que favorezcan o puedan prevenir la obesidad y su evaluación debe realizarse mediante estudios de intervención en humanos. En este sentido, habrá que tener presentes una serie de factores que pueden ser claves a la hora de interpretar los resultados y llegar a conclusiones válidas, como son: 1) la cepa o conjunto de cepas de probióticos, 2) la dosis de administración, 3) el tiempo durante el que se administra el/los probiótico/s, 4) las características físicas de los sujetos a los que se les realiza la administración (edad, género, genética, etc.), 5) las condiciones nutricionales de los sujetos que lo reciban (incluyendo IMC, composición corporal, actividad física, patologías), y 6) el número de sujetos (quizá el factor más controvertido hasta el momento), ya que la mayoría de los estudios realizados adolece de una n lo suficientemente alta y esto limita la potencia del estudio o el carácter confirmativo de los resultados. Para discutir sobre las conclusiones alcanzadas en los distintos estudios será relevante tener en cuenta la bondad de los estudios y el tipo de revisión por pares a que se hayan sometido para su publicación.

Referencias

1. Food and Agriculture Organization (FAO) and World Health Organization Expert Consultation (WHO). Probiotics in food. Health and nutritional properties and guidelines for evaluation. En: FAO Food and Nutrition Paper 85, 2006, ISBN 92-5-105513-0. Disponible en: ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf.
2. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science* 1965; 147(3659):747-748.
3. Bourlioux P, Koletzko B, Guarner F, Braesco V. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host. *Am J Clin Nutr* 2003; 78(4):675-683.
4. Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005; 307(5717):1915-1920.
5. Foster JA, McVey Neufeld KA. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci* 2013; 36(5):305-312.
6. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010; 464:59-65.
7. Guarner F, Malagelada JR. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003; 361(9356):512-519.
8. Chassard C, Lacroix C. Carbohydrates and the human gut microbiota. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2013; 16(4):453-460.
9. Tremaroli V, Bäckhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature* 2012; 489(7415):242-249.
10. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473(7346):174-180.
11. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen YY, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011; 334(6052):105-108.
12. de Vos WM, de Vos EA. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutr Rev* 2012; 70(Suppl 1):S45-56.
13. Saulnier DM, Ringel Y, Heyman MB, Foster JA, Bercik P, Shulman RJ, et al. The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut Microbes* 2013; 4(1):17-27.
14. Marcos A, Wärnberg J, Nova E, Gómez-Martínez S, Alvarez A, Alvarez R, et al. The effect of milk fermented by yogurt cultures plus Lactobacillus casei DN-114001 on the immune response of subjects under academic examination stress. *Eur J Nutr* 2004; 43(6):381-389.
15. Nova E, Toro O, Varela P, López-Vidriero I, Morandé G, Marcos A. Effects of a nutritional intervention with yogurt on lymphocyte subsets and cytokine production capacity in anorexia nervosa patients. *Eur J Nutr* 2006; 45(4):225-233.
16. Solis B, Nova E, Gómez-Martínez S, Samartín S, Mouane N, Lemtouni A, et al. The effect of fermented milk on interferon production in malnourished children and in anorexia nervosa patients undergoing nutritional care. *Eur J Clin Nutr* 2002; 56(Suppl 4):S27-33.
17. Guarner F, Requena T, Marcos A. Declaraciones consensuadas del Workshop: "Probióticos y Salud: Evidencia Científica". *Nutr Hosp* 2010; 25(5):700-704.
18. World Health Organization (2000). Obesity: Preventing and Managing the Global Epidemic. En: Technical Report Series. World Health Organization. Geneva.
19. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al. Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 2014; 384(9945):766-781.
20. Shen J, Obin MS, Zhao L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. *Mol Aspects Med* 2013; 34(1):39-58.
21. Finucane MM, Sharpton TJ, Laurent TJ, Pollard KS. A taxonomic signature of obesity in the microbiome? Getting to the guts of the matter. *PLoS One* 2014 Jan 8;9(1):e84689. doi: 10.1371/journal.pone.0084689.
22. Walters WA, Xu Z, Knight R. Meta-analyses of human gut microbes associated with obesity and IBD. *FEBS Lett* 2014; 588(22):4223-4233.
23. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper LV, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(44):15718-15723.
24. Ley RE, Bäckhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(31):11070-11075.

25. Mujico JR, Baccan GC, Gheorge A, Díaz LE, Marcos A. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. *Br J Nutr* 2013; 110(4):711-720.
26. Ji YS, Kim HN, Park HJ, Lee JE, Yeo SY, Yang JS, et al. Modulation of the murine microbiome with a concomitant anti-obesity effect by Lactobacillus rhamnosus GG and Lactobacillus sakei NR28. *Benef Microbes* 2012; 3(1):13-22.
27. Kondo S, Xiao JZ, Satoh T, Odamaki T, Takahashi S, Sugahara H, et al. Antiobesity effects of Bifidobacterium breve strain B-3 supplementation in a mouse model with high-fat diet-induced obesity. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74(8):1656-1661.
28. Bomhof MR, Saha DC, Reid DT, Paul HA, Reimer RA. Combined effects of oligofructose and Bifidobacterium animalis on gut microbiota and glycemia in obese rats. *Obesity* (Silver Spring) 2014; 22(3):763-771.
29. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006; 444:1022-1023.
30. Sanz Y, Rastmanesh R, Agostoni C. Understanding the role of gut microbes and probiotics in obesity: how far are we? *Pharmacol Res* 2013; 69(1):144-155.
31. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunenko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* 2009; 457(7228):480-484.
32. Marqués M, Moleres A, Rendo-Urteaga T, Gómez-Martínez S, Zapatera B, Romero P, et al. Design of the nutritional therapy for overweight and obese Spanish adolescents conducted by registered dieticians; the EVASYON study. *Nutr Hosp* 2012; 27(1):165-176.
33. Nadal I, Santacruz A, Marcos A, Wärnberg J, Garagorri JM, Moreno LA, et al. Shifts in clostridia, bacteroides and immunoglobulin-coating fecal bacteria associated with weight loss in obese adolescents. *Int J Obes* (Lond) 2009; 33(7):758-767.
34. Santacruz A, Marcos A, Wärnberg J, Martí A, Martin-Matillas M, Campoy C, et al. Interplay between weight loss and gut microbiota composition in overweight adolescents. *Obesity* (Silver Spring) 2009. 17(10):1906-1915.
35. Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor RB, Sherman PM, et al. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe* 2012; 12(5):611-622.
36. Clarke SF, Murphy EF, O'Sullivan O, Lucey AJ, Humphreys M, Hogan A, et al. Exercise and associated dietary extremes impact on gut microbial diversity. *Gut* 2014; 63(12):1913-1920.
37. Gootteland M. El papel de la microbiota intestinal en el desarrollo de la obesidad y de la diabetes de tipo-2. *Rev Chil Endocrinol Diabetes* 2013; 6(4):155-162.
38. Ogawa A, Kadooka Y, Kato K, Shirouchi B, Sato M. Lactobacillus gasseri SBT2055 reduces postprandial and fasting serum non-esterified fatty acid levels in Japanese hypertriacylglycerolemic subjects. *Lipids Health Dis* 2014; 13:36.
39. Kadooka Y, Sato M, Imaizumi K, Ogawa A, Ikuyama K, Akay Y, et al. Regulation of abdominal adiposity by probiotics (Lactobacillus gasseri SBT2055) in adults with obese tendencies in a randomized controlled trial. *Eur J Clin Nutr* 2010; 64(6):636-643.
40. Omar JM, Chan YM, Jones ML, Prakash S, Jones PJH. Lactobacillus fermentum and Lactobacillus amylovorus as probiotics alter body adiposity and gut microflora in healthy persons. *J Func Foods* 2013:116-123.
41. Agerholm-Larsen L, Raben A, Haulrik N, Hansen AS, Manders M, Astrup A. Effect of 8 week intake of probiotic milk products on risk factors for cardiovascular diseases. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54(4):288-297.
42. Andreasen AS, Larsen N, Pedersen-Skovsgaard T, Berg RM, Møller K, Svendsen KD, et al. Effects of Lactobacillus acidophilus NCFM on insulin sensitivity and the systemic inflammatory response in human subjects. *Br J Nutr* 2010; 104(12):1831-1838.
43. Sadrzadeh-Yeganeh H, Elmadfa I, Djazayery A, Jalali M, Heshmat R, Chamary M. The effects of probiotic and conventional yoghurt on lipid profile in women. *Br J Nutr* 2010; 103(12):1778-1783.
44. Ejtahed HS, Mohtadi-Nia J, Homayouni-Rad A, Niafar M, Asghari-Jafarabadi M, Mofid V. Probiotic yogurt improves antioxidant status in type 2 diabetic patients. *Nutrition* 2012; 28(5):539-543.
45. Leber B, Tripolt NJ, Blattl D, Eder M, Wascher TC, Pieber TR, et al. The influence of probiotic supplementation on gut permeability in patients with metabolic syndrome: an open label, randomized pilot study. *Eur J Clin Nutr* 2012; 66(10):1110-1115.
46. Moroti C, Souza Magri LF, de Rezende Costa M, Cavallini DC, Sivieri K. Effect of the consumption of a new symbiotic shake on glycemia and cholesterol levels in elderly people with type 2 diabetes mellitus. *Lipids Health Dis* 2012; 11:29.

VI Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica

Oviedo 5 y 6 de febrero de 2015

MESA REDONDA: APLICACIONES CLÍNICAS DE LOS PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS EN ATENCIÓN PRIMARIA

VI Workshop Probiotics, Prebiotics and Health: Scientific Evidence

Oviedo, 5 and 6 February, 2015

ROUND TABLE: CLINICAL APLICATIONS OF PROBIOTICS AND PREBIOTICS IN HEALTHCARE

Moderador/Moderator: Francisco Guarner

Nutrición Hospitalaria

Nutr Hosp. 2015;31(Supl. 1):21-25
ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ
S.V.R. 318

Aplicaciones en Gastroenterología

Juan J. Díaz Martín[1] y David González Jiménez[2]

[1]Sección de Gastroenterología y Nutrición pediátrica. AGC de Pediatría, HUCA, Oviedo, Asturias. [2]Servicio de Pediatría. Hospital Carmen y Severo Ochoa. Cangas del Narcea, Asturias. España.

Resumen

En los últimos años se ha multiplicado de forma exponencial el número de publicaciones sobre las aplicaciones de los probióticos. Sin embargo, éstas suelen ser heterogéneas, utilizar cepas y dosis muy diversas, así como distintos parámetros de medida, lo que dificulta la generalización de sus resultados.

En el momento actual existe un grado de evidencia alto sobre el papel de determinados probióticos en las siguientes entidades: tratamiento diarrea infecciosa aguda, prevención diarrea asociada a antibióticos, síndrome de intestino irritable, prevención de enterocolitis necrotizante y en enfermedad inflamatoria intestinal (pouchitis).

En este artículo se presenta una revisión actualizada de la literatura científica sobre el papel potencial del consumo de probióticos en diversas patologías gastrointestinales tanto en pacientes pediátricos como en adultos.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):21-25)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8703

Palabras clave: *Probióticos en gastroenterología. Diarrea infecciosa. Diarrea asociada a antibióticos. Enterocolitis necrotizante.*

USES IN GASTROENTEROLOGY

Abstract

Nowadays, publications on probiotics have increased exponentially. However they usually are heterogeneous, use diverse strains and doses, and different outcomes, making it difficult to generalize their results.

On the basis of the currently available literature, the use of probiotics is supported in the following diseases: acute diarrhea, antibiotic-associated diarrhea, irritable bowel syndrome, necrotizing enterocolitis and inflammatory bowel disease (particularly pouchitis).

This paper provides an update of the potential role of probiotics in gastrointestinal diseases, in both pediatric and adult patients.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):21-25)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8703

Key words: *Probiotics in gastroenterology. Infectious diarrhea. Antibiotic associated diarrhea. Necrotizing enterocolitis.*

Introduccion

En los últimos años los clínicos han pasado de estar interesados por saber qué es un probiótico, a estar interesados en qué cepa específica de probiótico puede ser útil para tratar una determinada patología. Teniendo en cuenta que el intestino humano es el origen de estos microorganismos, parece lógico pensar que gran número de las indicaciones para su uso deberían localizarse precisamente en el aparato digestivo.

En la última década, el número de publicaciones sobre el tema ha crecido de forma exponencial. Uno de los principales problemas a los que se enfrenta el clínico a la hora de valorar críticamente estas publicaciones es la gran heterogeneidad de las mismas: diferentes cepas, diferentes dosis, diferente tiempo de tratamiento, etc. La aparición en los últimos años de meta-análisis y de revisiones sistemáticas de la literatura, permite clarificar en cierta medida este panorama.

En el momento actual existe un grado de evidencia alto sobre el papel de determinados probióticos en las siguientes entidades: tratamiento diarrea infecciosa aguda, prevención diarrea asociada a antibióticos, trastornos intestinales funcionales, prevención de enterocolitis necrotizante y en la enfermedad inflamatoria intestinal (pouchitis) (Tabla I).

A continuación se describen las principales aplicaciones del empleo de los probióticos en gastroenterología tanto en la edad adulta como en la infancia.

Diarrea aguda

Tratamiento de la diarrea aguda

En el tratamiento de la diarrea aguda de causa infecciosa es donde los probióticos han demostrado una evidencia de nivel más alto. A pesar de la gran variabilidad de los estudios, las revisiones sistemáticas confirman el efecto beneficioso de los probióticos en

Correspondencia: Juan J. Díaz Martín
E-mail: juanjo.diazmartin@gmail.com

Tabla I

Principales aplicaciones de los probióticos en gastroenterología con evidencia al menos 1b. Modificado de la Guía práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología[7]

Trastorno	*Cepa probiótico*	*Dosis*	*Edad*
Tratamiento diarrea aguda infecciosa	*Lactobacillus rhamnosus* GG	$10^{10\text{-}11}$ ufc, 2 veces por día	Pediátrico
	Saccharomyces boulardii, cepa de S. cerevisiae	10^{9} 2-6 veces por día	Ambos
	Enterococcus faecium LAB SF68	10^{8} ufc, 3 veces al día	Adultos
Prevención de la diarrea asociada a antibióticos	*S. boulardii*, cepa de S. cerevisiae	10^{9} 2-6 veces por día	Ambos
	L. rhamnosus GG	10^{10} ufc, 1 o 2 veces al día	Ambos
	Bifidobacterium lactis Bb12 + *Streptococcus thermophilus*	$10^{7} + 10^{6}$ ufc/g de fórmula	Pediátrico
	L. rhamnosus (cepas E/N, Oxy y Pen)	2×10^{10}, 2 veces al día	Pediátrico
	E. faecium LAB SF68	10^{8} ufc, 2 veces al día	Adultos
	L. casei DN-114 001 en leche fermentada	10^{10} ufc, 2 veces al día	Adultos
	L. acidophilus CL1285 + L. casei LBC80R	5×10^{10} ufc, 1 o 2 veces al día	Adultos
Prevención de la diarrea nosocomial	*L. rhamnosus* GG	$10^{10\text{-}11}$ ufc, 2 veces por día	Pediátrico
	B. lactis Bb12 + *S. thermophiles*	$10^{8} + 10^{7}$ ufc/g de fórmula	Pediátrico
Prevención de la diarrea por C. difficile	*S. boulardii*, cepa de *S. cerevisiae*	2–3 x 10^{9} al día durante 28 días	Adultos
	L. acidophilus CL1285 + *L. casei* LBC80R	5×10^{9} ufc, 1 o 2 veces al día	Adultos
	L. acidophilus + *B. Bifidum*	2×10^{10} ufc cada cepa, al día	Adultos
	L. casei DN-114 001 en leche fermentada	10^{10} ufc, 2 veces al día	Adultos
Terapia coadyuvante para la erradicación de H. pylori	*L. casei* DN-114 001 en leche fermentada	10^{10} ufc, 2 veces al día	Pediátrico
	Lactobacillus acidophilus.	5 x 10^{9} al día	Adultos
	L. rhamnosus GG	6×10^{9} ufc, 2 veces al día	Adultos
	S. boulardii, cepa de *S. cerevisiae*	500 mg–1 g por día	Adultos
	L. reuteri ATCC 55730	10^{8} ufc/día	Adultos
Síndrome de intestino irritable	VSL#3	1 al dia < 11 años resto 2 al dia	Pediátrico
	Lactobacillus plantarum DSM 9843	5 x10^{7} al día	Adultos
	Bifidobacterium infantis 35624	10^{8} ufc, 1 vez al día	Adultos
	B. animalis DN-173 010 en leche fermentada	10^{10} ufc 2 veces al día	Adultos
	L. rhamnosus GG + *L. rhamnosus* LC705 + *B. breve* Bb99 + *Propionibacterium freudenreichii ssp.shermanii*	10^{10} ufc, 1 vez al día	Adultos
	B. longum 101 + *L. acidophilus* 102 + *Lactococcus lactis* 103 + *S. thermophilus* 104	10^{10} ufc, 1 vez al día	Adultos
Prevención de la enterocolitis necrotizante	*B. bifidum* NCDO 1453 + *L. acidophilus* NCDO 1748	10^{9} ufc cada cepa, 2 veces al día	Pediátrico
	Infloran®: *L. acidophilus* + *B. infantis*	10^{8} ufc cada uno, 2 al día	Pediátrico
	B. infantis + *B. bifidum* + *S. thermophilus*	10^{9} ufc cada uno, 1 vez al día	Pediátrico
Tratamiento de la colitis ulcerosa	Inducción de la remisión :VSL#3	4 a 9 x 10^{11} ufc, 2 veces al día	Ambos
	Prevención y mantenimiento en pouchitis. VSL#3	4 a 9 x 10^{11} ufc, 2 veces al día	Adultos
	Mantenimiento de la remisión: *E. coli* Nissle 1917	5×10^{10} 2 veces al día	Adultos

el tratamiento de esta entidad. Los niveles de evidencia mayores se obtienen sobre todo en el tratamiento de las gastroenteritis víricas, si se comparan con las de etiología bacteriana o parasitaria. Por otro lado, es interesante destacar que los efectos beneficiosos son más notables cuanto más precozmente se administre el probiótico.

En un reciente meta-análisis[1] que analizó 63 estudios con más de 8000 pacientes, la mayoría de ellos en edad pediátrica, demostró cómo el uso de probióticos acorta la diarrea casi 25 horas (IC 95% 15,9-36,6) y disminuye el número de deposiciones al segundo día de tratamiento. Los principales probióticos que han demostrado eficacia son: *Lactobacillus rhamnosus GG*[2]*, Saccharomyces boulardii, cepa de S. cerevisiae*[3] *y L. reuteri ATCC 55730.*

Basándose en los datos anteriores, las principales guías de práctica clínica y protocolos[4,5], contemplan el uso de probióticos junto con las soluciones de rehidratación oral, en el tratamiento de la diarrea aguda infecciosa.

Diarrea por Clostridium difficile

La infección por *Clostridium difficile* es la principal causa de infección nosocomial en nuestro medio, lo que supone un incremento de la morbimortalidad de los pacientes y del consiguiente gasto sanitario[6].

La microbiota intestinal normal inhibe el crecimiento de *C. difficile* y la liberación de sus toxinas. Los probióticos podrían actuar tanto como medida profiláctica como terapéutica. Diferentes meta-análisis han demostrado que el empleo de probióticos puede ser eficaz en la prevención de diarrea por *C. difficile* tal como recoge la guía clínica de la organización mundial de gastroenterología[7]. Una reciente revisión Cochrane[8] analizó 23 ensayos con 4213 participantes, niños y adultos y demostró que la administración de probióticos en pacientes que recibían antibióticos redujo el riesgo de desarrollar diarrea asociada a infección por *C. difficile* en un 64%. Los probióticos con mayor eficacia fueron: *S. boulardii, cepa de S. cerevisiae*[9,10] y mezclas de *Lactobacillus: L. acidophilus CL1285 + L. casei LBC80R*[11] y *L. acidophilus + B. Bifidum*[12].

Diarrea asociada a antibióticos

Existe una fuerte evidencia del efecto protector de los probióticos en cuanto a la prevención de la diarrea asociada a antibióticos, tanto en niños como en adultos.

La revisión Cochrane de Johnston y cols[13] concluye que el uso de *Lactobacillus GG*[14] o *Saccharomyces boulardii*[15] reducen el riesgo de diarrea asociada a antibióticos en niños. Además de estas cepas comentadas, en adultos otros probióticos como *E. faecium LAB SF68, L. casei DN-114 001, Bacillus clausii,* y mezclas como *L. acidophilus CL1285 + L. casei LBC80R* también han demostrado ser eficaces[7].

Se han descrito algunos efectos adversos, como fungemia asociada a *S. boulardii* o bacteriemia con ciertas cepas de probióticos. Estos efectos secundarios graves han sido descritos generalmente en pacientes críticos con inmunosupresión severa o en pacientes portadores de catéteres centrales.

En el momento actual, no existen estudios concluyentes para recomendar de manera sistemática el empleo conjunto de probióticos y antibióticos, por lo que su uso debe ser individualizado según las características del paciente y el tipo de antibiótico. Su administración debe realizarse al principio del tratamiento y no cuando se ha desencadenado el cuadro diarreico, por carecer entonces de utilidad.

Síndrome de Intestino Irritable

El síndrome de Intestino Irritable (SII) es un trastorno gastrointestinal funcional frecuente que afecta entre el 5 y 20% de la población general, principalmente a mujeres jóvenes y niños[16]. Aunque su fisiopatología no es totalmente conocida, existen datos que apoyan la importancia de la microbiota intestinal en su desarrollo, habiéndose encontrado diferencias en su composición al comparar individuos sanos con pacientes con SII.

Un reciente meta-ánalisis[17] en el que se analizaron 43 ensayos y un total de 3452 pacientes, concluyó que el uso de probióticos disminuye la persistencia de síntomas del SII en un 21%, con efectos beneficiosos sobre el dolor y distensión abdominales y las flatulencias. El *Lactobacillus plantarum DSM 9843* y combinaciones de *Bifidobacterium y Lactobacillus* fueron las que mostraron evidencias de grado más alto[18].

En pacientes pediátricos varios ensayos clínicos han obtenido buenos resultados con la combinación de probióticos *VSL#3* tras 5-6 meses de tratamiento[19]. Otras cepas que también han demostrado algún efecto beneficioso en el tratamiento del SII fueron el *E. coli* DSM 17252 y el *Lactobacillus* GG[20].

En resumen podemos afirmar que los estudios han demostrado ganancias terapéuticas al usar probióticos en comparación con placebo. Sin embargo, dada la heterogeneidad de los microorganismos estudiados, la duración y características de los pacientes implicados, el uso generalizado de probióticos en esta entidad sigue siendo controvertido.

Infeccion por *Helicobacter pylori*

La resistencia a los antibióticos y la falta de cumplimiento terapéutico son dos de las principales causas de fracaso de erradicación en los pacientes con infección por Helicobacter pylori[21].

El uso de probióticos como tratamiento coadyuvante podría disminuir los efectos secundarios del tratamien-

to, así como mejorar las tasas de erradicación. Los probióticos actuarían por mecanismos inmunológicos y no inmunológicos, produciendo sustancias antimicrobianas, compitiendo por la adhesión a la célula intestinal y mejorando la función de la barrera mucosa gástrica.

El reciente meta-ánalisis de Dang y cols[22] observó cómo las tasas de erradicación eran superiores en los pacientes que recibían además del tratamiento antibiótico los siguientes probióticos: *Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus casei DN-114001, Lactobacillus gasseri y Bifidobacterium infantis 2036*. Solamente en el caso del primero se encontraron varios ensayos publicados, mientras que en el resto, los resultados estaban avalados por una única publicación. Por otra parte, el efecto de los probióticos era mayor en aquellos grupos de pacientes que tenían tasas de erradicación más bajas, por tanto los autores consideran, que pueden ser de especial utilidad en aquellos entornos de alta resistencia a antibióticos y donde las tasas de erradicación habituales están por debajo del 50%.

También se ha postulado el uso de probióticos para disminuir los efectos secundarios del tratamiento antibiótico. Sin embargo el resultado de las revisiones no es concluyente[23-25].

Enfermedad inflamatoria intestinal

Colitis ulcerosa

Existen evidencias de alto grado que muestra la utilidad de los probióticos, en concreto la mezcla *VSL#3,* para la prevención y el mantenimiento de la remisión en pacientes con pouchitis. Otras formulaciones basadas en *Lactobacillus* no parecen tener la misma eficacia[26]. En el momento actual se puede recomendar a pacientes con pouchitis en remisión como terapia de mantenimiento o como tratamiento en aquellos con actividad leve.

La adición de probióticos al tratamiento convencional, también puede ser útil para la inducción de la remisión en pacientes con brote leve o moderado de Colitis Ulcerosa. Una vez más el probiótico mas estudiado tanto en niños[27] como en adultos[28] es el *VSL#3*.

La cepa *E. coli Nissle 1917* y también *VSL#3* han demostrado ser tan efectivas como la mesalazina en el mantenimiento de la remisión en pacientes con Colitis Ulcerosa[29]. Por lo tanto, pueden administrarse como tratamiento de primera línea en aquellos pacientes con alergia o intolerancia a los salicilatos o como tratamiento coadyuvante al tratamiento convencional con el objetivo de prolongar la duración de la remisión[30].

Enfermedad de Crohn

Los ensayos clínicos sobre el empleo de probióticos en la enfermedad de Crohn han mostrado resultados dispares[31]. Por este motivo en el momento actual no se recomienda el uso de probióticos en esta entidad. A pesar de todo, estudios prometedores con simbióticos que incluyen distintos tipos de bifidobacaterias sugieren que los probióticos podrían tener un rol tanto para la inducción de la remisión como para el tratamiento de mantenimiento[32,33].

Enterocolitis necrotizante

El menor riesgo de enterocolitis necrotizante en los neonatos alimentados con leche materna y las peculiaridades de la microbiota colónica del recién nacido prematuro, sugieren que la administración de probióticos, podría ser una alternativa para su prevención y tratamiento.

La mayoría de los estudios que han demostrado mayor eficacia utilizan una combinación de varias cepas lactobacilos y bifidobacterias[34]. La suplementación con probióticos en prematuros menores de 34 semanas y 1.500 gramos disminuye la incidencia de enterocolitis necrotizante establecida alrededor de un 30%. Por ello, la Cochrane Neonatal Review Group, apoya un cambio en la práctica clínica mediante el uso sistemático de probióticos en prematuros, excepto en aquellos de extremado bajo peso para la edad gestacional (< 1.000 g), debido a la falta de datos específicos en este grupo de alto riesgo[35].

Todos los estudios recomiendan un inicio temprano de la suplementación con probióticos, para un establecimiento rápido de la microbiota intestinal. La mayoría de los ensayos clínicos comienzan la suplementación cuando el neonato inicia la nutrición enteral. La suplementación debe ser continuada hasta alcanzar una edad gestacional corregida de 36-37 semanas o hasta el alta, ya que la relación entre la incidencia de enterocolitis necrotizante y edad gestacional es inversa[36].

En resumen, podemos concluir que gracias a la ingente labor investigadora desarrollada en los últimos años, disponemos de evidencias suficientes que nos indican la utilidad de determinados probióticos en el tratamiento de numerosas enfermedades digestivas. No obstante, la investigación continúa y es esperable que en los años venideros nuevas cepas de probióticos sean usadas para tratar otras enfermedades del aparato digestivo. La inclusión de los probióticos en las diferentes guías de práctica clínica como tratamiento de las diferentes enfermedades, contribuirá a un incremento del uso de los mismos por parte del clínico.

Referencias

1. Allen SJ , Martinez EG , Gregorio GV, Dans LF. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea . Cochrane Database Syst Rev 2010: (11): CD00304 .
2. Szajewska H, Ruszczyński M, Gieruszczak-Białek D. Lactobacillus GG for treating acute diarrhea in children. A meta-analysis of randomized controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:177–84.

3. Szajewska H, Skorka A, Dylag M. Meta-analysis: Saccharomyces boulardii for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:257–64.
4. Guarino A, Ashkenazi S, Gendrel D, Lo Vecchio A, Shamir R, Szajewska H. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management of acute gastroenteritis in children in Europe: update 2014. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014 ;59:132-52. See comment in PubMed Commons below
5. Pies´cik-Lech M, Shamir R, Guarino A, Szajewska H. Review Article: The Management of Acute Gastroenteritis in Children. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 37: 289-303.
6. Vonberg RP, Reichardt C, Behnke M, Schwab F, Zindler S, Gastmeier P. Costs of nosocomial Clostridium difficile-associated diarrhoea. *J Hosp Infect* 2008;70:15–20.
7. WGO. Probióticos y prebióticos. En: Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología. Octubre 2011. www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html.
8. Goldenberg JZ, Ma SS, Saxton JD, Martzen MR, Vandvik PO, Thorlund K, et al. Probiotics for the prevention of Clostridium difficile-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database Syst Rev.* 2013 May 31;5:CD006095.
9. McFarland LV, Surawicz CM, Greenberg RN, Fekety R, Elmer GW, Moyer KA, et al. A randomized placebo-controlled trial of Saccharomyces boulardii in combination with standard antibiotics for Clostridium difficile disease. *JAMA* 1994;271:1913–8.
10. Surawicz CM, McFarland LV, Greenberg RN, Rubin M, Fekety R, Mulligan ME, et al. The search for a better treatment for recurrent Clostridium difficile disease: use of high-dose vancomycin combined with Saccharomyces boulardii. *Clin Infect Dis* 2000;31:1012–7.
11. Gao XW, Mubasher M, Fang CY, Reifer C, Miller LE. Dose–response efficacy of a proprietary probiotic formula of Lactobacillus acidophilus CL1285 and Lactobacillus casei LBC80R for antibiotic-associated diarrhea and Clostridium difficile-associated diarrhea prophylaxis in adult patients. *Am J Gastroenterol* 2010;105:1636–41.
12. Plummer S, Weaver MA, Harris JC, Dee P, Hunter J. Clostridium difficile pilot study: effects of probiotic supplementation on the incidence of Clostridium difficile diarrhoea. *Int Microbiol* 2004;7:59–62.
13. Johnston B, Goldenberg J, Vandvik P, Sun X, Guyatt G. Probióticos para la prevención de la diarrea asociada con antibióticos en niños. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011 Issue 11. Art. No.: CD004827. DOI: 10.1002/14651858. CD004827.
14. Vanderhoof JA, Whitney DB, Antonson DL, Hanner TL, Lupo JV, Young RJ. Lactobacillus GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children. *J Pediatr* 1999;135:564–8.
15. Kotowska M, Albrecht P, Szajewska H. Saccharomyces boulardii in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;21:583–90.
16. Lovell RM , Ford AC. Global prevalence of, and risk factors for, irritable bowel syndrome: A meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012 ; 10 :712 – 21 .
17. Ford AC, Quigley EM, Lacy BE, Lembo AJ, Saito YA, Schiller LR. Efficacy of Prebiotics, Probiotics, and Synbiotics in Irritable Bowel Syndrome and Chronic Idiopathic Constipation: Systematic Review and Meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014 ;109:1547-1561.
18. Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, et al. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* 2010;59:325–32.
19. Guandalini S, Magazzù G, Cucchiara S, Gopalan S, Romano C, Canani RB et al. VSL#3 improves symptoms in children with irritable bowel syndrome: a multicentre, randomized, placebocontrolled, double-blinded, cross-over study. *JPGN* 2010; 51:24-30.
20. Sandhu BK, Paul SP. Irritable bowel syndrome in children: pathogenesis, diagnosis and evidence-based treatment. *World J Gastroenterol* 2014 28;20:6013-23.
21. Yogeswaran K, Chen G, Cohen L, Cooper MA, Yong E, Hsieh E, et al. How well is Helicobacter pylori treated in usual practice? *Can J Gastroenterol* 2011 ;25:543-6.
22. Dang Y, Reinhardt JD, Zhou X, Zhang G. The Effect of Probiotics Supplementation on Helicobacter pylori Eradication Rates and Side Effects during Eradication Therapy: A Meta-Analysis. *PLoS One* 2014 Nov 3;9.
23. Tong JL, Ran ZH, Shen J, Zhang CX, Xiao SD. Meta-analysis: the effect of supplementation with probiotics on eradication rates and adverse events during Helicobacter pylori eradication therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 2007 ;25:155–68.
24. Wang ZH, Gao QY, Fang JY. Meta-analysis of the efficacy and safety of Lactobacillus-containing and Bifidobacterium-containning probiotic compound preparation in Helicobacter pylori eradication therapy. *J Clin Gastroenterol* 2013; 47: 25–32.
25. Szajewska H, Horvath A, Piwowarczyk A. Meta-analysis: the effects of Saccharomyces boulardii supplementation on Helicobacter pylori eradication rates and side effects during treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2010; 32: 1069–79.
26. Holubar SD, Cima RR, Sandborn WJ, Pardi DS. Treatment and prevention of pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2010 Jun 16; (6):CD001176.
27. Miele E, Pascarella F, Giannetti E, Quaglietta L, Baldassano RN, Staiano A. Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 2009; 104: 437-43.
28. Jonkers D, Penders J, Masclee A, Pierik M. Probiotics in the management of inflammatory bowel disease: a systematic review of intervention studies in adult patients. *Drugs* 2012; 72: 803-823.
29. Floch MH, Walker WA, Madsen K, Sanders ME, Macfarlane GT, Flint HJ, et al. Recommendations for probiotic use-2011 update. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45 Suppl: S168-S171.
30. Orel R, Kamhi Trop T. Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 2014 7;20:11505-24.
31. Butterworth AD, Thomas AG, Akobeng AK. Probiotics for induction of remission in Crohn's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2008; (3): CD006634.
32. Fujimori S, Tatsuguchi A, Gudis K, Kishida T, Mitsui K, Ehara A, et al. High dose probiotic and prebiotic cotherapy for remission induction of active Crohn's disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2007; 22: 1199-1204.
33. Steed H, Macfarlane GT, Blackett KL, Bahrami B, Reynolds N, Walsh SV, et al. Clinical trial: the microbiological and immunological effects of synbiotic consumption a randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2010.
34. Deshpande GC, Rao SC, Keil AD, Patole SK. Evidence-based guidelines for use of probiotics in preterm neonates. *BMC Med* 2011; 9: 92.
35. Alfaleh K, Anabrees J, Bassler D, Al-Kharfi T. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; (3): CD005496.
36. Al-Hosni M, Duenas M, Hawk M, Stewart LA, Borghese RA, Cahoon M et al. Probiotics-supplemented feeding in extremely low-birth-weigth infants. *J Perinatol* 2012; 32: 253-259.

Nutrición Hospitalaria

Nutr Hosp. 2015;31(Supl. 1):26-30
ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ
S.V.R. 318

Papel de los probióticos en Obstetricia y Ginecología

A. Castro[1], M. González[1], J. J. Tarín[2] y A. Cano[1,3]

[1]Hospital Clínico Universitario de Valencia. [2]Departamento de Biología Funcional y Antropología Física, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Valencia. [3]Departamento de Pediatría, Obstetricia y Ginecología. Universidad de Valencia.

Resumen

La microbiota de cada individuo se estima en 2,5-3 kg de peso. La colonización bacteriana comienza en el momento del parto, por contacto del feto con la microbiota vaginal e intestinal de la madre. Los oligosacáridos de la leche materna estimulan el crecimiento de bacterias, que proporcionan el ambiente adecuado para el desarrollo de la inmunidad de la mucosa intestinal. Además, la leche materna es portadora de su propia microbiota, la cual se altera en las mastitis. La vagina constituye otro importante microambiente. Las disbiosis en esta zona conducen a la aparición de vaginosis bacteriana y candidiasis, siendo ambas una patología muy frecuente en la mujer en edad fértil. Los probióticos se presentan como tratamiento potencial y alentador de toda la patología asociada a alteraciones de la microbiota. Son necesarios más estudios que confirmen el beneficio de los probióticos en este campo.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):26-30)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8704

Palabras clave: *Probióticos en ginecología. Vaginosis. Vaginitis. Candiadisis.*

ROLE OF PROBIOTICS IN OBSTETRICS AND GYNECOLOGY

Abstract

The human microbiota is estimated to be 2.5-3.0 kg. Bacterial colonization starts during delivery, due to fetal contact with vaginal and intestinal maternal microorganisms. The oligosaccharides in human breast milk stimulate the growth of bacteria, which provide the optimal environment for intestinal mucosal immunity development. Additionally, breast milk has its own microbiota and it is altered in mastitis. The vagina is another important microenvironment. Vaginal dysbiosis leads to bacterial vaginosis and vaginal candidiasis, both of them very frequent in reproductive life. The probiotics are a potential and encouraging treatment for all microbiota alterations. Nevertheless, additional studies are required to confirm the benefits of probiotics.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):26-30)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8704

Key words: *Probiotics in gynecology. Vaginosis. Vaginitis. Candiadisis.*

Introducción

La microbiota fetal, neonatal, mamaria y vaginal está formada por especies bacterianas que cohabitan en un delicado equilibrio. La rotura de ese equilibrio, bien por la reducción en la población bacteriana autóctona o por el sobrecrecimiento de otras especies, se traduce en la aparición de patología. Los probióticos aparecen como un tratamiento alentador en estos casos, ya que restituyen la microbiota normal, presentándose como coadyuvantes y/o tratamiento de elección.

Microbiota en el feto/neonato

Hasta hace poco tiempo se mantenía la idea de que el feto intraútero no era portador de microorganismos. Actualmente se ha demostrado la presencia de lactobacilos en líquido amniótico, sangre de cordón umbilical y meconio de niños sanos en los que las membranas amnióticas estaban íntegras[1]. Estos son los únicos hallazgos existentes respecto al feto.

Se ha demostrado mediante biología molecular que el neonato es colonizado por la microbiota vaginal al atravesar el canal del parto, y seguramente también con microbiota intestinal que se distribuye por el cuerpo del recién nacido incluyendo piel, cavidad oral, nasofaringe y heces[2].

Durante la lactancia natural se produce un aumento de las bacterias que colonizan el intestino del neonato, como *Bifidobacterium infantis, Lactobacillus acidophilus y Bacteroides fragilis*. Estas bacterias estimulan el desarrollo de la inmunidad en mayor medida que la leche de fórmula[3].

En este sentido, la leche materna es considerada como el alimento ideal para el neonato, ya que no sólo incluye una combinación única de los nutrientes que éste necesita, sino que además contiene bacterias probióticas con efectos beneficiosos en el sistema inmune. Se han aislado distintas especies bacterianas en la

Correspondencia: Ana Castro.
Hospital Clínico Universitario de Valencia.
Avenida Blasco Ibañez 17 CP 46010 Valencia.
E-mail: anacastroperez1986@gmail.com

leche materna, siendo *Staphilococcus, Lactococcus, Enterococcus* y *Lactobacillus* los más frecuentes. Entre los *Lactobacillus* se ha considerado al *L. salivarus, L. gasseri, L.fermentum, L. reuteri, L. rhamnosus, L. plantarum*, entre otros, como potenciales probióticos[4, 5]. Suplementar la leche de fórmula con probióticos para simular la leche materna y sus funciones, en la medida de lo posible, puede ser una alternativa en niños con lactancia artificial[4].

Microbiota en la mama

Estudios recientes indican que la glándula mamaria contiene su propia microbiota durante la gestación avanzada y la lactancia. El mecanismo propuesto para la colonización de la mama consiste en el transporte de las bacterias desde el intestino materno gracias a las células mononucleares, primero hacia la mama y luego vehiculadas con la leche materna al intestino del neonato[5]. Se ha sugerido que las distintas especies bacterianas aisladas en leche materna descritas, además de efectos beneficiosos en el intestino del neonato, tienen un importante papel en el tratamiento de la mastitis.

Microbiota en la vagina

El ecositema vaginal es complejo y hormonodependiente. En la menarquía el aumento de los estrógenos incrementa la producción de glucosa por el epitelio, lo que constituye el sustrato para que los bacilos de Döderlain, denominados por eso lactobacilos, generen ácido láctico y reduzcan el pH[2]. Para mantener el ecosistema vaginal, los lactobacilos actúan compitiendo con los patógenos por los nutrientes disponibles, bloqueando receptores epiteliales para hongos por coagregación, generando sustancias como peróxido de hidrógeno, lactacinas y acidolinas que mantienen el pH ácido y potenciando la respuesta inmune mediante secreción de IL-8 e IL-10, cruciales en el aclaramiento de las vulvovaginitis[1].

Los lactobacilos vaginales derivan principalmente de la microbiota intestinal[2]. Está compuesta fundamentalmente por lactobacilos, aunque también existen bacilos, cocos grampositivos anaerobios y en mucha menor proporción estreptococos, enterococos, estafilococos, actinomicetos anaerobios, *Ureaplasma sp.* y *Mycoplasma hominis*. Los métodos moleculares han revelado que los lactobacilos predominantes en vagina son *Lactobacillus crispatus, L. jensenii , L. gasseri, L. iners, L. salivarius* y *L. vaginalis*. Con alguna frecuencia aparecen lactobacilos colonizadores del tubo digestivo como *L. rhamnosus, L. casei* y *L. plantarum*[6].

Basado en la fisiopatología de la microbiota vaginal, se han introducido los probióticos, de administración vaginal y oral, como preventivos y coadyuvantes al tratamiento de las vaginitis[1].

Implicaciones terapéuticas

Feto/neonato

La colonización bacteriana del intestino del neonato es fundamental para el desarrollo de la función inmunitaria de la mucosa. Dicha colonización comienza en el parto y continúa con la alimentación y el destete, de forma que los oligosacáridos presentes en la leche materna favorecen el crecimiento de bacterias beneficiosas para estimular la respuesta inmune de la mucosa intestinal. Este proceso se completa gracias a la tolerancia oral. Los niños nacidos por parto prematuro, mediante cesárea o que reciben excesivos antibióticos en el periodo perinatal tienen una colonización inicial inadecuada y una función inmunológica de la mucosa intestinal aberrante. Clínicamente se ha relacionado: la enterocolitis necrotizante con la prematuridad, el asma y la enfermedad inflamatoria intestinal con los antibióticos y la dermatitis atópica con el nacimiento por cesárea[3].

Se ha analizado la posibilidad de administrar probióticos en la gestante durante el periodo perinatal y la lactancia para favorecer la colonización intestinal del neonato. Hay efectos positivos descritos, como prevención de la dermatitis atópica, reducción de infecciones respiratorias y alteraciones gastrointestinales, mejoría en los controles glucémicos y reducción del riesgo de infecciones genitales. La necesidad de más estudios que soporten dichos hallazgos es evidente[7].

El uso de prebióticos y probióticos recompone la microbiota intestinal por restauración de la inmunidad en distintas patologías, en las que se altera su homeostasis, como la enterocolitis necrotizante, infecciones y disfunciones inmunitarias. Los microorganismos establecen una relación simbiótica con el tejido epitelial y linfoide del huésped accionando el desarrollo de la respuesta inmune innata y adaptativa. De esta forma, los prebióticos y probióticos administrados al neonato pueden transformar una disbiosis en una simbiosis y reducir potencialmente la incidencia de dichas enfermedades[3]. Las especies bacterianas usadas como probióticos en estas situaciones son bifidobacterias y lactobacilos.

Mastitis

La mastitis es una enfermedad común durante la lactancia, con una incidencia de hasta un 33%[5]. Es considerada como el resultado de una alteración en la microbiota fisiológica de la mama[8]. Las mastitis agudas son causadas fundamentalmente por *Staphylococcus aureus*, bacteria con capacidad para llegar a la glándula mamaria desde el intestino materno y allí puede sintetizar toxinas que provocan aparatosos síntomas locales. Las mastitis subagudas y subclínicas están causadas generalmente por estafilococos coagulasa negativos (*S. epidermidis),* estreptococos de los grupos *viridans/mitis* y algunas especies del género *Corynebacterium*[5y8].

El tratamiento empírico de las mastitis agudas consiste en el empleo de antibióticos y antiinflamatorios (Tabla I). Siempre hay que realizar un cultivo y un antibiograma por si las cepas causantes fuesen resistentes a los antibióticos propuestos. Los agentes causantes de mastitis subagudas y subclínicas son más resistentes a la antibioterapia, pero afortunadamente responden bastante bien al tratamiento con probióticos (Tabla I). De manera que, los probióticos son el tratamiento de primera elección en las mastitis subagudas y subclínicas, quedando el antibiótico como segunda opción. Algunas cepas de *Lactobacillus salivarius* parecen ser las mejores para el tratamiento de las mastitis subagudas, siendo eficaces en más del 90% de los casos. *L. fermentum* se considera eficaz en un 65-70% de los casos y se podría recurrir alternativamente a otras cepas como *L. reuteri o L. acidophilus* con menor eficacia (<30%) dado que se suelen utilizar en trastornos gastrointestinales[8].

Los probióticos *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus salivarius* parecen ser tan efectivos como el tratamiento antibiótico en un ensayo clínico aleatorizado con 352 mujeres con mastitis durante la lactancia. Sin embargo, los hallazgos del estudio necesitan confirmación por otros[9].

Vaginosis bacteriana

La vaginosis bacteriana afecta al 8-30% de las mujeres en edad fértil en los países industrializados, con mayor prevalencia en mujeres afroamericanas, africanas y con edad avanzada. No se considera una infección de transmisión sexual, aunque existen estudios donde se ha demostrado la presencia de células clue en la pareja, tanto heterosexual como homosexual, y en semen de donante criopreservado[2]. Se trata de una infección polibacteriana cuyos responsables son los comensales habituales de la vagina como anaerobios Gram negativos, *Mobilincus*, bacilos Gram positivos como el *Atopobium vaginae*. En la vaginosis existe una alteración en el equilibrio normal de la microbiota vaginal. Una hipótesis reciente la considera una forma natural de respuesta a la relación sexual, donde la mezcla del eyaculado y el trasudado vaginal generado en el coito elevan el pH en un intento de proteger los espermatozoides de los efectos del ácido láctico. Este nuevo microambiente favorecería la proliferación de *Gardenella vaginalis*, que podría ser la puerta de entrada para el resto de elementos polimicrobianos[1]. La menstruación también eleva el pH vaginal favoreciendo la aparición de vaginitis y vaginosis. El desequilibrio en la microbiota vaginal constituye el mecanismo fisiopatológico de vaginitis y vaginosis, aunque no está totalmente claro si la reducción de lactobacilos es causa o consecuencia de la proliferación de microorganismos[6].

La vaginosis bacteriana se asocia a parto pretérmino, rotura prematura de membranas, aminonitis y endometritis tras aborto quirúrgico[2].

El potencial de recidiva es alto tras tratamiento antibiótico con agentes anaerobicidas como el metroni-

Tabla I

Tratamiento empírico de las mastitis basado en sintomatología y agentes etiológicos. Modificada de Carrera M, Arroyo R, Mediano P et al. Lactancia materna y mastitis. Tratamiento empírico basado en la sintomatología y los agentes etiológicos. Acta Pediatr Esp 2012; 70:255-261

Tipo	*Agentes etiológicos*	*Sintomatología*	*Tratamiento*
Agudas	Staphylococcus aureus	Enrojecimiento Induración Disminución leche Síntomas pseudogripales Abscesos	Antibiótico: Amoxicilina/ácido clavulánico Cloxacilina Cefalosporinas Antiinflamatorios: Alternar paracetamol e ibuprofeno
Subagudas	Staphylococcus epidermidis Streptococcus mitis Streptococcus salivarius Rothia spp. Corynebacterium spp.	Dolor Induración Disminución leche La leche sale por 1 2 orificios y gotea Niños tomas largas y frecuentes Alternan tomas relajados con agresivas, tiran del pezón	Probióticos: Lactobacillus salivarius Lactobacillus fermentum Lactobacilus reuteri Otros Antibióticos (si probiótico ineficaz) Ciprofloxacino Cotrimoxazol Antiinflamatorios: ibuprofeno
Subclínicas	Staphylococcus epidermidis Streptococcus mitis Streptococcus salivarius Rothia spp.	Ausencia de dolor Resto similar a subagudas	Probióticos: Lactobacillus salivarius Lactobacillus fermentum Lactobacilus reuteri Otros

dazol o la clindamicina. Esto se explica dada la resistencia del *Atopobium* al metronidazol y a la formación de biopelículas o *biofilm*. Los *biofilm* se generan por la presencia de bacilos empaquetados en la mucosa vaginal. Dicha estructura favorece la resistencia al antibiótico y la transformación de la vaginosis en una entidad crónica[2].

Los probióticos aparecen como nuevas formas terapéuticas que intentan reconstruir el patrón estándar de la microbiota. Mediante el aporte de lactobacilos en forma de productos liofilizados (cápsulas vaginales o tampones), o en otros sustratos[1]. La terapia adyuvante con probióticos ha demostrado eficacia tanto en la prevención de las recurrencias como en el tratamiento de la vaginosis, sin embargo es improbable que pueda sustituir al antibiótico[10, 11].

La administración de probióticos puede ser tanto vaginal como vía oral. Se ha observado una mayor restitución de la microbiota vaginal normal con el tratamiento vía oral respecto a placebo[12] y una disminución en las recidivas con el tratamiento vía vaginal respecto a placebo en pacientes con vaginosis[13].

Según la revisión de la Cochrane, tanto el uso de metronidazol más probiótico como el de probiótico más estriol parecen alentadores, pero se necesitan ensayos clínicos aleatorizados, bien diseñados, con metologías estandarizadas y mayor cantidad de pacientes para confirmar los beneficios de los probióticos en el tratamiento de la vaginosis bacteriana[14].

Vulvovaginitis candidiásica

La vulvovaginitis candidiásica está producida por diferentes especies de hongos, fundamentalmente *Candida spp*. Existen varias circunstancias que pueden favorecer la proliferación del hongo: la diabetes mellitus no controlada, el uso de antibióticos, enfermedades inmunodepresoras o cualquier cambio en la microbiota vaginal[1].

El tratamiento se basa en los antifúngicos vía tópica y oral. No existe evidencia de que la microbiota vaginal sea deficiente en lactobacilos en las vulvovaginitis de repetición[15]. Sin embargo, la administración de probióticos como adyuvante al tratamiento ha demostrado en algunos estudios aumento en la eficacia y reducción de las recidivas[1, 16].

Conclusiones

En el intestino del neonato, la glándula mamaria y la vagina existe una microbiota específica y la aparición de un disbalance en su homeostasis provoca la aparición de patología. Los probióticos han demostrado ser un tratamiento efectivo en estos casos. En el neonato se utilizan en alteraciones gastrointestinales como la enterocolitis necrotizante, en las mastitis subagudas se presentan como tratamiento de primera línea y en la vaginosis bacteriana y la vulvovaginitis candidiásica tienen un importante papel como adyuvantes al tratamiento antibiótico o antifúngico respectivamente. Se necesitan más ensayos clínicos aleatorizados, bien diseñados, con metologías estandarizadas y mayor cantidad de pacientes para confirmar los beneficios de los probióticos, así como la mejor vía de administración, las cepas bacterianas más efectivas, las dosis y pautas de tratamiento.

Referencias

1. Protocolo de diagnóstico y tratamiento de las infecciones vulvovaginales S.E.G.O. 2012.
2. Danielsson D, Teigen PK, Moi H. The genital econiche: focus on microbiota and bacterial vaginosis. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1230:48-58.
3. Walker WA. Initial intestinal colonization in the human infant and immune homeostasis. *Ann Nutr Metab* 2013; 63:8-15.
4. Lara-Villoslada F, Olivares M, Sierra S et al. Beneficial effects of probiotic bacteria isolated from breast milk. *Br J Nutr* 2007; 98:96-100.
5. Fernández L, Langa S, Martín V et al. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 2013; 69:1-10.
6. Baquedano L et al. Menoguía de salud vaginal AEEM. 1 Ed. Barcelona: aureagrafic 2014. ISBN: 978-84940319-5-3.
7. Sanz Y. Gut microbiota and probiotics in maternal and infant health. *Am J Clin Nutr* 2011; 94:2000-2005.
8. Carrera M, Arroyo R, Mediano P et al. Lactancia materna y mastitis. Tratamiento empírico basado en la sintomatología y los agentes etiológicos. *Acta Pediatr Esp* 2012; 70:255-261.
9. Arroyo R, Martín V, Maldonado A et al. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral asministration of Lactobacillo isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 1551-1558.
10. Donders GG1, Zodzika J, Rezeberga D. Treatment of bacterial vaginosis: what we have and what we miss. *Expert Opin Pharmacother* 2014; 15: 645-657.
11. Parma M, Stella Vanni V, Bertini M, Candiani M. Probiotics in the prevention of recurrences of bacterial vaginosis. *Altern Ther Health Med* 2014; 20: 52-57.
12. Vujic G1, Jajac Knez A, Despot Stefanovic V et al. Efficacy of orally applied probiotic capsules for bacterial vaginosis and other vaginal infections: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2013; 168:75-79.
13. Ya W, Reifer C, Miller LE. Efficacy of vaginal probiotic capsules for recurrent bacterial vaginosis: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Am J Obstet Gynecol* 2010; 203: 120e1-6.
14. Senok AC, Verstraelen H, Temmerman M et al. Probiotics for the treatment of bacterial vaginosis. Cochrane Database Syst Rev 2009.
15. McClelland RS, Richardson BA, Hassan WM et al. Prospective study of vaginal bacterial flora and others risk factors for vulvovaginal candidiasis. *J Infect Dis* 2009; 199: 1883-1890.
16. Kovachev SM, Vatcheva-Dobrevska RS. Local probiotic therapy for vaginal candida infections. Probiotics Antimicrob Proteins 2014. (Epub ahead of print) Pubmed PMID: 25362524.

VI Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica

Oviedo 5 y 6 de febrero de 2015

SESIÓN DE USOS CLÍNICOS

VI Workshop Probiotics, Prebiotics and Health: Scientific Evidence

Oviedo, 5 and 6 February, 2015

CLINICAL USES

Moderador/Moderator: Carlos Bousoño

Nutrición Hospitalaria

Nutr Hosp. 2015;31(Supl. 1):33-47
ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ
S.V.R. 318

Probióticos: del laboratorio al consumidor

J. M. Rodríguez

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

Resumen

Introducción: **En los últimos años, el campo de los probióticos ha experimentado un gran auge. Sin embargo, de los miles de cepas aisladas cada año por su potencial probiótico en los laboratorios de todo el mundo, muy pocas pasan a una fase de desarrollo industrial y menos aún son las que consiguen una vida comercial.**

Objetivo: **En este artículo, se revisan los principales aspectos que se deben tener en cuenta en el, habitualmente, largo y tortuoso camino que debe seguir una cepa desde su aislamiento inicial hasta su comercialización.**

Resultados y conclusiones: **Cualquier microorganismo probiótico debe estar correctamente identificado a nivel de especie y cepa. La secuencia del genoma es la mejor identificación posible, además de proporcionar información muy valiosa sobre su seguridad, funcionalidad y propiedades de interés tecnológico. Los casos en los que se ha podido establecer una relación entre un probiótico y un efecto adverso son muy escasos y han afectado a personas con patologías subyacentes. Globalmente, aunque las distintas pruebas *in vitro*, *ex vivo* y en modelos animales proporcionan información útil durante el proceso de selección de cepas, los únicos datos que permiten evaluar la seguridad y eficacia de un probiótico de una forma directa son los que se obtienen en el curso de ensayos clínicos correctamente diseñados y dirigidos específicamente a la población diana. Por otra parte, las empresas que comercializan probióticos tienen la necesidad de obtener una biomasa muy elevada de forma económicamente rentable y de que la concentración de bacterias viables necesaria para ejercer el efecto beneficioso se mantenga hasta el final de la vida útil del producto. Finalmente, los aspectos comerciales son determinantes en la decisión de afrontar el desarrollo industrial y la puesta en el mercado de un probiótico.**

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):33-47)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8705

Palabras clave: *Probióticos. Identificación. Seguridad. Funcionalidad. Desarrollo industrial.*

Correspondencia: Juan M. Rodríguez.
Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Avda. Puerta de Hierro, s/n.
Universidad Complutense de Madrid. 28040 Madrid.
E-Mail: jmrodrig@vet.ucm.es

PROBIOTICS: FROM THE LAB TO THE CONSUMER

Abstract

Introduction: **In the last years, the field of probiotics has grown notably. However, out of the thousands of strains isolated each year in the labs around the world, very few enter in a phase of industrial development and even a lower number go to the market.**

Objective: **In this article, the main aspects that have to be taken into account in the, usually, long and winding road that a strain must follow from isolation to the market are reviewed**

Results and conclusions: **A probiotic microorganism has to be correctly identified at the species and strain levels. The genome sequence is the gold identification standard and provides valuable information on the safety, functionality and technological properties of a strain. The cases in which a link between a probiotic and an adverse effect has been established are scarce and have involved people with underlying pathologies. There is a wide variety of *in vitro*, *ex vivo* and animal model assays for the screening of probiotics, which provide useful information throughout the selection process; however, correctly designed clinical trials are the only way to obtain direct results on the safety and efficacy of a probiotic to the target population. Probiotic companies have the need to obtain a very high bacterial biomass in an economically viable manner while preserving the concentration of live bacteria required for exerting the expected beneficial effect until the end of the probiotic's shelf life. Finally, commercial aspects play a key role in the decision of starting an industrial development and, eventually, to place a probiotic in the market.**

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):33-47)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8705

Key words: *Probiotics. Identification. Safety. Functionality. Industrial development.*

Introducción

En los últimos años, el campo de los probióticos ha experimentado un gran auge, lográndose avances científicos y clínicos que han permitido el desarrollo y comercialización de diversos productos debidamente contrastados. Paralelamente, también ha aumentado la demanda de probióticos por parte de unos consumidores cada vez más conscientes de la estrecha relación entre nuestra microbiota y la salud. Desafortu-

nadamente, algunas compañías han aprovechado esta coyuntura para aplicar el término "probiótico" a productos que no encajan en este concepto y/o cuyos presuntos beneficios carecen de cualquier base científica. Este mal uso, intencionado o no, se ha visto favorecido por la ausencia, hasta principios del siglo XXI, de un consenso internacional sobre la metodología para evaluar la eficacia y seguridad de estos productos.

En 2001, una comisión de expertos convocados de forma conjunta por la FAO y la OMS reconoció la necesidad de establecer directrices para la evaluación de la eficacia y seguridad de los probióticos[1]. La comisión propuso una definición de probiótico que, desde entonces, ha sido la más ampliamente aceptada en todo el mundo: "*microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas confieren un beneficio a la salud del hospedador*". En 2002, y recogiendo el guante de la comisión, un grupo de trabajo mixto de la FAO y la OMS elaboró unas directrices con los requerimientos mínimos necesarios para que a un producto se le pudiera otorgar el apelativo de probiótico (Fig. 1)[2]. Los documentos derivados del trabajo de ambas comisiones, junto con las actualizaciones recogidas en los consensos de la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP)[3] y de la *Internacional Scientific Association for Probiotics and Prebiotics* (ISAPP)[4] son referencias clave para saber qué se entiende por probiótico en la actualidad y constituyen la base de este artículo.

El proceso que va desde la selección inicial de cepas hasta la comercialización de un probiótico eficaz para una diana específica no resulta sencillo (Fig. 2). Tiene que contemplar diversos aspectos (científicos, clínicos, tecnológicos, normativos, económicos, comunicativos…) que, aunque en ocasiones no son fáciles de conjugar, pueden y deben ser compatibles entre sí. Recientemente, se ha empleado el término "*marco probiótico*" para hacer referencia a todos los sectores implicados en que el conocimiento existente sobre los probióticos se traduzca en productos que supongan un beneficio para la Sociedad (Fig. 3)[4].

De los miles de cepas aisladas cada año por su presunto potencial probiótico en los laboratorios de todo el mundo, muy pocas pasan a una fase de desarrollo industrial y muchas menos aún son las que consiguen un hueco en los estantes de una farmacia, parafarmacia o establecimiento alimentario. En este artículo, se revisarán los principales aspectos que se deben tener en cuenta en el camino que debe seguir una cepa desde su aislamiento inicial hasta su comercialización.

Identificación de los microorganismos probióticos

La identificación de un aislado a nivel de especie y cepa es un requisito esencial para cualquier aislado que se pretenda comercializar. La asignación de un aislado a una especie u otra no es banal ya que la evaluación

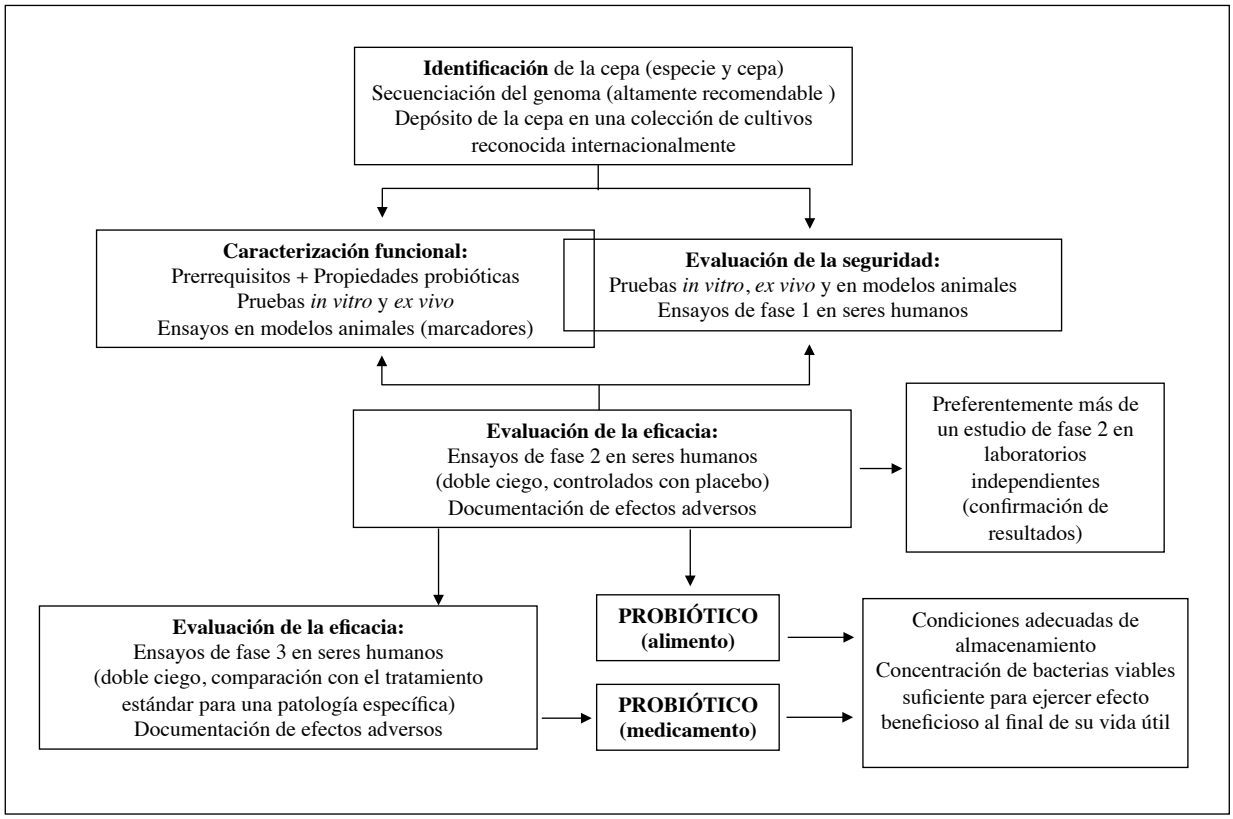

Fig. 1.—Directrices de la FAO/OMS para la evaluación de los probióticos[2].

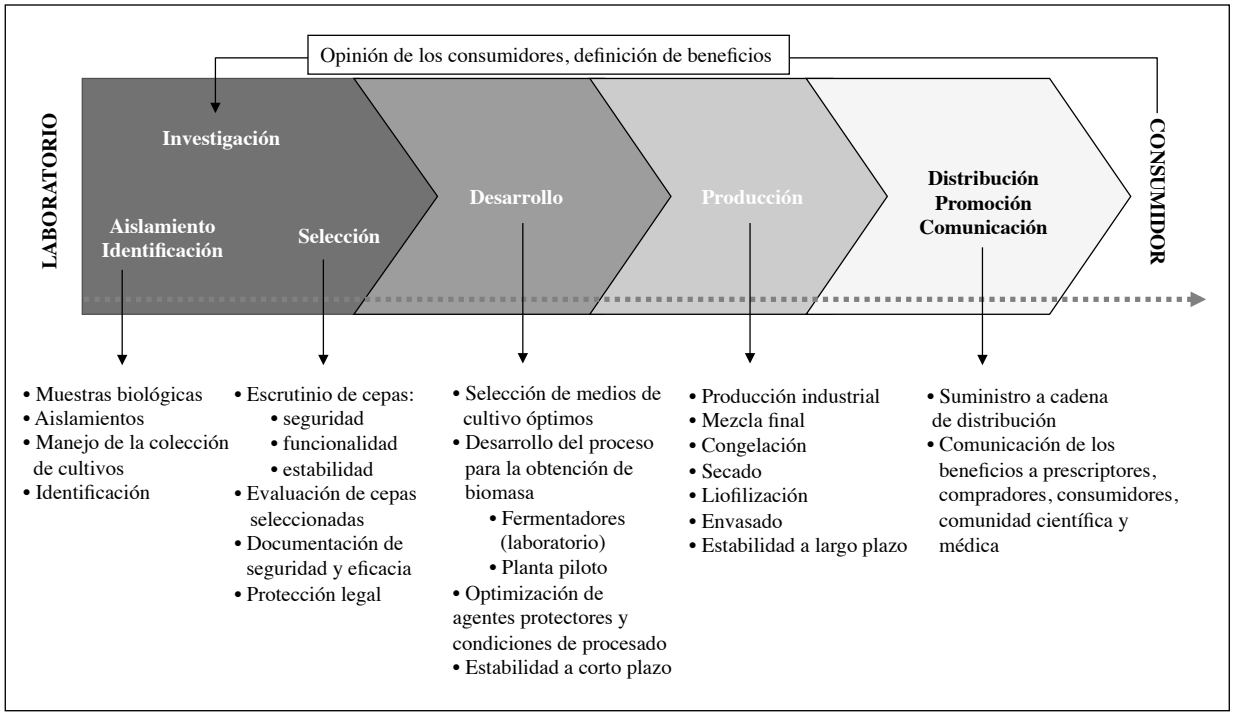

Fig. 2.—Etapas básicas desde el aislamiento inicial hasta la comercialización de un probiótico.

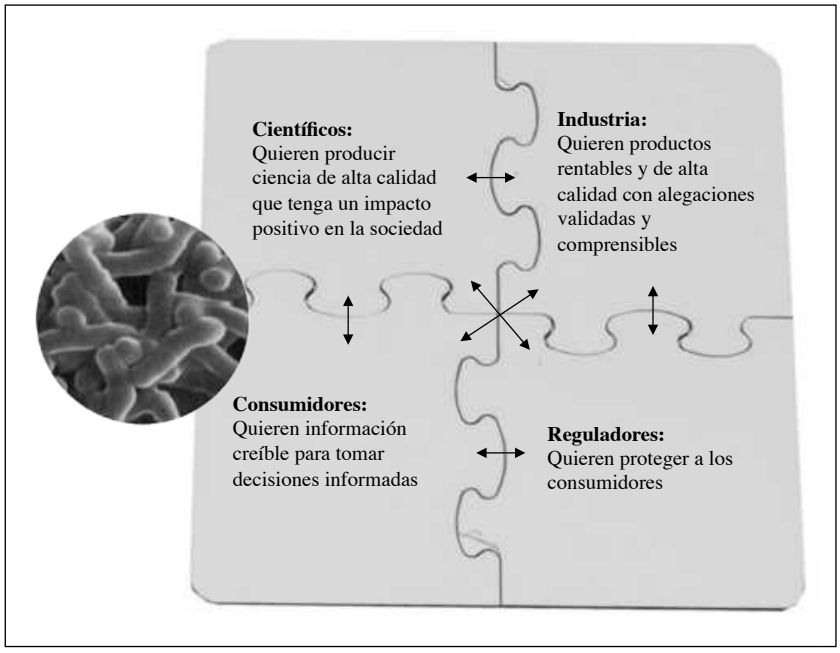

Fig. 3.—Relaciones entre los sectores implicados en el campo de los probióticos[4].

del riesgo ante la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) es mucho más sencilla para aquellas que, sobre la base de una historia de uso seguro, gozan de presunción cualificada de seguridad (QPS; del inglés, *Qualified Presumption of Safety*)[5]. La lista QPS se revisa anualmente, incorporando nuevas unidades taxonómicas si los datos disponibles así lo avalan. En consecuencia, es probable que en el futuro se incluyan géneros y especies (*Roseburia* spp., *Faecalibacterium prausnitzii*…) que no se han empleado hasta la fecha como probióticos pero a las que los estudios sobre el microbioma humano están vinculando con claros efectos beneficiosos para la salud.

Como cualquier otra disciplina, la taxonomía de bacterias y levaduras está en constante evolución y la determinación de especie debe realizarse (y, eventualmente, reevaluarse) con la metodología más válida en cada momento. Aunque las pruebas fenotípicas

(fermentación de carbohidratos, actividades enzimáticas…) fueron muy útiles cuando no existían otros métodos alternativos, actualmente no son válidas para la identificación de especies ya que su capacidad de resolución es claramente insuficiente; de hecho, la herencia del uso de métodos de identificación inadecuados es la principal causa de mal etiquetado de productos probióticos[6].

Las pruebas fenotípicas se fueron reemplazando, a partir de la última década del siglo pasado, por diversas técnicas moleculares, basadas en la detección de huellas genéticas (*fingerprinting*) o en la secuenciación de diversos genes. Entre ellas, la secuenciación parcial o completa del gen 16S rRNA se ha convertido, prácticamente, en el método estándar de identificación. Sin embargo, este abordaje posee algunos inconvenientes, como la existencia de secuencias no contrastadas en las bases de datos (EMBL/GenBank/DDBJ) o su incapacidad para discriminar entre subespecies estrechamente relacionadas, dentro de grupos muy exitosos evolutivamente como *Lactobacillus plantarum* o *Lactobacillus paracasei*. En este sentido, el uso de genes esenciales para el metabolismo celular (*housekeeping*), como *pheS*, *rpoA*, *atpD, tuf, groEL* o *recA*, o su combinación con el gen 16S rRNA ofrece una mayor capacidad discriminatoria. En cualquier caso, es inaceptable prolongar el uso de nomenclatura obsoleta o confusa en las etiquetas de los productos, a pesar de que existen ejemplos en este sentido en el mercado probiótico actual (*Lactobacillus biphidus* en vez de *Bifidobacterium bifidum*; *Lactobacillus sporogenes* en lugar de *Bacillus coagulans*). Curiosamente, algunas de las empresas que comercializan productos mal etiquetados están certificadas frente a la norma de calidad ISO9000 para la que cualquier producto mal identificado debe ser considerado como no conforme.

La identificación de un aislado a nivel de cepa es igualmente relevante porque posibilita su trazabilidad en pruebas de laboratorio, ensayos clínicos, estudios epidemiológicos (incluyendo su posible implicación en efectos adversos) y durante todo el proceso de producción y comercialización. También es deseable si existen efectos beneficiosos específicamente asociados a esa cepa. En muchos documentos, incluyendo el consenso de la SEPyP,[3] se considera que los efectos saludables demostrados para una cepa microbiana específica no son extrapolables o atribuibles a otras cepas de la misma especie; sin embargo, se trata de un aspecto que se debería revisar ya que algunos efectos (y los mecanismos que los sustentan) están ampliamente distribuidos entre especies pertenecientes a distintos géneros (producción de ácidos orgánicos, exclusión competitiva de patógenos…), otros son frecuentes entre las distintas cepas de una misma especie y, finalmente, otros son más raros (efectos neurológicos o endocrinológicos…) y sólo se pueden asociar a unas pocas cepas dentro de una especie determinada[4].

A pesar de la disponibilidad de diversas técnicas de genotipado, la electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) sigue siendo considerada de elección para diferenciar cepas, sin olvidar que la presencia de plásmidos y otros elementos extracromosómicos puede estar asociada a propiedades que la diferencien frente a otras de la misma especie. La secuencia del genoma completo (incluyendo dichos elementos extracromosómicos) es la mejor información posible para la identificación de una especie/cepa, además de proporcionar información muy valiosa sobre su seguridad, funcionalidad y propiedades de interés tecnológico (utilización preferencial de sustratos, resistencia a condiciones ambientales, presencia de fagos...). Actualmente, la genómica funcional ya facilita la selección de cepas para aplicaciones concretas.[7] El abaratamiento de los costes de secuenciación hace que sea económicamente accesible para las empresas y en el futuro se convertirá, con toda seguridad, en un requisito para cualquier cepa que se quiera comercializar.

Por otra parte, es habitual que la empresa interesada en una cepa la quiera proteger mediante una patente que cubra sus posibles aplicaciones. Para ello, tendrá que depositar la cepa en una colección de referencia como, por ejemplo, la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), bajo las condiciones del Tratado de Budapest. En este caso, la capacidad para diferenciar la cepa es una herramienta útil para detectar un posible uso ilegal por parte de terceros.

Seguridad de la cepa

Consideraciones generales

Los microorganismos utilizados como probióticos incluyen a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y, especialmente, a bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque algunas formulaciones pueden incluir algunas cepas de *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Propionibacterium*, *Bacillus* y *Escherichia*. El uso preferencial de lactobacilos y bifidobacterias se debe, por una parte, a que se les considera avirulentos y, de hecho, muchas especies gozan del estatus GRAS (*Generally Recognized as Safe)* de la FDA estadounidense y QPS de la EFSA; por otra, a que son los organismos que más se han empleado en las pruebas de aptitud probiótica y, en consecuencia, sus propiedades beneficiosas están más contrastadas.

Ahora bien, los organismos probióticos se emplean en un abanico muy amplio de situaciones, que incluye individuos sanos, personas sanas pero en una situación especial (bebés, mujeres embarazadas o lactantes, ancianos…) y otras con patologías de distintos tipos y severidades. En consecuencia, la evaluación de la seguridad debe tener en cuenta, entre otros factores, el microorganismo en cuestión, la forma de administración, el nivel de exposición, el estado de salud del hospedador y las funciones fisiológicas que pueden desempeñar en el mismo[8].

Los casos en los que se ha podido establecer una relación entre el consumo de un probiótico y un efecto adverso son extremadamente escasos y han afectado a personas con enfermedades graves subyacentes y/o con la barrera intestinal muy alterada. Esta bajísima incidencia es especialmente destacable teniendo en cuenta el amplio uso de este tipo de productos[9,10]. Por ejemplo, el riesgo de infección por *Lactobacillus* es de aproximadamente un caso por cada 10 millones de personas[11-13]. Las especies más implicadas son *Lactobacillus rhamnosus*[14,15] (generalmente en niños prematuros con síndrome de intestino corto), *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*[16] (en pacientes con vías centrales) y *Bacillus subtilis*[17,18]. Incluso en los raros casos en las que se presentan, se trata de infecciones reversibles y que responden bien al tratamiento antibiótico o antifúngico.

En teoría, los probióticos podrían producir cinco tipos de efectos adversos: 1) infectividad o patogenicidad; 2) producción de metabolitos no deseables; 3) posibilidad de transmisión de genes que confieran resistencia a antibióticos; 4) excesiva inmunoestimulación o inmunodepresión en individuos sensibilizados; y 5) efectos negativos asociados a los excipientes.

Patogenicidad

Hasta la fecha, no se ha hallado ningún gen inequívocamente relacionado con patogenicidad en los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, incluyendo los aislados asociados con sepsis u otros efectos adversos[19]. Los factores que se han propuesto para explicar su implicación en tales casos son precisamente los que, como veremos posteriormente, se consideran propiedades deseables en un organismo probiótico. Por ejemplo, su adherencia a las células del hospedador y la resistencia a los mecanismos de defensa innatos pueden facilitar su translocación patológica al medio interno y una proliferación indiscriminada en pacientes muy quebrantados, que puede acabar en una bacteriemia, un absceso hepático o una endocarditis. Pero sin embargo, la adherencia a las células del epitelio propicia la colonización de las mucosas con la consiguiente exclusión de patógenos, el fortalecimiento de la barrera intestinal y la mejora de las interacciones neuro-inmunológicas[20]. Igualmente, la resistencia a los sistemas innatos de defensa puede promover su persistencia en las mucosas y permitir una translocación "controlada", que es un proceso fisiológico selectivo y altamente regulado que sucede continuamente en individuos sanos, implicando una tasa baja de translocación que resulta ser importante para la homeostasis orgánica[21,22].

En contraste con lactobacilos y bifidobacterias, los enterococos pueden presentar numerosos factores de virulencia (hemolisina, gelatinasa, DNasa…)[23,24] por lo que no se han podido incluir en el listado QPS. A algunas especies del género *Bacillus* se les ha otorgado la consideración QPS (*B. coagulans*, *B. pumilus*, *B. subtilis*), aunque su utilización en alimentación/probiosis viene condicionada por la demostración de que la cepa no presenta actividad toxinogénica (ausencia de genes *Hbl* y *Nhe* y de citotoxicidad)[25].

Producción de metabolitos indeseables

En la literatura antigua se postulaba que el isómero D(-) del ácido láctico podría provocar acidosis en la población infantil. Sin embargo, muchas de las especies autóctonas del tracto gastrointestinal humano, como *Lactobacillus reuteri*, lo generan. También es el isómero más abundante en el yogur debido a la actividad de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. De hecho, los ensayos clínicos en los que se han administrado cepas probióticas productoras de D-lactato a niños a término y prematuros han revelado que no se produce ningún signo de acidosis, incluso tras su administración diaria durante los primeros 12 meses de vida[26-28].

En este sentido, la acidosis sólo se presenta cuando coinciden las siguientes circunstancias: (a) síndrome de intestino corto; (b) consumo de glúcidos en grandes cantidades; (c) malabsorción de los mismos; (d) aumento de la concentración de bacterias productoras de D-lactato (pertenecientes a la propia microbiota del paciente); (e) motilidad colónica disminuida; y (f) alteración en el metabolismo del ácido D-lactico[29,30]. Por ello, la administración una cepa productora de ácido D-láctico en pacientes de riesgo (cirugía intestinal, síndrome de intestino corto...) debe ser cuidadosamente vigilada si no está avalada por datos de seguridad en relación a este aspecto específico.

Las aminas biógenas (AB) se generan por descarboxilación de los aminoácidos y ejercen funciones fisiológicas esenciales como neurotransmisores y mediadores de la respuesta inmune. Sin embargo, determinados microorganismos (especialmente enterococos) pueden dar lugar a concentraciones muy altas de algunas AB (histamina, tiramina…) las cuales pueden inducir trastornos digestivos, circulatorios y respiratorios, especialmente en personas con niveles bajos de monoamino oxidasa o/y diamino oxidasa, que son los enzimas responsables de su degradación. Por este motivo, la incapacidad de sintetizar AB debe estar incluida en los criterios de selección de los cultivos iniciadores y también de aquellos probióticos que se vayan a vehicular a través de alimentos donde se puedan dar las condiciones para su formación.

Resistencia a antibióticos

La resistencia a antibióticos puede ser intrínseca y adquirida. En el primer caso, todas las cepas de una determinada especie son resistentes y la causa es, habitualmente, la falta de la estructura diana (ausencia del dímero D-ala-D-ala en los precursores de la pared de

los lactobacilos, que media la resistencia a glicopéptidos) o la impermeabilidad al antimicrobiano (caso de la resistencia de las bacterias Gram negativas frente a la penicilina G). Por tanto, la resistencia intrínseca no es transmisible y no constituye un motivo de especial preocupación. La resistencia adquirida la presentan determinadas cepas de una especie y es debida, en general, a la adquisición de genes que codifican enzimas que promueven la exportación del antibiótico o su alteración, de manera que ya no sea capaz de reconocer su estructura diana. Los genes responsables están, por tanto, localizados en elementos transmisibles (plásmidos, transposones e islas de patogenicidad) por lo que las cepas que los poseen no son aptas para su uso como organismos probióticos. Por eso es esencial determinar el patrón de susceptibilidad antibiótica de los organismos candidatos (Fig. 4)[31]. Actualmente se considera que se debe realizar de acuerdo a procedimientos aceptados internacionalmente como, por ejemplo, la versión más actualizada de la guía del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) o la norma ISO 10932:2010 (IDF 223:2010) o los criterios propuestos por Klare et al[32,33]. La secuenciación de los genomas también es muy útil para determinar si existen determinantes de resistencia en el acervo génico de un organismo candidato a probiótico.

Efectos negativos sobre el sistema inmunitario

La evaluación de la seguridad de los probióticos también debe contemplar su impacto en hospedadores inmunológicamente inmaduros o inmunocomprometidos. Todos los microorganismos, tanto autóctonos como alógenos (http://www.sepyp.es/es/wiki), ejercen un impacto sobre sistema inmunológico. La microbiota autóctona o de ocupación es crucial para el desarrollo y mantenimiento de la fisiología y homeostasis de las mucosas y epitelios que habitan, los cuales actúan como barrera y órgano de comunicación entre el medio ambiente luminal y el medio interno del anfitrión[34]. Un fracaso en esta interacción puede contribuir al desarrollo de patologías inflamatorias, metabólicas o infecciosas.

Todavía no conocemos bien los mecanismos por los que los microorganismos ejercen su acción sobre el sistema inmune, lo cual es un inconveniente para poder predecir la seguridad inmunológica de una intervención probiótica. El que un probiótico ejerza efectos inmunoestimulantes o inmunosupresores, que según las circunstancias pueden ser protectores o nocivos, depende de las interacciones entre las señales microbianas, la base genética del hospedador y las condiciones ambientales. Diversos estudios han mostrado que ciertas bacterias probióticas estimulan la proliferación y actividad de las células inmunitarias, aumentando la eficacia de la respuesta frente a patógenos. En contraste, otros probióticos son eficaces frente a la inflamación crónica y las alergias mediante la supresión de células efectoras y la inducción de mecanismos de tolerancia[35,36]. El conocimiento de las relaciones entre la estructura (genotipo, fenotipo) y las funciones de los probióticos en las poblaciones diana limitará el riesgo de inducir efectos inmunológicos adversos en el hospedador.

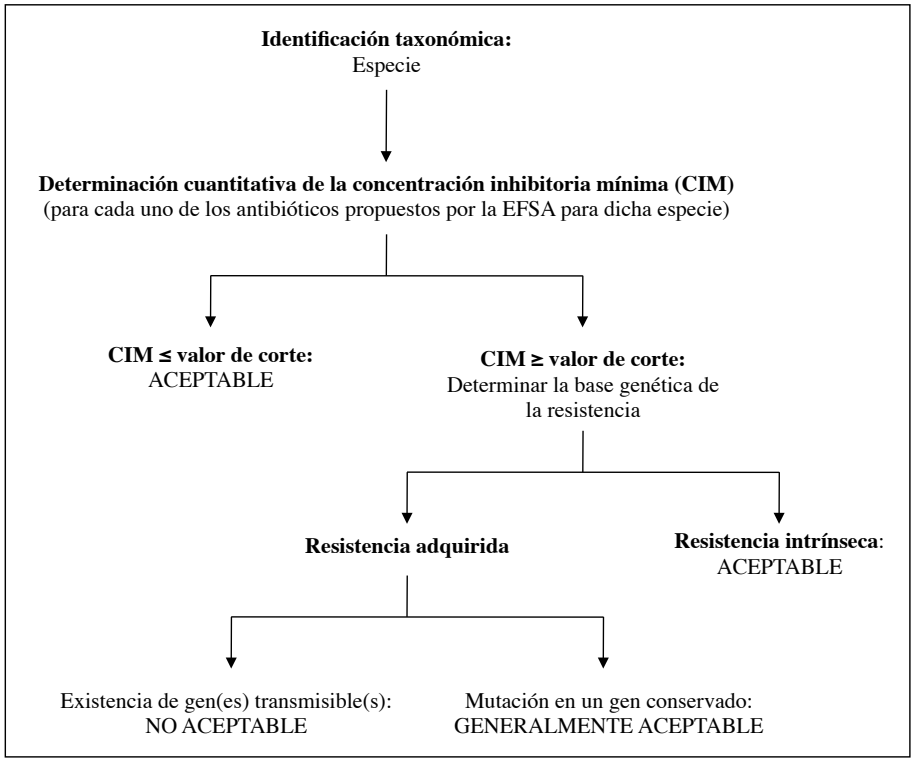

Fig. 4.—Esquema propuesto por la EFSA[31] para la evaluación de la resistencia a antibióticos en bacterias potencialmente probióticas.

Seguridad de los excipientes

La evaluación de seguridad de un probiótico debe tener en cuenta los excipientes empleados en la formulación de los productos finales. A modo de ejemplo, se han descrito casos de niños que han sufrido reacciones anafilácticas debidas a la exposición a las proteínas de leche de vaca empleada como excipiente[37,38]. En este sentido, los productos probióticos deben respetar la normativa vigente relativa a la declaración de alergenos en el etiquetado (Real Decreto 2220/2004, Directiva Europea 2006/142). Por lo que respecta a los ensayos clínicos, es importante incluir la alergia o intolerancia al excipiente entre los criterios de exclusión.

Pruebas y modelos para la evaluación de la seguridad

Existen numerosos tipos de ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para evaluar la seguridad de los probióticos. En general, todos son útiles para tener más información a la hora de seleccionar las cepas más seguras aunque los que se basan en pruebas fenotípicas sencillas y en el empleo de cultivos celulares poseen, en mayor o menor medida, el inconveniente de no reflejar adecuadamente las complejas interacciones que se establecen en un ser vivo. Las pruebas en animales han sido consideradas tradicionalmente como una parte esencial en la evaluación de la seguridad de cualquier preparado que se pretenda administrar a humanos. Para ello, se han empleado una amplia gama de especies pertenecientes a diversas clases zoológicas destacando, entre todas ellas, el modelo rata. No obstante, los modelos animales también son objeto de controversia por las connotaciones éticas inherentes y porque frecuentemente los datos de seguridad obtenidos no son directamente extrapolables a la especie humana[8]. Por ello, es deseable que el modelo animal sea seleccionado por su capacidad para predecir lo que pueda suceder en una persona, lo que implica que su anatomía y fisiología, incluyendo su desarrollo, los procesos metabólicos, las respuestas del sistema inmunitario y la composición de la microbiota, sean lo más similares posibles a las nuestras. En este sentido, el cerdo es el modelo ideal[39,40] a pesar de que plantea problemas de coste y espacio que frecuentemente obligan a optar por otras especies.

Hasta la fecha, los estudios de toxicidad oral aguda, subcrónica y crónica de probióticos en modelos estándar (por ejemplo, ratas sanas) (Fig. 5) no han mostrado efectos adversos, incluso cuando se han administrado a grandes dosis (hasta10.000 veces mayores que las consumidas normalmente en humanos) durante un

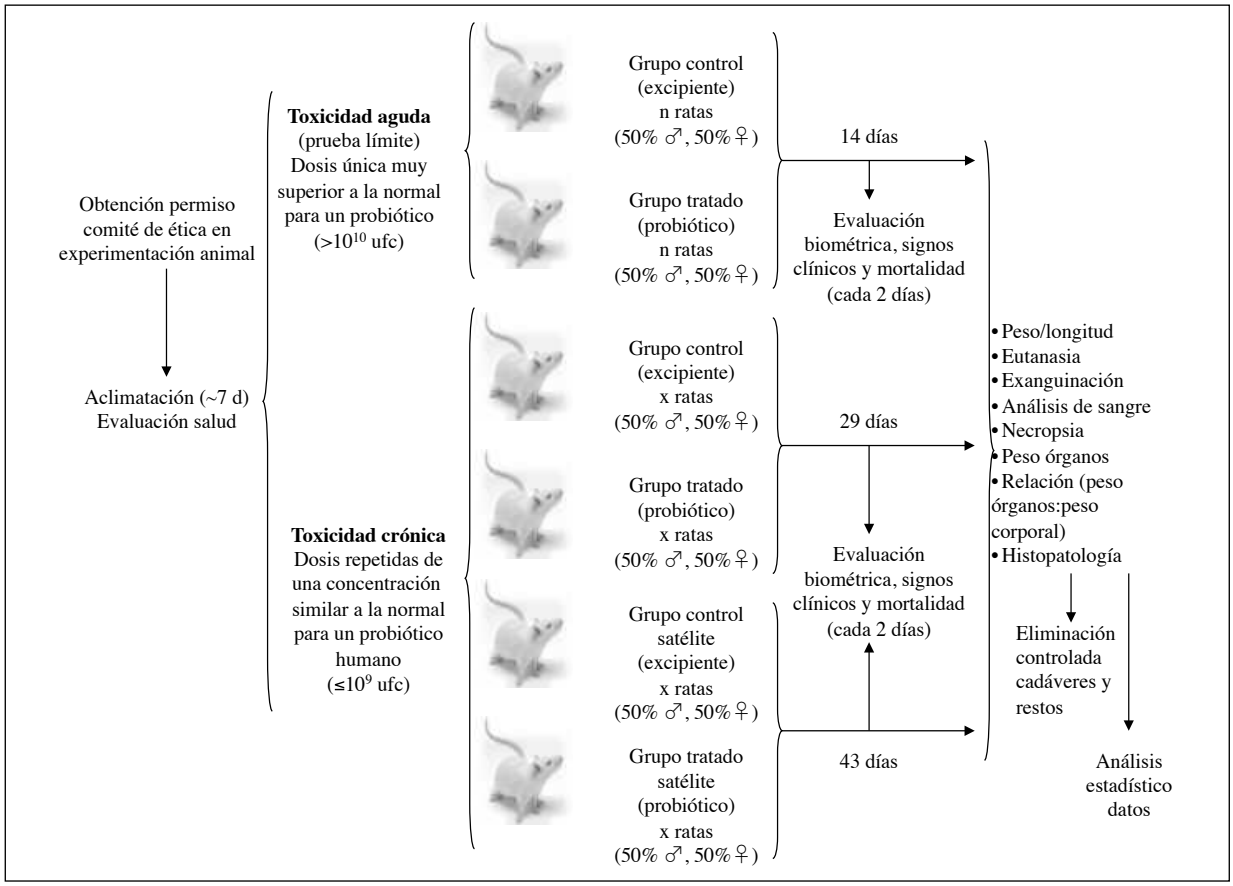

Fig. 5.—Diseño típico de los estudios de toxicidad oral en ratas.

periodo de tiempo prolongado[8,41,42]. Debido a esta baja o nula patogenicidad, algunos autores han recurrido al empleo de animales inmunodeprimidos o genéticamente predispuestos a padecer ciertas patologías para evaluar la seguridad de los probióticos, aunque esta estrategia ha sido cuestionada por la dificultad de extrapolar los resultados a una situación real. Otra alternativa a la que se ha recurrido para tratar de forzar la patogenicidad de los probióticos es su administración por rutas inusuales (intravenosa, intraperitoneal…). Nuevamente, son abordajes difíciles de validar ya que los resultados obtenidos no son, en absoluto, extrapolables a lo que sucede cuando la misma cepa se administra por vía oral.[42] Globalmente, aunque las distintas pruebas *in vitro*, *ex vivo* y en modelos animales pueden proporcionar información útil durante el proceso de selección de cepas, los únicos datos que permiten evaluar la seguridad de un probiótico de una forma directa son los que se obtienen en el curso de ensayos clínicos de fase 1, 2 y 3, correctamente diseñados y dirigidos específicamente a la población diana.

Funcionalidad

De forma similar a la evaluación de la seguridad, también existen numerosos ensayos *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* para detectar aquellas cepas que poseen propiedades funcionales relevantes. En mayor o menor medida, todos son útiles para disponer de la mayor información posible a la hora de hacer un escrutinio para seleccionar las cepas con mayor potencial probiótico pero, en la práctica, la mayor parte de los ensayos *in vitro* y *ex vivo* no permiten garantizar la funcionalidad de los microorganismos probióticos en un hospedador. Nuevamente, serán los ensayos clínicos (fase 2 y 3) los que determinen si un probiótico ejerce el efecto beneficioso que se esperaba sobre la población diana[43].

Desde el punto de vista funcional, los criterios de selección suelen incluir, por una parte, una serie de prerrequisitos para que la cepa pueda alcanzar su lugar de acción a una concentración adecuada (componente de la microbiota normal del hospedador diana, resistencia al tránsito por el aparato digestivo, capacidad de adherencia a células epiteliales…) y, por otra, propiedades que pudieran asociarse a un efecto beneficioso (producción de sustancias antimicrobianas, exclusión competitiva de patógenos, estimulación de la síntesis de mucinas, producción de ácidos grasos de cadena corta, síntesis de compuestos bioactivos determinados, neutralización o destoxificación de carcinógenos y de contaminantes abióticos, inmunomodulación, endocrinomodulación, neuromodulación…) (Fig. 6).

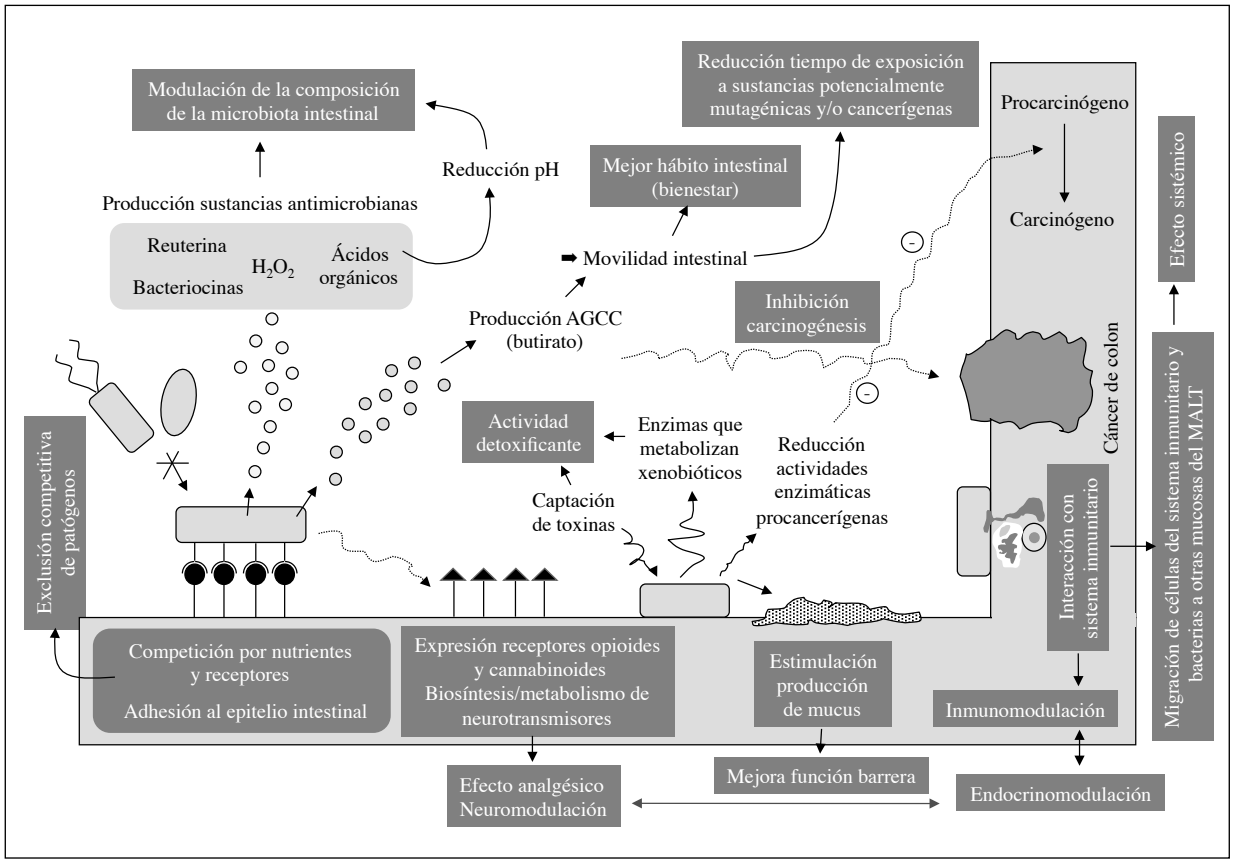

Fig. 6.—Representación esquemática de algunos de los efectos que pueden ejercer los probióticos en un hospedador, muchos de los cuales pueden estar interrelacionados.

Prerrequisitos

Tradicionalmente se recomendaba que las cepas probióticas se hubieran aislado de muestras de la misma especie a la que se le iban a administrar, basándose en la creencia de que las cepas de origen humano se implantarían o colonizarían nuestras mucosas con mayor facilidad que las aisladas de otras especies[44,45]. Sin embargo, el informe del grupo de trabajo FAO/OMS citado anteriormente, concluyó que no existe un criterio definido para el término "origen humano"[2] ya que, en muchos casos, resulta extraordinariamente difícil, sino imposible, conocer el origen último de una cepa (humano, animal, ambiental, alimentario…) a pesar de que haya sido aislada, por ejemplo, de una muestra de heces humanas. Igualmente señaló que existen diversos ejemplos de cepas probióticas que pertenecen a especies alóctonas pero que presentan efectos beneficiosos documentados en humanos. Por todo ello, concluyó que, globalmente, la propiedad "*origen humano*" no constituye un criterio relevante en la selección de probióticos para su uso en nuestra especie.

Para que las cepas probióticas que se administran oralmente puedan ejercer sus efectos beneficiosos deben resistir las condiciones ambientales del aparato digestivo y especialmente, el efecto microbiocida de la saliva, acidez gástrica, bilis, secreción pancreática… Debe tenerse en cuenta, además, que la composición de las distintas secreciones, el tiempo de vaciado gástrico o la motilidad intestinal pueden variar dependiendo de la edad y del estado de salud del hospedador. Para determinar la resistencia, se puede recurrir a métodos *in vitro* como la acidificación y/o la adición de sales biliares al medio de cultivo, al empleo de secreciones gastrointestinales obtenidas de individuos sanos o al uso de modelos dinámicos más sofisticados que simulan las condiciones del tracto digestivo en su conjunto[46]. La supervivencia de los microorganismos candidatos a ser probióticos también se puede estudiar *in vivo* usando técnicas de intubación intestinal y biopsias del colon o analizando su presencia en las heces de personas o animales que los hayan ingerido, recurriendo a técnicas moleculares que permitan reconocerlas entre los miembros de la microbiota autóctona del anfitrión[47].

Un factor importante para la supervivencia de bacterias probióticas es el substrato o matriz con el que se vehiculan[48-50]. Desde hace varios años se trabaja activamente en sistemas que permitan la máxima protección de las cepas probióticas durante su paso por el estómago y el duodeno, de tal manera que este criterio no suponga una limitación real.

Lo mismo es aplicable para la administración de probióticos por otras vías clásicas (vaginal) o emergentes (colirio oftalmológico, solución ótica, aplicación sobre la piel…) con relación a las condiciones específicas de cada ecosistema.

Cualidades probióticas

Las propiedades funcionales por las que se seleccione un probiótico pueden ser tan amplias como nos permita nuestra imaginación, la tecnología y el presupuesto disponible. Por este motivo, la intención de este apartado no es la de ofrecer un catálogo completo de características potencialmente probióticas sino destacar la diversidad y complejidad de las alternativas existentes. En principio, es necesario saber el uso que se dará al probiótico y sobre qué población se pretende aplicar; de esta manera, se seleccionarán las cepas pertinentes mediante las pruebas más adecuadas para poner de manifiesto las propiedades relevantes que permitan alcanzar el objetivo final.

El uso actual de los organismos probióticos pretende, en más del 90% de los casos, prevenir o erradicar las infecciones en las cavidades accesibles desde el exterior, principalmente, las del tracto digestivo y la vagina. Dentro de las primeras, se utilizan en el control de la diarrea, sea esta de origen infeccioso o iatrogénico, el estreñimiento, la intolerancia a la lactosa, la pouchitis, la enterocolitis necrotizante, el cólico del lactante, el síndrome del intestino irritable, etc. A nivel ginecológico se usan en vaginosis y vulvovaginitis de cualquier etiología, en la prevención de recidivas de dichos cuadros, en la prevención de la infección urinaria, en la corrección de los trastornos asociados a la menopausia y en las mastitis.

El antagonismo microbiano de los probióticos depende, en parte, de su capacidad de adherencia a las mucosas, aunque, como se ha comentado anteriormente, la adhesión a las células epiteliales es una propiedad controvertida. Sin embargo, es una característica clave para que una cepa pueda evitar el asentamiento de un patógeno potencial. En el proceso están implicados diversos componentes superficiales, incluyendo proteínas de unión al mucus, y algunas estructuras específicas, como los pili descritos en algunas cepas de *Lactobacillus rhamnosus*. Adicionalmente, la capacidad de auto-agregación puede aumentar sustancialmente la capacidad de colonización en aquellos ecosistemas en los que los probióticos tienen un tiempo de residencia corto.

El efecto protector de los probióticos viene también determinado por la generación de compuestos antimicrobianos. El más universal es el ácido (láctico, acético, propiónico y/o butírico) que resulta del metabolismo fermentativo de los azúcares, dado que la mayoría de los organismos probióticos son anaerobios aerotolerantes o estrictos. También juega un papel la producción de bacteriocinas, que son péptidos que producen poros en la membrana de las bacterias susceptibles o inducen su lisis, siendo, por tanto, bactericidas. Por último, la generación de agua oxigenada es un carácter muy demandado en los candidatos a probióticos vaginales, porque juega un papel capital en la protección de dicha cavidad.

Otra propiedad relevante de algunas cepas probióticas es la de coagregar con ciertos patógenos y, en conse-

cuencia, impedir su acceso a las mucosas. El efecto antimicrobiano de la congregación es particularmente intenso cuando la misma cepa es capaz de producir sustancias antimicrobianas que inhiban al patógeno en cuestión[51].

La integridad de las mucosas está influenciada por muchos factores, incluyendo su permeabilidad, la composición de las mucinas, el estrés oxidativo y el recambio de las células de la mucosa. Diversos estudios han demostrado la capacidad de algunos probióticos para mantener o mejorar la función de barrera intestinal mediante la modificación de la expresión de los genes que codifican proteínas de las zonas de oclusión (ocludina, ZO-1, claudina-1, claudina-4, JAM-A…), la modificación de la composición de monosacáridos de las mucinas, el aumento del grosor de la capa de mucus, la inhibición de los procesos de apoptosis y/o la promoción de la diferenciación celular y de actividades citoprotectoras, incluyendo la reducción del estrés oxidativo[52].

El tejido linfoide asociado a las mucosas representa la parte mayoritaria del sistema inmunitario y su interacción con la microbiota constituye uno de los pilares de la salud. De hecho, los procesos de disbiosis de la microbiota endógena alteran las respuestas inmunitarias y contribuyen a la aparición de enfermedades infecciosas, inflamatorias y autoinmunes. Por ello, no es de extrañar que la capacidad de inmunomodulación sea una de las actividades que más se hayan asociado a los probióticos. En este sentido, se ha evaluado el efecto de diversas cepas sobre los distintos componentes tanto de la inmunidad innata (células NK, células dendríticas, macrófagos, células epiteliales…) como de la adaptativa o adquirida (linfocitos Th1, Th2, Th17, Treg, Tc y B). Estos estudios abordan la proliferación y expresión génica de diversas poblaciones de células del sistema inmunitario y la producción de un amplio espectro de inmunoglobulinas, citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento por parte de las mismas[53]. No obstante, el proceso de selección tiene que tener en cuenta que el tipo de respuesta inmunológica asociada a un probiótico (activación, desviación, regulación, supresión) puede ser positiva o negativa dependiendo del estado del hospedador. En consecuencia, para modular una inmunopatía en beneficio del hospedador se debe tener el mayor conocimiento posible sobre los mecanismos responsables de la patología y sobre las respuestas que se pueden esperar del probiótico. Por ello, la cepa debe ser cuidadosamente seleccionada dependiendo de la población a la que vaya dirigida.

La neuromodulación es uno de los efectos más prometedores en el campo de los probióticos. El tracto gastrointestinal humano contiene una red nerviosa muy compleja, denominada sistema nervioso entérico, cuyo objetivo principal es la regulación de las funciones fisiológicas y la armonización de la comunicación entre el cerebro, el tracto gastrointestinal, el sistema endocrinológico y el sistema inmunitario[54]. Las alteraciones de este "eje intestino-cerebro" suelen asociarse a ciertas patologías psiquiátricas (desde la ansiedad y la depresión hasta el autismo) e intestinales (síndrome de intestino irritable) y a la presencia de una microbiota aberrante en los individuos que las padecen[55,56]. En este sentido, se considera que los probióticos pueden tener un impacto importante para estas poblaciones aunque, nuevamente, será necesaria una cuidadosa selección de las cepas (interacción con receptores nerviosos, efectos en la biosíntesis y metabolismo de neurotransmisores…) y estudios que revelen la magnitud, mecanismos y relevancia clínica de los posibles efectos beneficiosos.

Existe un amplio y creciente espectro de pruebas fenotípicas para poner de manifiesto propiedades probióticas mediante procedimientos *in vitro*. Además, la disponibilidad de un análisis funcional del genoma empleando las tecnologías de secuenciación de nueva generación[7,57] y las nuevas micromatrices funcionales[58] han revolucionado el descubrimiento de propiedades potencialmente probióticas dentro de una cepa. Este abordaje permite un detallado análisis de genes implicados en la colonización, persistencia, interacción y señalización dentro del hospedador humano y, en consecuencia, una selección rápida de cepas con propiedades muy específicas.

Ensayos in vivo

Los ensayos *in vivo* ofrecen la ventaja de poder aplicar una amplia gama de técnicas (desde las –ómicas hasta las avanzadas de imagen, pasando por las técnicas bioquímicas, de microbiología molecular y de biología celular) para intentar dilucidar los mecanismos de acción e identificar marcadores relacionados con los efectos beneficiosos (y, eventualmente, con los posibles efectos adversos) de un probiótico.

El empleo de modelos animales permite estudiar muestras, tejidos ý órganos a los que, por motivos éticos, es imposible acceder en ensayos clínicos humanos, por lo que siguen siendo imprescindibles para determinar mecanismos de acción y marcadores biomédicos. Como ya se indicó al hablar de los aspectos de seguridad de los probióticos, existen múltiples modelos que se pueden utilizar para poner de manifiesto la funcionalidad de los probióticos *in vivo*, aunque las diferencias anatómicas y fisiológicas con nuestra especie hace que sean los ensayos clínicos con personas los que finalmente determinen el grado de eficacia del probiótico para la diana elegida. Los estudios descriptivos en los que se comparan muestras de individuos sanos y enfermos son extremadamente útiles para determinar los marcadores que hay que incluir en los ensayos clínicos, cuyo objetivo debe ser determinar si realmente se produce el "efecto beneficioso" incluido en la definición de probiótico y, en ese caso, cuál es su magnitud.

Los ensayos clínicos en los que se evalúa la eficacia son, típicamente, los de fase 2 y 3 (Tabla I). Los estudios de fase 2 evalúan la eficacia de un probiótico frente a un placebo, preferentemente en formato de do-

Tabla I
Aspectos que hay que tener en cuenta para la realización de un ensayo clínico humano

Selección de la población diana
Selección del tipo de ensayo
Cálculo de la muestra (sobre la hipótesis de partida) para que tenga significancia estadística
Disponibilidad del probiótico tal y como se administraría realmente a la población a las que va destinado (concentración, excipiente, posología...)
Documentación (para presentar al Comité de Ética y para el seguimiento del ensayo):
Protocolo
Criterios de inclusión y de exclusión
Hoja de información al paciente y consentimiento informado
Memoria económica
Ficha técnica del producto que se va a administrar
CV del investigador principal (uno por cada centro participante)
Idoneidad instalaciones
Idoneidad investigador principal y colaboradores
Compromiso investigador principal
Póliza de seguros
Carta para fiscalía de menores (en el caso de que los participantes lo sean)
Procedimiento y material utilizado para el reclutamiento de los participantes
Cuaderno de recogida de datos (papel, formato electrónico) de los participantes
Diario de los participantes (en caso necesario)
Instrucciones para la recogida y conservación de las muestras biológicas
Registros de acontecimientos adversos (AA) y acontecimientos adversos graves (AAG)
Registro de abandono prematuro del estudio
Registro de muestras biológicas recogidas por el participante o personal sanitario
Registro de muestras biológicas recibidas en el laboratorio
Registro de control de temperaturas/tiempos (transporte/almacenamiento del probiótico y de las muestras biológicas)
Procedimiento de aleatorización
Sobres de ruptura de ciego
Permiso del Comité de Ética
Contrato con el/los hospital(es)/centro(s) de atención primaria
Seguimiento/comunicación con el Comité de Ética
Alta del estudio en base de datos de ensayos clínicos (ClinicalTrials.gov o similar)

ble ciego, y recogen los posibles efectos adversos. El resultado deseable sería una mejora biológica y estadísticamente significativa en alguno(s) de los siguientes aspectos: bienestar o calidad de vida, reducción del riesgo de enfermedad, recuperación más rápida, menor sintomatología y/o aumento del tiempo entre recurrencias. Se necesitan más evidencias clínicas derivadas de este tipo de estudios para que los probióticos (especie, cepa, formulación, dosis, aplicación específica para la que ha mostrado eficacia) ganen credibilidad entre los consumidores y, especialmente, entre la comunidad sanitaria, independientemente de que se comercialicen en forma de alimentos o presentaciones medicamentosas.

Los estudios de fase 3 evalúan la eficacia de un probiótico frente a la terapia estándar empleada para prevenir o tratar una enfermedad determinada[59]. En general, son ensayos ciegos y aleatorizados en los que el tamaño de la muestra debe ser calculado cuidadosamente y en los que se deben incluir los posibles efectos adversos e incidencias, una evaluación de la relación riesgo/beneficio y una serie de controles para comprobar la calidad del ensayo. El problema de los estudios de fase 3 es que son muy caros, por lo que tienden a restringirse a aquellos casos en los que parece más evidente que puedan reemplazar o complementar a los medicamentos convencionales. Un ejemplo claro de ello es el tratamiento de las enfermedades infecciosas, debido a la incidencia creciente de la resistencia a antibióticos entre los microorganismos patógenos.

El grupo de trabajo de la FAO y la OMS recomendó la publicación en revistas científicas o médicas reconocidas internacionalmente, tanto de la documentación que demuestre el carácter probiótico de una cepa (incluyendo la evidencia de los ensayos clínicos) como la de aquellos casos en los que se obtengan resultados negativos[2].

Aspectos tecnológicos

El hecho de que una cepa bacteriana crezca bien en condiciones de laboratorio (pequeños volúmenes, me-

dios de cultivo complejos…) no significa, ni mucho menos, que vaya a suceder lo mismo en condiciones industriales. En este sentido, las empresas que comercializan o desean comercializar probióticos se enfrentan a dos retos tecnológicos importantes: (1) la necesidad de obtener una biomasa bacteriana muy elevada de forma económicamente rentable y (2) la necesidad de que la concentración de bacterias viables necesaria para ejercer el efecto beneficioso se mantenga hasta el final de la vida útil del producto.

Ambos aspectos están relacionados con las características fisiológicas de cada cepa, por lo que las condiciones deben establecerse caso a caso. Además, la viabilidad también depende del formato en el que se vayan a administrar las bacterias ya que, por ejemplo, la vida útil de los productos lácteos probióticos refrigerados es notablemente más corta que la de los productos liofilizados que se venden con una presentación medicamentosa (cápsula, polvo…). A su vez, dentro de los productos liofilizados existen diversos parámetros (concentración de oxígeno, humedad, temperatura de almacenamiento…) y formatos (microencapsulación, recubrimientos...) que juegan un papel importante en la estabilidad del producto. En cualquier caso, resulta inevitable que una cierta proporción de bacterias mueran o resulten dañadas durante el proceso productivo o el almacenamiento del preparado probiótico y, en este sentido, las empresas suelen recurrir a la sobredosificación inicial, de tal manera que se conserve la dosis eficaz hasta el final de su vida útil.

Las empresas que se dedican al desarrollo de probióticos (incluyendo el escalado industrial y los estudios de viabilidad) suelen organizar su trabajo en forma de etapas con un grado creciente de dificultad en las que es absolutamente necesario que se alcancen los objetivos de una fase para poder pasar a la siguiente. La primera etapa suele consistir en: (a) el depósito de la cepa en el banco de la empresa y la comprobación de su identidad (especie) y (b) la evaluación de su capacidad fermentativa (producción, limosidad, morfología…) a pequeña escala en biorreactores o mini-fermentadores que simulen las condiciones de los fermentadores de producción (temperatura, pH, agitación…).

La segunda fase consiste en el escalado a producciones en planta piloto para evaluar la productividad antes y después del proceso de liofilización y el estudio de la estabilidad a los tres meses. En general, el objetivo es que el microorganismo permanezca viable (pérdida ≤ 0,2 log ufc) en una mezcla con celulosa (u otro excipiente) envasada en sobres de papel de aluminio, almacenados a una actividad de agua constante (<0,2) y a 25°C. En la siguiente fase, se determina el flujo de trabajo para que el probiótico entre en la fase de fabricación. Tras la primera producción, se define el precio sobre la base del perfil del producto (ufc/g) y se completa la validación analítica de la mezcla. El objetivo final es la liberación del producto mientras se continúan los estudios de estabilidad a largo plazo (dos años), tanto en refrigeración como a temperatura ambiente (~25ºC). En general, se pretende que el procedimiento permita disponer de un producto con una elevada concentración (>5 x 10^{10} ufc/g) que, una vez dosificado en los envases finales, tenga una vida útil prolongada a temperatura ambiente. En los casos en los que no es posible, el producto se tiene que conservar en refrigeración hasta su venta.

En cualquier caso, resulta imprescindible la aplicación de los principios del sistema APPCC (Análisis de Peligros y Puntos de Control Críticos) y de buenas prácticas de fabricación para garantizar que los preparados probióticos llegan al consumidor con la máxima calidad posible; por ejemplo, es importante descartar la contaminación por otros microorganismos y el mantenimiento de la viabilidad de las cepas y la estabilidad de los excipientes hasta, al menos, el final del periodo de vida útil del preparado. Es recomendable, asimismo, que las empresas que comercializan probióticos hagan controles de los productos de la competencia en el marco de la protección de cepas patentadas y de los derechos de propiedad industrial.

Cuando una empresa introduce un probiótico en el mercado, debería asegurar que está bien etiquetado. En este sentido, el comité de expertos de la FAO/WHO[2] recomendó que se recoja la siguiente información en la etiqueta de cualquier producto que contenga probióticos: a) género, especie y cepa; b) dosis mínima de microorganismos viables al final de la vida útil; c) cantidad necesaria de producto que se debe consumir para conseguir la dosis efectiva; d) efecto(s) beneficioso(s); e) condiciones de almacenamiento y f) forma de contacto con el servicio de atención al cliente.

Finalmente, es de esperar que el acúmulo de evidencias científicas obtenidas desde la primera evaluación por EFSA de las alegaciones de salud de productos probióticos, unida a una presentación adecuada de las mismas, permita la admisión de los preparados que los contienen y que cumplen con las exigencias publicadas en su día[60].

Aspectos comerciales

La opinión del departamento comercial de una empresa alimentaria o farmacéutica resulta fundamental a la hora de tomar una decisión sobre el desarrollo industrial y la eventual puesta en el mercado de un probiótico. Las funciones de dicho departamento incluyen, entre otras, los estudios de mercado (que permiten detectar aquellas necesidades de los consumidores, cuya resolución pueda ser rentable), la promoción y publicidad del producto, las ventas y el servicio post-venta. Normalmente, son actividades que implican una interacción constante con los departamentos de producción, financiero y de recursos humanos.

En general, se suelen identificar tres figuras con relación a la decisión de compra: el *prescriptor* (profesional que recomienda el producto y cuya opinión es valorada por el consumidor; por ejemplo, el médico, el veterina-

rio o el farmacéutico), el *comprador* (persona que adquiere el producto pero que no tiene por qué coincidir con el consumidor; por ejemplo, los padres que compran un preparado probiótico indicado para cólico del lactante) y *el consumidor*. Por otra parte, resulta importante tener en cuenta la segmentación de mercado, bien por género (por ejemplo, los probióticos para infecciones vaginales o para mastitis), edad (probióticos pediátricos o para la tercera edad), nivel de ingresos, etc.

Las campañas de marketing básicamente se suelen enfocar, como en cualquier otro tipo de producto, en distintos elementos: sus características (incluyendo el envase), el precio, la distribución o disponibilidad y el servicio post-venta. Normalmente, el ciclo de vida de un producto comprende las etapas de *introducción o lanzamiento* (salida al mercado de un nuevo preparado; se producen ventas pero el saldo puede llegar a ser negativo ya que implica un gasto de promoción notable), *crecimiento* (el producto empieza a ser conocido, las ventas experimentan un fuerte desarrollo y los beneficios también) y *madurez* (las ventas se estabilizan y los beneficios hacen lo propio). Eventualmente, puede existir una etapa de *declive* o *saturación* (caída considerable de ventas y beneficios), durante la que se puede intentar relanzar el producto introduciendo alguna innovación.

La determinación del precio se puede basar en los costes, en la elasticidad de la demanda, en los precios que fija la competencia para productos similares, etc. En general, los preparados probióticos disponibles en farmacias y parafarmacias no están cubiertos por el Sistema Público de Salud por lo que suelen tener un coste final elevado para el comprador (~1 €/cápsula, sobre u óvulo). Este hecho propicia que un porcentaje relativamente elevado de usuarios potenciales no tenga acceso a ellos, especialmente cuando se requiere un tratamiento prolongado. En el futuro, la mayor disponibilidad de resultados basados en ensayos clínicos bien diseñados y ciertos cambios normativos podrían hacer variar la situación.

La política de distribución permite que el producto se encuentre en el lugar y momento adecuados para poder ser adquirido por el consumidor. En general, el proceso que sigue el producto desde que sale de la cadena de producción hasta que llega a manos del cliente es el siguiente: almacenamiento del producto, distribución física, facturación y cobro. El canal de distribución es cualquiera de los medios (establecimientos alimentarios, farmacias, parafarmacias...) que se utilizan para conseguir que los productos recorran el camino desde el productor hasta el consumidor.

La promoción del producto incluye la publicidad en diversos medios, especialmente en revistas especializadas y en el lugar de venta y la visita a los prescriptores por parte de representantes de la empresa. En este sentido, es también importante la promoción de la interacción entre los investigadores y clínicos que aislaron y evaluaron la(s) cepa(s) probiótica(s) y los prescriptores, a través de reuniones o sesiones en congresos. Esto les facilitará una información de primera mano sobre las bondades del preparado, que probablemente se percibirá como menos sesgada que la ofrecida por los representantes de la compañía comercializadora. Por último, existe la posibilidad de la divulgación para el público en general, aunque en este caso parece más apropiado suministrar información sobre la microbiota de ocupación, sus funciones y los beneficios que aporta, de modo que el uso de probióticos se perciba como lo que es, una aplicación racional de dichos beneficios en aras de una mejor salud pública.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido auspiciado por la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos (SEPyP) y su contenido se corresponde básicamente con el de la ponencia homónima presentada en el VI Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud. Evidencia Científica (SEPyP, Oviedo, 5 y 6 de febrero de 2015). El autor desea expresar su mayor agradecimiento a Juan Evaristo Suárez (Área de Microbiología e Instituto de Biotecnología, Universidad de Oviedo; miembro de la junta directiva de la SEPyP) por revisar críticamente el manuscrito y mejorar sustancialmente tanto su forma como su fondo.

Referencias

1. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. *WHO* 2001.
2. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. *FAO* 2002.
3. Guarner F, Requena T, Marcos A. Consensus statements from the Workshop "Probiotics and Health: Scientific evidence". *Nutr Hosp* 2010; 25: 700-704.
4. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11: 506-514.
5. EFSA. Scientific Opinion on the maintenance of the list of QPS biological agents intentionally added to food and feed (2013 update). *EFSA J* 2013; 11: 3449.
6. Huys G, Vancanneyt M, D'Haene K, Vankerckhoven V, Goossens H, Swings J. Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res Microbiol* 2006; 157: 803-810.
7. Douillard FP, de Vos WM. Functional genomics of lactic acid bacteria: from food to health. *Microb Cell Fact* 2014; 13 Suppl 1: S8.
8. Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannsperger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes* 2010; 1: 164-185.
9. Cannon JP, Lee TA, Bolanos JT, Danziger LH. Pathogenic relevance of *Lactobacillus*: a retrospective review of over 200 cases. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2005; 24: 125-126.
10. Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr* 2006; 83: 1256-1264.

11. Salminen MK, Tynkkynen S, Rautelin H, Saxelin M, Vaara M, Ruutu P, et al. *Lactobacillus bacteremia* during a rapid increase in probiotic use of *Lactobacillus rhamnosus* GG in Finland. *Clin Infect Dis* 2002; 35: 1155-1160.
12. Borriello SP, Hammes WP, Holzapfel W, Marteau P, Schrezenmeir J, Vaara M, et al. Safety of probiotics that contain lactobacilli or bifidobacteria. *Clin Infect Dis* 2003; 36: 775-780.
13. Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, Gueguen M. Safety assessment of dairy microorganisms: the Lactobacillus genus. *Int J Food Microbiol* 2008; 126:278-285.
14. Rautio M, Jousimies-Somer H, Kauma H, Pietarinen I, Saxelin M, Tynkkynen S, et al. Liver abscess due to a *Lactobacillus rhamnosus* strain indistinguishable from *L. rhamnosus* strain GG. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 1159-1160.
15. Mackay AD, Taylor MB, Kibbler CC, Hamilton-Miller JM. *Lactobacillus endocarditis* caused by a probiotic organism. *Clin Microbiol Infect* 1999; 5: 290-292.
16. Hennequin C, Kauffmann-Lacroix C, Jobert A, Viard JP, Ricour C, Jacquemin JL, et al. Possible role of catheters in *Saccharomyces boulardii* fungemia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19: 16-20.
17. Oggioni MR, Pozzi G, Valensin PE, Galieni P, Bigazzi C. Recurrent septicemia in an immunocompromised patient due to probiotic strains of *Bacillus subtilis*. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 325-326.
18. Spinosa MR, Braccini T, Ricca E, De Felice M, Morelli L, Pozzi G, et al. On the fate of ingested *Bacillus* spores. *Res Microbiol* 2000; 151: 361-368.
19. Vesterlund S, Vankerckhoven V, Saxelin M, Goossens H, Salminen S, Ouwehand AC. Safety assessment of *Lactobacillus* strains: presence of putative risk factors in faecal, blood and probiotic isolates. *Int J Food Microbiol* 2007; 116: 325-331.
20. Huys G, Botteldoorn N, Delvigne F, De Vuyst L, Heyndrickx M, Pot B, et al. Microbial characterization of probiotics-advisory report of the Working Group 8651 Probiotics of the Belgian Superior Health Council (SHC). *Mol Nutr Food Res* 2013; 57: 1479-504.
21. Perez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, Segura-Roggero I, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics* 2007; 119: e724-e732.
22. Rodríguez JM. The origin of human milk bacteria: is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv Nutr* 2014; 5: 779-784.
23. Franz CM, Muscholl-Silberhorn AB, Yousif NM, Vancanneyt M, Swings J, Holzapfel WH. Incidence of virulence factors and antibiotic resistance among enterococci isolated from food. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 4385-4389.
24. Eaton TJ, Gasson MJ. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 2001; 67: 1628-1635.
25. Duc le H, Hong HA, Barbosa TM, Henriques AO, Cutting SM. Characterization of *Bacillus* probiotics available for human use. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 2161-2171.
26. ISAPP. Annual Report. International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics. http://www.isapp.net/Portals/0/docs/Annual%20Reports/annual_report_2003.pdf, 2003.
27. Connolly E, Lönnerdal B. d(–)-lactic acid-producing bacteria: safe to use in infant formulas. *Nutrafoods* 2004; 3: 37-49.
28. Connolly E, Abrahamsson T, Bjorksten B. Safety of d(–)-lactic acid producing bacteria in the human infant. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2005; 41: 489-492.
29. Uribarri J, Oh MS, Carroll HJ. D-lactic acidosis. A review of clinical presentation, biochemical features, and pathological mechanisms. *Medicine* 1998; 77: 73-82
30. Hove H. Lactate and short chain fatty acid production in the human colon: implications for D-lactic acidosis, short bowel syndrome, antibiotic-associated diarrhoea, colon cancer and inflammatory bowel disease. *Dan Med Bull* 1998; 45: 15-33
31. EFSA. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importante. *EFSA J* 2012; 10: 2740
32. Klare I, Konstabel C, Müller-Bertling S, Reissbrod R, Huys G, Vancanneyt M, et al. Evaluation of new broth media for microdilution antibiotic susceptibility testing of lactobacilli, pediococci, lactococci, and bifidobacteria. *Appl Environl Microbiol* 2005; 71: 8982-8986.
33. Klare I, Konstabel C, Werner G, Huys G, Vankerckhoven V, Kahlmeter G, et al. Antimicrobial susceptibilities of *Lactobacillus*, *Pediococcus* and *Lactococcus* human isolates and cultures intended for probiotic or nutritional use. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 900-912.
34. O'Hara AM, Shanahan F The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep* 2006; 7: 688-693.
35. Kalliomaki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361: 1869-1871.
36. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, Lukás M, Fixa B, Kascák M, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004; 53: 1617-1623.
37. Moneret-Vautrin DA, Morisset M, Cordebar V, Codreanu F, Kanny G. Probiotics may be unsafe in infants allergic to cow's milk. *Allergy* 2006; 61: 507-508.
38. Lee TT, Morisset M, Astier C, Moneret-Vautrin DA, Cordebar V, Beaudouin E, et al. Contamination of probiotic preparations with milk allergens can cause anaphylaxis in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 746-747.
39. Patterson JK, Lei XG, Miller DD. The pig as an experimental model for elucidating the mechanisms governing dietary influence on mineral absorption. *Exp Biol Med* 2008; 233: 651-654.
40. Pang X, Hua X, Yang Q, Ding D, Che C, Cui L, et al. Inter-species transplantation of gut microbiota from human to pigs. *ISME J* 2007; 1: 156-162.
41. Momose H, Igarashi M, Era T, Fukuda Y, Yamada M, Ogasa K. Toxicological studies on *Bifidobacterium longum* BB536. *Appl Pharmacol* 1979; 17: 881-887.
42. Ishibashi N, Yamazaki S. Probiotics and safety. *Am J Clin Nutr* 2001; 73: 465-470.
43. Reid R, Jass J, Sebulsky MT, McCormick JK. Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin Microbiol Rev* 2003; 16: 658–672.
44. Holzapfel WH, Haberer P, Snell J, Schillinger U, Huis in't Veld J. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998; 41: 85-101.
45. Ouwehand AC, Kirjavainen PV, Shortt C, Salminen S. Probiotics: mechanisms and established effects. *Int Dairy J* 1999; 9: 43-52.
46. Marteau P, Minekus M, Havenaar R, Huis in't Veld JHJ. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and mall intestine: validation and the effects of bile. *J Dairy Sci* 1997; 80: 1031-1037.
47. Fernández L, Marín ML, Langa S, Martín R, Reviriego C, Fernández A, et al. A novel genetic label for detection of specific probiotic lactic acid bacteria. *Food Sci Tech Int* 2004; 10: 101-108.
48. Saxelin M, Ahoras M, Salminen S. Dose response on the faecal colonization of *Lactobacillus* strain GG administered in two different formulations. *Microbiol Ecol Health Dis* 1993; 6: 119-122.
49. Saxelin M, Pessi T, Salminen S. Fecal recovery following oral administration of *Lactobacillus* strain GG (ATCC 53103) in gelatine capsules to healthy volunteers. *Int J Food Microbiol* 1995; 25: 199-203.
50. Charteris W, Kelly P, Morelli L, Collins. Development and application of an *in vivo* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *J Appl Microbiol* 1998; 84: 759-768.
51. Boris S, Suárez JE, Vázquez F, Barbés C. Adherence of human vaginal lactobacilli to vaginal epithelial cells and interaction with uropathogens. *Infect Immun* 1998; 66: 1985-1989.

52. Howarth GS, Wang H. Role of endogenous microbiota, probiotics and their biological products in human health. *Nutrients* 2013; 5: 58-81.
53. Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: homeostasis and immunopathology. *Nutrients* 2013; 5: 1869-1912.
54. Mayer EA. Gut feelings: the emerging biology of gut-brain communication. *Nat Rev Neurosci* 2011; 12: 453-466.
55. Critchfield JW, Van Hemert S, Ash M, Mulder L, Ashwood P. The potential role of probiotics in the management of childhood autism spectrum disorders. *Gastroenterol Res Pract* 2011; 2011: 161358.
56. Saulnier DM, Ringel Y, Heyman MB, Foster JA, Bercik P, Shulman RJ, et al. The intestinal microbiome, probiotics and prebiotics in neurogastroenterology. *Gut Microbes* 2013; 4: 17-27.
57. Saulnier DM, Santos F, Roos S, Mistretta TA, Spinler JK, Molenaar D, et al. Exploring metabolic pathway reconstruction and genome-wide expression profiling in *Lactobacillus reuteri* to define functional probiotic features. *PLoS One* 2011; 6:e18783.
58. Tu Q, He Z, Li Y, Chen Y, Deng Y, Lin L, et al. Development of HuMiChip for functional profiling of human microbiomes. *PLoS One* 2014; 9: e90546.
59. Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 2010; 50: 1551-1558.
60. EFSA. Guidance on the scientific requirements for health claims related to gut and immune function. *EFSA J* 2011; 9: 1984.

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8706

COMUNICACIONES ORALES

Urinary metabolomic fingerprinting after consumption of a probiotic strain in women with mastitis

Rosa Vázquez-Fresno[1,2], Rafael Llorach[1,2], Jelena Marinic[3], Sara Tulipania[2,4], Mar Garcia-Aloy[1,2], Irene Espinosa-Martos[2,5], Esther Jiménez[2,5], Juan Miguel Rodríguez[2,5] and Cristina Andres-Lacueva[1,2]

[1]Biomarkers and Nutrimetabolomic Lab., Nutrition and Food Science Department, XaRTA, INSA, Torribera Campus, Pharmacy Faculty, University of Barcelona, Av. Joan XXIII s/n, 08028 Barcelona, Spain. [2]INGENIO-CONSOLIDER Programme, Fun-c-food CSD2007-063, Ministry of Science and Innovation, Barcelona, Spain. [3]Department of Chemistry and Biochemistry, School of Medicine, University of Rijeka, Brace Brancetta 20, 51 000 Rijeka, Croatia. [4]Biomedical Research Institute (IBIMA), Service of Endocrinology and Nutrition, Málaga Hospital Complex (Virgen de la Victoria), Campus de Teatinos s/n, University of Málaga, Málaga 29010, Spain. [5]Department of Nutrition, Food Science and Technology, Complutense University of Madrid, Avda. Puerta de Hierro, s/n, 28040 Madrid, Spain.

Abstract

Probiotics can potentially influence systemic health with several mechanisms of action. Mastitis is a common disease during lactation with an incidence of up to 33% of lactating mothers. This condition is usually defined as an inflammation of the mammary gland, characterized by a variety of local and, sometimes, systemic symptoms, being staphylococci and streptococci the main aetiological agents. In this context, some probiotic lactobacilli strains isolated from breast milk appear to be particularly effective for treating mastitis and, therefore, constitute an attractive alternative to antibiotherapy. A 1H NMR-based metabolomic approach was applied for identifying the metabolomics changes occurring in urinary metabolome as a reflect of overall biochemical effects after consuming a probiotic strain (Lactobacillus salivarius PS2) in women with mastitis. 24 h urine of women with lactational mastitis was collected at baseline and after 21 days of probiotic (PB) administration. Multivariate analysis (OSC-PLS-DA and hierarchical clustering) showed metabolome differences after PB treatment. The discriminant metabolites detected at baseline were lactose, ibuprofen and acetaminophen (two pharmacological drugs commonly used for mastitis pain), while, after PB intake, creatine and the gut microbial co-metabolites hippurate and TMAO were detected. In addition, a voluntary desertion of the pharmacological drugs ibuprofen and acetaminophen was observed after probiotic administration. The application of NMR-based metabolomics enabled the identification of the overall effects of probiotic consumption among women suffering from mastitis and highlighted the potential of this approach in evaluating the outcomes of probiotics consumption. To our knowledge, this is the first time that this approach has been applied in women with mastitis during lactation.

Adaptación metabólica de la microbiota del colon a la dieta

Mego M[1], Bendezú A[1], Merino X[2], Méndez S[1], Accarino A[1], Monclus E[3], Izquierdo M[3], Navazo I[3], Gibson GR[4], Guarner F[1] y Azpiroz F[1].

[1]Instituto de recerca, Hospital universitario Vall d'Hebron; Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (Ciberehd); Departamento de Medicina, Universidad Autónoma de Barcelona. [2]Departamento de Radiología, Hospital Universitari Vall d'Hebron. [3]Instituto de Visualización, Realidad virtual e Interacción, Universidad Politécnica de Cataluña, Barcelona, España. [4]Department of Food Biosciences, The University of Reading, Reading. UK.

Resumen

Antecedentes. Recientemente demostramos que una dieta rica en residuos no absorbibles, fermentables por las bacterias colónicas, aumenta a corto plazo la producción de gas y produce síntomas digestivos. Al contrario, está descrito que algunos prebióticos, disminuyen estos síntomas.

Hipótesis. Prebióticos inducen un proceso de adaptación de la microbiota, que modifica su metabolismo y mejora su tolerancia.

Material y métodos. En 20 sujetos sanos se administró un prebiótico (Bimuno, prebiotic powder, Clasado, UK; 2.8 mg/d) tres semanas; además de una dieta tres días antes, al principio y final del tratamiento. Se midió: número de evacuaciones anales de gas diarias, volumen de gas evacuado durante cuatro horas tras comida prueba y volumen del contenido colónico a través de resonancia abdominal.

Resultados. Antes del tratamiento los sujetos tuvieron 12+1 evacuaciones anales de gas y evacuaron 160+17 mL de gas. Al principio del tratamiento aumentó el número de evacuaciones de gas (18+2 veces; p=0,006) y el volumen de gas evacuado (236+23 mL; p=0,003). Sin embargo, a las tres semanas de tratamiento se observó disminución del número de evacuaciones de gas (11+2; p=0,002 vs inicio tratamiento) y del volumen de gas evacuado (169+23 mL; p=0,001 vs inicio tratamiento), volvieron a niveles pre-tratamiento (p>0,1 para ambos). Aumentó significativamente el volumen del colon (740+73 mL vs 628+62 mL pre-tratamiento; p <0.05); el incremento se mantuvo durante el tratamiento (792+64 por 3 semanas; p <0.05 vs pre-tratamiento).

Conclusión. Prebióticos producen a corto plazo aumento de la producción de gas, posteriormente la microbiota se adapta y modifica su metabolismo.

La preparación para colonoscopia puede inducir cambios persistentes en la microbiota intestinal

Virginia Robles, Suchita Panda, Alba Santiago, Ester Navarro, Antonio Torrejón, Claudia Herrera, Chaysavanh Manichanh, Francesc Casellas, Natalia Borruel y Francisco Guarner.

Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona.

Resumen

Se ha descrito pérdida de la biodiversidad microbiana del intestino en algunas patologías digestivas (enfermedad inflamatoria, intestino irritable, diarrea por *C. diff*). Nuestro objetivo fue investigar los cambios inducidos por el lavado intestinal con soluciones de polietilenglicol (PEG) mediante secuenciación masiva del gen 16S rRNA en muestras fecales obtenidas antes y después del lavado.

Se analizaron muestras de 12 voluntarios sanos recogidas el día -30 (T1) y el día -1 (T2) antes del lavado con PEG, una muestra sólida del día del lavado (T3), y los días +1 (T4), +15

(T5), +30 (T6), y +60 (T7). Los extractos de ADN (método de Godon) se sometieron a pirosecuenciación del 16S rRNA (V4; Roche 454), tras amplificación con primers universales. El análisis bioinformático utilizó la plataforma Qiime.
No se identificaron cambios de los géneros dominantes que determinan el enterotipo (Bacteroides para enterotipo 1, Prevotella para enterotipo 2, y otros géneros para el 3). El análisis de composición bacteriana de las muestras mediante coordenadas principales distinguió un grupo de 6 personas (grupo A) en los que no hubo cambios cualitativos a lo largo de los tres meses de estudio, otro grupo de tres personas con cambios relacionados con la ingesta de PEG (grupo B), y un tercer grupo de tres personas con cambios sin clara relación con la ingesta de PEG (grupo C). En el grupo A tampoco hubo cambios en biodiversidad (Chao 1 y número de OTUs), pero sí hubo caída de biodiversidad en los grupos B y C. Tres individuos no recuperaron la biodiversidad inicial en la última muestra (T7, dos meses después de PEG). Por último, la presencia de *Akkermansia muciniphila* se vio significativamente afectada por el lavado con PEG (T2 3,8±2,3; T4 0,13±0,09; T7 0,90±0,72).
Conclusiones: El lavado intestinal con PEG no modifica la estructura global de la microbiota pero puede afectar la biodiversidad y la presencia de algunas especies.

La gastroenteritis de los niños y su tratamiento por los fermentos (etiología y patogenia)

Guillermo Alvarez-Calatayud[1] y Evaristo Suárez[2]
[1]Servicio de Gastroenterología Pediátrica, Hospital Gregorio Marañón, Madrid. [2]Área de Microbiología. Facultad de Medicina. Universidad de Oviedo.

Resumen
Este título corresponde a una Tesis Doctoral que defendió el 28 de Junio de 1911, el licenciado en Medicina Francisco Muñoz Seca y que obtuvo la calificación de aprobado (¡¿cómo aprobado?!) (¡¿una tesis?!).
Introducción: gran protagonismo a los trabajos de Escherich (¿de qué me suena?), de Tissier (¿os suena?) y de Metchnikoff (éste seguro que sí). ¿Oísteis aquello de que gracias a los métodos genotípicos hemos descubierto que hay multitud de microorganismos no cultivables? Observación de Eberte en 1896: En un mL de heces diarreicas hay 33.021.206, de los que recuperan 3.518.232 tras cultivo en placa (¡Toma ya PCR!) (¿Será estadísticamente significativo?).
Resultados: se describen 4 periodos de colonización en el recién nacido amamantado: aséptico, de infección creciente, de transformación de la flora y de la flora constante ¡que ocurre a los cuatro días! (que nos lo expliquen la Collado y el Gueimonde) en la que predomina el *Bacillus bifidus* (o sea, que el de ahora es un mote). Al comparar los datos con los obtenidos de niños criados a biberón, encuentra que en estos el periodo de transformación de la flora es más lento, los *B. bifidus* no son preponderantes y hay muchos más tipos bacterianos (¿Qué índice de impacto se merece esto?).
Paquito estudia, además, el cambio de flora durante la gastroenteritis, sugiriendo la ingestión de "fermentos" como medidas de prevención y tratamiento: lactobacilina (Bacilo búlgaro más *Bacillus acidi Lactis*), biolactyl (bacilo búlgaro más *Streptococcus lactique*) menos potente y lacteol (bacilos lácticos secos que reviven en el intestino) todavía menos potentes (a ver si lo de los probióticos no va a ser tan moderno….).
La Tesis finaliza con la exposición de una serie de casos de niños diarreicos y febriles que trató nuestro héroe con lactobacilina. Todos sanaron salvo uno que murió debido probablemente a su extrema debilidad al inicio del tratamiento (Minoru, ¡te ganó por 20 años!).
¿Por qué no sabemos de esta gente?

Functionalized meat foods with prebiotics as colon cancer prevention in an animal model

Javier Fernández[1], Estefanía Ledesma[2], Enric Milán[3], Pedro Costa[3], Joaquín Monte[2], María Varela[4], Adolfo Suárez[4], Claudio J. Villar[1] and Felipe Lombó[1]
[1]Universidad de Oviedo. Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Departamento de Biología Funcional. C/ Julián Clavería 7. 33006 Oviedo (Principado de Asturias). lombofelipe@uniovi.es. [2]El Hórreo Healthy Food SL, C/ Las Cabañas 43, 33180 Noreña (Principado de Asturias). [3]COSFER SA, C/Isaac Peral, 2, Can Castells, 08420 Canovelles, Barcelona (Cataluña). [4]Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), Carretera de Rubín s/n, 33011 Oviedo (Principado de Asturias).

Abstract
Colon cancer is the main cause of cancer in European population, with about 28.2 cases per 100,000 habitants per year[1]. Different genetic, chemical, environmental and nutritional factors affect the colon mucosa, generating diverse gene damages that eventually will lead to alterations in the multiplication process at the colonocyte level, and finally giving an invasive carcinoma[2].
Prebiotics compounds are not digested by enzymes present in human digestive tract. However, several species of gut bacteria are able to metabolize these prebiotics, giving rise to short-chain fatty acids (SCFAs) with antitumor activity[3].
A colon cancer rat model has been used in order to evaluate the effect of two functional meat products with respect to prevention of this neoplasm. These functional foods (ham and chorizo sausage) contain the prebiotic fructooligosaccharide inulin at diverse concentrations[4]. Colon cancer was induced in five groups of seven Fisher 344 rats by using azoxymethane (a carcinogen with tropism for colon mucosa)[5], and during 5 months, rats were fed with regular feed (absolute control) or with the functional foods. Five control groups of three Fisher 344 rats were not induced with carcinogen. Functional foods increased colon production of SCFAs with respect to control feed.
After the study, animals were sacrificed and colons examined. Rats fed with functional ham and chorizo sausage showed 33.27%-64.61% less tumors than respective control groups. Also, they showed 44.60%-70.30% less tumor covered areas in colon mucosa than control groups. Rats fed with functional food also showed an increase in caecum weight and some colon microbiota populations.

Referencias
1. Globocan 2012 http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_population.aspx.
2. Tantamango YM, Knutsen SF, Beeson L, Fraser G, Sabate J. Association between dietary fiber and incident cases of colon polyps: the adventist health study. *Gastrointest Cancer Res* 2011; 4(5-6):161-167.
3. J.H. Cummings, G.T. Macfarlane The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *J Appl Microbiol* 1991; 70(6): 443–459.
4. Kelly G. Inulin-type prebiotics--a review: part 1. *Altern Med Rev* 2008; 13(4):315-329.

5. Martha VergheseT, Lloyd T. Walker,Louis Shackelford, Chandramohan B. Chawan. Inhibitory effects of nondigestible carbohydrates of different chain lengths on azoxymethane-induced aberrant crypt foci in Fisher 344 rats. *Nutrition Research* 2005; 25: 859–868.

Beneficial changes in gastrointestinal microbial communities associated with the consumption of an infant formula supplemented with the probiotic bacteria *Bifidobacterium longum subsp; Infantis* CECT7210: a metagenomic approach

José Antonio Moreno[1], Gloria C. Cifuentes[1], Mireia Morera[1], Juan Fco. Martínez-Blanch[2], Francisco Codoñer[2] Salvador Genoves[3], Empar Chenoll[3], Isabel Polanco[4], Ricardo Closa-Monasterolo[5], Joaquín Escribano[5], Natalia Ferré[5] , Verònica Luque[5] and Montserrat Rivero[1]

[1]Laboratorios Ordesa S.L. (josea.moreno@ordesa.es). 2 LifeSequencing S.L. [3]Biopolis S.L. [4]Hospital Infantil Universitario La Paz, Madrid. [5]Universitat Rovira i Virgili, Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili.

Abstract

Decreasing cost of next-generation sequencing has allowed deep sequencing of clinical samples providing unique opportunities to understand host-associated microbial communities during nutritional interventions with probiotics. The present metagenomic study aimed at monitoring the colonization of microbial communities in the gastrointestinal tract in two different infant groups using samples of their feces obtained from a Double Blind Placebo Controlled Randomized Clinical trial where each group has been fed infant formula with probiotic *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT7210 (treated group) or without the probiotic bacteria (control group).

Microbial biodiversity was increased in the group fed infant formula containing CECT7210 in comparison with the control group, ratio *Phylum Bacteroidetes*/*Firmicutes* at the end of the nutritional intervention with probiotic CECT7210 was lower in the treated group than in the control group (0.0017±0.0064 *versus* 0.0054 ± 0.0138). Presence of *Bifidobacterium* species and *Bifidobacterium longum* specie were significantly increased in the treated group at the end of the study compared with the control group ($p \leq 0.026$ and $p \leq 0.0023$ respectively). Presence of pathogens (*Escherichia*, *Clostridium*, *Salmonella* and *Yersinia*) was lower in the treated group compared with control group but this difference was not statistically significant. In spite of global pathogen reduction was not significant, presence of *Escherichia coli* in the treated group was statistically lower than in the control group ($p \leq 0.024$).

Results allow concluding that consumption of infant formula with probiotic bacteria CECT7210 can promote healthier microbiota in babies and play a positive role in the gastrointestinal tract of infant.

VI Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica

Oviedo 5 y 6 de febrero de 2015

SESIÓN DE INMUNONUTRICIÓN

VI Workshop Probiotics, Prebiotics and Health: Scientific Evidence

Oviedo, 5 and 6 February, 2015

IMMUNONUTRITION

Moderador/Moderator: Patricia Rúas Madiedo

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8707

COMUNICACIONES ORALES

Are polyphenol rich foods associated with specific intestinal microorganisms in systemic lupus erythematosus patients?

Adriana Cuervo[1], Arancha Hevia[2], Patricia López[1], Ana Suárez[1], Borja Sánchez[2,#], Abelardo Margolles[2] and Sonia González[1]

[1]Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo, Asturias, Spain. [2]Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Villaviciosa, Asturias, Spain.

Abstract

Our group has recently proved the existence of a gut microbial dysbiosis in patients with systemic lupus erythematosus (SLE), resulting in differences in the ratio *Firmicutes*/*Bacteroidetes*, and supporting previous evidence involving intestinal bacteria in the initiation and amplification of inflammatory processes and autoimmune diseases. While several studies have addressed the use of dietary fibres to modify intestinal microbial populations, information about other highly correlated components, such as polyphenols, is scarce. The aim of this work was the identification of dietary components able to influence this altered microbiota in 20 women suffering from SLE and 20 age-matched controls. Food intake was recorded by means of a food frequency questionnaire. Energy was calculated from CESNID food composition tables and Phenol-Explorer was used for polyphenol intake. Results showed positive associations between flavone intake and *Blautia*, flavanones and *Lactobacillus* and dihydrochalcones and *Bifidobacterium* in the SLE group. Regarding the controls, dihydroflavonols were directly associated with *Faecalibacterium*, whereas flavonol intake was inversely associated with *Bifidobacterium*. From the food sources of these polyphenols related to microbiota, orange intake was directly associated with *Lactobacillus* and apple with *Bifidobacterium* in SLE, whilst red wine was the best contributor to *Faecalibacterum* variation. The association between common foods and particular microbial genera, reported to be decreased in SLE, could be of great importance for these patients.

Comparative study of the effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 and *Lactobacillus salivarius ssp; Salivarius* CECT5713 on intestinal microbiota composition and mirna expression in the DSS model of mouse colitis

Francesca Algieri[1], Alba Rodríguez-Nogales[1], José Garrido-Mesa[1], Natividad Garrido-Mesa[1], María Pilar Utrilla[1], María Elena Rodríguez-Cabezas[1], Natalia Chueca[2], Federico García[2] and Julio Gálvez[1]

[1]Department of Pharmacology, CIBER-EHD, CIBM, ibs.GRANADA, University of Granada, Spain. [2]Microbiology Department, San Cecilio University Hospital, Instituto Biosanitario de Investigación (ibs.GRANADA), Granada, Spain.

Abstract

Introduction: All probiotics do not display the same biological effects, and their specific immunomodulatory properties may contribute to differential effects. The present study compared the *in vivo* effects of two probiotics *Escherichia coli* Nissle 1917 and *Lactobacillus salivarius ssp. salivarius CECT5713* in the DSS model of mouse colitis.

Material and Methods: Escherichia coli Nissle 1917 and *Lactobacillus salivarius* were given orally ($5x10^8$ UFC) to C57BL/6 mice for two weeks before DSS-induced colitis. Non-colitic and non-treated colitic groups were also included. Mice were scored daily using a Disease Activity Index (DAI). Once mice were sacrificed, the colonic specimens were evaluated by determining the expression of proinflammatory markers and micro-RNAs by qRT-PCR. Moreover, changes in microbiota populations were evaluated by pyrosequencing.

Results: Both probiotics prevented the colonic damage induced by DSS, as evidenced by lower DAI values and colonic weight/length when compared with untreated control mice. Probiotics modified the colonic expression of different cytokines (IL-1β, IL-12, IL-10 and TGF-β). Both treatments were associated with changes in micro-RNAs expression, like miR-155, miR-223, miR-375 and miR-143. Finally, pyrosequence characterization of microbiota showed that probiotics treatments increased the bacterial diversity, reverting the dysbiosis produced by DSS-colitis.

Discussion: Escherichia coli Nissle 1917 and *Lactobacillus salivarius ssp. salivarius CECT5713* were able to modify the expression of different inflammatory markers and microRNAs, as well as to increase the intestinal bacterial diversity, although each probiotic showed differential characteristics, which could be of great interest to control the complex pathogenesis of IBD.

Capacidad inmunomoduladora de cepas de bifidobacterias productoras de exopolisacáridos: estudio *in vivo* con ratas wistar

Nuria Salazar[1], Patricia López[2], Pablo Garrido[3], Javier Morán[3], Estefanía Cabello[3], Celestino González[3], Miguel Gueimonde[1], Ana Suárez[2], Clara G. de los Reyes-Gavilán[1] y Patricia Ruas-Madiedo[1]

[1]Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias. CSIC. Villaviciosa, Asturias, España. [2]Departamento de Biología Funcional, Área de Inmunología, Universidad de Oviedo, Asturias, España. [3]Departamento de Biología Funcional, Área de Fisiología, Universidad de Oviedo, Asturias, España.

Resumen

La administración de probióticos mediante su inclusión en productos lácteos representa una estrategia para modular la microbiota intestinal a través de la dieta. Varias cepas de *Bifidobacterium* poseen características probióticas y algunas producen carbohidratos exocelulares complejos de naturaleza glicosídica, los exopolisacáridos (EPS). En nuestro estudio evaluamos la capacidad de 2 cepas productoras de EPS, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* IPLA R1 y *Bifidobacterium longum* IPLA E44 para modular la respuesta inmune y la homeostasis de la glucosa dependiente de insulina utilizando como modelo ratas Wistar alimentadas con una dieta estándar. Los animales divididos en tres grupos, se alimentaron diariamente durante 24 días con 10% de leche desnatada, o con 10^9 cfu de la cepa correspondiente en leche desnatada. Se observó un aumento significativo de la citocina reguladora TGF-β en ambas cepas en comparación con el grupo de ratas control, alcanzándose los niveles más altos en las

ratas alimentadas con la cepa IPLA R1. Esta cepa presentó además un perfil inmunoprotector, reduciendo la producción de la citocina proinflamatoria IL-6. Por otra parte, la quinasa Akt fosforilada disminuyó en el músculo gastrocnemio de las ratas alimentadas con la cepa IPLA R1, sin afectar a la glucosa, la insulina, y el índice HOMA en sangre, o los niveles del trasportador de glucosa GLUT-4, situado en la membrana de los adipocitos y las células del tejido muscular. Por lo tanto, la cepa *B. animalis* IPLA R1 es un candidato probiótico para ser probado en modelos animales con un estado leve de inflamación.

Prebiotic suplementation during suckling modulates the course of rotavirus gastroenteritis in rats

M Rigo-Adrover[1], S Ramos-Romero[1], T Pérez-Berezo[1], S Saldaña[1], A Franch[1], C Castellote[1], M Castell[1], K van Limwpt[2], K Knipping[2], J Garssen[2] and FJ Pérez-Cano[1]

[1]Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona and Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA), Barcelona, Spain. [2]Nutricia Research, Utrecht, The Netherlands.

Abstract

Introduction: Rotaviruses (RV) are the most important cause of severe dehydrating diarrhoea in young children worldwide. Some studies suggest breastfeeding or the use of specific probiotics and prebiotics as protective agents to attenuate the clinical course of RV infection.

Aim: The objective of this study was to investigate the anti-diarrhoeal effect by supplementation of two prebiotic mixtures: Pre1, a combination of short-chain galactooligosaccharides (scGOS) and long-chain fructooligosaccharides (lcFOS) 90:10 and Pre2, a combination of scGOS, lcFOS and pectin-derived acidic oligosaccharides (pAOS) (76.5:8.5:15) in the suckling rat RV infection model.

Methods: Lewis rats received daily 0.8% of total daily intake (w/w) of the prebiotic mixtures from the 3rd to the 21st day of life. The 7th day of life a RV was orally inoculated in both groups and in non-supplemented (NS) animals. Diarrhoea incidence and severity, RV-specific antibodies and viral shedding were evaluated.

Results: Both prebiotic mixtures induced loose stool by itself which hindered the diarrhoea scoring. However, both mixtures were able to modulate the course of the RV diarrhoea. Pre1 (scGOS/lcFOS) reduced diarrhoea incidence (~10%), severity (~0.2, in a 1 to 4 score) and faecal weight increase (~4 mg/faecal sample) compared to the NS animals during the first days after viral inoculation ($p<0.05$). Both prebiotic mixtures differentially modulated immune response against RV and reduced up to 10 times the viral elimination compared to the NS group.

Conclusion: Both prebiotic interventions modulated the course of RV-induced acute gastroenteritis, the specific immune response and the fecal clearance of the viral particles.

Efecto de *Lactobacillus plantarum* 3547 en el restablecimiento de la respuesta inflamatoria asociada a obesidad

Maria Tabernero Urbieta[1], Bricia López Plaza[2], Carlota Largo Aramburu[1], Victor Caz Bonilla[1], Carmen Gómez Candela[2] y Mónica Santamaría Ramiro[1]

[1]Departamento de Cirugía Experimental. [2]Investigación en Nutrición y Alimentos Funcionales (NUTRINVEST). Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ). Paseo de la Castellana 261; 28046, Madrid.

El presente estudio ha sido apoyado por Grupo CARINSA a través del proyecto HUENUFOOD (CEN- 20101016) del programa CENIT del Ministerio de Economía y Competitividad de España.

Resumen

En obesidad los niveles basales de marcadores inflamatorios se ven incrementados; sin embargo, frente a una infección la respuesta inflamatoria es deficiente. La microbiota intestinal juega un papel clave en la modulación de la respuesta inmune, y dada su relativa plasticidad es una diana terapéutica accesible mediante el uso de probióticos, como *Lactobacillus plantarum* 3547 (Lp3547). El objetivo de este estudio fue evaluar el potencial de Lp3547 en el restablecimiento la respuesta inflamatoria en individuos obesos. Para ello se obtuvieron 30 muestras de sangre de voluntarios que durante 12 semanas habían consumido diariamente una capsula de Lp3547 (10x109 ufc/d) o placebo (maltodextrina). Mediante gradiente de Ficoll se aislaron células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) que fueron incubadas con/sin LPS, simulando una infección. Tras 6h se recolectaron los sobrenadantes donde se determinaron concentraciones de citoquinas (IL-6, IL-1β, IL-10 y TNF-α) mediante citometría de flujo. En todos los casos las PBMCs liberaron citoquinas en respuesta al LPS. En el grupo placebo la concentración de TNF-α fue significativamente menor en los individuos obesos que en los normopeso y en las concentraciones de IL-6 e IL-10 se observó la misma tendencia. Esta tendencia también se observó en IL-1β y TNF-α del grupo probiótico, pero no en IL-6 y en ningún caso las diferencias entre individuos con distinto IMC fueron significativas. Estudios previos han descrito que Lp3547es capaz de reducir la inflamación basal en individuos obesos, mientras que en estudio preliminar proponemos que además es capaz de incrementar la respuesta inflamatoria en caso de infección.

Immunomodulatory properties of *Lactobacillus fermentum* ECT5716 in DSS-colitis: impact on micro-RNA expression and bacterial diversity

Alba Rodríguez-Nogales[1], Francesca Algieri[1], José Garrido-Mesa[1], Natividad Garrido-Mesa[1], María Pilar Utrilla[1], María Elena Rodríguez-Cabezas[1], Natalia Chueca[2], Federico García[2] and Julio Gálvez[1]

[1]Department of Pharmacology, CIBER-EHD, CIBM, ibs.GRANADA University of Granada, Spain. [2]Microbiology Department, San Cecilio University Hospital, Instituto Biosanitario de Investigación (ibs.GRANADA), Granada, Spain.

Abstract

Introduction: Probiotics exert beneficial effects through different mechanisms, including immunomodulatory properties and affecting the microbiota composition. These can downregulate inflammatory mediators including micro-RNAs. In this study we evaluated the immunomodulatory properties of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 in DSS-colitis in mice, emphasizing the relation between micro-RNA expression and bacterial diversity.

Methods: Male C57BL/6 mice were pretreated with *L. fermentum* at $5x10^8$ ufc/mice/day for two weeks before colitis induction with DSS (3% w/v). Non-colitic and non-treated colitic groups were also included. Six days after colitis induction, all mice were sacrificed. The inflammatory status was evaluated by a disease activity index (DAI), qRT-PCR analysis of inflam-

matory markers and micro-RNAs, and changes in microbiota populations (pyrosequencing) and lymphocyte subpopulations in intestine lymphatic nodes (flow-cytometry).
Results: Probiotic administration showed intestinal anti-inflammatory effect, evidenced macroscopically by lower DAI values and biochemically by a decreased expression of the pro-inflammatory cytokine IL-1β, and an increased expression of mucins (MUC-2 and MUC-3) as well as tight junction proteins. Also, the micro-RNA expression profile showed a reduced expression of miR-143 and miR-375 while miR-155, miR-223 and miR-150 were increased in untreated colitic mice, being restored after probiotic treatment. Finally, the treatment was able to modify lymphocyte populations and alter the composition of the microbiota.
Discussion / Conclusion: L. fermentum CECT5716 was able to increase the diversity of microbiota as well as to alter the expression of different inflammatory markers, micro-RNAs and the frequency of different T cell sub-populations. These results support the immunomodulatory effects of probiotics and its use in IBD.

VI Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica

Oviedo 5 y 6 de febrero de 2015

TALLERES: EMPLEO DE PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS EN ATENCIÓN PRIMARIA

VI Workshop Probiotics, Prebiotics and Health: Scientific Evidence

Oviedo, 5 and 6 February, 2015

WORKSHOP: USE OF PROBIOTICS AND PREBIOTICS IN HEALTHCARE

Moderadores/Moderator: Guillermo Álvarez Calatayud y Fernando Azpiroz

Nutrición Hospitalaria

Nutr Hosp. 2015;31(Supl. 1):59-63
ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ
S.V.R. 318

Empleo de probióticos y prebióticos en atención primaria

Guillermo Álvarez Calatayud[1] y Fernando Azpiroz[2]

[1]Servicio de Gastroenterología Pediátrica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. [2]Servicio de Gastroenterología. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. España.

Resumen

Los probióticos se utilizan en gran número de patologías tanto pediátricas como en el adulto, principalmente en problemas gastrointestinales como la diarrea aunque también se ha valorado su efecto beneficioso en alteraciones inmunológicas como la dermatitis atópica y, en los últimos años, en diferentes patologías de la mujer como las vulvovaginitis y las mastitis.

Sin embargo, el empleo de probióticos no está del todo incorporado a la práctica clínica habitual por los médicos de Atención Primaria debido en parte a los resultados poco concluyentes de la mayoría de los estudios, y por otro lado a la gran diversidad en el diseño de los mismos, lo que justifica la variabilidad en los resultados de su eficacia. Esto trae consigo una importante dificultad para desarrollar guías definitivas de tratamiento, aunque hay excepciones como, por ejemplo, la de la WGO.

El objetivo del presente taller, impartido en el VI Workshop de la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos es formar a los médicos de Atención Primaria, tanto pediatras como generalistas, en las aplicaciones clínicas de estos preparados nutricionales en diversas patologías: diarrea aguda y diarrea asociada a antibióticos, enterocolitis necrotizante, empleo en fórmulas lácteas infantiles, cólico del lactante, síndrome de intestino irritable, enfermedad inflamatoria intestinal, vulvovaginitis y mastitis.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):59-63)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8708

Palabras clave: *Probióticos y prebióticos en atención primaria. Probióticos y prebióticos en pediatría.*

USE OF PROBIOTICS AND PREBIOTICS IN PRIMARY CARE

Abstract

Probiotics are used in a great number of both paediatric and adult diseases, mainly in gastrointestinal disorders, like diarrhoea. Nevertheless, their beneficial effect on immune alterations, such as atopic dermatitis and, more recently, in women related diseases such as vulvovaginitis and mastitis have also been observed.

However, the use of probiotics is not completely implemented into the routine clinical practice for primary care physicians. There is still a great controversy with scarce scientific evidence, due to the diversity in the designs thereof which justifies the variability in the efficacy results. This outcome leads to difficulties in developing definitive treatment guidelines although there are exceptions, for example, WGO.

The aim of this workshop, held at the VI Congress of the Spanish Society of Probiotics and Prebiotics is the training of primary care physicians, both paediatricians and general practitioners in the clinical applications of these nutritional preparations in different diseases: acute diarrhoea; antibiotic associated diarrhoea, necrotizing enterocolitis, employment in infant milk formulas, infant colic, irritable bowel syndrome and inflammatory bowel disease, as well as vulvovaginitis and mastitis.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):59-63)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8708

Key words: *Probiotics and prebiotics in healthcare. Probiotics and Prebiotics in Pediatrics.*

Introducción

El organismo humano alberga una comunidad diversa de bacterias simbióticas a las que denominamos **microbiota autóctona**, que establece una relación mutualista con el anfitrión, de modo que influye permanentemente en su fisiología. Por ejemplo, hay evidencia clara de que las interacciones bacteria-anfitrión en la mucosa del intestino desempeñan un papel muy importante en el desarrollo y regulación del sistema inmunitario[1].

Si esta interacción no es adecuada, la homeostasis ante la carga antigénica ambiental y la respuesta del individuo puede fallar. Ello puede repercutir en el desarrollo de patologías de desrregulación inmunitaria frente a estructuras antigénicas propias (autoinmunidad), incluyendo la propia microbiota (enfermedad inflamatoria intestinal) o estructuras antigénicas del ambiente (atopia).

En la actualidad se da gran importancia a la modulación de esta microbiota intestinal mediante los **alimentos funcionales**, que son aquellos que añaden a la función nutritiva un efecto beneficioso sobre la salud[2].

Correspondencia: Guillermo Álvarez Calatayud/Fernando Azpiroz.
E-mail: galvarezcalatayud@gmail.com
azpiroz.fernando@gmail.com

Algunos de estos alimentos tienen como constituyentes los **probióticos** (microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas producen un efecto beneficioso en la salud y el bienestar del huésped), los **prebióticos** (carbohidratos no digeribles cuya ingestión induce el crecimiento de microorganismos beneficiosos) y los **simbióticos**, asociación de los dos anteriores.

Uso clínico de probióticos, prebióticos y simbióticos en Atención Primaria

Los probióticos se han utilizado en gran número de patologías tanto pediátricas como en el adulto, principalmente en problemas gastrointestinales como la diarrea infecciosa, el sobrecrecimiento bacteriano y, más recientemente, en procesos inflamatorios crónicos como la enfermedad inflamatoria intestinal o en trastornos funcionales como el síndrome del intestino irritable, el cólico del lactante o el estreñimiento[3].

También se ha valorado su efecto beneficioso en alteraciones inmunológicas como la dermatitis atópica, en la prevención y tratamiento de la alergia alimentaria y, en los últimos años, en la prevención de infecciones del recién nacido pretérmino y en la infección por *H. pylori*. Desde hace unos años también se están empleando en diferentes patologías de la mujer como las vulvovaginitis y las mastitis.

Sin embargo el empleo de probióticos no está del todo incorporado a la práctica clínica habitual por los médicos de Atención Primaria debido a los escasos estudios y a los resultados poco concluyentes de la mayoría de ellos. La gran diversidad en el diseño de los estudios realizados justifica la gran variabilidad en los resultados de eficacia[4]. De hecho, la mayoría de metaanálisis concluye que hay insuficientes trabajos con probióticos específicos en grupos definidos de pacientes lo que trae consigo gran dificultad para desarrollar guías definitivas de tratamiento aunque hay excepciones como, por ejemplo, la de la WGO[5].

La implicación de la microbiota intestinal en la patogenia de diversas patologías y su aplicación en la práctica clínica habitual con el empleo de probióticos, prebióticos y simbióticos ha cobrado un inusitado interés en los últimos años. Prueba de ello es que hemos pasado, en la base de datos **PubMed,** de 175 estudios clínicos sobre **PROBIÓTICOS** en el año 2000 a un total de 1262 a finales de 2014 y de 78 artículos científicos sobre **MICROBIOTA** a 3205 en el mismo periodo de tiempo, como se aprecia en la figura 1.

Hay que considerar que los diferentes probióticos emplean distintas estrategias de acción y que no todas las cepas presentan la misma resistencia ni capacidad de colonización y, por tanto, no tienen la misma eficacia clínica. Por ello, hay que considerar que los efectos en la práctica clínica son específicos de cepa y no están indicados para las mismas situaciones. Los datos

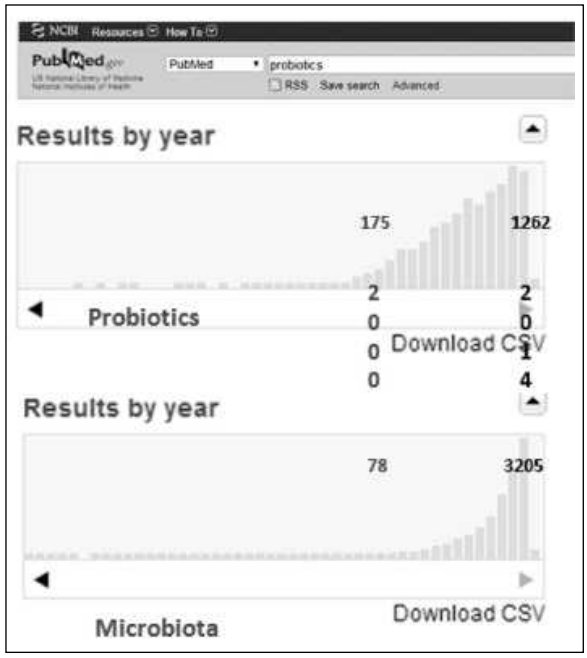

Fig. 1.—Referencias biblograficas sobre probioticos y microbiota en PubMed.

agrupados de distintas cepas podrían llevar a falsas conclusiones.

Para que exista evidencia de que la administración de una cepa probiótica específica o un prebiótico o de mezclas de ellos pueden ser beneficiosos para la salud o pautarse como tratamiento de una determinada enfermedad es necesario que cumpla una serie de condiciones clínicas que estén respaldadas por ensayos clínicos bien diseñados y con suficiente poder estadístico[6].

Futuras aplicaciones del empleo de probióticos y prebióticos

Existen estudios realizados en animales de experimentación y, algunos, en humanos sobre diversas patologías que abren una puerta esperanzadora sobre el empleo de probióticos y prebióticos tanto en su profilaxis como tratamiento. Hay estudios concluyentes sobre las posibles acciones beneficiosas sobre el sistema inmune en la prevención de enfermedades alérgicas e infecciosas y las probables aplicaciones en diversas afecciones del aparato digestivo.

Pero, también hay investigaciones que apoyarían su utilización en problemas nutricionales (obesidad, malnutrición), enfermedades neurológicas y alteraciones del comportamiento (cefaleas, autismo, estados de depresión y ansiedad) y la eventual prevención de varios tipos de cáncer (colon, mama, vejiga, etc.). Por último, se está avanzando mucho en las oportunas repercusiones que la disbiosis intestinal pueda tener en la aparición de enfermedades cardiovasculares, arteriosclerosis, diabetes, hipercolesterolemia, síndrome metabólico, etc.[7]. Todo ello traería como consecuencia

posibles beneficios para la salud de los pacientes atendidos en Atención Primaria.

Las nuevas estrategias sobre Investigación parece que van encaminadas, en primer lugar, a la modificación de la microbiota intestinal en aquellos individuos predispuestos con la incorporación de dietas adecuadas mediante el consumo de alimentos funcionales y al empleo de prebióticos que incrementen la diversidad de especies favorables en nuestro intestino[8].

También se están aunando esfuerzos en Investigación Básica en la selección de microorganismos con propiedades funcionales favorables para el ser humano. Por último, los científicos deben hacer hincapié en el escrutinio de nuevas especies beneficiosas y en la restitución específica de defectos identificados en situaciones patológicas con el objetivo final de promover un impacto positivo en la población.

Empleo de probióticos en patologías especificas

En el V Workshop probioticos, prebioticos y salud: evidencia científica organizado por la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos en febrero de 2015 en Oviedo se imparte un taller interactivo sobre el "Empleo de probióticos y prebióticos en Atención Primaria". Su objetivo es formar a los médicos de Atención Primaria, tanto pediatras como generalistas, en las aplicaciones clínicas de estos preparados nutricionales. A continuación se describen las patologías desarrolladas en el taller[9,10].

Diarrea aguda y diarrea asociada a antibióticos

La mayor evidencia sobre la eficacia de los probióticos ha sido descrita en el tratamiento de la diarrea aguda infecciosa, sobre todo en la infancia, siendo más significativo en las diarreas producidas por rotavirus. Parece que los efectos beneficiosos son más notables cuanto más precozmente se administran los probióticos en el curso de la enfermedad, no evidenciándose efectos adversos con su administración. Concretamente, se ha observado una disminución de la duración media del proceso, sobre todo a partir del tercer día, efecto evidenciado principalmente con *Lactobacillus rhamnosus* GG*, L. reuteri* y *S. boulardii*[11].

Por otro lado, se ha observado que los probióticos en combinación con antibióticos reducen el riesgo de diarrea asociada a los mismos. No hay, por el momento, estudios concluyentes para recomendar de manera rutinaria el empleo conjunto de probióticos y antibióticos, aunque algunas cepas, principalmente *Saccharomyces boulardii y Lactobacillus* GG, han demostrado su eficacia disminuyendo la incidencia de diarrea. Su administración debe realizarse al principio del tratamiento y no cuando se ha desencadenado el cuadro[12].

Enterocolitis necrotizante

Los pretérminos desarrollan una microbiota colónica muy diferente a la de los recién nacidos sanos, quizás debido al empleo de antibióticos de amplio espectro y a las medidas de esterilización que se utilizan en las UCI neonatales. El menor riesgo de desarrollar enterocolitis necrotizante, la patología gastrointestinal más importante a estas edades, en los neonatos alimentados con leche materna está en relación con su contenido de factores inmunoprotectores, inmunomoduladores, antimicrobianos y antiinflamatorios.

Una alternativa para su prevención sería evitar el crecimiento de patógenos mediante la administración de suplementos enterales de probióticos en las UCI neonatales para colonizar el intestino con microbiota no patógena. Con ello se ha demostrado una reducción de su incidencia, el riesgo de presentación de formas graves y la mortalidad global en prematuros. La mayoría de los estudios utilizan combinación de cepas (*Bifidobacterium* y *Lactobacillus)* por la mayor colonización y sinergismo. Aún así, se necesitan más estudios en cuanto a especie, cepa y dosis óptima, para evaluar su eficacia y seguridad[13].

Fórmulas lácteas infantiles

El perfil microbiano de los recién nacidos a término, por parto vaginal y alimentados exclusivamente con leche materna constituye el estándar de microbiota beneficiosa y sirve de referencia para el desarrollo de las fórmulas infantiles. De este modo, con el objetivo de modular la microbiota intestinal de lactante, estimular el crecimiento de bifidobacterias e inhibir otras especies potencialmente patógenas, a las fórmulas lácteas para lactantes se añaden dichos componentes.

El Comité de Nutrición de la ESPGHAN en su última referencia acerca de estos preparados, concluye que su administración en fórmulas infantiles puede estar asociada con beneficios clínicos, tales como una reducción en el riesgo de infecciones gastrointestinales inespecíficas, una disminución del riesgo secundario al empleo de antibióticos y una menor frecuencia de los cólicos y/o irritabilidad. Sin embargo, no recomienda su uso rutinario en las fórmulas infantiles debido a que los estudios disponibles actualmente varían en la calidad metodológica y las cepas específicas estudiadas[14].

Cólico del lactante

Su empleo se basa en la existencia de una microbiota colónica anormal en los lactantes con cólicos. Actúa mejorando la motilidad intestinal y ejerciendo efectos directos en la vía nerviosa del dolor visceral. La cepa de *Lactobacillus reuteri* DSM 17938, administrada en forma liofilizada a una dosis de 10^8 ufc/

día es la que más evidencia científica tiene. En varios estudios prospectivos y aleatorizados realizados hasta ahora, en el que se compara el uso de *L.reuteri* frente a dimeticona y frente a placebo se ha observado que la tasa de respondedores al tratamiento fue significativamente mayor en el grupo probiótico en los días 14, 21 y 28 ($p<0,001$) con reducción del tiempo de llanto diario y disminución significativa en la percepción de los padres sobre la severidad del cólico[15]. En un estudio reciente también se ha observado la eficacia de la cepa LGG en los lactantes prematuros que padecen cólicos.

Síndrome de intestino irritable

Este frecuente trastorno gastrointestinal funcional se caracteriza por la presencia de molestias o dolores abdominales asociados cambios en el ritmo intestinal en ausencia de alteración orgánica que lo justifique. Aunque se desconoce su fisiopatología, hay datos que apoyan su relación con la microbiota intestinal, ya que se han descrito algunas diferencias con respecto a individuos sanos. Además su instauración tiene relación, en una tercera parte de los casos, con procesos infecciosos gastrointestinales. Se ha postulado que algunos pacientes tienen un sobrecrecimiento bacteriano, pero estos datos han sido cuestionados. La mayoría de los estudios sugieren que varias especies de *Bifidobacterium* y de *Lactobacillus* tienen beneficios en su tratamiento, demostrando que en las terapias prolongadas su uso disminuye las puntuaciones de síntomas totales (dolor abdominal, distensión, flatulencia y borborigmos) de forma significativa. Sin embargo, dada la heterogeneidad de los microrganismos estudiados, la duración de la administración y características de los pacientes tratados, son necesarios más estudios[16].

Enfermedad inflamatoria intestinal

Quizás, sea la entidad donde existen más evidencias, tanto en humanos como en animales de experimentación, sobre la imprescindible participación de la microbiota intestinal para que se produzca la enfermedad. El uso de probióticos permite la intervención terapéutica a nivel microbiológico modificando la microbiota intestinal, que es en última instancia la responsable de activar la respuesta inmunitaria[17]. Esta es una enfermedad que cursa en brotes y los prebióticos y probióticos pueden tener eficacia en prevenir los brotes y mantener la remisión.

Siguiendo las recomendaciones de la Guía Mundial sobre probióticos y prebióticos de la WGO, podemos resumir que las cepas *E. coli* Nissle 1917 y *Lactobacillus* GG son tan efectivas como la mesalazina en el mantenimiento de la remisión de la colitis ulcerosa. La mezcla VSL#3 ha demostrado ser eficaz induciendo y manteniendo la remisión en niños y adultos con colitis ulcerosa leve a moderada [5].

Hay buena evidencia que muestra la utilidad de los probióticos para impedir una crisis inicial de reservoritis o pouchitis (con la mezcla VSL#3) y evitar recidivas futuras de esta entidad tras la inducción de su remisión con antibióticos. Se puede recomendar a pacientes con actividad leve o como terapia de mantenimiento para aquellos que estén en remisión. Los ensayos clínicos sobre el empleo de probióticos y prebióticos en la enfermedad de Crohn han mostrado resultados dispares[18].

Vulvovaginitis

Se puede ejercer un efecto beneficioso sobre la salud de la mujer mediante el empleo de probióticos dirigidos a modular la microbiota vaginal. La función de los probióticos en el ecosistema vaginal consistiría básicamente en impedir la proliferación de microorganismos patógenos y la pérdida de lactobacilos productores de H_2O_2. Los recientes avances en la comprensión de la microbiología, inmunología, bioquímica y fisiología de ecosistema vaginal han incrementado el interés del empleo de probióticos.

Existen resultados prometedores sobre el uso de varias cepas probióticas como terapia adyuvante con antibióticos y fungicidas tanto para el tratamiento de la candidiasis vulvovaginal como para la prevención de recurrencias. El objetivo es la restauración de la flora vaginal normal y su empleo se puede hacer tanto por vía oral como vaginal[19]. Estas terapias están avaladas por sociedades científicas ginecológicas (AEEM y SEGO) que concluyen que el uso de lactobacilos podrían ser una alternativa prometedora, costo-efectiva y segura en la prevención de las recurrencias en población seleccionada.

Mastitis

Las mastitis son una causa frecuente de abandono de la lactancia. El tratamiento tradicional ha sido hasta ahora con antibióticos y antiinflamatorios, consiguiendo su curación en un porcentaje bajo: del 10-30% de las mastitis causadas por *S. aureus*. Este hecho explica la recurrencia y/o cronificación de muchas mastitis, lo que supone toda una frustración para la madre y puede determinar un destete brusco.

En los últimos tiempos, se está abriendo el abanico terapéutico, estudiándose la aplicación de probióticos con resultados esperanzadores. La disponibilidad de cepas de lactobacilos procedentes de la leche humana con potencial probiótico ha llevado a realizar algún ensayo en el que se ha aplicado vía oral para el tratamiento de las mastitis lactacionales. Se trata además de cepas que se sabe tienen una elevada resistencia durante su tránsito por el aparato digestivo, interac-

ciones con las células dendríticas y una importante actividad frente a los principales agentes etiológicos de mastitis (por mecanismos competitivos de exclusión con los *Streptococcus* y *Staphylococcus* causantes de mastitis)[20].

Referencias

1. Suarez JE. Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. *Nutr Hosp* 2013;28 S1:s38-s41.
2. Johnson CL, Versalovic J. The human microbiome and its potential importance to pediatrics. *Pediatrics* 2012;129: 950-960.
3. Floch MH, Walker WA, Madsen K, Sanders ME, Macfarlane GT, Flint HJ, et al. Recommendations for probiotic use-2011 update. *J Clin Gastroenterol* 2011; 45: S 168-171.
4. Alvarez-Calatayud G, Martinez MJ, Albertos S, Galicia I. (ed). Probioticoterapia en Gastroenterología. Pharma and Health Consulting 2013.
5. WGO. Probióticos y prebióticos. En: Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología. Octubre 2011. www. Worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html.
6. Probiotics: Their Potential to Impact Human Health. En: Council for Agricultural Science and Technology. Octubre 2007. Disponible en: www. cast-science.org.
7. WGO. Handbook on Gut Microbes. May 2014. http://www.wgofoundation.org/2014-resources.
8. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sanders ME. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11: 506-414.
9. Alvarez-Calatayud G, Suárez E (ed). Respuesta a las preguntas más frecuentes sobre Microbiota autóctona, probióticos y prebióticos. Pharma and Health Consulting 2014.
10. Alvarez-Calatayud G, Perez-Moreno J, Tolin M, Sanchez C. Aplicaciones clínicas del empleo de probióticos em pediatria. *Nutr Hosp* 2013; 28:564-574.
11. Szajewska H, Guarino A, Hojsak I, Indrio F, Kolacek S, Shamir R et al. Use of Probiotics for Management of Acute Gastroenteritis: A Position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 58:531–539.
12. Johnston B, Goldenberg J, Vandvik P, Sun X, Guyatt G. Probióticos para la prevención de la diarrea asociada con antibióticos en niños. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2011 Issue 11. Art. No.: CD004827. DOI: 10.1002/14651858.CD004827.
13. Alfaleh K, Anabrees J, Bassler D, Al-Kharfi T.Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2011. Mar 16; (3):CD005496.
14. Supplementation of Infant Formula With Probiotics and/or Prebiotics: A Systematic Review and Comment by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *JPGN* 2011;52:238-250.
15. Savino F, Cordisco L. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 in Infantile Colic: A Randomized, Double- Blind Placebo-Controlled Trial. *Pediatrics* 2010; 126; e526.
16. Verna CE, Lucak S. Use of probiotics in GI disorders: What to recommend? *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 2010; 3: 307-319.
17. Guarner F. Microbiota intestinal y enfermedades inflamatorias del intestino. *Gastroenterol Hepatol* 2011; 34:147-154.
18. Sartor RB. Probiotics for gastrointestinal diseases. www.uptodate.com 2014 Aug.
19. Falagas ME, Betsi GI, Athanasiou S. Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 266-272.
20. Jiménez E, Fernández L, Maldonado A et al. Oral administration of lactobacilli strains isolated from breast milk in women with lactational infectious mastitis. *BMC Infectious Diseases* 2008; 8: 51.

Nutrición Hospitalaria

Nutr Hosp. 2015;31(Supl. 1):64-67
ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ
S.V.R. 318

Pediatría

Probióticos en la diarrea aguda y asociada al uso de antibióticos en pediatría

Carlos Pérez

Servicio de Pediatría Hospital de Cabueñes. Gijón. España.

Resumen

Los probióticos son beneficiosos en el tratamiento de la diarrea aguda. Una revisión sistemática demuestra que el uso de probióticos reduce en un día la duración de la diarrea y disminuye el 59% el riesgo de que la diarrea persista más allá de 4 días. También disminuye en 24 horas la duración de la estancia hospitalaria. El efecto beneficioso de los probióticos es específico para cada especie. *Lactobacillus rhamnosus* GG y Saccharomyces boulardii son los dos probióticos que han demostrado su eficacia en la diarrea aguda. El uso de probióticos disminuye en un 50% la incidencia diarrea asociada a antibióticos. No se han descrito efectos secundarios de importancia en los ensayos clínicos realizados aunque se han descrito infecciones invasivas en niños inmunodeprimidos o portadores de vías centrales.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):64-67)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8709

Palabras clave: *Diarrea infecciosa. Diarrea asociada a antibióticos. Probióticos.*

PROBIOTICS FOR THE TREATING ACUTE DIARRHEA AND PREVENTING ANTIBIOTIC-ASSOCIATED DIARRHEA IN CHILDREN

Abstract

Probiotics are helpful in the treatment of acute diarrhea. Several systematic reviews show that the use of probiotics shortens the duration of diarrhea in one day and reduces by 59% the risk of diarrhea lasting longer than 4 days. Hospital stay is 24 hours shorter in children treated with probiotics. The benefitial effect of probiotics is species-specific; *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces boulardii* are the two species with proven efficacy in the treatment of acute diarrhea. The use of probiotics reduces by 50% the risk of antibiotic-associated diarrhea. No significant side effects were found in the clinical trials but rare cases of invasive infections have been reported in immunosuppressed children or those with indwelling central venous catheters.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):64-67)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8709

Key words: *Infectious diarrhea. Antibiotic associated diarrhea. Probiotics.*

Los probióticos son microorganismos vivos, no patógenos, que consumidos en cantidades adecuadas producen un efecto beneficioso en la salud y el bienestar del huésped[1,2]. Aunque los probióticos son un tema de actualidad, hace ya más de 2000 años el autor romano Plinio el Viejo ya recomendaba el uso de leche fermentada para el tratamiento de la diarrea aguda[3]. Revisamos a continuación los conocimientos actuales sobre el uso de probióticos en la diarrea aguda adquirida en la comunidad y en la diarrea asociada al uso de antibióticos en la población pediátrica.

Correspondencia: Carlos Pérez.
E-mail: perezmendez.carlos@gmail.com

Diarrea aguda

La diarrea aguda se define como una disminución en la consistencia de las deposiciones (líquidas o blandas, es decir, que adoptan la forma del recipiente) y/o un aumento de su número (típicamente tres o más en 24 horas). El cambio en la consistencia de las heces en relación con el patrón habitual en el niño es un indicador más preciso de diarrea, sobre todo en los primeros meses de vida. La diarrea aguda dura habitualmente menos de 7 días y siempre menos de 14 días[4].

La incidencia de diarrea en niños menores de 3 años en Europa oscila entre 0.5 y 2 episodios por niño y año[4]. El agente etiológico más frecuente de la diarrea aguda en la edad pediátrica es el rotavirus. En un estudio realizado en una población de atención primaria en Valencia, la incidencia de gastroenteritis por rota-

virus en un año fue de 15/1000 en niños menores de 5 años y de 31/1000 en menores de un año[5]. Rotavirus es también la causa más frecuente de diarrea nosocomial en España[6]. Norovirus está emergiendo como la causa más frecuente de diarrea aguda en algunas regiones de Europa con una alta cobertura de vacuna frente a rotavirus. La diarrea aguda por parásitos es excepcional en niños sanos.

La base del tratamiento de la diarrea es la rehidratación oral y la realimentación precoz; el uso de zinc puede ser beneficioso en niños mayores de seis meses en países en vías de desarrollo pero no es de esperar que aporte ningún beneficio en las regiones en las que el déficit de zinc es excepcional[4].

Los probióticos pueden ser beneficiosos en el tratamiento de la diarrea aguda estimulando el sistema inmunitario, compitiendo con los microorganismos patógenos por los nutrientes y los sitios de adherencia en las células intestinales, acidificando el contenido intestinal y elaborando sustancias neutralizantes de los patógenos intestinales[8].

Diversos metaanálisis y revisiones sistemáticas concluyen que el uso de probióticos tiene un efecto beneficioso moderado en el tratamiento de la diarrea aguda en la infancia[8-12].

Una revisión Cochrane analizó 63 estudios, (56 de ellos pediátricos) incluyendo un total de 8014 pacientes[8]. Casi todos los estudios demostraron una reducción en la duración de la diarrea y en la frecuencia de las deposiciones en los pacientes que recibieron probióticos comparados con los controles. Globalmente, el uso de probióticos redujo la duración de la diarrea en 25 horas (diferencia media: 24 horas; intervalo de confianza 95% 15,9 a 33,6 horas; n= 4555, estudios =35); el riesgo de que la diarrea se prolongase más allá de 4 días en un 59% (RR 0,41; 0,32 a 0,53; n=2853, estudios =29) y aproximadamente en uno el número de deposiciones el día 2 después de la intervención (diferencia media: 0,8; 0,45 a 1,14; n =2751, estudios =20). Sin embargo, existieron grandes diferencias en el tamaño del efecto entre los distintos estudios, no explicables por la calidad de los estudios, la cepa de probiótico utilizada o su dosis, la viabilidad de los organismos, la causa de la diarrea o el entorno (países desarrollados o en vías de desarrollo) en el que se realizó el estudio. Por ello, los autores concluyen que aunque los resultados con alentadores y sugieren que los probióticos son seguros y parecen tener efectos beneficiosos acortando la duración de la diarrea y la frecuencia de las deposiciones, es necesaria más investigación para identificar qué probióticos deben utilizarse y en qué grupos de pacientes, así como para evaluar el coste-eficacia de este tratamiento[8].

La revisión de Salari observó una disminución de la duración de la estancia hospitalaria en el grupo tratado con probióticos comparado con el grupo placebo de algo más de un día (diferencia media: -1,12 con IC95% = -1,87 a -0,38) en 10 ensayos clínicos que analizaban este marcador. Aunque los datos sobre reducción de la estancia hospitalaria no son concluyentes, el uso de probióticos en esa situación podría suponer una reducción importante en los costes sanitarios asociados a la diarrea aguda[10].

Un metaanálisis más reciente centrado en *Saccharomyces boulardii* observó también un modesto efecto beneficioso del uso del probiótico comparado con placebo[11]. El uso de *S. boulardii* redujo en aproximadamente un día la duración de la diarrea (diferencia media: -0,99; IC95% =-1,4 a -0,58) y el tiempo de hospitalización (diferencia media: -0,84; IC95% = -1,14 a -0,54). Más del 50% de los niños en el grupo tratado ya no tenían diarrea el día 3 (RR: 0,52; 0,42-0,65). Este estudio mostró de nuevo una gran heterogeneidad en los estudios, así como un posible sesgo de publicación[11].

El efecto de los probióticos depende de la especie y de la cepa utilizada y los efectos de un microorganismo no pueden ser extrapolados a especies o cepas distintas[4,13,14]. Los probióticos que han demostrado claramente su eficacia son fundamentalmente *Lactobacillus rhamnosis* GG (LGG) y *S. boulardii*. Este efecto parece ser dosis-dependiente, siendo más eficaces las dosis más elevadas. También son más útiles cuando se emplean precozmente en el curso de la diarrea[3,14]. Su eficacia también parece ser mayor en las gastroenteritis por virus que en las diarreas bacterianas y en las que afectan a niños en países desarrollados comparados con los países en vías de desarrollo, probablemente en relación con la diferente etiología y el estado nutricional en uno y otro caso[3,15,16].

Basándose en estos datos, varias sociedades científicas aconsejan el uso de determinadas cepas de probióticos, utilizadas precozmente, en el tratamiento de la diarrea aguda en los niños. La European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition (ESPGHAN) recomienda considerar el uso de LGG y *Saccharomyces boulardi*, junto con la terapia de rehidratación, en niños con diarrea aguda[4]. La recomendación es más débil para *L. reuteri* DSM 17938 y para otra cepa de probióticos inactivada por calor (*L. acidophilus* LB) aunque esta última no puede considerarse un probiótico ya que no se trata de un microorganismo vivo. Para el resto de cepas, considera que aún no existen suficientes datos para hacer una recomendación. La Academia Americana de Pediatría apoya el uso de probióticos, específicamente LGG, en el tratamiento de la diarrea aguda con el objetivo de disminuir los síntomas en un día[14]. También la guía de práctica clínica elaborada conjuntamente por la Sociedad Española de Gastroenterología, Nutrición y Hepatología y por la Sociedad Española de Infectología Pediátrica considera el uso de LGG y *S. boulardii* en el tratamiento de la gastroenteritis aguda en los niños[17].

En la tabla I se recogen los probióticos y las dosis recomendadas en las guías de práctica clínica de la ESPGHAN[4].

No existen en este momento datos suficientes para recomendar el uso de probióticos en la prevención de la diarrea aguda[4,14].

Tabla I
Nivel de recomendación y dosis aconsejada para los distintos tipos de probióticos. Adaptado de la referencia[4]

Probiótico	*Nivel de recomendación*	*Dosis*
LGG	Fuerte	≥10 ufc/día 5-7 días
Saccharomyces boulardii	Fuerte	250-750 mg/día, 5-7 días
Lactobacillus reuteri DSM 17938	Débil	10^8 -4 x 10^8 ufc/día, 5-7 días
Lactobacillus acidophilus inactivado por calor	Débil	Mínimo: 5 dosis de 10^{10} ufc durante 2 días Máximo: 9 dosis de 10^{10} ufc durante 4 días y medio

Diarrea asociada a antibióticos

Más de 500 especies de bacterias habitan el tracto digestivo humano y su equilibrio es vital para una función gastrointestinal normal; las bacterias patógenas superan a los microbios "beneficiosos" en una proporción de diez a uno. El tratamiento con antibióticos altera la microflora intestinal, lo que resulta en un abanico de síntomas, especialmente diarrea[18]. La prevalencia de diarrea asociada a antibióticos (DAA) en la edad pediátrica oscila entre 6% y 29%[19]. En un estudio de 650 niños no hospitalizados tratados con antibióticos, el 11% presentó un cuadro de diarrea en los 7 días siguientes; la frecuencia fue aún mayor (18%) en los niños menores de dos años. La incidencia de diarrea llegó hasta el 23% con algunos antibióticos, como amoxicilina-clavulánico[20]; otras aminopenicilinas, las cefalosporinas y la clindamicina también se asocian con frecuencia con diarrea[21]. El tratamiento más eficaz de la DAA es la retirada del antibiótico que la desencadena tan pronto como sea posible.

Una revisión Cochrane analizó la utilidad de los probióticos para prevenir la DAA[21]. Incluyó 16 estudios con un total de 3432 niños que comparaban la incidencia de DAA en niños tratados con distintos probióticos comparados con un grupo control, tratado con placebo o sin tratamiento. Los participantes recibieron distintos probióticos (*Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp*, *Streptococcus spp* o *S. boulardii*) solos o en combinación y con dosis variables; siete de los dieciséis ensayos clínicos estudiaron *L. rhamnosus* o *S. boulardii*. La incidencia de DAA fue de 9% en el grupo tratado con probióticos comparada con 18% en el grupo control (RR 0,52; IC95% 0,38 a 0,72). Al analizar por subgrupos, se observó que este efecto fue más marcado en el grupo de niños tratados con dosis altas de probióticos (≥ 5 x 10^9 ufc/día) que en los tratados con dosis más bajas. Así, en el subgrupo de dosis altas la incidencia de DAA fue de 8% en el grupo de probióticos frente a 22% en el grupo control (RR: 0,40; IC95% 0,29 a 0,55); en el subgrupo de dosis bajas, la incidencia de DAA fue de 8% en el grupo de probióticos frente a 11% en el grupo control (RR: 0,80; IC95% 0,53 a 1,21). El número de niños que necesitarían tratarse con altas dosis de probióticos para prevenir un caso de DAA es 7 (NNT 7; IC95% 6 a 10). La alta tasa de pérdidas en el seguimiento hace que la significación estadística de estos resultados sea marginal. Los autores concluyen que *L. rhamnosus* y *S. boulardii* a una dosis alta (entre 5 x 10^9 y 40 x 10^9 UFC/día) pueden prevenir la aparición de diarrea asociada a antibióticos sin efectos secundarios destacables en niños por otra parte sanos. Este efecto beneficioso debería ser confirmado en un estudio prospectivo bien diseñado y con un tamaño muestral adecuado. No se pueden hacer recomendaciones sobre la eficacia de ninguno de los otros probióticos o de las combinaciones de estos. Estos resultados son similares a los de un metaanálisis previo; en este estudio otros dos probióticos, *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus*, demostraron también ser efectivos[22]. La Academia Americana de Pediatría considera que hay datos para aconsejar el uso de probióticos para la prevención de la DAA[14]. El tratamiento debe comenzarse de forma precoz, al inicio del tratamiento antibiótico[2,3,23]; no existen datos que sugieran que los probióticos sean eficaces en el tratamiento de la DAA una vez establecida1[14].

Clostridium difficile forma parte de la flora transitoria del intestino grueso hasta en un 50% de los niños pequeños y es la primera causa identificable de diarrea en pacientes hospitalizados[2]. La diarrea asociada a *C. difficile* (DACD) es la más grave entre todas las DAA. Una revisión Cochrane analizó 23 ensayos clínicos, incluyendo 4213 participantes, que estudiaban el efecto beneficioso de los probióticos en la prevención de la DACD[24]. Concluye que el uso de probióticos reduce en un 64% (RR: 0,36; IC95%: 0,26 a 0,51) el riesgo de DACD, aunque no en la incidencia de infección por *C. difficile* (RR 0,89; IC95%: 0,64 a 1,24). El estudio no observó diferencias en los resultados entre los estudios que incluyen a población adulta y los realizados en niños. A pesar de estos datos, una reciente guía de la AAP desaconseja el empleo de probióticos tanto en la prevención como en el tratamiento de la infección por *C. difficile* en niños[25].

Seguridad de los probióticos

No se han observado efectos secundarios de importancia en ninguno de los ensayos clínicos publicados[8,21]. La posibilidad de efectos secundarios graves en la población pediátrica sin patología de base es ex-

tremadamente baja. Sí se han descrito casos aislados de bacteriemia por *Lactobacillus spp*. y, sobre todo, fungemia por *S. boulardii*, en niños de riesgo, fundamentalmente niños inmunodeprimidos o en portadores de catéteres centrales, por lo que deben extremarse las precauciones antes de decidir su utilización en estos grupos de riesgo[3,14]. Se han descrito casos de fungemia por *S. boulardii* en pacientes portadores de vías venosas centrales que no habían recibido el probiótico y cuyo único factor de riesgo era la apertura de una cápsula con el probiótico en su proximidad[26].

Referencias

1. Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y Prebióticos. Octubre de 2011. www.worldgastroenterology.org/probiotics-prebiotics.html.
2. Alvarez-Calatayud G, Pérez-Moreno J, Tolín M, Sánchez C. Aplicaciones clínicas del empleo de probióticos en pediatría. *Nutr Hosp* 2013; 28: 564-574.
3. Vandenplas V, De Greef E, Devreker T, Veereman-Wauters G, Hauser B. Probiotics and prebiotics in infants and children. *Curr Infect Dis Rep* 2013; 15: 251-262.
4. Guarino A, Ashkenazi S, Gendrel D, Lo Vecchio A, Shamir R, Szajewska H. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases Evidence-Based Guidelines for the Management of Acute Gastroenteritis in Children in Europe: Update 2014. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 59: 132–152.
5. Díez-Domingo J, Oyagüez Martín I, Ballester Sanz A, González López A, Casani Martínez C, Pidró Boronat C et al. Rotavirus gastroenteritis among children under five years of age in Valencia, Spain. *Pediatr Infect Dis J* 2006; 25: 455-457.
6. Gutiérrez-Gimeno MV, Martin-Moreno JM, Díez-Domingo J, Asensi-Botet F, Hernández-Marco R, Correcher-Medina P, Sánchez-Fauquier A. Nosocomial rotavirus gastroenteritis in Spain: a multicenter prospective study. *Pediatr Infect Dis J* 2010; 29: 23-27.
7. Hemming M, Rasanen S, Huhti L, Paloniemi M, Salminen M, Vesikari T. Major reduction of rotavirus, but not norovirus, gastroenteritis in children seen in hospital after the introduction of RotaTeq vaccine into the National Immunization Programme in Finland. *Eur J Pediatr* 2013; 172: 739–746.
8. Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, Dans LF. Probiotics for treating acute infectious diarrhea. Cochrane Database System Rev. 2010; (11): CD003048.
9. Szajewska H, Skorka A, Ruszczynski M, Gieruszczak-Bialek D. Meta-analysis: *Lactobacillus GG* for treating acute diarrhea in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2007; 25: 871-881.
10. Salari P, Nikfar S, Abdollahi M. A meta-analysis and systematic review on the effect of probiotics in acute diarrhea. *Inflamm Allergy Drug Targets* 2012; 11: 3-14.
11. Dinleyici EC, Eren M, Oxen M, Yargic ZA, Vandenplas Y. Effectiveness and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute infectious diarrea. *Expert Opin Biol Ther* 2012; 12: 395-410.
12. Freedman SB, Ali S, Oleszczuk M, Gouin S, Hartling L. Treatment of acute gastroenteritis in children: an overview of systematic reviews of interventions commonly used in developed countries. *Evid Based Child Health* 2013; 8: 1123-1137.
13. Carvajal Encina F, Balaguer A. La eficacia de los probióticos en el tratamiento de la diarrea aguda difiere según la cepa utilizada. *Evid Pediatr* 2007; 3: 99.
14. Thomas DW, Greer FR. Probiotics and prebiotics in pediatrics. *Pediatrics* 2010; 126: 1217-1231.
15. Correa NB, Penna J, Lima FM, Nicoli JR, Filho LA. Treatment of acute diarrhea with *Saccharomyces boulardii* in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2011; 53: 497-501.
16. Hegar B, Waspada IMI, Gunardi H, Vandenplas Y. A double blind randomized trial showing probiotics to be ineffective in acute diarrea in Indonesian children. *Indian J Pediatr* 2014 Abril 29 [Epub ahead of print].
17. Costa i Pagés J, Polanco Allué I, Rodrigo Gonzalo de Liria C. Guía de práctica clínica. Gastroenteritis aguda en el niño, Guía multidisciplinar SEGNHP-SEIP 2010. www.guiasalud.es/GPC/GPC_464_Gastroenteritis.pdf
18. Rohde CL, Bartolini V, Jones N. The use of probiotics in the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea with special interest in *Clostridium difficile*-associated diarrhea. *Nutr Clin Pract* 2009; 24: 33-40.
19. Alam S, Mushtaq M. Antibiotic associated diarrhea in children. *Indian Pediatr* 2009; 46: 491-496.
20. Turck D, Bernet JP, Marx J, Kempf H, Giard P, Walbaum O, et al. Incidence and risk factors of oral antibiotic-associated diarrhea in an outpatient pediatric population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003; 37: 22-26.
21. Johnstone BC, Goldenberg JZ, Vandvik PO, Sun X, Guyatt GH. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database System Rev* 2011; (11): CD004827.
22. Szajewska H, Ruszczynski M, Radzikowski A. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Pediatr* 2006; 149: 367–372.
23. Boyanova L, Mitov I. Coadministration of probiotics with antibiotics: why, when and for how long? *Expert Rev Anti Infect* Ther 2012; 10: 407-409.
24. Goldenberg JZ, Ma SSY, Saxton JD, Martzen MR, Vandvik PO, Thorlund K, et al. Probiotics for the prevention of Clostridium difficile-associated diarrhea in adults and children. *Cochrane Database System Rev* 2013; (5): CD006095.
25. American Academy of Pediatrics Committee on Infectious Diseases. *Clostridium difficile* infection in infants and children. *Pediatrics* 2013; 131: 196-200.
26. Whelan K, Myers CE. Safety of probiotics in patients receiving nutritional support: a systematic review of case reports, randomized controlled trials, and nonrandomized trials. *Am J Clin Nutr* 2010; 91: 687–703.

Nutrición Hospitalaria

Nutr Hosp. 2015;31(Supl. 1):68-71
ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ
S.V.R. 318

Pediatría

Empleo de probióticos en la prevención de la enterocolitis necrotizante en recién nacidos prematuros

Marta Suárez Rodríguez y G. Solís Sánchez

Servicio de Neonatología. AGC Pediatría. Hospital Universitario Central de Asturias. España.

Resumen

La enterocolitis necrotizante es la patología digestiva adquirida más frecuente y grave en el periodo neonatal, que ocasiona una importante morbi-mortalidad. Según los últimos metaanálisis, el tratamiento profiláctico con probióticos en el recién nacido prematuro disminuye de manera significativa el riesgo de padecer una enterocolitis necrotizante severa (estadíos II o III). Dicho tratamiento también ha demostrado una disminución de la mortalidad, de los días de hospitalización y de los días tras los que se alcanza la nutrición enteral exclusiva. Por todo ello, el Grupo de Nutrición y Metabolismo Neonatal de la Sociedad Española de Neonatología considera que el uso de probióticos debería tenerse en cuenta en el recién nacido prematuro ≤ 32 semanas de gestación y/o < 1500 g, si bien su uso debe someterse a una estrecha monitorización.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):68-71)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8710

Palabras clave: *Enterocolitis necrotizante. Recién nacidos prematuros. Probióticos.*

USE OF PROBIOTICS IN THE PREVENTION OF NECROTIZING ENTEROCOLITIS IN PREMATURE NEWBORNS

Abstract

Necrotizing enterocolitis is the most frequent and life threatening pathology of the neonatal period and causes high morbi-mortality. According to the most recent metaanalyses, prophylactic treatment of premature newborns with probiotics significantly lowers the risk of suffering from severe necrotizing enterocolitis (stages II and III). This treatment also reduces the mortality, the hospitalization period and the days after which exclusive enteral nutrition is reached. Based in these facts, the Nutrition and Neonatal Metabolism Group of the Spanish Society of Neonatology considers that probiotics should be taken into consideration for use on less than 32 weeks-gestation premature newborns and/or those born with a weight lower than 1,500 g, although their use has to be submitted to close monitoring.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):68-71)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8710

Key words: *Necrotizing enterocolitis. Premature new born. Probiotics.*

Recién nacido varón de 28+1 semanas de gestación ingresado en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales al nacimiento.

Gestación única controlada. Ecografías prenatales normales. Parto por cesárea urgente por desprendimiento de placenta. Apgar 6/8. Peso: 1120 g. Ingresa en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) conectado a CPAPn. A las 3 horas de vida presenta aumento de las necesidades de oxígeno y de los signos de dificultad respiratoria y en la radiografía de tórax se objetiva un patrón compatible con enfermedad de membrana hialina. Se administra una dosis de surfactante con muy buena respuesta. A las 24 horas se inicia alimentación enteral con fórmula para prematuros. Buena tolerancia inicial, pero a los 8 días de vida (EGC 29+2 semanas, peso: 1170 g) presenta un cuadro de apneas, mala perfusión periférica, distensión abdominal con dolor generalizado a la palpación y cambios en la coloración de la piel del abdomen. Analítica: Hb: 11,6 g/dl, leucocitos 11300 (60% de neutrófilos), plaquetas 88000. Acidosis metabólica en la gasometría. En la radiografía de abdomen se observa dilatación de asas, neumatosis intestinal y gas en región de la vena porta.

Correspondencia: Marta Suárez Rodríguez.
E-mail: msr1070@hotmail.com

1. ¿Cuál es la sospecha diagnóstica?

A) Enterocolitis necrotizante grado IB
B) Sepsis nosocomial
C) Alergia a proteínas de leche de vaca
D) Enterocolitis necrotizante grado IIB

RESPUESTA CORRECTA: D

La enterocolitis necrotizante es la patología digestiva adquirida más frecuente y grave en el periodo neonatal, que ocasiona una importante morbi-mortalidad. Entre un 5 y un 25% de casos ocurren en niños a término, pero es principalmente una patología de los prematuros de muy bajo peso. La incidencia es del 10% de los neonatos de muy bajo peso, aunque esta incidencia varía de unos países a otros y de unos centros a otros[1, 2]. Clínicamente se clasifica en 3 estadíos (Tabla I).

2. ¿Qué factores habrán influido en el desarrollo de la enterocolitis necrotizante en este neonato?

A) Prematuridad y alimentación con fórmula adaptada
B) Prematuridad y la necesidad de ventilación no invasiva
C) Antibioterapia
D) Ninguno de los anteriores

RESPUESTA CORRECTA: A

La patogenia de la enterocolitis necrotizante continua sin conocerse completamente[1]. Parece que es el resultado de una combinación de factores en un huésped susceptible que termina con la necrosis del intestino, con o sin perforación. La prematuridad y la alimentación enteral con fórmula son los únicos factores evidentemente asociados a la enterocolitis necrotizante: el 90% de los niños afectos son prematuros, siendo mayor su incidencia cuanto menor es la edad gestacional y más bajo el peso al nacer. El 90% han recibido alimentación enteral con fórmula adaptada previa a la aparición de la enfermedad[3].

Esta mayor susceptibilidad de los niños prematuros se atribuye a la inmadurez de la motilidad intestinal, de la función digestiva, de la regulación del flujo sanguíneo mesentérico y de aspectos inmunológicos locales y sistémicos. Recientemente se han implicado factores genéticos en la patogenia de la enterocolitis, entre los que cabe destacar mutaciones génicas en el TNF-α, NOD2 y receptores de la IL-4[3].

3. ¿La microbiota intestinal de este neonato habrá influido de alguna manera en el desarrollo de la enterocolitis necrotizante?

A) Sí, ha disminuido el riesgo de enterocolitis ya que la microbiota del prematuro es menos abundante que la del recién nacido a término
B) Sí, ha aumentado el riesgo de enterocolitis porque en el recién nacido prematuro se produce una alteración en el proceso de colonización intestinal
C) La microbiota intestinal no influye en desarrollo de una enterocolitis necrotizante
D) Ninguna de las anteriores es verdadera

RESPUESTA CORRECTA: B

La colonización intestinal normal se produce, durante el parto, como consecuencia del contacto del niño con la microbiota vaginal y la propia de la zona perineal de la madre (enterococos, bifidobacterias, bacteroides, lactobacilos) y posteriormente de la propia lactancia (bifidobacterias y lactobacilos). Esta colonización se ve favorecida por el pH gástrico relativamente elevado y la secreción atenuada de bilis, típicas de los recién nacidos[4]. La microbiota intestinal se va a

Tabla I
Clasificación de la enterocolitis. Criterios de Bell, modificados por Walsh y Kleigman

Estadio NEC	*Signos sistémicos*	*Signos intestinales*	*Signos radiológicos*
IA SOSPECHA	Inestabilidad térmica, apnea, bradicardia, letargia	Restos gástricos, distensión abdominal leve, vómitos, sangre oculta en heces	Normal o íleo leve
IB SOSPECHA	Ídem	Abundante sangre en heces	Normal o íleo leve
IIA CONFIRMADA (leve)	Ídem	IB + ausencia ruidos intestinales y/o dolor abdominal	Dilatación, íleo, neumatosis intestinal
IIB CONFIRMADA (moderada)	Ídem + acidosis metabólica y trombocitopenia	IIA + dolor abdominal definido y/o celulitis abdominal	IIA + gas en vena porta y/o ascitis
IIIA AVANZADA Intestino intacto (Grave)	Ídem + hipotensión, bradicardia, apnea acidosis mixta, CID	IIB + signos de peritonitis generalizada. Abdomen muy doloroso y distendido	IIB + ascitis definida
IIIB INTESTINO PERFORADO	Ídem	Ídem	IIIA + neumoperitoneo

ver condicionada por el tipo de parto y por el tipo de alimentación. Así, los niños nacidos por parto vaginal tienen una microbiota más rica en bifidobacterias y lactobacilos que los niños nacidos por cesárea.

En los recién nacidos prematuros, debido a la inmadurez intestinal, al uso frecuente de antibióticos y a la estancia en la UCIN, hay una alteración en la colonización intestinal que predispone al desarrollo de enterocolitis necrotizante[5]. En la microbiota intestinal de estos neonatos prematuros hay bajos niveles de bifidobacterias y sin embargo, hay un aumento de microorganismos patógenos como *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter y Pseudomonas*.

4. Además de utilizar la lactancia materna en la medida de lo posible, ¿qué otra medida ha demostrado mayor eficacia en la disminución del riesgo de enterocolitis necrotizante severa en el recién nacido prematuro?

A) Uso de antibioterapia empírica
B) Administración de suplementos de arginina
C) Administración de probióticos
D) Tratamiento con ranitidina

RESPUESTA CORRECTA: C

El uso de tratamiento profiláctico con probióticos en el recién nacido prematuro ha demostrado una disminución significativa del riesgo de padecer una enterocolitis necrotizante severa (estadíos II o III) frente al uso de placebo[1, 2]. En la última revisión de la biblioteca Cochrane se incluyen 24 ensayos clínicos aleatorizados sobre el uso de probióticos en el recién nacido prematuro (recién nacido < 37 semanas y/ < 2500 g), lo que supone 2761 niños tratados con probióticos frente a 2768 niños no tratados. En 20 de ellos el objetivo principal era evaluar la disminución de la incidencia de enterocolitis necrotizante grave (estadios II o III) y todos ellos concluyen que la administración profiláctica de probióticos en este grupo de neonatos disminuye significativamente la incidencia de enterocolitis necrotizante severa[1].

En un estudio que incluye 152 recién nacidos de menos de 32 semanas de edad gestacional y menos de 1250 g de peso al nacimiento, la incidencia de enterocolitis necrotizante fue menor en los que recibieron suplementos de arginina frente a los que recibieron placebo. De todas maneras, estos resultados hay que interpretarlos con cautela debido a la alta prevalencia de enterocolitis necrotizante en el grupo control[6].

5. ¿Qué otros beneficios ha demostrado el tratamiento con probióticos en el recién nacido prematuro?

A) Disminución de la incidencia de sepsis
B) Disminución de la mortalidad y de los días de hospitalización
C) Mejor ganancia ponderal
D) No tiene más efectos beneficiosos

RESPUESTA CORRECTA: B

Según los últimos metaanálisis de ensayos clínicos controlados y aleatorizados, el tratamiento profiláctico con probióticos en el recién nacido prematuro de menos de 37 semanas y menos de 2500 g de peso al nacimiento, disminuye de forma significativa la mortalidad, los días de hospitalización y los días tras los que se alcanza la nutrición enteral exclusiva[1, 2]. Sin embargo, en la revisión Cochrane del año 2014[1], los autores concluyen que no es posible extrapolar estos resultados a los recién nacidos de menos de 1000 g, al no existir datos suficientes con respecto a los beneficios y los efectos adversos potenciales en este grupo de neonatos. Esta conclusión no parece clara, ya que el 25% de los recién nacidos incluidos en el metaánalisis eran menores de 1000 g y sólo un 3% de la población tenía un peso al nacimiento mayor de 1500 g. El Grupo de Nutrición y Metabolismo Neonatal de la Sociedad Española de Neonatología considera que el uso de probióticos debería tenerse en cuenta en el prematuro ≤ 32 semanas de gestación y/o < 1500 g, incluidos los menores de 1000 g, si bien su uso, en especial en los recién nacidos con menos de 1000 g, debe someterse a una estrecha monitorización[5].

6. ¿Cuál de las siguientes sería una limitación de las actuales revisiones sistemáticas sobre el uso de los probióticos en el recién nacido prematuro?

A) Los tipos de probióticos utilizados son diferentes en cada uno de los ensayos clínicos
B) Se evalúa el tipo de alimentación del recién nacido
C) No hay limitaciones
D) Todas las anteriores son correctas

RESPUESTA CORRECTA: A

La principal limitación de los trabajos publicados sobre el uso de probióticos es que el tratamiento no es una intervención homogénea, ya que en cada ensayo clínico se utiliza un tipo diferente de probiótico[5, 7]. En algunos se utilizan especies de lactobacilos solos, en otros bifidobacterias solas y en otros combinaciones de varios probióticos. Se sabe que existe un efecto dependiente del tipo de género, especie y cepa, por lo que los resultados beneficiosos atribuidos a un tipo de probiótico no son extrapolables a otro probiótico. Además, tampoco hay uniformidad en la dosis, inicio y duración del tratamiento con probióticos.

Por otro lado, no existe un control del tipo de alimentación del prematuro y dado que la lactancia materna tiene un efecto protector frente al desarrollo de las enterocolitis, esto podría ser un factor de confusión en los resultados[7].

Los datos actuales deberían ser confirmados con un nuevo ensayo clínico aleatorizado multicéntrico con diseño adecuado para un tipo concreto de probiótico, dosis, intervalo y duración del tratamiento, en el que además se tenga en cuenta el tipo de alimentación del recién nacido[7].

7. En caso de utilizar un probiótico para la prevención de la enterocolitis necrotizante, ¿Cuál sería el más adecuado?

A) *Lactobacillus spp*
B) *Bifidobacterium spp*
C) *Lactobacillus + Bifidobacterium*
D) *Saccharomyces boulardii*

RESPUESTA CORRECTA: C

El tratamiento profiláctico con *Lactobacillus + Bifidobacterium* en el recién nacido prematuro ha demostrado provocar un descenso significativo de la mortalidad y de la incidencia de enterocolitis necrotizante severa. Sin embargo, la administración de *Lactobacillus spp*, *Bifidobacterium spp* o *Saccharomyces boulardii* solos no reducen la mortalidad en este grupo de neonatos. Por tanto, a día de hoy, la pauta más adecuada sería la administración de una mezcla de *Lactobacillus spp y Bifidobacterium spp*[1]. En general, se recomienda un inicio del tratamiento precoz, cuando se inicia la nutrición enteral, a ser posible antes de los 7 días de vida y mantenerlo hasta el alta o hasta las 35 semanas de edad postconcepcional[7].

Referencias

1. AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enteroclitis in preterm infants (Review). *Evid.-Based Child Health* 2014; 9(3): 584-671.
2. AlFaleh K, Anabrees J, Bassler D, Al-Kharfi T. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev* 2011; (3): CD005496.
3. Demestre Guasch X, Raspall Torrent F. Enterocolitis necrosante. En: Protocolos Diagnóstico Terapéuticos de la AEP: Neonatología, Ergon (2ª Ed), Madrid, 2008.
4. Pascual Marcos MJ. Uso de prebióticos y probióticos en las fórmulas lácteas infantiles. *Nutr Hosp* 2013; 28(1): 53-55.
5. Narbona López E, Uberos Fernández J, Armadá Maresca MI, Couce Pico ML, Rodríguez Martínez G, Saenz de Pipaon M. Gurpo de Nutrición y Metabolismo Neonatal, Sociedad Española de Neonatología: recomendaciones y evidencias para la suplementación dietética con probióticos en recién nacidos de muy bajo peso al nacer. An Pediatr (Barc). 2014. http://dx.doi.org/10.1016/j.anpedi.2014.06.020.
6. Schanler RJ. Prevention of necrotizing enterocolitis in newborns. In: UpToDate, Kim MS (Ed), UpToDate, Waltham, MA, 2014.
7. González de Dios J, González Muñoz M. Probióoticos y enterocolitis necrotizante del prematuro; to NEC or not to NEC?, ésta es la pregunta. *Nutr Hosp* 2013; 28(6): 2115-2123.

Nutrición Hospitalaria

Nutr Hosp. 2015;31(Supl. 1):72-77
ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ
S.V.R. 318

Pediatría

Uso de probióticos y prebióticos en las fórmulas infantiles

Venancio Martínez Suárez

Centro de Salud El Llano, Gijón. España.

Resumen

Actualmente no hay datos suficientes para recomendar la suplementación rutinaria de las fórmulas infantiles con probióticos y/o prebióticos. Sin embargo, la administración de cualquiera de ambos componentes alimentarios de forma aislada o en combinación en los preparados de inicio o de continuación se ha asociado a efectos clínicos beneficiosos más allá de los primeros meses de vida. Entre ellos se incluyen la reducción en el riesgo de infecciones gastrointestinales y su tratamiento, el control de las manifestaciones de atopia, disminución del uso de antibióticos y una menor frecuencia de cólicos o irritabilidad. Además, los diferentes estudios realizados no han mostrado consecuencias nocivas de su consumo. Desde una revisión de las publicaciones más significativas, el presente texto quiere ofrecer una rápida panorámica sobre los principales aspectos asistenciales que hoy nos plantea este tema.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):72-77)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8711

Palabras clave: *Fórmulas infantiles. Probióticos. Prevención de diarrea. Prevención de cólicos infantiles.*

USE OF PROBIOTICS AND PREBIOTICS IN INFANT FORMULAS

Abstract

Currently there are insufficient data to recommend routine supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics. However, administration of either food components in isolation or in combination early or follow-on or toddler infant formulas has been associated with clinical benefit beyond the first months of life. Thus, among them, a reduced risk of gastrointestinal infections and their treatment, control of atopy manifestations, decreased antibiotic use and a lower frequency of colic or irritability can be included. Furthermore, different studies have shown no harmful consequences of its consumption. From a review of the most relevant studies, this paper aims to provide a quick overview of the main clinical issues this topic brings up today.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):72-77)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8711

Key words: *Infant formula. Probiotics. Diarrhea prevention. Infant colic prevention.*

La leche humana favorece la proliferación y mantenimiento de flora bifidógena en el tubo digestivo del lactante, con las importantes consecuencias que ello pueda tener sobre su salud. Para lograr ese mismo efecto con las fórmulas infantiles (FIs) en los últimos años se han diseñado dos estrategias, con tres posibilidades: el uso de las bacterias vivas (probióticos), la administración de sustancias favorecedoras del crecimiento de esas bacterias (prebióticos) o la combinación de ambas (simbióticos)[1]. La información hoy disponible permite afirmar: que la microbiota gastrointestinal influye sobre el estado de salud del niño, pudiendo el desarrollo de algunas enfermedades verse modificado por cambios en la colonización temprana del intestino[2-9]; que dicha microbiota puede ser modificada con el consumo de probióticos y prebióticos[10-12]; y que estos son productos seguros, aunque no hay datos suficientes sobre sus efectos como para recomendar su adición sistemática a las fórmulas[3]. Hay que subrayar que esta actual falta de pruebas suficientes de eficacia no significa que en el futuro la investigación clínica no llegue a establecer beneficios significativos para la salud de los probióticos y prebióticos.

Desarrollo de la microbiota intestinal

El tracto gastro-intestinal del feto es aséptico, existiendo una cronología hasta alcanzar la microbiota madura[13-15]. La primera inoculación del tubo digestivo fetal se produce en el momento del nacimiento a partir de la microbiota intestinal y vaginal materna, cambiando luego rápidamente desde una fase temprana en la que los anaerobios facultativos (bacterias entéricas, enterococos y estafilococos) se constituyen

Correspondencia: Venancio Martínez Suárez.
E-mail: venancioms@telecable.es

en gérmenes dominantes. En los niños alimentados exclusivamente con leche materna, sigue una segunda fase en la que los anaerobios estrictos (*bifidobacterium* y *lactobacilos)* constituyen 60-90% del total de la microbiota; en los alimentados con fórmula ésta es menos diversa y no existe un predominio de esas especies. Y, por último, la fase de ablactación o de introducción de la alimentación complementaria lleva a la instauración de la microbiota madura tipo adulto con una disminución de las bifidobacterias. El caso es que al año de vida la microbiota intestinal del niño que recibe lactancia maternal y del que recibe fórmula son básicamente iguales, tanto en número como en composición. De hecho, a partir de esta edad y más allá de la infancia las concentraciones de bacterias en el colon alcanzan 10^{12} unidades formadoras de colonias por mililitro de contenido intestinal (10 veces el número total de células en el cuerpo humano), con 500 especies diferentes y 30 a 40 constituyendo el 99% de esa microbiota en el adulto[16].

Hoy se acepta que la aparición de muchas enfermedades puede estar relacionada con la interferencia de algunos factores sobre el desarrollo temprano del sistema de defensa de la mucosa intestinal[17, 18]. Ciertamente, el principal factor determinante de la actividad del sistema inmune es la predisposición genética[19], aunque se ha comprobado que una colonización rápida y extensa es dependiente de la edad gestacional al nacer, del tipo de nacimiento y de la alimentación recibida inicialmente. Así, los recién nacidos por cesárea, prematuros y/o expuestos a antibióticos en el período perinatal o postnatal tienen un retraso en la colonización probiótica comensal del intestino.

Fórmulas suplementadas con probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios de salud en el huésped[20, 21], típicamente bacterias anaerobias cuyas características biológicas les permiten prevalecer sobre algunos microorganismos patógenos del tracto digestivo humano. Sintetizan y liberan productos metabólicos –denominados posbióticos– que ejercen cierta influencia reguladora beneficiosa sobre el huésped y pueden actuar como moduladores inmunológicos[4, 5, 22]. Las bacterias probióticas más estudiadas son *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG), *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus*. También algunas levaduras como *Saccharomyces boulardii* se han considerado como agentes probióticos. Los efectos de todos estos organismos pueden variar en función de la cepa utilizada, de la formulación de un tipo o más de bacterias lácticas, de su interacción, del sustrato sobre el que fermentan y de la genética del individuo, del tipo de enfermedad que padezca y de la dosis administrada, con lo que la ventaja esperable en su uso debe de ser analizada conociendo y especificando estas características (Figs. 1 y 2).

¿Cuál es la dosis ideal?

¿Cómo interactúan cepas diferentes entre sí?

¿Es mejor un mayor número de cepas?

¿Modifican el valor nutricional de la fórmula?

¿Cambia su metabolismo al incorporarse al ambiente alimentario?

¿Cómo es la interacción con ácidos grasos esenciales?

¿Transferencia de resistencia a antibióticos?

¿Riesgo infección en prematuros, inmunodeprimidos y cardiopatías congénitas?

¿Efectos a largo plazo en la respuesta inmune?

Fig. 1.—Probióticos: cuestiones por resolver

No todos los probióticos son iguales.

Su acción es específica de cada cepa y para cada patología.

Los resultados obtenidos en estudios para una determinada cepa no son extrapolables a otras cepas de probióticos.

Es necesario utilizar probióticos de calidad reconocida y con un sólido aval científico que garantice su eficacia y seguridad.

Fig. 2.— Principales consideraciones sobre el uso de probióticos en las fórmulas infantiles

Los probióticos en la prevención y tratamiento de algunas enfermedades

Diarrea infecciosa

Los resultados de los ensayos controlados aleatorios (ECAs) han probado un claro beneficio de los probióticos en la prevención de infecciones gastrointestinales agudas en lactantes y niños sanos[23, 24]. Las cepas de probióticos utilizados incluyeron LGG, *S thermophilus*, *Lactobacillus casei y B. lactis*, o *Lactobacillus reuteri* mezclado con leche o fórmula infantil o administrado como un suplemento oral. Un meta-análisis ha mostrado que se necesita que 7 niños reciban LGG para prevenir una GEA nosocomial por rotavirus[25], y aunque los datos disponibles no apoyan suficientemente el uso rutinario de los probióticos para prevenir la diarrea por rotavirus se acepta que puede haber circunstancias en las que resulten beneficiosos.

En cuanto al tratamiento, ECAs en niños previamente sanos han proporcionado resultados sobre el beneficio terapéutico de los probióticos en la diarrea infecciosa aguda. En un ensayo aleatorizado doble ciego controlado con placebo[26] la administración de LGG disminuyó la duración de la diarrea por rotavirus en una media de 40 horas, aunque la duración de la diarrea de cualquier otra etiología no se vio afectada, acortando también el tiempo necesario para la rehidratación intravenosa en una media de 18 horas. Los resultados de otros meta-análisis[27-29] y de una revisión Cochrane[30] han mostrado su beneficio en el tratamiento de la diarrea infecciosa aguda en niños, reduciendo el número de deposiciones diarreicas y la duración de la diarrea en aproximadamente un día. Según los estu-

dios disponibles, LGG es el probiótico más eficaz y su efecto es dosis-dependiente. Los probióticos también parecen ser más eficaces cuando se administran precozmente en el curso de la diarrea.

Diarrea asociada al uso de antibióticos

Varios meta-análisis de los ECAs sobre el uso de probióticos en la prevención de la diarrea asociada a antibióticos en niños indican su efecto beneficioso[31, 32]. En la mayoría de los estudios el tratamiento con un probiótico se inició simultáneamente a la terapia de una infección respiratoria aguda (otitis media), reduciéndose el riesgo de desarrollar la diarrea asociada a antibióticos respecto al placebo del 28,5% al 11,9%[31]. LGG, *B. lactis*, *S. thermophilus* y *S. boulardii* han sido los agentes utilizados, y aproximadamente 1 de cada 7 casos de diarrea asociada a antibióticos fue impedido por el uso de un probiótico[31]. Según un meta-análisis[32], el tratamiento probiótico redujo significativamente las probabilidades de diarrea asociada a antibióticos en comparación con placebo, tanto con la levadura *S. boulardii* como con LGG, y sin diferencias significativas entre ambos. Por lo tanto, los probióticos pueden considerarse de utilidad para reducir la incidencia de la diarrea asociada a antibióticos.

Por el contrario, en niños no se han realizado ECAs para valorar el efecto de los probióticos en el tratamiento de la diarrea asociada a antibióticos, por lo que su uso generalizado no puede ser recomendado. Sin embargo, el pediatra que atiende a un niño con diarrea secundaria al uso de antibióticos debe sopesar los posibles beneficios de su asociación o, alternativamente, el suspender o modificar el tratamiento antibiótico cuando sea posible.

Cólico del lactante

Hasta la fecha ningún ECA se ha realizado con la prevención del cólico como un criterio de valoración principal. Un solo ECA no ciego examinó el efecto de la administración de *L. reuteri* frente simeticona en el tratamiento de los cólicos en lactantes amamantados[33], mejorando los síntomas de cólico (minutos de llanto por día) dentro de la primera semana de tratamiento en comparación con la terapia de simeticona, aunque se necesitan más estudios para recomendar el uso rutinario.

Otras enfermedades digestivas

En una revisión Cochrane de 2008[34] sobre la base de 9 ECAs[35-43] la suplementación enteral con probióticos redujo significativamente tanto la incidencia de enterocolitis como su mortalidad, aunque la sepsis nosocomial secundaria no disminuyó significativamente[34]. Estos ECAs apoyarían el complementar con probióticos las fórmulas de uso en recién nacidos prematuros de más de 1.000 g al nacer, aunque en prematuros extremos (de menos de 1.000 g) los datos no permiten estimar con fiabilidad su eficacia y seguridad. La misma Cochrane insta a la precaución en la interpretación y aplicación de estos resultados debido a la gran heterogeneidad de los estudios incluidos en la revisión.

Se ha constatado un modesto beneficio en el uso de probióticos como terapia adyuvante para la infección sintomática por *H. pylori* en adultos[44]. En niños solo se ha publicado un ECA[45] en el que se observó una mayor tasa de erradicación en el grupo de tratamiento con suplemento de probióticos, sin que los efectos adversos difirieran significativamente. Por lo tanto, los probióticos podrían ser considerados beneficiosos en niños, aunque para valorar algunos aspectos serán necesarios más estudios.

Respecto a la enfermedad inflamatoria intestinal, los resultados de los ECAs en adultos con probióticos para el tratamiento de la colitis ulcerosa han mostrado una eficacia comparable al tratamiento con fármacos antiinflamatorios en casos leves y moderados[46-49]. Según una reciente revisión Cochrane[50] en niños no se puede recomendar su uso general sin otras investigaciones. Y para la enfermedad de Crohn no se ha probado eficacia alguna.

Ha habido un único ECA sobre el tratamiento del síndrome del intestino irritable en niños[51], en el que LGG mostró reducir la distensión abdominal y el malestar en un grupo de 50 pacientes pediátricos en un período de estudio de 6 semanas.

Un ECA abordó el uso de probióticos (LGG) frente a placebo como terapia adyuvante de la lactulosa en el tratamiento del estreñimiento funcional[52], no pudiéndose a la luz de sus resultados recomendar administración en el tratamiento del estreñimiento.

Enfermedad atópica

Los niños atópicos tienen una microbiota intestinal diferente de la de otros niños, con una concentración mayor de *Clostridium* y menor cantidad de *Bifidobacterium*[22, 52], lo que ha servido de fundamento para la administración de probióticos a lactantes con riesgo de enfermedades atópicas, especialmente a los alimentados con fórmula.

En un estudio doble ciego ECA enfrentando a LGG con placebo durante las últimas 4 semanas de embarazo y que se continuaba durante 6 meses después del nacimiento en casos de alto riesgo de alergia[53], la frecuencia del eccema atópico a los dos años fue significativamente menor en el grupo LGG. El número de parejas madre-hijo LGG necesario para prevenir 1 caso de eccema atópico crónica recurrente fue de 4,5. A los 4 años de edad, el eczema se produjo en el 26% de los recién nacidos en el grupo con LGG, en comparación con 46% en el grupo placebo. Estos resultados apoyan un efecto preventivo para dar un probiótico a las ma-

dres al final del embarazo y para las madres y los lactantes durante los primeros 6 meses de lactancia para la prevención del eccema atópico en niños con riesgo de enfermedad atópica. Sin embargo, estos resultados no han sido confirmados por Kopp y Salfeld[54], lo que dio lugar a que Prescott y Bjorksten[55] y una revisión Cochrane de 2007[56] a concluir que no hay pruebas suficientes para justificar la administración rutinaria de suplementos de probióticos a mujeres embarazadas o niños pequeños para prevenir las enfermedades alérgicas en la infancia.

Al considerar su efecto como tratamiento de la alergia, en un ECA la administración a lactantes con dermatitis atópica moderada a severa de *Lactobacillus fermentum* durante 8 semanas mejoró la extensión y severidad de los eccemas respecto a los que recibieron placebo[57, 58]. Estos resultados son alentadores, aunque la revisión Cochrane de 2008[59] indica que según los estudios disponibles los probióticos no han demostrado suficientemente su eficacia en el tratamiento del eccema atópico.

Infecciones respiratorias

A pesar de los estudios realizados, no disponemos de evidencia de que algún probiótico añadido a la fórmula disminuya el número de episodios infecciosos respiratorios ni descienda el uso de antibióticos en lactantes menores de 6 meses. También es débil la evidencia de que se asocie a un menor consumo de antibióticos en niños por encima del medio año de vida.

Prevención y tratamiento del cáncer

Si bien los resultados de estudios en modelos animales han demostrado ciertos beneficios de algunos alimentos funcionales como el yogur y de la administración de los probióticos en la prevención de procesos cancerígenos[61], no se justifica la recomendación de su administración rutinaria para tratar o prevenir el cáncer ni en humanos adultos ni en niños.

Fórmulas con prebióticos

Un prebiótico es un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias en el colon (Fig. 3). Los prebióticos son casi siempre oligosacáridos y entre ellos los fructo-oligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y la inulina son los más importantes. Se ha señalado que en concentraciones suficientes y con una relación FOS/GOS adecuada (de 1/9) pudieran tener cierto efecto protector frente a algunas enfermedades[2]. Los polisacáridos complejos que constituyen la fibra dietética también pueden ser consi-

No es absorbido ni hidrolizado en tramos superiores del tracto digestivo.

Debe ser un sustrato selectivo para una o un número limitado de bacterias del colon.

Debe ser capaz de modificar la microbiota colónica de una forma beneficiosa para la salud.

Puede inducir efectos luminales o sistémicos beneficiosos.

Fig. 3.—Característica principales de los prebióticos

derados como agentes prebióticos. Y a pesar de que los nucleótidos de la dieta no se ajustan a una definición estricta, se consideran agentes prebióticos y han demostrado una función inmunomoduladora local específica[62].

Pocos ECAs han examinado los efectos de la adición de oligosacáridos prebióticos a las fórmulas infantiles (63-65), aunque Boehm et al[64] estudiaron el efecto de la adición de oligosacáridos a una concentración de 1 g/dL a los preparados para lactantes prematuros durante 1 mes (90% GOS y 10% FOS) encontrando recuentos de bifidobacterias en heces significativamente aumentados respecto al grupo no suplementado. Además, los recuentos alcanzaron el rango de un grupo de referencia amamantado. En otro estudio, Moro et al[66] hallaron altas concentraciones de bifidobacterias y lactobacilos en las heces de niños con fórmula suplementada, habiéndose probado también[67] buena tolerancia y sin efectos adversos durante el período de suplementación. Sin embargo, es preciso disponer de más información antes de que la utilidad de la adición de prebióticos a las fórmulas para lactantes se pueda determinar.

Seguridad de los probióticos y prebióticos añadidos a las fórmulas infantiles

La seguridad de la adición de probióticos y prebióticos a las FIs se ha evaluado en varios ECAs (66-68). Debido a que estos productos se utilizan a menudo como única fuente de nutrición en los lactantes durante un período crítico del crecimiento y desarrollo, todos los ingredientes utilizados en su preparación deben haber probado la ausencia de cualquier tipo de riesgo. El Comité de Nutrición de la Sociedad Europea de Gastroenterología Pediátrica, Hepatología y Nutrición (ESPGHAN) ha manifestado que se necesitan más estudios para confirmar la total seguridad y eficacia en el uso de probióticos y prebióticos en niños[7], si bien hasta la fecha estos productos se han mostrado inocuos en los lactantes. Según declaró este Comité sería deseable tener un procedimiento centralizado de supervisión para garantizar su seguridad, reconocer su identidad y garantizar su estabilidad genética[7, 20, 68]. La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación ha apoyado la adición de productos prebióticos a las fórmulas infantiles de continuación[69], que en EEUU no requieren revisión y aprobación previa a la comercialización de la Food and Drug Admi-

nistration (FDA), aunque todos los preparados para lactantes deben cumplir lo que se consideran buenas prácticas de fabricación, embasado y distribución, controladas por la Ley de fórmulas infantiles de 1980 bajo sus auspicios y control directos.

Referencias

1. Martínez V, Moreno JM. Lactancia artificial, dentro del Tratado de Pediatría de Cruz, 11 edición, de la Asociación Española de Pediatría. Ergón, Madrid 2014; pp: 1043-47.
2. Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr* 2007; 137(3 suppl 2): 830S– 837S.
3. Kullen MJ, Bettler J. The delivery of probiotics and prebiotics to infants. *Curr Pharm Des* 2005;11(1):55–74.
4. Michail S, Sylvester F, Fuchs G, Issenman R. Clinical efficacy of probiotics: review of the evidence with focus on children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;43(4): 550 –557.
5. Boyle RJ, Robins-Browne RM, Tang ML. Probiotic use in clinical practice: what are the risks? *Am J Clin Nutr* 2006;83(6): 1256 –1264.
6. Szajewska H, Setty M, Mrukowicz J, Guandalini S. Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2006;42(5):454–475.
7. Agostoni C, Axelsson I, Braegger C, et al. Probiotic bacteria in dietetic products for infants: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004;38(4):365–374.
8. Saavedra JM. Clinical applications of probiotic agents. *Am J Clin Nutr* 2001;73(6): 1147S–1151S.
9. Matarese LE, Seidner DL, Steiger E. The role of probiotics in gastrointestinal disease. *Nutr Clin Pract* 2003;18(6):507–516.
10. Langhendries JP, Detry J, Van Hees J, et al. Effect of a fermented infant formula containing viable Bifidobacteria on the fecal flora composition and pH of healthy full-term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;21:177–181.
11. Bennet R, Nord CE, Zetterstrom R. Transient colonization of the gutof newborn infants by orally administered Bifidobacteria and Lactobacilli. *Acta Paediatr* 1992;81:784–787.
12. Fukushima Y, Li ST, Hara H, Terada A, Mitsuoka T. Effect of follow up formula containing Bifidobacteria (NAN BF) on fecal flora metabolites in healthy children. *Biosci Microflora* 1997; 16:65–72.
13. Stark PL, Lee A. The microbial ecology of the large bowel of breast-fed and formula-fed infants during the first year of life. *J. Med. Microbiol* 1982;15:189–203.
14. Orrhage K, Nord CE. Factors controlling the bacterial colonization of the intestine in breast-fed infants. *Acta Paediatr Suppl* 1999;88:47–57.
15. Harmsen HJM, Wildeboer-Veloo ACM, Raangs GC, Wagendop AA, Klijn N, Bindels JG, Welling GW. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification and detection methods. *J Ped Gastroenterol Nutr* 2000;30:61-67.
16. Tannock G. The intestinal microflora. In: Fuller R, Perdigón G, eds. Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health. Oxford, England: Blackwell Press; 2003:1–23.
17. Matsuzaki T, Takagi A, Ikemura H, Matsuguchi T, Yokokura T. Intestinal microflora: probiotics and autoimmunity. *J Nutr* 2007; 137(3 suppl 2):798S– 802S.
18. Yuan Q, Walker WA. Innate immunity of the gut: mucosal defense in health and disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2004; 38(5):463– 473.
19. Koletzo B, Aggett PJ, Bindels JG, Bung P, Ferré P, Gil A, Lentze MJ, Roberfroid M, Strobel S. Growth, development and differentiation: functional food science approach. *Br J Nutr* 1998; 80(Suppl 1):S5-S45.
20. Council for Agricultural Science and Technology Probiotics: Their Potential to Impact Human Health. Ames, IA: Council for AgriculturalScienceandTechnology;2007.Disponibleen:www.cast-science.org/websiteUploads/publicationPDFs/ CAST %20Probiotics%20Issue%20Paper% 20FINAL144.pdf.
21. Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. Guidelines for the evaluation of probiotics in food: joint FAO/WHO Working Group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Disponible en: ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2. pdf.
22. Björkstén B, Naaber P, Sepp E, Mikelsaar M. The intestinal microflora in allergic Estonian and Swedish 2-year-old children. *Clin Exp Allergy* 1999;29(3):342–346.
23. Oberhelman RA, Gilman RH, Sheen P, et al. A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J Pediatr* 1999;134(1):15–20.
24. Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *Am J Clin Nutr* 2004;79(2):261–267.
25. Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz JZ, Armanska M, Mikolajczyk W. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J Pediatr* 2001;138(3):361–365.
26. Szymanski H, Pejcz J, Jawien M, Chmielarczyk A, Strus M, Heczko PB. Treatment of acute infectious diarrhoea in infants and children with a mixture of three Lactobacillus rhamnosus strains: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23(2):247–253.
27. Szajewska H, Mrukowicz JZ. Probiotics in the treatment and prevention of acute infectious diarrhea in infants and children: a systematic review of published randomized, double-blind, placebo-controlled trials. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33(suppl 2):S17–S25.
28. Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM,Christakis DA. Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 2002;109(4):678–684.
29. Huang JS, Bousvaros A, Lee JW, Diaz A, Davidson EJ. Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children: a meta-analysis. *Dig Dis Sci* 2002;47(11):2625–2634.
30. Allen SJ, Okoko B, Martinez E, Gregorio G, Dans LF. Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;(2):CD003048.
31. Szajewska H, Ruszczynski M, Radzikowski A. Probiotics in the prevention of antibiotic-associated diarrhea in children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *J Pediatr* 2006; 149(3):367–372.
32. D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ* 2002;324(7350):1361.
33. Savino F, Pelle E, Palumeri E, Oggero R, Miniero R. Lactobacillus reuteri (American Type Culture Collection Strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: a prospective randomized study. *Pediatrics* 2007;119(1).
34. Alfaleh K, Bassler D. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterminfants. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(1):CD005496.
35. Bin-Nun A, Bromiker R, Wilschanski M, et al. Oral probiotics prevent necrotizing enterocolitis in very low birth weight neonates. *J Pediatr* 2005;147(2):192–196.
36. Costalos C, Skouteri V, Gounaris A, et al. Enteral feeding of premature infants with Saccharomyces boulardii. *Early Hum Dev* 2003;74(2):89 –96.
37. Dani C, Biadaioli R, Bertini G, Martelli E, Rubaltelli FF. Probiotics feeding in prevention of urinary tract infection, bacterial sepsis and necrotizing enterocolitis in preterm infants: a prospective double blind study. *Biol Neonate* 2002;82(2): 103–108.
38. Kitajima H, Sumida Y, Tanaka R, Yuki N, Takayama H, Fujimura M. Early administration of Bifidobacterium breve to preterm infants: randomised controlled trial. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 1997; 76(2):F101–F107.
39. Li Y, Shimizu T, Hosaka A, Kaneko N, Ohtsuka Y, Yamashiro Y. Effects of Bifidobacterium breve supplementation on intestinal flora of low birth weight infants. *Pediatr Int* 2004;46(5):509 –515.

40. Lin HC, Su BH, Chen AC, et al. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics* 2005;115(1):1– 4.
41. Manzoni P, Mostert M, Leonessa ML, et al. Oral supplementation with Lactobacillus casei subspecies rhamnosus prevents enteric colonization by Candida species in preterm neonates: a randomized study. *Clin Infect Dis* 2006;42(12):1735–1742.
42. Millar MR, Bacon C, Smith SL, Walker V, Hall MA. Enteral feeding of premature infants with Lactobacillus GG. *Arch Dis Child* 1993; 69(5 spec No.):483– 487.
43. Reuman PD, Duckworth DH, Smith KL, Kagan R, Bucciarelli RL, Ayoub EM. Lack of effect of Lactobacillus on gastrointestinal bacterial colonization in premature infants. *Pediatr Infect Dis* 1986;5(6):663–668.
44. Lesbros-Pantoflickova D, Corthesy-Theulaz I, Blum AL. Helicobacter pylori and probiotics. *J Nutr* 2007;137(3 suppl 2): 812S– 818S.
45. Sýkora J, Valeckova K, Amlerova J, et al. Effects of a specially designed fermented milk product containing probiotic Lactobacillus casei DN-114 001 and the eradication of H. pylori in children: a prospective randomized double-blind study. *J Clin Gastroentero* 2005;39(8):692– 698.
46. Kruis W, Schutz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral Escherichia coli preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11(5):853– 858.
47. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic Escherichia coli versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999;354(9179):635– 639.
48. Kruis W, Fric P, Pokrotnieks J, et al. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic Escherichia coli Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* 2004; 53(11):1617–1623.
49. Ishikawa H, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A, Otani T. Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr* 2003; 22(1):56–63.
50. Mallon P, McKay D, Kirk S, Gardiner K. Probiotics for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(4):CD005573.
51. Bausserman M, Michail S. The use of *Lactobacillus* GG in irritable bowel syndrome in children: a double-blind randomized control trial. *J Pediatr* 2005;147(2):197–201.
52. Banaszkiewicz A, Szajewska H. Ineffectiveness of *Lactobacillus* GG as an adjunct to lactulose for the treatment of constipation in children: a double-blind, placebocontrolled randomized trial. *J Pediatr* 2005;146(3):364 –369.
53. Kalliomäki M, Kirjavainen P, Eerola E, Kero P, Salminen S, Isolauri E. Distinct patterns of neonatal gut microflora in infants in whom atopy was and was not developing. *J Allergy Clin Immunol* 2001;107(1): 129 –134.
54. Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-upof a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003; 361(9372):1869 –1871.
55. Kopp MV, Salfeld P. Probiotics and prevention of allergic disease. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2009;12(3):298 –303.
56. Prescott SL, Björkstén B. Probiotics for the prevention or treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 2007;120(2): 255–262.
57. Osborn DA, Sinn JK. Probiotics in infants for prevention of allergic disease and food hypersensitivity. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(4):CD006475.
58. Weston S, Halbert A, Richmond P, Prescott SL. Effects of probiotics on atopic dermatitis: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child* 2005;90(9):892–897.
59. Viljanen M, Savilahti E, Haahtela T, et al. Probiotics in the treatment of atopic eczema/dermatitis syndrome in infants: a double-blind placebo-controlled trial. *Allergy* 2005;60(4):494 –500.
60. Boyle RJ, Bath-Hextall FJ, Leonardi-Bee J, Murrell DF, Tang ML. Probiotics for treating eczema. *Cochrane Database Syst Rev* 2008;(4):CD006135.
61. Burns AJ, Rowland IR. Anti-carcinogenicity of probiotics and prebiotics. *Curr Issues Intest Microbiol* 2000;1(1):13–24.
62. Cilla A, Lacomba R, García-Llatas G, Alegría A. Prebióticos y nucleótidos en alimentación infantil; revisión de la evidencia. *Nutr Hosp* 2012;27(4):1037-1048.
63. Arslanoglu S, Moro GE, Schmitt J, Tandoi L, Rizzardi S, Boehm G. Early dietary intervention with a mixture of prebiotic oligosaccharides reduces the incidence of allergic manifestations and infections during the first two years of life. *J Nutr* 2008; 138(6):1091–1095.
64. Arslanoglu S, Moro GE, Boehm G. Early supplementation of prebiotic oligosaccharides protects formula-fed infants against infections during the first 6 months of life. *J Nutr* 2007;137(11): 2420–2424.
65. Boehm G, Lidestri M, Casetta P, et al. Supplementation of a bovine milk formula with an oligosaccharide mixture increases counts of faecal bifidobacteria in preterm infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2002;86(3):F178 –F181.
66. Moro G, Minoli I, Mosca M, et al. Dosagerelated bifidogenic effects of galacto- and fructooligosaccharides in formula-fed term infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002;34(3):291–295.
67. Schmelzle H, Wirth S, Skopnik H, et al. Randomized double-blind study of the nutritional efficacy and bifidogenicity of a new infant formula containing partially hydrolyzed protein, a high beta-palmitic acid level, and nondigestible oligosaccharides. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2003;36(3): 343–331.
67. Bettler J, Euler R. An evaluation of the growth of term infants fed formula supplemented with fructo-oligosaccharides. *Int J Probiotics* 2006;1:19 –26.
68. European Food Safety Authority. Microorganisms in food and feed: qualified presumption of safety-QPS. Disponible en: www.efsa.europa. eu/en/events/event/colloque041213.htm.
69. Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Disponible en: www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf.

Nutrición Hospitalaria

Nutr Hosp. 2015;31(Supl. 1):78-82
ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ
S.V.R. 318

Pediatría

Probioticoterapia en el cólico del lactante: caso clínico

Jimena Pérez-Moreno[1], Luz Taboada Castro[2], Mar Tolín Hernani[1], César Sánchez Sánchez[1] y Guillermo Álvarez-Calatayud[1]

[1]Sección Gastroenterología y Nutrición Infantil. Hospital General Universitario Gregorio Marañón Madrid. [2]Servicio de Pediatría. Hospital San Rafael, Madrid. España.

Resumen

El cólico del lactante es un evento fisiológico prevalente en niños sanos menores de 3 meses capaz de perturbar el entorno familiar. A pesar de su naturaleza benigna y autorresolutiva, en algunas ocasiones, requiere un abordaje terapéutico.

Se han propuesto numerosas líneas terapéuticas aunque su etiopatogenia sigue siendo desconocida y multifactorial. La microbiota intestinal tiene un papel importante en el cólico. Varios estudios muestran que los lactantes con cólicos tienen menos bifidobacterias y lactobacilos y más *Escherichia, Klebsiella, Serratia, Vibrio, Yersinia y Pseudomonas* en el colon. La cepa probiótica *L. reuteri* DSM 17938 administrada una vez al día a 10^8 ufc/día es la que más evidencia científica tiene hasta el momento en el tratamiento del cólico del lactante, sin observarse efectos secundarios.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):78-82)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8712

Palabras clave: *Cólico del lactante. Probioticoterapia.*

PROBIOTICS FOR THE TREATMENT OF INFANT COLIC: A CLINICAL CASE

Abstract

Infant colic is a prevalent physiological event of healthy children under 3 months of age which can disrupt the child's home environment. Despite its benign natural history, sometimes requires a therapeutic approach.

Numerous therapeutical lines have been proposed although its pathogenesis remains unknown and multifactorial. The gut microbiota plays an important role in the infant colic. Several studies have shown less bifidobacteria and lactobacilli in infant colic meanwhile *Escherichia, Klebsiella, Serratia, Vibrio, Yersinia* and *Pseudomonas* are more prominent in colon. The probiotic *strain L. reuteri* DSM 17938, when administered once daily to 10^8 cfu / day, seems to have the most scientific evidence up to date in the treatment of infant colic, without significant side effects.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):78-82)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8712

Key words: *Infant colic. Probiotic-therapy.*

Caso clínico

Varón de 1 mes de vida que presenta, desde hace 10 días, episodios de 4 horas de duración consistentes en llanto de inicio brusco, de predominio vespertino. Ocurren casi a diario y no parecen relacionarse con el sueño ni con el hambre. No se asocian vómitos, ni rechazo del alimento. Habitualmente realiza una deposición grumosa y una diuresis por toma. Está alimentado con lactancia materna exclusiva a demanda con buena técnica alimentaria y buena ganancia ponderal.

Antecedentes personales: embarazo controlado y normal. Parto eutócico a término (40 semanas de edad gestacional con un peso al nacimiento de 2.800 gr. Periodo neonatal inmediato sin complicaciones. Pruebas metabólicas normales

Exploración física: Peso: 4,45 kg (p88, 1,18DE); Talla:54 cm (p69, 0,51 DE); Perímetro cefálico: 38 cm (p80, 0,85 DE). Buen estado general, bien hidratado y perfundido. No exantemas en piel. Auscultación cardiaca rítmica y sin soplos. Auscultación pulmonar con buena entrada de aire bilateral sin ruidos añadidos ni dificultad respiratoria. Abdomen blando y depresible sin masas ni visceromegalias, sin signos de irritación peritoneal. Faringe y otoscopia bilateral normal. Fontanela anterior normotensa. Reactivo y vital, neuroconducta normal.

1. ¿Cuál es tu impresión diagnóstica?

A) Alergia a proteínas de leche de vaca no mediada por IgE

Correspondencia: Jimena Pérez-Moreno.
E-mail: jimenapermor@gmail.com

B) Enfermedad por reflujo gastroesofágico
C) Cólico del lactante
D) Estreñimiento
E) Invaginación intestinal

RESPUESTA CORRECTA: C

Las características clínicas del llanto que presenta el paciente cumplen los criterios de Wessel y los criterios Roma III de la definición del cólico del lactante. Son episodios de irritabilidad o llanto sin causa aparente, de 3 o más horas de duración al día, al menos 3 días por semana y durante al menos 1 semana. Además cursan en un lactante sano y sin afectación del crecimiento. De manera característica, dichos episodios tienen predominio vespertino, son paroxísticos y asocian hipertonía. Es un frecuente motivo de consulta en Atención Primaria y Urgencias con una prevalencia de 10-40%[1].

Con una anamnesis detallada y una exploración clínica completa se puede realizar el diagnóstico de cólico del lactante. Es importante descartar otras posibles causas orgánicas de llanto a estas edades, con una prevalencia menor del 5% que serían: hematoma subdural o traumatismo, lesión corneal, infecciones (orina, respiratoria, otitis media, meningitis), estreñimiento, alergia a proteínas de leche de vaca (APLV), enfermedad por reflujo gastroesofágico, hernia inguinal, invaginación intestinal, etc.

2. ¿Cuál sería el manejo terapéutico del paciente?

A) Debemos tratarlo siempre por la angustia que puede llegar a producir
B) Nunca precisa tratamiento farmacológico al tratarse de un proceso autolimitado
C) Hay que explicar a los padres la naturaleza benigna y autolimitada del proceso y ofrecer tratamiento si lo creemos necesario
D) Antes de iniciar cualquier medida terapéutica es importante realizar pruebas complementarias para descartar patología orgánica
E) Es muy conveniente derivarlo a la consulta del especialista (digestivo infantil) por su frecuente asociación con la APLV

RESPUESTA CORRECTA: C

El cólico del lactante es un proceso benigno y autolimitado que tiende a la autorresolución en un 60% de los casos a los 3 meses y en 80-90% a los 4 meses. Por tanto el objetivo del tratamiento es ayudar a los padres a hacer frente el llanto del niño y prevenir las posibles secuelas de mala relación padre-hijo. Se han propuesto muchas líneas terapéuticas para el manejo del cólico del lactante en parte porque su etiopatogenia, a pesar de numerosos estudios, sigue siendo desconocida[2] y probablemente multifactorial.

Existen diversas teorías gastrointestinales que intentan explicar la fisiopatología de esta entidad. Se ha propuesto una posible inmadurez intestinal (los estudios son contradictorios); intolerancias a carbohidratos como lactosa, sorbitol o fructosa; ambas teorías sin clara correlación estadísticamente significativa. En otros estudios se muestra una posible hipermotilidad intestinal[3] por alteración del sistema nervioso autónomo. Otras teorías proponen unos factores biológicos (mala técnica alimentaria, elevación de niveles de serotonina en niños con cólicos, exposición a nicotina) y psicosociales (alteraciones del temperamento, hipersensibilidad o variables parentales como el estrés familiar) para explicar esta entidad.

3. ¿Qué tratamientos se han propuesto para el tratamiento del cólico del lactante?

A) Cambios en la alimentación del lactante con fórmulas parcialmente hidrolizadas
B) Fitoterapia y Homeopatía
C) Farmacoterapia: sacarosa, simeticona, antiespasmolíticos, lactasa
D) Probioticoterapia
E) Todos los anteriores

RESPUESTA CORRECTA: E

Numerosos tratamientos se han utilizado para el tratamiento del cólico del lactante, no todos con la misma evidencia científica. Entre ellos se han propuesto los siguientes: técnicas de apoyo psicológico a los padres; cambios en la alimentación con fórmulas hipoalergénicas (parcialmente hidrolizadas), de soja, enriquecidas en fibra o extensamente hidrolizadas, dieta materna exenta de lácteos, modificación en las técnicas de alimentación, etc.; medidas posturales; fitoterapia; remedios homeopáticos; terapias farmacolóicas diversas (sacarosa, simeticona, antiespasmolíticos, lactasa, etc.); empleo de probióticos; masajes (manipulación espinal y osteopática craneal); acupuntura.

En las últimas revisiones del cólico del lactante[2,4], muestran un probable efecto beneficioso las fórmulas lácteas extensamente hidrolizadas (HePLV), por la posibilidad de que exista una APLV como causa de la irritabilidad, en cuyo caso deberá realizarse una prueba empírica inicial con HePLV durante 2 semanas debiendo reintroducirse una fórmula adaptada si no hay mejoría clínica. No están recomendadas las fórmulas parcialmente hidrolizadas como tratamiento sistemático, si bien hay estudios indicando que estas fórmulas con prebióticos (fructooligosacáridos y galactooligosacáridos) y ácido βpalmítico parecen reducir de forma significativa el número de episodios de llanto comparado con otros tratamientos[3]. Son las llamadas fórmulas anticólicos. Otra propuesta es la de las fórmulas adaptadas enriquecidas en fibra, sin evidencia para su uso[2] y fórmulas de soja, cuyo uso no está reco-

mendado por debajo de los seis meses de vida por los fitoestrógenos de la soja y su riesgo alergénico[2].

Los anticolinérgicos (dicyclomine y bromuro de cimetropio) podrían tener un posible beneficio pero su uso implica un riesgo inaceptable para el paciente (distrés respiratorio o crisis convulsivas hasta en un 8%) por lo que están contraindicados. Actualmente, a pesar de haber estudios publicados al respecto, el beneficio de otros tratamientos como las fórmulas bajas en lactosa, la sacarosa, la fitoterapia, la lactasa o simeticona, es desconocido[2,3].

4. ¿Hay evidencia de alteración de la microbiota intestinal en niños con cólicos?

A) No se ha conseguido demostrar en estudios randomizados una alteración de la microbiota intestinal en estos niños.
B) Sí parece que existe una disminución de bifidobacterias y lactobacilos pero solo en niños con lactancia artificial.
C) Sí que parece que hay un aumento de los géneros *Escherichia, Klebsiella,Serratia, Vibrio, Yersinia y Pseudomonas* pero sólo en los niños con lactancia artificial.
D) Sí que existe una disminución de bifidobacterias y lactobacilos con aumento de los géneros *Escherichia, Klebsiella,Serratia, Vibrio, Yersinia y Pseudomonas* tanto en niños con lactancia artificial como lactancia materna.
E) Sólo se han observado cambios en la microbiota de estos niños si se les administraba lactancia materna exclusiva.

RESPUESTA CORRECTA: D

Varios estudios clínicos muestran una microbiota intestinal diferente en los niños con cólicos respecto a los niños sin cólicos, de forma independiente a la alimentación. En el estudio de Weerth[5] et al, se muestra como los niños sin cólicos tienen una microbiota más estable y diversa respecto a los lactantes que sí presentan esta dolencia. Además estos últimos tienen menores niveles de lactobacilos y bifidobacterias así como niveles mayores de proteobacterias como *E.coli*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* y *Yersinia*. Este estudio además muestra cómo el llanto de los niños con cólicos está directamente relacionado con el número de proteobacterias de la microbiota intestinal. El estudio de Savino et al[6], refleja resultados parecidos obteniendo mayor cantidad de cepas de *L. brevis* y *L. lactis* en lactantes alimentados con lactancia materna con cólicos que probablemente explicaran el meteorismo y la distensión abdominal.

5. ¿Qué cepa de las siguientes ha mostrado más evidencia científica en el tratamiento del cólico del lactante?

A) *Saccharomyces boulardii*
B) *Lactobacillus bulgaricus*
C) *Lactobacillus reuteri* DSM 17938
D) *Streptococcus thermophilus*
E) Los mayores beneficios se observan con el empleo de prebióticos

RESPUESTA CORRECTA: C

Actualmente la cepa probiótica que ha mostrado más evidencia científica en el tratamiento del cólico del lactante es el *Lactobacillus reuteri* DSM 17938. Son varios los estudios[7,8,9] que muestran cómo esta cepa, administrada en cantidades de *1x 10*^{8} *ucf/día*, reduce el tiempo de llanto sin afectar a la ganancia ponderal ni el ritmo deposicional y mejorando con ello la calidad de vida de los pacientes y sus familias. Se ha visto además en estos estudios cómo el tratamiento con esta cepa disminuye la cantidad de *E.coli* de la microbiota de niños con cólicos, aumentando la cantidad de lactobacilos fecales. En este contexto, se ha publicado recientemente una revisión sobre la evidencia científica del *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 para el tratamiento, entre otras patologías, del cólico del lactante en lactantes con lactancia materna, demostrando su seguridad, incluso en niños inmunocomprometidos y prematuros[10].

En un estudio piloto, se ha observado cómo el empleo de esta cepa no sólo mejora la sintomatología del cólico sino que paralelamente también disminuye los valores de los marcadores inflamatorios intestinales (niveles de calprotectina en heces) [11]. Por el contrario, en otro ensayo randomizado, doble ciego y frente a placebo, no se han hallado diferencias en los niveles de este marcador ni en la colonización de *E. coli* en ambos grupos. Los autores tampoco encontraron beneficios clínicos con el uso de esta cepa en relación al tiempo de llanto y/o irritabilidad tanto en los lactantes alimentados al pecho como en los que tomaban fórmula artificial [12]. Sin embargo, sugieren que son necesarios más estudios para definir qué subgrupos de pacientes podrían beneficiarse del empleo de probióticos.

Recientemente, se ha demostrado cómo la suplementación precoz en prematuros con prebióticos (GOS y polidextrosa) asociado a probióticos *(L.rhamnosus* GG) podría aliviar los síntomas de llanto de forma significativa ($p<0,05$) comparado con placebo, sin efectos secundarios[13]. En otro estudio, también ha demostrado su eficacia un simbiótico (mezcla de 7 cepas con FOS) para disminuir los síntomas en lactantes menores de 3 meses con cólicos en comparación con el placebo[14]. Todos estos estudios vienen reflejados en la tabla I.

6. ¿Cuál es el mecanismo de acción del* L. reuteri *DSM 17938 en el cólico del lactante?

A) Inhibe el crecimiento de bacterias coliformes productoras de gas en niños con cólicos.

Tabla I
Estudios sobre el empleo de probióticos en el cólico del lactante

Estudio	*Características*	*Conclusiones*
Savino F et al, 2007[7]	RCT N=90 niños con LM *L. reuteri* vs simeticona	Reducción del tiempo de llanto >50% durante el periodo del estudio (28 días)
Savino F et al, 2010[8]	RCT ciego N=50 niños con LM *L. reuteri* vs placebo	Disminuye llanto Aumenta *Lactobacilli* fecal y disminuye *E.coli* No afecta a ganancia peso, deposiciones, reflujos. NNT=4 (IC 95%: 2-21)
Szajewska H et al, 2013[9]	RCT N=80 *L. reuteri* vs placebo	Reduce el tiempo de llanto y mejora la calidad de vida pacientes. NNT=2 (IC 95%: 2-3)
Varea V et al, 2014[11]	EP=17 *L. reuteri*	Mejora la sintomatología Disminuye los marcadores inflamatorios
Sung V et al, 2014[12]	RCT N=167 *L. reuteri* vs placebo	No beneficios clínicos No diferencias microbiota fecal
Pärtty A et al, 2014[13]	RCT N=94 prematuros *L. rhamnosus* GG vs placebo	Reduce el tiempo de llanto en prematuros. NNT=2 (IC 95%: 2-5)
Kianifar H et al, 2014[14]	N=50 Simbiótico (7 cepas +FOS) vs placebo	Reduce el tiempo de llanto

RCT= ensayos clínicos controlados. EP=estudio piloto. LM=lactancia materna. FA=fórmula adaptada. NNT=número necesario a tratar.

B) Facilita el vaciamiento gástrico.
C) Modifica percepción de dolor intestinal por inhibición de la contractilidad intestinal.
D) Disminuye la inflamación intestinal.
E) Todos los anteriores son mecanismos de acción demostrados en estudios científicos.

RESPUESTA CORRECTA: E

El *L. reuteri* DSM 17938 puede mostrar beneficio en el tratamiento del cólico a través de diferentes mecanismos de acción. En primer lugar, el estudio de Savino et al[8] demuestra cómo inhibe el crecimiento de las bacterias coliformes productoras de gas en lactantes con cólicos. Este autor, señala, además, en este estudio, cómo el *L. reuteri* DSM 17938 disminuye la inflamación intestinal, suprimiendo la producción de citoquinas proinflamatorias y promoviendo el desarrollo de las células reguladoras T-reg (Fig. 1). Indrio et al.[15] ha observado cómo la suplementación a niños prematuros con fórmulas con prebióticos (FOS y GOS) y la cepa probiótica (a dosis de $1x10^8$ ufc/

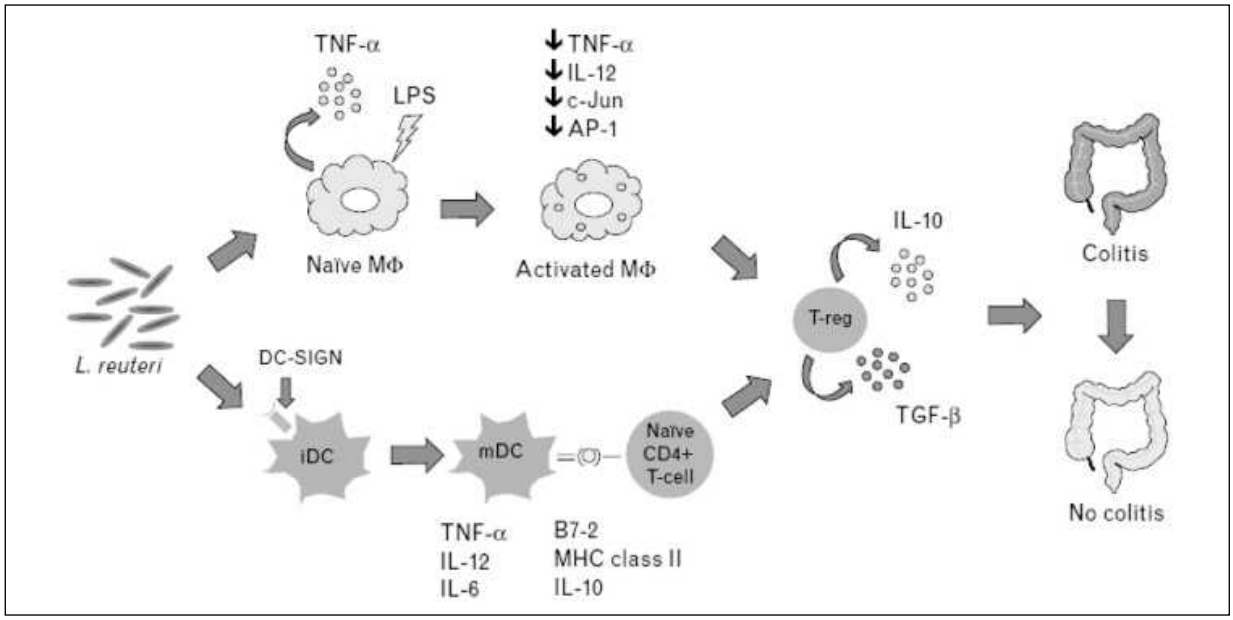

Fig 1.—Mecanismo de acción de L. reuteri *DSM 17938 en el cólico del lactante. Tomado de Savino F, Curr Opin Pediatr 2010[17].*

día) estimula el vaciamiento gástrico favoreciendo la maduración de la actividad electrogastrográfica en estos pacientes. Por último, en el estudio de Wang B[16], realizado en ratas, se ha demostrado cómo el *L. reuteri* DSM 17938 (a $1x10^9$ ufc/d) puede modificar la percepción del dolor intestinal por la inhibición de la contractilidad intestinal.

Conclusión

La microbiota intestinal parece tener un papel importante en la etiopatogenia del cólico del lactante. La predominancia de proteobacterias en los bebés con cólico, independientemente de la forma de alimentación, podría explicar el aumento de los episodios de llanto y meteorismo. La disminución de estas bacterias, alcanzando una microbiota más estable y diversa, es el objetivo del tratamiento con probióticos en esta entidad. De momento, *L. reuteri* DSM 17938 parece ser la cepa que muestra mayor beneficio en su tratamiento. Su administración a dosis de $1x10^8$/día, parece disminuir el número de episodios de llanto, siendo segura incluso en niños prematuros. No obstante, empiezan a realizarse nuevos ensayos clínicos controlados con otras cepas con resultados esperanzadores[11,12].

Referencias

1. Sung V, Hiscock H, Tang M, Mensah FK, Heine RG, Stock A, et al. Probiotics to improve outcomes of colic in the community: protocol for the Baby Biotics randomised controlled trial. *BMC Pediatr* 2012;12:135.
2. Management of infantile colic. Drug Ther Bull. *BMJ* 2013;51:6-9.
3. Savino F, Palumeri E, Castagno E, Cresi F, Dalmasso P, Cavallo F, Oggero R. Reduction of crying episodes owing to infantile colic: A randomized controlled study on the efficacy of a new infant formula. *Eur J Clin Nutr* 2006;60:1304-1310.
4. Teri Lee Turner, Shea Palamountain. Patient information: colic (excessive crying) in infans (beyond the basics). UpToDate. 2013.
5. Weerth C, Fuentes S, Puylaert P, de Vos MW. Intestinal microbiota of infants with colic: development and specific signatures. *Pediatrics* 2013;131:e550-558.
6. Savino F, Bailo E, Oggero R, Tullio V, Roana J, Carlone N, Cuffini AM, Silvestro L. Bacterial counts of intestinal Lactobacillus species in infants with colic. *Pediatr Allergy Immunol* 2005;16:72-75.
7. Savino F, Pelle E, Palumeri E, Oggero R, Miniero R. Lactobacillus reuteri (American Type Culture Collection Strain 55730) versus simethicone in the treatment of infantile colic: a prospective randomized study. *Pediatrics* 2007; 119:e124-130.
8. Savino F, Cordisco L, Tarasco V, Palumeri E, Calabrese R, Oggero R,et al. Lactobacillus reuteri DSM 17938 in infantile colic: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Pediatrics* 2010;126:e526-533.
9. Szajewska H1, Gyrczuk E, Horvath A. Lactobacillus reuteri DSM 17938 for the management of infantile colic in breastfed infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Pediatr* 2013;162:257-262
10. Urbańska M, Szajewska H. The efficacy of Lactobacillus reuteri DSM 17938 in infants and children: a review of the current evidence. *Eur J Pediatr* 2014;173:1327-1333.
11. Varea V, Hocevar H, Soriano A, Aguilar I, Suma E. Valoración del uso de *Lactobacillus reuteri* en el tratamiento de los cólicos del lactante: estudio piloto. *Acta Pediatr Esp* 2014; 72: 154-159.
12. Sung V, Hiscock H, Tang M, Mensah FK, Nation ML, Satzke C et al. Treating infant colic with the probiotic *Lactobacillus reuteri*: double blind, placebo controlled randomized trial. *BMJ* 2014;348:g2107 doi: 10.1136/bmj.g2107.
13. Pärtty A, Luoto R, Kalliomäki M, Salminen S, Isolauri E. Effects of early prebiotic and probiotic supplementation on development of gut microbiota and fussing and crying in preterm infants: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Pediatr* 2013;163:1272-1277.
14. Kianifar H, Ahanchian H, Grover Z, Jafari S, Noorbakhsh Z, Khalkshour A et al.Synbiotic in the management of infantile colic: A randomized controlled trial. *J Pediatric Child Health* 2014;50:801-805.
15. Indrio F, Riezzo G, Raimondi F, Bisceglia M, Cavallo L, Francavilla R. Effects of probiotic and prebiotic on gastrointestinal motility in newborns. *J Physiol Pharmacol* 2009;60 Suppl 6:27-31.
16. Wang B, Mao YK, Diorio C, Wang L, Huizinga JD, Bienenstock J, Kunze W. Lactobacillus reuteri ingestion and IK (Ca) channel blockade have similar effects on rat colon motility and myenteric neurones. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:98-107.
17. Savino F, Tarasco V. New treatments for infant colic. *Curr Opin Pediatr* 2010;22:791-797.

Nutrición Hospitalaria

Nutr Hosp. 2015;31(Supl. 1):83-88
ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ
S.V.R. 318

Adultos

Síndrome de Intestino Irritable; papel de la microbiota y probiótico-terapia

Rafael Tojo González[1], Adolfo Suarez Gonzalez[2], Patricia Rúas Madiedo[3], Alejo Mancebo Mata[1], María Pipa Muñiz[1], Eva Barreiro Alonso[1], Francisco Javier Roman Llorente[1], María Carmen Moro Villar[4], Marta María Arce González[5], María Francisca Villegas Diaz[5], Eugenia Mosquera Sierra[5] y Mónica Ruiz Ruiz[5]

[1]Aparato Digestivo, Hospital de Cabueñes Gijón. [2]Aparato Digestivo, Hospital Universitario Central de Asturias. [3]Instituto de Productos Lácteos de Asturias-Consejo Superior de Investigaciones Científicas. [4]Diplomada Universitaria en Enfermería, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo. [5]Diplomada Universitaria en Enfermería, Hospital de Cabueñes Gijón. España.

Resumen

El Síndrome de intestino irritable (SII) se define por síntomas de dolor abdominal, y alteración del hábito intestinal. Cuenta con diversos tratamientos disponibles, sin que hasta el momento haya destacado ninguna estrategia terapéutica en especial. La fisiopatología del SII permanece inexplicada, aunque diversas líneas de evidencia sugieren un papel de la microbiota intestinal. A pesar de que existe controversia, es probable que la microbiota contribuya a la generación de síntomas, al menos en algunos pacientes, a través de un proceso de fermentación alterado, de la modificación de la función de barrera intestinal, de la modulación inadecuada de la función sesorio-motora entérica y del eje cerebro-enteral.

La probiótico-terapia produce un modesto alivio sintomático en SII, aunque la evidencia actual no es suficiente para la recomendación general de uso. Los mejores resultados se obtienen, en niños, con *Lactobacillus rhamnosus* GG, que mejora discretamente el dolor abdominal, mientras que en adultos el beneficio parece mayor empleando especies de *Bifidobacterium*.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):83-88)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8713

Palabras clave: *Síndrome del intestino irritable. Probioticoterapia. Microbiota digestiva.*

IRRITABLE BOWEL SYNDROME; GUT MICROBIOTA AND PROBIOTIC THERAPY

Abstract

Irritable bowel syndrome (IBS) is characterized by symptoms of abdominal pain and altered bowel habits. This common disorder is managed by varying clinical styles as no dominant therapeutic strategy has emerged. The pathophysiology of IBS remains unknown, but several lines of evidence link this disorder with the gut microbiota. Although controversy exists, gut microbiota is likely contributing to symptoms of IBS, at least in some patients, through an altered fermentation process, an impaired intestinal barrier function, a harmful modulation of enteric sensorimotor function, a promotion of low-grade inflammation without tissue damage, and a harmful modulation of the brain-gut axis.

Probiotic therapy has a modest effect on IBS symptomatic relief, but the actual evidence is not strong enough to support a general recommendation of use. The best results are achieved, in children, with *Lactobacillus rhamnusus* GG, which moderately improves abdominal pain, while in adults the benefit appears to be greatest employing *Bifidobacterium* species.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):83-88)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8713

Key words: *Irritable bowel syndrome. Probiotictherapy. Digestive microbiota.*

Introducción

Desde el momento en que la microbiota juega un papel en la homeostasis del huésped, especialmente en la salud digestiva, diversas patologías se asocian a alteraciones, o desequilibrios, en su composición[1]. Las alteraciones en la microbiota relacionadas con enfermedad ocurren por cambios en su composición (disbiosis), función, e interrelación con el huésped, con un papel fundamental de las alteraciones en la inmunidad innata y el eje cerebro-enteral[2]. No obstante, la mejor definición del papel fisiopatológico de la microbiota representa un reto de futuro. Para ello los mecanismos implicados en el papel patogénico en enfermedades digestivas han de ser explorados desde un punto de vista mecanístico, y no meramente descriptivo, en busca de la relevancia clínica, y de dianas terapéuticas[3]. El análisis funcional, mediante técnicas

Correspondencia: Rafael Tojo González.
E-mail: rafael_tojo@msn.com

de proteómica y metabolómica, aportará información sobre las funciones inmunológica y metabólica de la microbiota, y sus interrelaciones con el huésped, en forma de identidad, o firma, metabólica de la enfermedad estudiada[4].

Los trastornos funcionales gastrointestinales se definen, y categorizan, en base a grupos de síntomas, crónicos o recurrentes, que pueden ser atribuidos al tracto digestivo. La microbiota intestinal puede tener un papel patogénico en dichos trastornos, especialmente en trastornos funcionales intestinales, lo que constituye un importante campo de investigación, existiendo una evidencia creciente que apoya este nuevo concepto microbiano[5].

El Síndrome de intestino irritable (SII) se caracteriza por dolor o molestias abdominales, asociado a la defecación, o a alteración del hábito intestinal. Se subclasifica en SII con predominio de estreñimiento (SII-E), diarrea (SII-D), o mixto (SII-M), con un subtipo de SII inclasificable[6]. El SII con frecuencia se asocia a otros síntomas gastrointestinales, así como trastornos funcionales digestivos, y no digestivos[7].

La prevalencia de SII en países industrializados ronda el 10 a 20% de la población general, más frecuente en mujeres, lo que hace al SII el trastorno gastrointestinal más extendido. Además, los individuos que padecen SII presentan unos índices de calidad de vida reducidos, y más comorbilidades que la población general[8].

Papel de la microbiota en el síndrome de intestino irritable

Muchos de los mecanismos fisiopatológicos de SII aún no están totalmente claros, sin embargo, existen diversos factores con implicación demostrada, en mayor o menor medida, en la generación de síntomas, como son los factores genéticos, la motilidad gastrointestinal alterada, hipersensibilidad visceral, alteraciones en el eje cerebro-enteral, inflamación de bajo grado, alteraciones psicosociales, y el papel de la microbiota[9].

La microbiota puede estar implicada en la fisiopatología del SII a través de dos vías, los mecanismos metabólicos a nivel local, y la interacción inmunológica con el huésped, basándose en la presencia de cambios en la composición taxonómica y funcional de la microbiota, y la descripción de alteraciones en la intercomunicación microbiota-huésped[3]. La relevancia clínica de algunos de estos hallazgos es poco clara, siendo la cuestión clave si las alteraciones descritas se tratan de causa, o bien consecuencia, del trastorno digestivo, pues no existe una correlación entre las mismas y la evolución del cuadro clínico a lo largo del tiempo. Por último, está por determinar la importancia relativa de cada una de las vías fisiopatológicas que implican a la microbiota, en una mejor definición de su papel fisiopatológico en el SII[10].

Papel fisiopatológico de la microbiota intestinal. Líneas de evidencia

Hay estudios de diversa índole que aportan evidencia sobre el papel de la microbiota intestinal en el SII. Estudios sobre modelos experimentales muestran que alteraciones en la microbiota intestinal pueden conducir a cambios en la función sensorio-motora, con alteración en la motilidad e hipersensivilidad[11]. Diversos estudios observacionales también apoyan el concepto microbiano. Hay un subgrupo de SII, hasta el 20%, cuyo debut sigue a una infección entérica, ocurriendo hasta en el 10% de las gastroenteritis agudas. Una infección entérica resulta en una profunda alteración en la diversidad microbiana del huésped, con depleción de *Eubacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus,* y *Faecalibacterium prausnitzii*, y un cambio en el ratio anaerobios/aerobios[12]. El mecanismo exacto a través del que dicha alteración determina la persistencia de síntomas de SII tras el episodio infeccioso agudo no está totalmente claro, pero se ha descrito susceptibilidad genética, un descenso en la producción microbiana de ácidos grasos de cadena corta, y un aumento de las células enteroendocrinas a nivel de la mucosa[13]. El sobrecrecimiento bacteriano intestinal (SBI) está presente entre el 4%, y hasta en el 54%, de los casos de SII[14]. Sin embargo, las grandes diferencias entre estudios, carencias metodológicas, como la falta de estandarización, la pobre sensibilidad y especificidad del test de aliento, y el cuestionado valor de corte aplicado a cultivos de aspirado duodenal/yeyunal (>10^5 UFC/ml), y la presencia de factores de confusión, como intervenciones dietéticas, uso de mediaciones concomitantes, y el hecho de que la mayoría de la microbiota no puede ser cultivada, hacen que la importancia del SBI en SII permanezca poco clara, cuestionando así la conveniencia de buscar SBI de forma sistemática[15]. Disminuyendo el punto de corte hasta (>10^3 UFC/ml), la tasa de SBI en SII se describe entre el 30 y 40%, y más alta que en controles sanos. Este hallazgo apoya la hipótesis de que dicho mecanismo puede jugar un papel en SII, al menos en algunos pacientes[16].

Recientes estudios microbiológicos, mediante técnicas moleculares, han demostrado alteraciones cuantitativas en grupos bacterianos específicos, aunque con resultados inconsistentes, y en ocasiones contradictorios. No hay un patrón de cambio uniforme, sino una variedad de grupos microbianos descritos, y algunos coincidentes con el grupo de controles sanos[3]. A pesar de lo anterior, en SII se describe, de forma consistente, una diversidad filogenética reducida[17], inestabilidad temporal[18], y diferencias en la microbiota asociada a mucosa respecto a controles sanos, con incremento en *Bacteroides* y Clostridia, y reducción en Bifidobacterias[19].

Estudios de intervención apoyan el concepto microbiano de SII, al mostrar los efectos beneficiosos de tratamientos dirigidos a la microbiota intestinal, como

antibióticos específicos[20], prebioticos[21], probioticos[22], e intervenciones dietéticas[23].

Papel fisiopatológico de la microbiota intestinal. Mecanismos

En el SII se describen diversas alteraciones en la composición taxonómica de la microbiota, en su composición funcional, y en las interacciones microbiota-huésped (Tabla I). Uno de los principales hallazgos es la alteración en el proceso de fermentación colónica. Los oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y polioles (FODMAPs) son carbohidratos de cadena corta, que incluyen fructosa, lactosa, polioles, fructanos, y galacto-oligosacaridos, de pobre absorción, que constituyen el sustrato para la fermentación por la microbiota colónica, generando ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente acido acético, butírico, y propiónico. En modelos experimentales, los AGCC desencadenan contracciones motoras ileales y colónicas de gran amplitud, y promueven la hipersensibilidad visceral[24]. En el SII, las poblaciones bacterianas productoras de AGCC se encuentran aumentadas, al igual que los niveles fecales de AGCC, que además se correlacionan con síntomas de intensidad severa en sus niveles más altos[25]. La dieta pobre en FODMAPs reduce los síntomas atribuidos al tracto digestivo, proporcionando una nueva y prometedora estrategia terapéutica en SII[23].

La microbiota intestinal es un componente esencial en la promoción, mantenimiento, y función de la barrera intestinal. Diferentes estudios muestran una función de barrera alterada en el SII, con el subsiguiente aumento de la permeabilidad intestinal, a través de diversos mecanismos. Sin embargo, aún no está totalmente definida la relación entre los cambios en la microbiota y la alteración de la función de barrera intestinal[26].

La función sensorio-motora intestinal también se encuentra modulada, entre otros factores, por la microbiota, a través de dos mecanismos, el efecto directo de productos bacterianos[10], y de forma indirecta, a través de la deficiente transformación de ácidos biliares primarios en secundarios, provocando un exceso de ácidos biliares primarios en colon, que estimulan la motilidad y secreción. En SII-D se observa un incremento de ácidos biliares primarios en heces, cuyos niveles se correlacionan con su consistencia, asociado a un descenso del grupo *Clostridium leptum*, que contiene muchas de las bacterias que transforman ácidos grasos primarios en secundarios[27].

Tabla I
Papel fisiopatológico de la microbiota intestinal en el SII. Mecanismos

Proceso de fermentación alterado
Deterioro en la función de barrera intestinal
Modulación de la función sensorio-motora enteral
Inflamación de bajo grado sin daño tisular
Modulación del eje cerebro-enteral

Hay una creciente aceptación de la hipótesis que entiende el SII como una condición de inflamación de bajo grado sin daño tisular. La microbiota, y la comunicación bidireccional microbiota-huésped, influyen de forma importante en el sistema inmune mucoso. Diversas líneas de investigación apoyan esta hipótesis, aunque hay escasa evidencia del vínculo directo entre alteraciones en la microbiota y activación inmunológica intestinal con inflamación de bajo grado[28]. La comunicación bidireccional microbiota-huésped alterada puede aumentar la permeabilidad intestinal, y la exposición antigénica a nivel mucoso, determinando la presencia de inflamación de bajo grado, subclínica, pero suficiente para provocar disfunción sensorio-motora y generar síntomas[2].

Los datos proporcionados por estudios en modelos experimentales, y en humanos, demuestran el efecto modulador de la microbiota sobre el eje cerebro-enteral, a nivel periférico y central. La microbiota puede afectar directamente el sistema nervioso enteral (SNE) a través de la liberación de productos de síntesis y metabolitos bacterianos, e indirectamente a través de la inducción a la liberación de mediadores inmunológicos del huésped con impacto en el SNE. Además, la microbiota puede actuar directamente a nivel central, a través de mecanismos inmunológicos, humorales, y neurales, incluso afectando la bioquímica cerebral y el comportamiento, en modelos experimentales[29].

Probióticos en el síndrome de intestino irritable

Existen diversas aproximaciones en el abordaje terapéutico del SII, sin que se defina a día de hoy una clara estrategia dominante[8]. El potencial terapéutico de los probióticos se ha explorado a través de diferentes ensayos clínicos –expuestos en las tablas II y III–, habiendo al menos algunos resultados positivos, que muestran mejoría en la sintomatología global, hinchazón, y flatulencia[30]. Toda una serie de meta-análisis y revisiones sistemáticas muestran que, tomados como grupo, los probióticos son efectivos en el control sintomático del SII, con una modesta reducción de síntomas[22]. Por otro lado, con la evidencia disponible actualmente, es difícil obtener conclusiones sistemáticas sobre probiótico-terapia en SII, debido al uso de diferentes cepas y especies, preparaciones (únicas o en combinación), dosificación, y diseño de los ensayos clínicos. Además, faltan datos acerca de la eficacia a largo plazo. Por tanto, la evidencia disponible no es lo bastante robusta para determinar la recomendación de empleo sistemático en SII, siendo necesarios más estudios. Sin embargo, dado que la eficacia de las diversas opciones terapéuticas es limitada, es razonable la realización de un intento terapéutico en aquellos pacientes interesados en este abordaje (Tabla IV)[31, 32].

Tabla II
Ensayos clínicos con probióticos (cepa única) en SII

Probiótico	*n*	*Duración*	*Resultado*
Bifidobacterium animalis DM173 010[33]	274	6 sem.	Mejora las molestias, calidad de vida, hinchazón, frecuencia defecatoria en SII-E.
Bifidobacterium bifidum MIMBb75[34]	122	4 sem.	Mejora síntomas y calidad de vida.
Bifidobacterium infantis 35624[35, 36]	77	8 sem.	Mejora síntomas.
	362	4 sem.	Mejora síntomas (mujeres).
Lactobacillus acidophilus SDC 2012[37]	40	4 sem.	Reduce dolor/molestias abdominales.
Enterococcus faecium[38]	54	4 sem.	Mejoría general.
Lactobacillus plantarum 299V[39, 40]	60	4 sem.	Disminuye dolor abdominal y flatulencia.
	20	4 sem.	Mejora dolor abdominal y frecuencia defecatoria.
Lactobacillus rhamnosus GG[41-43]	50	6 sem.	Mejora la distensión abdominal percibida (niños).
	104	4 sem.	Mejora el dolor abdominal (niños).
	141	12 sem.	Mejora el dolor abdominal (niños).

Tabla III
Ensayos clínicos con mezclas de probióticos en SII

Mezcla probióticos	*n*	*Duración*	*Resultado*
B. bifidum BGN4, *B. lactis* AD011, *L. acidophilus* AD031, *L. casei* IBS041[44].	70	8 sem.	Reduce dolor abdominal y molestia defecatoria.
L. plantarum LP01, *B. breve* BR03, *L. acidophilus* LA02[45].	70	4 sem.	Reduce dolor abdominal y severidad de otros síntomas.
L. rhamnosus GG, *L. rhamnosus* LC705, *Propionibacterium freudenreichii* spp. *shermanii* JS, *B. animalis* spp. *lactis* Bb12[46, 47].	103	6 meses	Mejora el índice sintomático.
	86	5 meses	Mejora el índice sintomático.
VSL#3 (*B. longum*, *B. infantis*, *B. breve*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. bulgaricus*, *L. plantarum*, *Streptococcus thermophilus*)[48-50].	25	8 sem.	Reduce la hinchazón en SII-D.
	48	4 sem.	Reduce flatulencia y mejora tránsito colónico.
	59	6 sem.	Mejora síntomas y calidad de vida (niños).
L. acidophilus CUL60, *L. acidophilus* CUL21, *B. lactis* CUL34, *B. bifidum* CUL20[51].	52	8 sem.	Mejora el índice sintomático.

Tabla IV
Consideraciones prácticas relevantes en probiótico-terapia

Los efectos adversos más frecuentes son transitorios, e incluyen hinchazón.
No hay un probiótico que sea útil para toda la patología digestiva.
Los beneficios desaparecen poco después de finalizar la administración.
Los beneficios sintomáticos probablemente serán modestos.
Cada cepa tiene propiedades beneficiosas para el huésped únicas.
Las indicaciones, cepas, y dosis empleadas en los ensayos clínicos deben ser tenidas en cuenta para guiar el tratamiento con probióticos.
La probiotico-terapia debe emplearse como suplemento, más que sustituto, de otros tratamientos.
Se debe evitar su empleo en pacientes críticos o con inmunodeficiencia severa.

A pesar de que no está clara la estrategia de tratamiento óptima, los mejores resultados se han obtenido, en niños, empleando la cepa *Lactobacillus rhamnosus GG*, con una mejoría moderada del dolor abdominal[41-43], mientras que en adultos, en vista de la evidencia actual, el beneficio parece mayor con el género *Bifidobacterium* (Grado de evidencia 2C), más que *Lactubacillus*, ya sea en formulación única o en combinación de cepas[52]. Dentro de las bifidobacterias, la especie *Bifidobacterium infantis* es la más efectiva hasta la fecha, evaluada en dos ensayos clínicos bien diseñados[35, 36]. Hay una serie de consideraciones adicionales pendientes de ser evaluadas y definidas, como la mejor dosificación y duración de tratamiento, guiando la elección entre tratamiento continuo de mantenimiento, o a demanda, el coste-efectividad y los perfiles de seguridad. La investigación actual, y en un futuro próximo, se centra en encontrar la mejor cepa(s) de probiótico(s), sobre pacientes subtipados según los criterios Roma III, e incluso para síntomas individuales[22]. Además, el uso de probióticos modificados mediante ingeniería genética como sistema de liberación de otros agentes terapéuticos es un área de investigación activa y de horizontes prometedores[53].

Referencias

1. Wu GD, Lewis JD. Analysis of the human gut microbome and association with disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013; 11:774-777.
2. Aziz A, Dore J, Emmanuel A, et al. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterol Motil* 2013;25:4-15.
3. Simren M, Barbara G, Flint HJ, et al. Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* 2013;62:159-176.
4. Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EM. Techniques used to characterize the intestinal microbiota: a guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:312-322.
5. Pimentel M, Chang C. Inflammation and microflora. *Gastroenterol Clin North Am* 2011;40:69.85.
6. Longstreth GF, Thompson WG, Chey WD, et al. Functional Bowel Disorders. *Gastroenterology* 2006;130:1480-1491.
7. Sperber AD, Dekel R. Irritable bowel syndrome and co-morbid gastrointestinal and extra-gastrointestinal functional syndromes. *J Neurogastroenterol Motil* 2010;16:113-119.
8. Quigley EM, Abdel-Hamid H, Barbara G, et al. A global perspective on irritable bowel syndrome: a consensus statement of the World Gastroenterology Organisation Summit Task Force on irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2012;46:356-366.
9. Ohman L, Simren M. Pathogenesis of IBS: role of inflammation, immunity, and neuroimmune interactions. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2010;7:163-173.
10. Ringel Y, Maharshak N. Intestinal microbiota and immune function in the pathogenesis of irritable bowel syndrome. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2013;305:529-541.
11. Bercik P, Wang L, Verdu EF, et al. Visceral hyperalgesia and intestinal dysmotility in a mouse model of postinfective gut dysfunction. *Gastroenterolgy* 2004;127:179-187.
12. Spiller R, Garsed K. Postinfectious irritable bowel syndrome. *Gastroenterolgy* 2009;136:1979-1988.
13. Villani AC, Lemire M, Thabane M, et al. Genetic risk factors for post-infectious irritable bowel syndrome following a waterborne outbreak of gastroenteritis. *Gastroenterology* 2010;138:1502-1513.
14. Ford AC, Spiegel BM, Talley NJ, et al. Small intestinal bacterial overgrowth in irritable bowel syndrome: systematic review and meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2009;7:1279-1286.
15. Spiegel BM. Questioning the bacterial overgrowth hypothesis of irritable bowel syndrome: an epidemiologic and evolutionary perspective. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2011;9:461-469.
16. Pyleris M, Giamarellos-Bourboulis EJ, Koussoulas B, et al. Small bowel culture confirms the presence of small intestinal bacterial overgrowth in a subset of IBS subjects. *Gastroenterology* 2011;140(Suppl1):S152.
17. Carroll M, Ringel-Kulka T, Siddle JP, et al. Alterations in composition and diversity of the intestinal microbiota in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:521-530.
18. Maukonen J, Satokari R, Matto J, et al. Prevalence and temporal stability of selected clostridial groups in irritable bowel syndrome in relation to predominant faecal bacteria. *J Med Microbiol* 2006;55:625-633.
19. Parkes GC, Rayment NB, Hudspith BN, et al. Distinct microbial populations exist in the mucosa-associated microbiota of subgroups of irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:31-39.
20. Tack J. Antibiotic therapy for the irritable bowel syndrome. *N Engl J Med* 2011;364:81-82.
21. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, et al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *Br J Nutr* 2010;104(Suppl2):S1-S63.
22. Korpela R, Niittynen L. Probiotics and irritable bowel syndrome. *Microb Ecol Health Dis* 2012;23:18573-18579.
23. Halmos EP, Power VA, Shepherd SJ, et al. A diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* 2014;146:67-75.
24. Bourdu S, Dapoigny M, Chapuy E, et al. Rectal instillation of butyrate provides a novel clinically relevant model of noninflammatory colonic hypersensitivity in rats. *Gastroenterology* 2005;128:1996-2008.
25. Tana C, umesaki Y, Imaoka A, et al. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2010;22:512-519.
26. Camilleri M, Madsen K, Spiller R, et al. Intestinal barrier function in health and gastrointestinal disease. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:503-512.
27. Duboc H, Rainteau D, Rajca S, et al. Increase in fecal primary bile acids and dysbiosis in patients with diarrhea-predominant irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil* 2012;24:513-520.
28. Kamada N, Chen GY, Inohara N, et al. Control of pathogens and pathobionts by the gut microbiota. *Nat Immunol* 2013;14:685-690.
29. Mayer EA, Savidge T, Shulman RJ. Brain-gut microbiome interactions and functional bowel disorders. *Gastroenterology* 2014;146:1500-1512.
30. Ford AC, Moayyedi P, Lacy BE, et al. American College of Gastroenterology Monograph on the Management of Irritable Bowel Syndrome and Chronic Idiopatic Constipation. *Am J Gastroenterol* 2014;109:S2-S26.
31. Ford AC, Quigley EM, Lacy BE, et al. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopatic constipation: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol* 2014;109:1547-1561.
32. Ciorba MA. A Gastroenterologist's guide to probiotics. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2012;10:960-968.
33. Guyonnet D, Chassany O, Ducrotte P, et al. Effect of a fermented milk containing Bifidobacterium animalis DN-173 010 on the health-related quality of life and symptoms in irritable bowel syndrome in adults in primary care: a multicentre, randomized, double-blind, controlled trial. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;26:475-486.
34. Guglielmetti S, Mora D, Gschwender M, et al. Randomised clinical trial: Bifidobacterium bifidum MIMBb75 significantly alleviates irritable bowel syndrome and improves quality of

life – a double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:1123-1132.
35. O'Mahony L, McCarthy J, Kelly P, et al. Lactobacillus and Bifidobacterium in irritable bowel syndrome: symptom responses and relationship to cytokine profiles. *Gastroenterology* 2005;128:541-551.
36. Whorwell PJ, Altringer L, Morel J, et al. Efficacy of an encapsulated probiotic Bifidobacterium infantis 35624 in women with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2006;101:1581-1590.
37. Sinn DH, Song JH, Kim HJ, et al. Therapeutic effect of Lactobacillus acidophilus-SDC 2012, 2013 in patients with irritable bowel syndrome. *Dig Dis Sci* 2008;53:2714-2718.
38. Gade J, Thorn P. Paraghurt for patients with irritable bowel syndrome. A controlled clinical investigation from general practice. *Scand J Prim Health Care* 1989;7:23-26.
39. Nobaek S, Johansson ML, Molin G, et al. Alteration of intestinal microflora is associated with reduction in abdominal bloating and pain in patients with irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2000;95:1231-1238.
40. Niedzielin K, Kordecki H, Birkenfeld B. A controlled, double-blind, randomized study on the efficacy of Lactobacillus plantarum 299V in patients with irritable bowel syndrome. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2001;13:1143-47.
41. Bausserman M, Michail S. The use of Lactobacillus GG in irritable bowel syndrome in children: a double-blind randomized control trial. *J Pediatr* 2005;147:197-201.
42. Gawronska A, Dziechciarz P, Horvath A. A randomized double-blind placebo-controlled trial of Lactobacillus GG for abdominal pain disorders in children. *Aliment Pharmacol Ther* 2007;25:177-184.
43. Horvath A, Dziechciarz P, Szajewska H. Meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for abdominal pain-related functional gastrointestinal disorders in childhood. *Aliment Pharmacol Ther* 2011;33:1302-1310.
44. Hong KS, Kang HW, Im JP, et al. Effect of probiotics on symptoms in Korean adults with irritable bowel syndrome. *Gut Liver* 2009;3:101-107.
45. Saggioro A. Probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. *J Clin Gastroenterol* 2004; 38:S104-106.
46. Kajander K, Hatakka K, Poussa T, et al. A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention. *Aliment Pharmacol Ther* 2005;22:387-394.
47. Kajander K, Myllyluoma E, Rajilic-Stojanovic M, et al. Clinical trial: multispecies probiotic supplementation alleviates the symptoms of symptoms of irritable bowel syndrome and stabilizes intestinal microbiota. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;27:48-57.
48. Kim HJ, Camilleri M, McKinzie S, et al. A randomized controlled trial of a probiotic, VSL#3, on gut transit and symptoms in diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:895-904.
49. Kim HJ, Vazquez Roque MI, Camilleri M, et al. A randomized controlled trial of a probiotic combination VSL#3 and placebo in irritable bowel syndrome with bloating. *Neurogastroenterol Motil* 2005;17:687-696.
50. Guandalini S, Magazzu G, Chiaro A, et al. VSL#3 improves symptoms in children with irritable bowel syndrome: a multicenter, randomized, placebo-controlled, double-blind, crossover study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010;51: 24-30.
51. Williams EA, Stimpson J, Wang D, et al. Clinical trial: a multistrain probiotic preparation significantly reduces symptoms of irritable bowel syndrome in a double-blind placebo-controlled study. *Aliment Pharmacol Ther* 2009;29:97-103.
52. Brandt LJ, Chey WD, Foxx-Orenstein AE, et al. American College of Gastroenterology Task Force on Irritable Bowel Syndrome. An evidence-based systematic review on the management of irritable bowel syndrome. *Am J Gastroenterol* 2009;104 (suppl 1):S1-S35.
53. Steidler L, Neirynck S. In situ delivery of therapeutic proteins by recombinant *Lactococcus lactis*. *J Microbiol* 2003;41: 63-72.

Nutrición Hospitalaria

Nutr Hosp. 2015;31(Supl. 1):89-95
ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ
S.V.R. 318

Adultos

Mastitis infecciosa: nueva solución para un viejo problema

David A. Beltrán Vaquero[1], Ana E. Crespo Garzón[2], Tomás C. Rodriguez Bravo[3] y Ángel Garcia Iglesias[3]

[1]Ayuntamiento de Madrid. [2]Centro de Salud El Naranjo, Fuenlabrada. Madrid, [3]Hospital Universitario de Salamanca. España.

Resumen

La mastitis es la inflamación de uno o varios lóbulos de la glándula mamaria acompañada o no de infección[1]. La etiología más frecuente es la infecciosa y el periodo de mayor prevalencia es durante la lactancia. La incidencia varía del 2 al 33% según los diferentes autores, siendo más frecuente en primíparas y durante las primeras semanas postparto.

Existen otros procesos inflamatorios mamarios relacionados con etiologías que no guardan relación con la lactancia, como pueden ser neoplasias o traumatismos a los cuales no vamos a hacer referencia, dado que el objetivo primordial de este trabajo está orientado a la etiología infecciosa y casi exclusivamente en relación con el puerperio y lactancia.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):89-95)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8714

Palabras clave: *Mastitis infecciosa. Lactancia. Probioticoterapia.*

INFECTIOUS MASTITIS: A NEW SOLUTION FOR AN OLD PROBLEM

Abstract

Mastitis is an inflammation of one or several mammal lobes accompanied or not by a mammary gland infection (WHO 2000). The most frequent etiology is infectious, and the highest prevalence period in women is breast-feeding time. The incidence varies from 2 to 33% according to different authors, being more frequent in primiparous women and during the early postpartum weeks. There are other breast inflammatory processes related etiologies, unrelated to breastfeeding, such as neoplasms or trauma to which no reference is made at this time, since the primary objective of this work is focused on infectious etiology which is caused almost exclusively in relation to postpartum and lactation factors.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):89-95)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8714

Key words: *Infectious mastitis. Breastfeeding. Probiotic-therapy.*

Etiología

El *Staphylococcus aureus* es la bacteria responsable de la mayoría de las mastitis lactacionales (65-90%) (Tratado de Obstetria y Ginecología. SEGO) y, principalmente, de aquellas que presentan una clínica evidente que orientan tanto al diagnóstico microbiológico como a la terapia antibiótica empírica que precozmente se instaura a la mujer, dado que existen muy pocos servicios hospitalarios que realicen análisis microbiológico de la leche materna con anterioridad a instaurar el tratamiento.

El *Staphylococcus epidermidis* es responsable, principalmente, de las mastitis subagudas y subclínicas. Este microorganismo está muy frecuentemente asociado al uso de catéteres y sistemas de drenaje[2]. Por otro lado la mama durante el tercer trimestre de gestación y la lactancia constituye un complejo sistema de drenaje.

Correspondencia: David A. Beltrán Vaquero.
E-mail: beltrangine@gmail.com

Los estreptococos son el segundo grupo bacteriano responsable de estos procesos infecciosos. Entre ellos destacan: *S. agalactie, S. viridans, S. mitis, S. salivarius* y *S. pneumoniae*[3]. Se han relacionado con cuadros subagudos y subclínicos.

Las corynebacterias representan el tercer grupo mayoritario como agentes causales de estos procesos, habiéndose relacionado principalmente con cuadros subagudos y granulomatosos. Hasta hace unos eran considerados de etiología desconocida[4]. Los cuadros clínicos provocados por estos microorganismos presentan una clara tendencia a la recurrencia, cronificación y supuración. Este tipo de microorganismos, frecuentemente, son causantes de infecciones en el tracto urinario.

Patogenia

Clásicamente se admitía, por la mayoría de los autores, que la principal vía de llegada de microorganismos, en la mastitis puerperal, era directamente a través de las grietas, rágades o fisuras, que se producen en areola y pezón frecuentemente durante el inicio de la

lactancia (2º-3º día), para posteriormente alcanzar la vía linfática, representado un 15% de la incidencia. El estancamiento de secreciones facilita la llegada de microorganismos por vía canalicular, afectando al parénquima glandular mamario y tejido intersticial.

En los últimos estudios ha tomado especial relevancia como puerta de entrada la vía hematógena, siendo considerada desde este punto de vista la mastitis puerperal como consecuencia de una infección metastásica.

Factores predisponentes

Son múltiples los factores que pueden que pueden alterar la microbiota mamaria y favorecer la aparición de infección. Entre ellos merecen especial mención el estrés, tabaquismo, enfermedades autoinmunes, déficits inmunitarios (congénitos ó adquiridos), iatrogenia. De hecho, la administración de antibióticos durante el último trimestre de embarazo, parto y/o lactancia aumenta la frecuencia. En definitiva todas aquellas circunstancias que facilitan una situación de disbiosis en las mucosas humanas, provocan un aumento de las mastitis infecciosas[5].

Factores protectores

La composición cualitativa de la leche materna es muy particular, de modo que difiere de una persona a otra en cuanto a contenido de sustancias con acción protectora: oligosacáridos libres, interacciones proteína-carbohidrato, contenido de selectinas (proteínas que intervienen en la adhesión de células del sistema inmune) etc[6].

La microbiota de las mucosas humanas no es homogénea, existiendo grandes diferencias interindividuales, de las cuales depende un claro papel predisponente o defensor frente a muchas enfermedades[7]. Estos hallazgos pueden determinar, a medio o largo plazo, un enfoque individualizado de la medicina preventiva. Resulta evidente, por lo anteriormente expuesto, que la utilización de alternativas a los antibióticos (polifenoles, probióticos, etc.) podría ser determinante para el tratamiento de cuadros leves y moderados de este tipo de mastitis.

Clínica

La sintomatología que aparece depende del tipo de mastitis puerperal como veremos a continuación:

Mastitis aguda: la mayoría de las veces están producidas por *S. aureus*. Esta entidad está decreciendo en los países desarrollados. Clínicamente, hallaremos una extensión variable de la superficie del órgano afectado que comienza a tornarse dura, edematosa (recuerda la piel de naranja), caliente, enrojecida y dolorosa. En ocasiones, el cuadro puede acompañarse de fiebre elevada, linfangitis mamaria y sintomatología vegetativa como nauseas y vómitos. El tratamiento precoz y preciso puede abortar el proceso. De lo contrario y, en dependencia de otros factores asociados, puede evolucionar al absceso mamario.

Absceso mamario: producido por *S. aureus* y, muy frecuentemente, por *S. epidermidis* y otros estafilococos coagulasa negativos[8]. Curiosamente, más del 50% de las cepas de *S. aureus* causantes de abscesos son resistentes a meticilina. La incidencia, como complicación de una mastitis aguda, se estima en 11%[9]. Según su localización se diferencian tres tipos: superficial, intramamario y retromamario. En ocasiones se localiza a nivel de las glándulas de Montgomery.

Mastitis subaguda: representa el tipo más frecuente de mastitis puerperal. Aparece como un dolor en forma de pinchazo o sensación de quemazón, no presentando a la inspección signos inflamatorios locales ni sintomatología a nivel sistémico. Todo condiciona un infradiágnostico y un incorrecto abordaje terapéutico, que determinan destetes no deseados.

Mastitis granulomatosa: existen pruebas suficientes para pensar que el microorganismo responsable es *Corynebacterium kroppenstedtii*, aislado en el esputo de una mujer con infección respiratoria[10]. El desarrollo de los granulomas es lento y progresivo. Este hecho explica que, en ocasiones, el cuadro clínico puede presentarse meses después de haber suspendido la lactancia.

Diagnóstico

El diagnóstico debe ser clínico, analítico, ecográfico y anatomopatológico mediante punción-aspiración (PAAF). Los hallazgos analíticos más habituales son leucocitosis, neutrofilia con desviación izquierda y una aceleración en la velocidad de sedimentación globular. El cultivo de leche materna es crucial para el correcto diagnóstico microbiológico y poder garantizar un abordaje terapéutico correcto, aunque en la práctica clínica, en la mayoría de los casos, se pauta tratamiento de forma empírica.

La ecografía diferencia claramente la mastitis difusa y el absceso. En la primera se visualizan zonas hipoecogénicas y disminución en la definición de las estructuras y, en el absceso, observamos una colección bien delimitada, irregular y de predominio hipoecógenico. El PAAF aporta doble información diagnóstica: por un lado, permite el estudio citológico del material obtenido y, en segundo lugar, facilita la realización de cultivo microbiológico y el correspondiente antibiograma.

Formas histológicas de mastitis puerperal[11]

- Subareolar: afectación dermis subyacente.
- Glandular o galactoforitis supurada: afectación de uno o varios lobulillos, importante destrucción tisular, el pus drena por los ductos y el pezón.

- Intersticial: afectación del tejido conjuntivo adiposo interlobular.
- Abscesificada (5%): hay una colección purulenta rodeada por una membrana piógena que dará lugar a un absceso. Los abscesos podrán ser superficiales, intramamarios o retromamarios.
- Flemonosa: El agente causal es el estreptococo. La mama está muy edematosa.

Diagnóstico diferencial

El mayor problema que nos podemos encontrar reside en diferenciar una mastitis aguda puerperal y un carcinoma inflamatorio agudo, dado que la inspección y la palpación son muy similares. Solamente la presencia de ganglios supraclaviculares nos orientará a la presencia de un carcinoma. Tampoco el estudio mamográfico, ni la ecografía, ni la termografía (actualmente en desuso) nos resuelven el problema. Quizá la única solución es el estudio citológico mediante PAAF. En definitiva, el análisis histológico resolverá toda duda, pero de todas maneras, clínicamente, hay dos datos muy orientativos: en la mastitis hay aumento de temperatura local y fiebre que encontraremos en raras ocasiones en el carcinoma.

Tratamiento

Se debe pautar medicación sintomática: antitérmicos, antiflogísticos locales y analgésicos. Puede ayudar la aplicación de calor local seco. En cuanto a la antibioticoterapia, teniendo en consideración que la mayoría de las veces el tratamiento se instaura de forma empírica, los más utilizados son: cloxacilina, amoxicilina, amoxicilina/clavulánico, mupirocina, eritromicina y cefazolina.

Ante la presencia de absceso es preciso el tratamiento quirúrgico realizando incisiones arqueadas en la zona de máxima fluctuación, con desbridamiento de todos los posibles tabiques y lavados con abundante suero fisiológico. Es mandatorio durante la intervención tomar una muestra de pus para su estudio microbiológico. Posteriormente se seguirá el tratamiento antibiótico y curas locales diarias[12].

La leche materna:
una fuente inagotable de sorpresas

Hasta hace muy poco existía la creencia generalizada de que la leche materna era un fluido estéril aunque, en realidad, nadie la había estudiado desde el punto de vista microbiológico. Los estudios microbiológicos realizados en la última década han revelado que, en realidad, la leche materna contiene una microbiota que no sólo es diversa, sino también muy compleja.

Los primeros estudios realizados utilizando métodos de cultivo clásicos, revelaron la presencia de microorganismos de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* y *Enterococcus* en muestras de leche humana obtenidas de distintos países[13,14]. (Fig. 1). Estudios posteriores confirmaron estos resultados y revelaron que, aunque en menor número, también contiene otros géneros de bacterias Gram positivas (*Leuconostoc*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Gemella*, *Rothia*) e incluso Gram negativas (*Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*) cultivables[15,16] (Fig. 1).

Además, se han podido aislar bacterias anaerobias estrictas pertenecientes a los géneros *Bifidobacterium* y, más recientemente, *Veillonella*[18-21]. Sin embargo, las bacterias cultivables presentes en comunidades microbianas complejas representan tan solo un pequeño porcentaje del total. En el caso de la microbiota intestinal, por ejemplo, se ha estimado que sólo el 30% de las bacterias puede cultivarse con la tecnología disponible actualmente.

El empleo de métodos moleculares (desde los primeros estudios basados en la técnica de electroforesis en gel con un gradiente de desnaturalización hasta los más recientes de secuenciación masiva) ha revelado la existencia de una mayor diversidad de filotipos bacterianos en la leche materna[22-24]. Estos estudios han corroborado que las secuencias de DNA bacteriano más abundantes en este fluido pertenecen a los géneros *Staphylococcus, Streptococcus* y *Corynebacterium* y la presencia de todos los géneros bacterianos que habían sido descritos con técnicas de cultivo.

De hecho, el análisis de 47 muestras de leche obtenidas de 16 mujeres reveló la existencia en todas las muestras analizadas, aunque en proporción variable, de 9 unidades taxonómicas operacionales: *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium*, *Rolstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas*, *Bradyrhizobiaceae* (Fig. 2).

Por otra parte, un estudio reciente de la diversidad microbiana en la leche materna, basado en la pirosecuenciación, ha puesto de manifiesto la existencia en leche materna de una pequeña proporción de DNA de varios anaerobios estrictos, distintos de *Bifidobacterium* y *Veillonella,* que se encuentran habitualmente en la microbiota intestinal, como *Bacteroides* y distintos miembros de la clase Clostridia. Dentro de la clase Clostridia, se identificó DNA de *Blautia*, *Dorea* y *Ruminococcus*, así como de varios productores de butirato como *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Coprococcus* y *Subdoligranulum*, que tienen una estrecha relación con la salud intestinal. Aunque en otro sentido estas técnicas analíticas, independientes de cultivo, también pueden introducir sesgos debido a diferencias en la facilidad para el aislamiento y la amplificación del DNA de las distintas especies bacterianas.

El origen de las bacterias que se encuentran en la leche materna es muy polémico. Tradicionalmente se ha considerado que procedían de la piel circundante (pezón, areola mamaria). De hecho, los géneros mayoritarios en la leche materna (*Staphylococcus*, *Corynebacterium* y *Propionibacterium*) también se encuentran en la

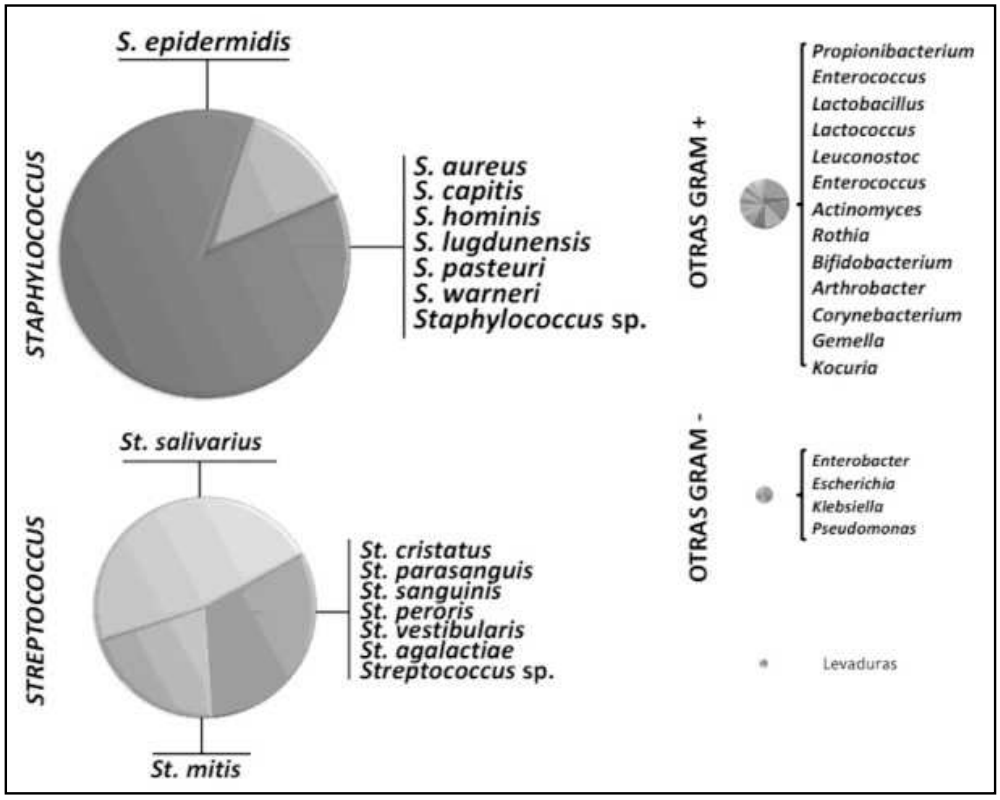

Fig. 1.—Diversidad de la microbiota de la leche materna según las técnicas de cultivo tradicionales. Fuente: Heikkila y Saris (2003); Jiménez et al. (2008); Marín et al. (2009)[17].

piel de los individuos adultos[25]. Por otra parte, se ha sugerido que el flujo retrógrado de leche desde la boca del niño a la glándula mamaria durante la succión podría introducir bacterias presentes en la boca del lactante en la glándula mamaria.

Sin embargo, a pesar de que las bacterias del género *Streptococcus* son las más frecuentes en la cavidad oral de los lactantes[26], en estos momentos es imposible discernir la dirección de la transmisión, en caso de que exista. Además, es posible aislar bacterias del calostro obtenido antes del nacimiento del niño. Este hecho, junto con la existencia en la leche materna de bacterias con un carácter anaerobio estricto, indica la existencia de otra vía alternativa, posiblemente endógena. Algunos autores han propuesto un modelo que explicaría cómo algunas bacterias pueden atravesar el epitelio intestinal de la madre y llegar a la glándula mamaria por medio de la circulación enteromamaria[27-29].

Una de las principales funciones de esta microbiota mamaria es contribuir a la colonización del intestino del lactante. Esto no debe extrañar ya que cada vez existen más pruebas de que la transmisión microbiana de la madre a su descendencia es un hecho universal en el reino animal[30]. En el caso de los mamíferos empezaría durante la gestación y se completaría durante el nacimiento y la lactancia a través de la leche materna. De esta forma, no se deja al azar la transmisión de una ingente cantidad de información genética asociada al microbioma, sino que se asegura una correcta colonización microbiana de la descendencia, que tantas repercusiones va a tener en su estado de salud tanto a corto como a largo plazo.

Una correcta colonización intestinal del lactante contribuye a protegerle de infecciones, programar su sistema inmune innato, participar en la digestión de nutrientes, producir distintas sustancias bioactivas y potenciar un correcto desarrollo cognitivo. Recientemente se ha propuesto que esta microbiota mamaria también podría tener repercusión a largo plazo en la salud de la madre, dada la estrecha relación que existe entre una disbiosis en el tejido mamario y el cáncer de mama[31].

A pesar de que la composición de la microbiota mamaria parece ser específica de cada individuo, existen diversos factores que pueden modificarla, entre los que cabe destacar el uso de antibióticos. Así se constata en un estudio en el que se observó que la frecuencia de detección de lactobacilos y bifidobacterias en la leche materna se reducía significativamente (alrededor de un 50%) en las mujeres que habían recibido antibioterapia durante el embarazo y la lactancia[21]. Por otra parte, la alteración de ese equilibrio, con la pérdida de la diversidad microbiana característica y el predominio de un pequeño número de especies, determina la aparición de mastitis que son relativamente comunes y de especial relevancia durante la lactancia (Fig. 2).

Probióticos: una prometedora alternativa para las mastitis lactacionales

Puesto que la mastitis lactacional se trata de una disbiosis o cambio anómalo de la microbiota mamaria, el tratamiento con probióticos se considera una buena

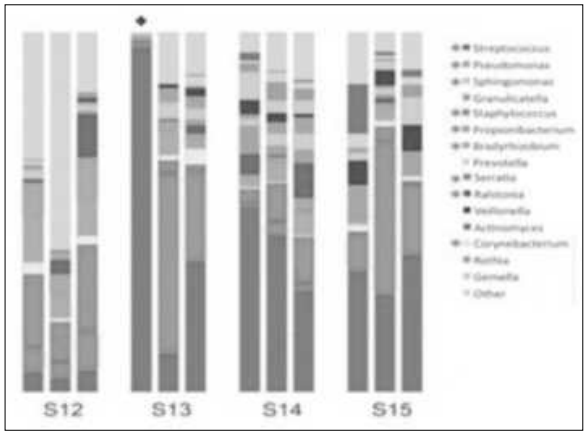

Fig. 2.—Diversidad y complejidad bacteriana (según pirosecuenciación del gen de RNA ribosómico 16S) en muestras de leche obtenidas de cuatro mujeres en tres momentos distintos. En la leyenda se han marcado con un asterisco las 9 unidades taxonómicas operacionales presentes en todas las muestras analizadas en el estudio (realizado con un total de 16 mujeres). En la primera muestra obtenida de la mujer 13 (S13), y marcada con un rombo (♦), el 95% de las secuencias obtenidas pertenecían al género Streptococcus y el recuento de células somáticas fue unas 5 veces superior al obtenido en las dos muestras restantes; estos resultados con compatibles con una mastitis lactacional. Fuente: Hunt et al. (2011).

opción para restablecer el equilibrio de esta microbiota[32]. La bacterioterapia o empleo de ciertos microorganismos beneficiosos o probióticos para desplazar a los agentes patógenos implicados en un proceso infeccioso se propuso hace ya más de 25 años, demostrando ser efectiva en varios tipos de infecciones recurrentes[33]. El aumento alarmante de la resistencia bacteriana a antibióticos como consecuencia del uso poco controlado de antimicrobianos y la poca efectividad del tratamiento antibiótico en algunas ocasiones, ha hecho que vuelva a aumentar el interés por la probioterapia. Los probióticos se definen como microorganismos vivos que cuando se ingieren en cantidades adecuadas ejercen un efecto beneficioso en la salud del hospedador[34]. Es importante resaltar que las propiedades probióticas dependen de cada cepa y deben ser ensayadas individualmente.

Precisamente, de entre las bacterias cultivables de la leche materna de mujeres sanas se han aislado algunas cepas pertenecientes al género *Lactobacillus* que tienen propiedades probióticas demostradas no solo *in vitro*, sino incluso en ensayos clínicos[35-39]. Es especialmente relevante la capacidad de ciertas cepas (*Lactobacillus coryniformis* CECT5711, *Lactobacillus fermentum* CECT5716, *Lactobacillus gasseri* CECE5714 y *Lactobacillus salivarius* CECT5713) para inhibir a los principales agentes etiológicos de las mastitis lactacionales (bacterias de los géneros *Staphylococcus* y *Streptococcus*), adherirse a epitelios, sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal y tener actividad anti-inflamatoria e inmunomoduladora[37,38,40,41].

La reciente secuenciación del genoma completo de dos de estas cepas, *L. salivarius* CECT5713 y *L. fermentum* CECT5716, y el estudio detallado de la relación existente entre los rasgos genéticos y fenotípicos de *L. salivarius* CECT5713, entre los que cabe destacar la existencia de proteínas con posible mimetismo molecular con proteínas humanas, permite explicar, al menos en parte, sus propiedades probióticas[42,43]. La seguridad de estas dos cepas también ha sido probada[44,45].

La eficacia de determinadas cepas de lactobacilos aislados de leche materna para el tratamiento de la mastitis ha sido demostrada en dos ensayos clínicos. En el primero participaron 20 mujeres con mastitis causada por estafilococos que se asignaron al azar a uno de dos grupos: el grupo probiótico ingirió diariamente durante 4 semanas 10^{10} unidades formadoras de colonias (ufc) de *L. salivarius* CECT5713 y la misma cantidad de *L. gasseri* CECT5714, mientras que el grupo control solo recibió el excipiente. El recuento medio de estafilococos en leche se redujo en el grupo probiótico de 4,74 $\log_{10}$ ufc/mL, antes de iniciar el tratamiento probiótico, a 2,96 $\log_{10}$ ufc/mL al finalizar el estudio, siendo este último valor similar al que se encuentra normalmente en muestras de leche de mujeres sanas. Además, las manifestaciones clínicas de mastitis desaparecieron ya al cabo de 2 semanas de iniciarse la ingestión del probiótico. Cabe resaltar que las cepas probióticas administradas por vía oral pudieron aislarse al final del estudio de muestras de leche en un poco más de la mitad de las mujeres del grupo probiótico. En cambio, no se observaron cambios ni en el recuento de estafilococos ni en la evolución de los síntomas clínicos en el caso de las mujeres asignadas al grupo control, poniendo de manifiesto la eficacia de las dos cepas ensayadas[46].

En un segundo ensayo clínico, en el que participaron 352 mujeres afectadas de mastitis durante un periodo de tres semanas, se comparó la eficacia individual de dos cepas de lactobacilos aisladas previamente de leche de mujeres sanas frente a la terapia antibiótica clásica. En esta ocasión, las participantes se repartieron al azar en tres grupos: las mujeres de dos grupos tomaron un probiótico (grupo A, 10^9 ufc/día de *L. fermentum* CECT5716; grupo B, 10^9 ufc/día de *L. salivarius* CECT5713) mientras que las asignadas al tercero (grupo C) recibieron la terapia antibiótica que prescribieron los facultativos de su centro de salud. De nuevo, se comprobó la efectividad de ambas cepas para restaurar el equilibrio de la microbiota mamaria y eliminar los síntomas clínicos de la mastitis[35]. Pero además, los probióticos presentaron una gran ventaja frente al tratamiento con antibióticos, ya que la evolución de los síntomas clínicos fue más favorable y las recurrencias y los efectos adversos fueron menos frecuentes (Tabla I).

La existencia de la circulación enteromamaria, que se intensifica al final del embarazo y durante la lactancia, y la comprobación de que las dos cepas de lactobacilos probióticos administrados oralmente en los dos estudios anteriores llegan a la glándula mamaria, abre la interesante posibilidad de modular la microbiota mamaria mediante la ingestión de probióticos. Esto

Tabla I

Comparación de los principales cambios microbiológicos y clínicos observados tras la administración diaria durante 3 semanas de un probiótico (10^9 ufc de Lactobacillus fermentum *CECT5716 o de* Lactobacillus salivarius *CECT5713) o un antibiótico a mujeres con mastitis*

	Lactobacillus fermentum *CECT5716* *(n = 124)*	Lactobacillus salivarius *CECT5713* *(n = 127)*	*Antibiótico* *(n = 101)*	
Recuentos bacterianos:	**Disminución (en $\log_{10}$ ufc/mL)**			
Totales	1,74	2,14	1,11	$P < 0{,}01$
Staph. epidermidis	1,56	1,78	0,90	$P < 0{,}01$
Staph. aureus	1,76	1,80	0,98	$P < 0{,}01$
Strep. mitis	1,55	1,81	0,98	$P < 0{,}01$
Dolor en el pecho	**Disminución (escala 1-10)**			
	6,33	6,45	3,80	$P < 001$
Detección del probiótico en leche materna	54%	68%	–	
Recurrencia de mastitis	10,5%	7,1%	30,7%	
Candidiasis vaginal	–	–	8,9%	
Flatulencia	5,6%	–	–	
Abandono de lactancia	–	–	8,9%	

[El antibiótico prescrito fue amoxicilina+ácido clavulánico (39%), amoxicilina (23%), cotrimoxazol (19%), cloxacilina (18%)o eritromicina (2%)]
Fuente: Arroyo et al. (2010).

puede tener un impacto favorable no sólo para la salud de la madre sino también para la de su hijo lactante. Es de esperar que esta estrategia, junto con un uso controlado y racional de los antibióticos, permita reducir en un futuro la incidencia de esta patología en las mujeres lactantes.

Referencias

1. OMS. Mastitis: causes and management. Geneva: WHO, 2000.
2. Aldea-Mansilla C, Garcia de Viedma D, Cercenado E, Martin-Rabadan P, Marin M, Bouza E. Comparison of phenotypic with genotypic procedures for confirmation of coagulase-negative *Staphylococcus* catheter-related blood- stream infections. *J Clin Microbiol* 2006; 44:3529-3532.
3. Wüst J, Rutsch M, Stocker S. *Streptococcus pneumoniae* as an agent of mastitis *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1995; 14: 156-157.
4. Taylor GB, Paviour SD, Musaad S, Jones WO, Holland DJ. A clinicopatho logical review of 34 cases of inflammatory breast disease showing an association between corynebacteria infection and granulomatous mastitis. *Pathology* 2003; 35:109-119.
5. Rodríguez JM, Jiménez E, Merino V, Maldonado ML, Marín ML et al. Microbiota de la leche humana en condiciones fisiológicas. *Acta Pediatr Esp* 2008; 66:77-82.
6. Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Ann Rev Nutr* 2000; 20:699-722.
7. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011; 473:174-180.
8. Moazzez A, Kelso RL, Towfigh S, Sohn H, Berne TV, Mason RJ. Breast abscess bacteriologic features in the era of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* epidemics. *Arch Surg* 2007; 142:881-884.
9. Amir LH, Forster D, McLachlan H, Lumley J. Incidence of breast abscess in lactating women: report from an Australian cohort. *Br J Obstet Gynaecol* 2004; 111:1378-1381.
10. Collins JK, Thornton G, O'Sullivan GO. Selection of probiotic strains for human applications. *Int Dairy J* 1998; 8:487-490.
11. Tratado de Obstetricia y Ginecología SEGO. Décimo tercera edición. 2013.
12. Barbosa-Cesnik et al. Lactation mastitis. *JAMA* 2003;289 (13): 1609-1612.
13. Heikkilä MP, Saris PEJ. Inhibition of Staphylococcus aureus by the commensal bacteria of human milk. *J Appl Microbiol* 2003;95:471-478.
14. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jimínez E, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 2003; 143:754-758.
15. Jiménez E, Delgado S, Fernández L, García N, Albújar M, Gómez A, Rodríguez JM. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of staphylococcal and enterococcal populations for potential virulence factors. *Res Microbiol* 2008; 159:595-601.
16. Jiménez E, Delgado S, Maldonado A, Arroyo R, Albújar M, García N, Jariod M, Fernández L, Gómez A, Rodríguez JM. *Staphylococcus epidermidis*: a differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. *BMC Microbiol* 2008; 8:143.
17. Marín ML, Arroyo R, Jiménez E, Gómez A, Fernández L, Rodríguez JM. Cold storage of human milk: effect on its bacterial composition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2009; 49:343-348.
18. Grönlund MM, Gueimonde M, Laitinen K, Kociubinski G, Grönroos T, Salminen S, Isolauri E. Maternal breast-milk and intestinal bifidobacteria guide the compositional development of the Bifidobacterium microbiota in infants at risk of allergic disease. *Clin Exp Allergy* 2007; 37:1764-1772.
19. Martín R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, Rodríguez JM. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* 2009; 75:965-969.
20. Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. *Br J Nutr* 2013; 110:1253-1262.
21. Soto A, Martín V, Jiménez E, Mader I, Rodríguez JM, Fernández L. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of antibiotherapy and other host and clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2014; 59:78-88.

22. Martín R, Heilig HG, Zoetendal EG, Jiménez E, Fernández L, Smidt H, Rodríguez JM. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res Microbiol* 2007;158:31-37.
23. Hunt KM, Foster JA, Forney LJ et al. Characterization of the Diversity and Temporal Stability of Bacterial Communities in Human Milk. *PLoS One* 2011;6:e21313.
24. Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. *Am J Clin Nutr* 2012;96:544-551.
25. Rosenthal M, Goldberg D, Aiello A, Larson E, Foxman B. Skin microbiota: microbial community structure and its potential association with health and disease. *Infect Genet Evol* 2011;11:839-848.
26. Zaura E, Nicu EA, Krom BP, Keijser BJF. Acquiring and maintaining a normal oral microbiome: current perspective. *Front Cell Infect Microbiol* 2014; 4:85.
27. Jeurink PV, van Bergenhenegouwen J, Jiménez E, Knippels LM, Fernández L, Garssen J, Knol J, Rodríguez JM, Martín R. Human milk: a source of more life than we imagine. *Benef Microbes* 2013; 4:17-30.
28. Fernández L, Langa S, Martín V, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM. The microbiota of human milk in healthy women. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2013; 59:31-42.
29. Fernández L, Langa S, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Martín R, Rodríguez JM. The human milk microbiota: origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol Res* 2013; 69:1-10.
30. Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol* 2013; 11:e1001631.
31. Xuan C, Shamonki JM, Chung A, Dinome ML, Chung M, Sieling PA, Lee DJ. Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. *PLoS One* 9:e83744.
32. Fernández L, Arroyo R, Espinosa I, Marín M, Jiménez E, Rodríguez JM. Probiotics for human lactational mastitis. *Benef Microbes* 2014; 5:169-183.
33. Huovinen P. Bacteriotherapy: the time has come. *BMJ* 2001; 323: 353–354.
34. FAO/WHO (Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization). 2001. Report on Joint FAO/WHO Expert Consultation on evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probio_report_en.pdf.
35. Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of lactobacilli isolated from breast milk. *Clin Infect Dis* 2010;50:1551-1558.
36. Jara S, Sánchez M, Vera R, Cofré J, Castro E. The inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. isolated from breast milk on gastrointestinal pathogenic bacteria of nosocomial origin. *Anaerobe* 2011;17:474-477.
37. Martín R, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. Probiotic potential of 3 lactobacilli strains isolated from breast milk. *J Hum Lact* 2005;21:8-17.
38. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Martín R, Rodríguez JM, Xaus J. Antimicrobial potential of four *Lactobacillus* strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol* 2006;101:72-79.
39. Jiménez E, Fernández L, Maldonado A, Martín R, Olivares M, Xaus J, Rodríguez JM. Oral administration of *Lactobacillus* strains isolated from breast milk as an alternative for the treatment of infectious mastitis during lactation. *Appl Environ Microbiol* 2008;74:4650-4655.
40. Díaz-Ropero MP, Martín R, Sierra S, Lara-Villoslada F, Rodríguez JM, Xaus J, Olivares M. Two *Lactobacillus* strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol* 2007;102:337-343.
41. Pérez-Cano FJ, Dong H, Yaqoob P. In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Inmunobiology* 2010;12:996-1004.
42. Jiménez E, Langa S, Martín V, Arroyo R, Martín R, Fernández L, Rodríguez JM. Complete genome sequence of *Lactobacillus fermentum* CECT 5716, a probiotic strain isolated from human milk. *J Bacteriol* 2010;192:4800.
43. Langa S, Maldonado-Barragán A, Delgado S, Martín R, Martín V, Jiménez E, Ruíz-Barba JL, Mayo B, Connor RI, Suárez JE, Rodríguez JM. Characterization of L*actobacillus salivarius* CECT 5713, a strain isolated from human milk: from genotype to phenotype. *Appl Microbiol Biotechnol* 2012;94:1279-1287.
44. Lara-Villoslada F, Sierra S, Díaz-Ropero MP, Olivares M, Xaus J. Safety assessment of the human milk-isolated probiotic *Lactobacillus salivarius* CECT5713. *J Dairy Sci* 2007;90:3583-3589.
45. Lara-Villoslada F, Sierra S, Díaz-Ropero MP, Rodríguez JM, Xaus J, Olivares M. Safety assessment of *Lactobacillus fermentum* CECT5716, a probiotic strain isolated from human milk. *J Dairy Sci* 2009;76:216-221.
46. Jiménez E, Martín R, Maldonado A, Martín V, De Segura Gomez A, Fernández L, Rodríguez JM. Complete genome sequence of *Lacto*bacillus salivarius CECT 5713, a probiotic strain isolated from human milk and infant feces. *J Bacteriol* 2010;192:5266-5267.

VI Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica

Oviedo 5 y 6 de febrero de 2015

CONSENSO CIENTÍFICO SOBRE PREBIÓTICOS

VI Workshop Probiotics, Prebiotics and Health: Scientific Evidence

Oviedo, 5 and 6 February, 2015

SCIENTIFIC CONSENSUS ON PREBIOTICS

Nutrición Hospitalaria

Nutr Hosp. 2015;31(Supl. 1):99-118
ISSN 0212-1611 • CODEN NUHOEQ
S.V.R. 318

Prebióticos; concepto, propiedades y efectos beneficiosos

N. Corzo[1], J. L. Alonso[2], F. Azpiroz[3], M. A. Calvo[4], M. Cirici[5], R. Leis[6], F. Lombó[7], I. Mateos-Aparicio[8], F. J. Plou[9], P. Ruas-Madiedo[10], P. Rúperez[11], A. Redondo-Cuenca[12], M. L. Sanz[13] y A. Clemente[14]

[1]Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM) Madrid. [2]Departamento de Ingeniería Química, Universidad de Vigo. Facultad de Ciencias, Campus de Ourense, Ourense. [3]Servicio de Aparato Digestivo, Hospital Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona. [4]Grupo de investigación en Microbiología aplicada y medio-ambiental, Facultad de Veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona, Campus de Bellaterra, Barcelona. [5]BENEO. Connecting nutrition and health, BENEO-Ibérica Barcelona. [6]Unidad de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica, Dpto. Pediatría, Hospital Clínico Universitario de Santiago, Área de Gestión Integrada de Santiago, Universidad de Santiago de Compostela. [7]Grupo de Investigación de Biotecnología y Terapia Experimental basada en Nutraceúticos (BITTEN), Instituto Universitario de Oncología del Principado de Asturias (IUOPA), Universidad de Oviedo, Facultad de Medicina, Oviedo. [8]Departamento de Nutrición y Bromatología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid. [9]Grupo de Biocatálisis Aplicada, Instituto de Catálisis y Petroleoquímica, CSIC, Madrid. [10]Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias - (IPLA-CSIC) Asturias. [11]Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC) Madrid. [12]Departamento de Nutrición y Bromatología II, Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid. [13]Departamento de Análisis Instrumental y Química Ambiental, Instituto de Química Orgánica General (CSIC), Madrid. [14]Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal, Estación Experimental del Zaidin (CSIC), Granada. España.

Resumen

Los prebióticos son ingredientes alimentarios no digeribles (oligosacáridos) que llegan al colon y sirven de sustrato a los microorganismos, originando energía, metabolitos y micronutrientes utilizados por el hospedador y estimulando el crecimiento selectivo de determinadas especies beneficiosas (principalmente, bifidobacterias y lactobacilos) de la microbiota intestinal. En este artículo se realiza una revisión sobre los carbohidratos prebióticos desde diferentes perspectivas, comenzando por las definiciones de prebióticos formuladas a lo largo de los últimos treinta años por científicos y diferentes organismos internacionales. Se realiza una descripción detallada de los prebióticos aceptados, como tales, que presentan propiedades beneficiosas fundamentadas en estudios llevados a cabo en humanos (fructanos tipo inulina y FOS; GOS, lactulosa y oligosacáridos de leche humana), los que se consideran prebióticos emergentes y aquellos que se encuentran en fases iniciales de estudio. Además y teniendo en cuenta que la estructura química de los carbohidratos influye notablemente en sus propiedades prebióticas, se describen las técnicas más utilizadas para su análisis y caracterización. Asimismo, se detallan los modelos *in vitro* e *in vivo* más utilizados para estudiar la resistencia de los prebióticos a la digestión y la absorción gastrointestinal, la fermentación de los prebióticos en el colon así como los criterios a tener en cuenta para llevar a cabo ensayos de intervención en humanos. Por último se realiza una amplia descripción de los efectos beneficiosos de los prebióticos para la salud a nivel intestinal y

Correspondencia: Nieves Corzo
Departamento de Bioactividad y Análisis de Alimentos.
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación.
CIAL (CSIC-UAM) Campus Cantoblanco CEIO UAM + CSIC
Nicolás Cabrera, 9 28029 Madrid
E-mail: nieves.corzo@csic.es

PREBIOTICS: CONCEPT, PROPERTIES AND BENEFICIAL EFFECTS

Abstract

Prebiotics are non-digestible food ingredients (oligosaccharides) that reach the colon and are used as substrate by microorganisms producing energy, metabolites and micronutrients used for the host; in addition they also stimulate the selective growth of certain beneficial species (mainly bifidobacteria and lactobacilli) in the intestinal microbiota. In this article, a multidisciplinary approach to understand the concept of prebiotic carbohydrates, their properties and beneficial effects in humans has been carried out. Definitions of prebiotics, reported by relevant international organizations and researchers, are described. A comprehensive description of accepted prebiotics having strong scientific evidence of their beneficial properties in humans (inulin-type fructans, FOS, GOS, lactulose and human milk oligosaccharides) is reported. Emerging prebiotics and those which are in the early stages of study have also included in this study. Taken into account that the chemical structure greatly influences carbohydrates prebiotic properties, the analytical techniques used for their analysis and characterization are discussed. *In vitro* and *in vivo* models used to evaluate the gastrointestinal digestion, absorption resistance and fermentability in the colon of prebiotics as well as major criteria to design robust intervention trials in humans are described. Finally, a comprehensive

sistémico. Como conclusión, podría decirse que la investigación existente hasta el momento, sobre prebióticos, es extensa y pone de manifiesto que es necesario considerar un gran número de factores para poder atribuir alegaciones de salud a un prebiótico.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):99-118)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8715

Palabras clave: *Prebióticos. Definiciones. Análisis. Modelos. Efectos beneficiosos.*

summary of the beneficial effects of prebiotics for health at systemic and intestinal levels is reported. The research effort on prebiotics has been intensive in last decades and has demonstrated that a multidisciplinary approach is necessary in order to claim their health benefits.

(*Nutr Hosp* 2015;31(Supl. 1):99-118)

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8715

Key words: *Prebiotics. Definitions. Analysis. Models. Beneficial effects.*

Introducción

Actualmente los consumidores están cada vez más concienciados de la relación que existe entre dieta y salud, hecho que ha impulsado el desarrollo y la comercialización de alimentos funcionales con propiedades beneficiosas. El nuevo estilo de vida ha provocado el abandono de determinados hábitos saludables de alimentación que durante años han formado parte de nuestra historia y tradición. Existe una gran variedad de compuestos con una determinada actividad funcional y que se podrían utilizar como ingredientes alimentarios o suplementos dietéticos. De todos ellos, los prebióticos son los que han provocado un mayor interés en los últimos años, probablemente debido a la gran incidencia de patologías relacionadas con la función gastrointestinal. El mercado de los alimentos funcionales es muy variado y concretamente el de los prebióticos ha ido creciendo de tal forma que en 2007 se contabilizaron unos 400 productos alimenticios prebióticos[1]. Por otra parte, el mercado global de alimentos y bebidas que contienen prebióticos y probióticos continuó subiendo de forma que las ventas en el año 2008 se incrementaron un 12,5% con respecto a las estimadas en el año 2007[2].

De entre todos los ingredientes alimentarios, los carbohidratos no digeribles (oligo- y polisacáridos) son los candidatos más importantes para ser considerados como prebióticos. Estos carbohidratos pueden estar presentes de forma natural en alimentos tales como la leche y la miel, así como en hortalizas, verduras, frutas, cereales, legumbres y frutos secos, pudiéndose obtener, de estos últimos, por extracción directa mediante solubilización en agua o soluciones acuosas (p.ej. inulinas, oligosacáridos de achicoria o soja) y por tratamientos químicos (utilizando álcalis o ácidos) o enzimáticos [por ejemplo, la hidrólisis enzimática de inulina para obtener los fructooligosacáridos (FOS)]. La hidrólisis enzimática suele ser la elegida ya que se utilizan condiciones de tratamiento más suaves. En la figura 1 se indican las diferentes fuentes y procedimientos de obtención de los carbohidratos no digeribles considerados prebióticos, así como de los potencialmente prebióticos y de los que están actualmente en estudio[3].

Los carbohidratos prebióticos pueden también obtenerse mediante síntesis, ya sea química o enzimática (reacciones de transglicosilación). En esta última se utilizan diferentes tipos de enzimas, como las β-fructofuranosidasas para obtener FOS, las β-galactosidasas para obtener galactooligosacáridos (GOS), las transglucosidasas para obtener isomaltooligosacáridos (IMOS), etc. Estas enzimas pueden proceder de diferentes microorganismos (hongos, levaduras y bacterias) y, en las reacciones pueden dar lugar a mezclas de oligosacáridos prebióticos de composición y estructura (longitud de cadena, tipos de monosacáridos, grado de ramificación) variadas. Mediante síntesis química pueden obtenerse oligosacáridos prebióticos, como la lactulosa, disacárido que se obtiene por isomerización de la lactosa utilizando catalizadores básicos.

Definición de prebiótico

Durante los últimos 30 años los prebióticos han suscitado un gran interés entre investigadores de ámbitos tan variados como la nutrición, la biomedicina, la industria de alimentos y la administración. A lo largo de todos estos años, se han propuesto diferentes definiciones, persistiendo todavía hoy el debate de si éstas reflejan todas las propiedades que pueden presentar los prebióticos.

Los primeros estudios sobre prebióticos se remontan a los años 80 cuando investigadores japoneses demostraron, en cultivos *in vitro* utilizando como inóculo heces humanas, que ciertos oligosacáridos no digeribles (fundamentalmente FOS) eran fermentados selectivamente por bifidobacterias y que además tenían la capacidad de estimular su crecimiento. Los resultados de estas investigaciones fueron confirmados por Gibson y Roberfroid[4] investigadores que propusieron la primera definición de prebiótico en la que indicaron que: "*es un ingrediente alimentario no digerible que afecta beneficiosamente al hospedador al estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de uno o un limitado número de especies bacterianas en el colon, y que por lo tanto mejora la salud"*. En 2004, Gibson y col.[5], revisaron este concepto y definieron de nuevo los prebióticos como: "*ingredientes que al ser fermentados selectivamente dan lugar a cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota intestinal confiriendo beneficios tanto para la salud como para el bienestar del individuo"*.

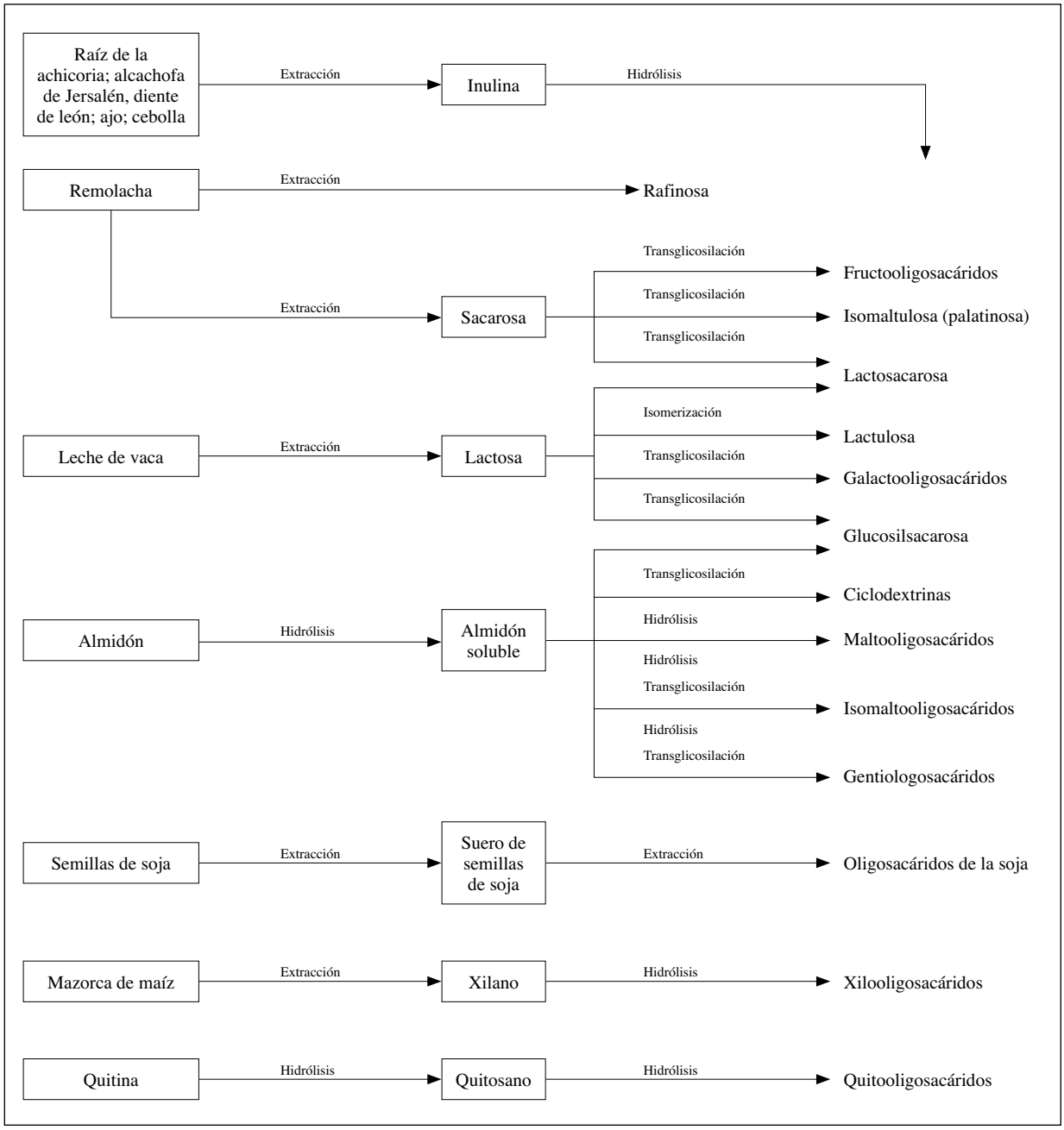

Fig. 1.—Representación esquemática de los procesos de producción de los oligosacáridos no digeribles. (Sako y col.[3], modificado. Reproducción con permiso de Elsevier).

Posteriormente, Roberfroid y col.[6], validaron y ampliaron el concepto de prebiótico indicando que *"son ingredientes que producen una estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad(es) de uno o de un limitado número de géneros/especies de microorganismos en la microbiota intestinal confiriendo beneficios para la salud del hospedador"*. Estos investigadores consideran que el efecto prebiótico debe usarse para identificar o indicar cambios selectivos en la microbiota intestinal además de efectos fisiológicos cuando se realizan estudios de intervención en humanos o en animales de experimentación.

Diferentes organismos internacionales tales como la Food and Agriculture Organization (FAO)[7] de Naciones Unidas y la International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)[8] también definieron a los prebióticos como: "*ingredientes alimentarios que al ser fermentados selectivamente producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal confiriendo beneficios en la salud del individuo"*. Por último, la World Gastroenterology Organisation (WGO)[9] definió a los prebióticos como: "*sustancias de la dieta (fundamentalmente polisacáridos no amiláceos y oligosacáridos no digeribles*

por enzimas humanas) que nutren a grupos seleccionados de microorganismos que habitan en el intestino favoreciendo el crecimiento de bacterias beneficiosas sobre las nocivas".

Utilizacion de prebióticos por la microbiota intestinal

El intestino grueso es, en comparación con otras zonas del tracto gastrointestinal, un ecosistema muy complejo que contiene un gran número de microorganismos que se denominan microbiota intestinal. El medio es favorable para el crecimiento de bacterias (beneficiosas y perjudiciales) debido al pH cercano a la neutralidad, a la alta disponibilidad de nutrientes, así como al tránsito lento de los mismos. Dado que la microbiota puede dar lugar a compuestos beneficiosos para la salud, actualmente existe un gran interés en usar dietas que promuevan el crecimiento de estos grupos bacterianos[10]. En la figura 2 pueden apreciarse los principales metabolitos generados a partir de la utilización de los carbohidratos prebióticos por los microorganismos (fermentación sacarolítica), en el intestino grueso[4]. Tras la ingestión de un alimento se origina una serie de gases tales como hidrógeno (H_2), anhídrido carbónico (CO_2) y metano (CH_4) que no tienen efectos negativos, con la excepción de producir flatulencia e hinchazón; y ácidos grasos de cadena corta (SCFA) (acetato, butirato y propionato, principalmente), además de lactato, que son beneficiosos tanto para la microbiota intestinal (disminuyendo ligeramente el pH), como para las células intestinales (que necesitan estos SCFA para obtener energía). Ciertos componentes de la microbiota producen etanol que es metabolizado rápidamente por otras bacterias intestinales y no ejerce ningún efecto en el hospedador. En la figura 2, también pueden apreciarse los productos originados por la microbiota intestinal, como resultado del metabolismo de las proteínas. Así, se genera sulfuro de hidrógeno (SH_2), que puede reaccionar fácilmente y tener efectos negativos en el intestino, ácidos grasos de cadena ramificada (BCFA) tales como isobutirato, isovalerato. Se produce amoníaco (NH_3), tioles, aminas, y fenoles e indoles que son irritantes para las células intestinales, posiblemente mutagénicos o pueden tener un efecto negativo en el sistema inmune en altas concentraciones. Una excesiva fermentación de las proteínas, especialmente en el colon distal (el más cercano al ano), se ha relacionado con enfermedades tales como el cáncer de colon o enfermedades inflamatorias del intestino. Por todo lo expuesto, es muy importante favorecer la fermentación sacarolítica en el intestino grueso.

Oligosacáridos como prebióticos

Para que un ingrediente o alimento pueda considerarse como prebiótico debe cumplir una serie de requisitos tales como: i) no ser hidrolizado o absorbido en el tracto gastrointestinal (GIT) superior (esófago, estómago y duodeno) y, por lo tanto, ser resistente a

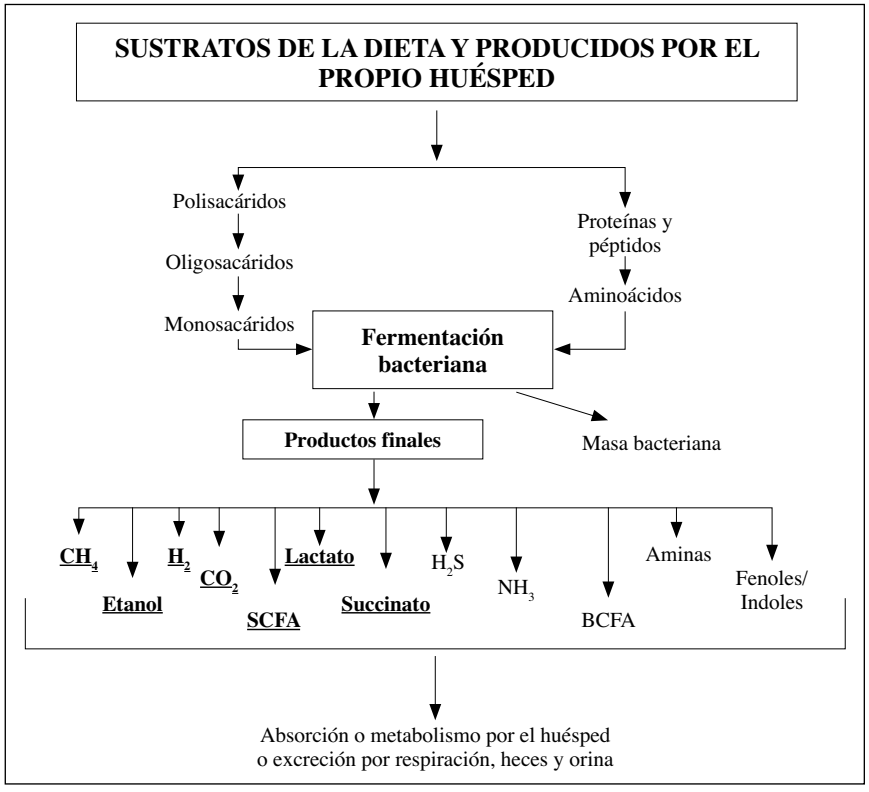

Fig. 2.—Esquema general de la fermentación por la microbiota colónica humana de proteínas y carbohidratos. SCFA = Ácidos Grasos de Cadena Corta BCFA= Ácidos Grasos Ramificados (Gibson y Roberfroid[4]. Reproducción con permiso de American Society for Nutrition). (En negrita y subrayado los metabolitos originados por la utilización de los carbohidratos prebióticos por los microorganismos, en el intestino grueso).

la acidez gástrica, a la hidrólisis por enzimas digestivas y no absorberse en el intestino delgado; ii) ser fermentado selectivamente por bacterias beneficiosas de la microbiota intestinal y; iii) ser capaz de inducir efectos fisiológicos beneficiosos para la salud[4].

Los carbohidratos no digeribles pueden clasificarse en dos tipos, *colónicos* (fibra alimentaria) y *prebióticos*. Los ingredientes *colónicos* son carbohidratos que llegan al colon, sirven como sustrato para los microorganismos que lo habitan originando energía, sustratos metabólicos y micronutrientes para el hospedador. Dentro de este grupo se incluyen los polisacáridos estructurales de plantas, tales como pectinas, hemicelulosas o celulosa, gomas o algunos oligosacáridos derivados de la soja, glucooligosacáridos, arabinooligosacáridos, etc.

Los prebióticos realizan todas las actividades mencionadas anteriormente, pero además, estimulan el crecimiento selectivo de determinadas especies beneficiosas (bifidobacterias, lactobacilos, etc.), de la microbiota intestinal.Aunque en el mercado mundial se están comercializando, como prebióticos, un gran número de carbohidratos, solamente existe evidencia científica de sus propiedades en humanos, en los fructanos tipo inulina y los FOS, los GOS, la lactulosa y los oligosacáridos de leche humana (HMO)[2,11-12].

Inulina y Fructooligosacáridos (FOS)

Su fórmula general puede ser GF_n indicando la presencia de varias unidades de fructosa unidas a una glucosa terminal mediante enlaces glicosídicos β-(2→1) o FF_n conteniendo unidades de fructosa unidas entre sí, también, por enlaces β-(2→1).

La inulina está formada por oligosacáridos y polisacáridos en los que el grado de polimerización (DP) varía de 2 a 65 unidades con un valor medio de 10 y con una estructura mayoritaria GF_n. También puede contener una cantidad menor de estructuras FF_n.

Los FOS son oligosacáridos que se obtienen por hidrólisis de la inulina presente en productos vegetales, o mediante transfructosilación enzimática, a partir de sacarosa, utilizando fructosiltransferasas. Por hidrólisis parcial utilizando endo-inulinasas, se obtiene oligofructosa (FOS) que es una mezcla de fructanos, con una estructura GF_n o FF_n que pueden presentar un DP de 2 a 7 con un promedio de 4. Los FOS, obtenidos por síntesis enzimática utilizando sacarosa, son una mezcla de fructanos, con una estructura GF_n y en este caso los enlaces glicosídicos pueden ser β-(2→1) o del tipo β-(2→6)[13].

Actualmente está aceptado que la inulina y los FOS no se degradan ni se absorben en el tracto gastrointestinal superior de tal forma que llegan intactos al colon donde son metabolizados por la microbiota intestinal. La configuración β en posición 2→1, del carbono anomérico de la fructosa, les hace resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas humanas[10]. Diferentes ensayos de fermentación *in vitro* utilizando cultivos puros de microorganismos o cultivos de heces humanas, así como ensayos en humanos, han puesto de manifiesto que la inulina y los FOS favorecen el crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos disminuyendo el de bacteroides y clostridios[14].

El reconocimiento de la inulina y los FOS como ingredientes GRAS (Generally Recognized as Safe) en USA y como FOSHU (Foods of Specified Health Use) en Japón ha permitido que actualmente, la inulina y la oligofructosa se utilicen sin restricciones en un gran número de alimentos como yogures, bebidas, barritas de cereales, galletas, cereales y productos de bollería o formando parte de alimentos simbióticos.

Existe una amplia variedad de productos comerciales, que se utilizan actualmente en la industria de alimentos tal como queda reflejado en la tabla I.

Lactulosa

El prebiótico más sencillo es la lactulosa, disacárido sintético que se obtiene industrialmente mediante isomerización, en medio básico, de la lactosa presente en el permeado del suero de quesería. También puede obtenerse por síntesis enzimática utilizando lactosa y fructosa y β-galactosidasas de diferentes orígenes[17].

La lactulosa es resistente a las enzimas digestivas de tal forma que no es hidrolizada, a diferencia de la lactosa, alcanzando el colon inalterada donde es metabolizada selectivamente por las bifidobacterias y lactobacilos. Esta propiedad bifidogénica, se conoce desde hace muchos años, siendo Petuely[18] el primero en usar este carbohidrato como ingrediente en la elaboración de leches infantiles, para favorecer el crecimiento de las bifidobacterias en lactantes. En los años siguientes, diversos autores desarrollaron nuevos productos basándose en el mismo principio y en 1961 Adachi y Patton[19] recapitularon en un extenso trabajo los conocimientos adquiridos sobre la lactulosa, poniendo de manifiesto sus propiedades singulares como factor de crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias intestinales. En diferentes ensayos de fermentación *in vitro* y en ensayos en humanos se demostró la baja absorción de la lactulosa en el intestino delgado y su metabolismo en el colon favoreciendo el crecimiento de la microbiota beneficiosa y produciendo una significativa disminución de bacteroides clostridios, estreptococos y enterobacterias[10]. Las propiedades prebióticas de la lactulosa se han puesto de manifiesto cuando se ha añadido a alimentos como yogures, fórmulas infantiles, leche de soja, etc[20-22]. Sin embargo, para utilizar la lactulosa como prebiótico hay que establecer la dosis adecuada ya que una cantidad excesiva puede producir flatulencias y diarrea.

Recientemente se han descrito nuevos oligosacáridos derivados de la lactulosa (OsLu)[23-24] que al presentar mayor peso molecular que este disacárido pueden llegar intactos a zonas más distales del colon (donde es mayor la incidencia de determinadas patologías). Diferentes ensayos de fermentación *in vitro* utilizando cultivos puros y heces humanas, así como ensayos *in vivo* utilizan-

Tabla I
Inulina y FOS comerciales y empresas elaboradoras para la industria de alimentos

Prebiótico	*Obtención*	*Nombre comercial*	*Empresas elaboradoras*	*Referencias*
Inulina	Extracción a partir de achicoria	Orafti® Inulin Frutafit Fibruline	Beneo Orafti (Bélgica) Sensus (Holanda) Cosucra (Bélgica)	WGO [9] Rodriguez Colinas [15]
FOS (Fructo-oligosacáridos de cadena corta; scFOS)	Síntesis enzimática a partir de sacarosa	Actilight	Beghin-Meiji (Japón) Tereos (Francia)	Gibson y col. [10] Rodriguez Colinas [15]
FOS (Fructo-oligosacáridos de cadena corta; scFOS)	Extracción de caña de azúcar o remolacha	Nutraflora	GTC Nutrition Company, Westminster, CO	Birkett y Francis [16] WGO [9]
FOS (Oligofructosa)	Hidrólisis parcial de inulina	Orafti® Oligofructose Frutalose Fibrulose	Beneo Orafti Sensus Cosucra	Gibson y col. [10] Rodriguez Colinas [15]
FOS (Oligofructosa)		Oligo-sugar (jarabe/polvo)	Cheil Foods and Chemicals (Corea)	Gibson y col. [10]
		Meioligo (jarabe/polvo)	Meiji Seika Kaisha, (Japón)	Gibson y col. [10]

do animales, han puesto de manifiesto las propiedades bifidogénicas que presentan estos oligosacáridos[25-28].

Además, por todas las propiedades que presenta, la lactulosa se utiliza no solo en nutrición, como prebiótico, sino también como medicamento para el tratamiento del estreñimiento crónico o de la encefalopatía portal hepática[22].

La lactulosa también está considerada en Japón como un ingrediente FOSHU[21]. Por otra parte la EFSA (European Food Safety Agency)[29] ha reconocido que reduce el tiempo de tránsito intestinal y recomienda una ingesta de al menos 10 g, en una sola toma, para obtener dicho efecto. Existe una gran variedad de productos comerciales que contienen lactulosa[30], que se utilizan actualmente en la industria farmacéutica y alimentaria tal como queda reflejado en la tabla II.

Galactooligosacáridos (GOS)

Los GOS son compuestos obtenidos industrialmente a partir de la lactosa del permeado de suero de quesería, mediante transglicosilación catalizada por β-galactosidasas (lactasas). Estas enzimas, en determinadas condiciones, son capaces de catalizar tanto la hidrólisis de la lactosa como la formación de un enlace β-glicosídico entre la galactosa liberada en la hidrólisis y la lactosa u otros carbohidratos presentes en el medio de reacción. Los GOS también se encuentran de forma natural en la leche humana y animal.

Estos oligosacáridos contienen de 2-10 moléculas de galactosa unidas a una glucosa terminal y se diferencian entre sí en la longitud de la cadena y en el tipo de enlace[31]. En los primeros trabajos de elaboración y evaluación de los GOS se usaba la terminología de TOS (oligosacáridos obtenidos por transgalactosilación). La composición de la mezcla de GOS resultante depende del tipo de enzima utilizado, de la concentración y naturaleza del sustrato y de las condiciones de reacción (pH, temperatura y tiempo)[32-33]. Estos azúcares presentan un reconocido carácter prebiótico, ya que estimulan el crecimiento de bacterias lácticas y bifidobacterias en el intestino humano[6].

Los GOS también han sido reconocidos, en todos los países de la Unión Europea, como ingredientes ali-

Tabla II
Lactulosa comercial y empresas elaboradoras para la industria farmaceútica y de alimentos (Playne y Crittenden[30])

Nombre comercial	*Empresas elaboradoras*
Duphalac (jarabe) Bifiteral (jarabe) Chromulac (jarabe) Cephulac (jarabe) Lactulose (en polvo)	Solvay Pharmaceuticals GmH, Hannover Germany
MLS-50 (jarabe) MLP-40 (en polvo) MLC-A (en polvo) MLC-H (en polvo) Milei lactulose (jarabe)	Morinaga Milk Industry Co. Higashihara. Kanagawa, Japón
Lactulose MIP (jarabe)	Chephasar Chem-Pharm Ingbert, Germany
Danilax (jarabe)	Danipharm A/S Denmark
Laevolac (jarabe)	Fresenius Pharma Austria GMBH, Austria
Regulact	Laboratorios Server, México

mentarios y no como aditivos debido a su presencia de forma natural en la leche materna y están considerados en USA, por la FDA, como GRAS y en Japón como FOSHU[34]. Se utilizan en la elaboración de leches maternizadas (junto con FOS) con objeto de imitar los efectos de la leche humana sobre la microbiota de los lactantes.

Debido a las posibles propiedades beneficiosas para la salud asociadas al consumo de estos prebióticos, la demanda de alimentos que los contienen se ha incrementado enormemente, particularmente en Japón y Europa[35]. Por ello, se han realizado numerosos estudios encaminados a optimizar su producción especialmente mediante transgalactosilación vía enzimática, ya que la síntesis química es muy tediosa[36-38]. En la tabla III puede observarse la gran variedad existente, en cuanto a productos comerciales se refiere, de los GOS que se usan actualmente en la industria de alimentos.

Oligosacáridos de leche humana (HMO)

La leche humana contiene hasta un 10% de carbohidratos de los cuales la lactosa es el mayoritario (55-70 g/L) mientras que los HMO se encuentran en concentraciones comprendidas entre 12-14 g/L, siendo el calostro el que posee los mayores niveles de oligosacáridos (22-24 g/L). La fracción que constituye los HMO es muy compleja ya que está formada por al menos 1000 componentes, estando la, gran mayoría de ellos, en cantidades muy bajas. A estos oligosacáridos se les ha considerado como los primeros prebióticos, ya que se ha comprobado que son los responsables del alto número de bifidobacterias presentes en heces de lactantes y también se les conoce como "factor bifidogénico". Hasta el momento se han identificado más de 200 HMO, de los cuales solo 80 han podido ser totalmente caracterizados[43-45].

Tabla III
GOS comerciales y empresas elaboradoras para la industria de alimentos

Nombre comercial del prebiótico	*Empresas elaboradoras*	*Procedencia de β-galactosidasas*	*Referencias*
Bimuno (en jarabe y en polvo)	Clasado Ltd Milton Keynes, UK	*Bifidobacterium bifidum*	Lamsal [2] Torres y col. [39] Sangwan y col. [40]
Cup-oligo H-70 (jarabe) Cup-oligo P (en polvo)	Nissin Sugar Manufacturing Compny Tokio Japón	*Cryptococus laurentii*	Lamsal [2] Playne y Crittenden [30] Torres y col. [39] Sangwan y col. [40]
Dairygold GOS	Dairygold Food Ingredients (Irlanda)		Sangwan y col. [40]
Garakutoorigo (jarabe) (origomeito 55 N)	San-ei Sucrochemical Co., Ltd		Playne y Crittenden [30]
Oligomate 50		*Aspergillus oryzae* y *Streptococcus thermophiles*	Ito y col. [41]
Oligomate 55 (jarabe) Oligomate 55 P (polvo) TOS-100	Yakult Honsha(Tokyo, Japón)	*Sporobolomyces singularis y Kluyveromyces lactis*	Lamsal [2] Torres y col. [39] Sangwan y col. [40] Otieno [42]
Promovita GOS	Fayrefield Food, Crece, UK First milk ingredients, Paisley UK	*Aspergillus oryzae*	Lamsal [2] Torres y col. [39] Sangwan y col. [40]
Purimune	GTC Nutrition (United States)	*Bacillus circulans*	Lamsal [2] Torres y col. [39] Sangwan y col. [40]
P7L	Snow Brabdt Milk Products (Japón)		Sangwan y col. [40]
Transgalactosylated: - oligosacáridos -disacáridos		*Aspergillus oryzae* *Streptococcus thermophilus*	Torres y col. [39]
Vivinal-GOS; TOS syrup	Borculo Domo Ingredients (Friesland Foods Domo) (Zwolle, The Netherlands)	*Bacillus circulans*	Lamsal [2] Playne y Crittenden [30] Torres y col. [39] Sangwan y col. [40] Otieno [42]

Los HMO están constituidos, principalmente, por una molécula de lactosa en su extremo reductor a la que, mediante la acción de diferentes glicosil-transferasas, se unen distintos carbohidratos. Al igual que los GOS, los HMO neutros están compuestos de glucosa y galactosa pero también contienen varias unidades de *N*-acetil-glucosamina y fucosa. Los HMO ácidos contienen, además de los carbohidratos mencionados anteriormente, unidades de ácido *N*-acetil-neuramínico (también conocido como ácido siálico)[45-46]. La presencia del ácido siálico y de la fucosa en posición terminal convierte a estos oligosacáridos en no digeribles por las enzimas digestivas y, por tanto, llegan intactos al colon donde son metabolizados por la microbiota intestinal. Además, los HMO que contienen fucosa y ácido siálico comparten estructuras con glicanos (mucina) del epitelio intestinal de lactantes. Estos glicanos son receptores de patógenos por lo que, la presencia de estos oligosacáridos en la leche materna supone un mecanismo de defensa[47]. Aunque los beneficios que aporta el consumo de dichos oligosacáridos son considerados únicos, su utilización en la elaboración de alimentos a gran escala es prácticamente imposible dado su escaso contenido en las leches de origen animal (vaca, oveja, cabra, búfala). Por ello existe un gran interés en el desarrollo de procedimientos de síntesis de oligosacáridos derivados de lactosa que presenten propiedades prebióticas.

Carbohidratos prebióticos emergentes

En la actualidad hay un creciente interés en la búsqueda y comercialización de nuevos oligosacáridos prebióticos con propiedades funcionales mejoradas. Algunos de ellos están disponibles comercialmente (Tabla IV) y ya se consideran, en cierta medida, prebióticos a pesar de no haber suficientes evidencias científicas, mientras que otros están todavía en una fase inicial de estudio.

Xilooligosacáridos (XOS)

Los XOS son oligosacáridos formados por cadenas de D-xilosa unidas por enlaces β-(1→4) que se obtienen por hidrólisis de xilano presente en la hemicelulosa. En algunos casos presentan sustituyentes como ácidos urónicos, grupos acetilo y residuos de arabinosa. En este último caso, reciben el nombre de arabinoxilooligosacáridos (AXOS). Los estudios *in vitro*[48-49] e *in vivo* tanto en animales[50] como de intervención en humanos[51-53] han puesto de manifiesto que los XOS tienen efecto bifidogénico. Además, se les atribuyen otras propiedades beneficiosas tales como disminuir los niveles de glucosa, colesterol total y LDL en pacientes con diabetes mellitus tipo 2[54]; actividad antimicrobiana[55] o actividad inmunomoduladora[56].

Lactosacarosa (LS)

La LS es un trisacárido no reductor que se usa como edulcorante artificial. Es resistente a la digestión en el estómago e intestino delgado y, en estudios realizados *in vivo* con animales (pollos, perros y gatos), se ha demostrado que su ingesta aumenta el número de bifi-

Tabla IV
Otros productos prebióticos comerciales y empresas elaboradoras para la industria de alimentos

Prebiótico	*Nombre comercial*	*Empresas Elaboradoras*
Almidón resistente	Hi-Maize resistant starch	National Starch*
α-Glucooligosacáridos	BioEcolians	Solabia
Gentio-oligosacáridos	Gentose 45 (L), 80 (L) y 80 (P)	Nihon Shokuhin Co., (Japón)
Isomaltooligosacáridos	Isomalto: 500 (L), 900 (L) y 900 (P)	Showa Sangyo Co. (Japón)
"	Panorup (L)	Hayashibara Shoji Inc. (Japón)
"	Panorich (L); Biotose 50 (L)	Nihon Shokuhin Co., (Japón)
Lactosacarosa	Nyuka-Origo LS 40, 55 (L) Nyuka-Origo LS 55 (P) Pet Oligo L55 (L y P) Newka-Oligo LS : 35 y 55 (L) Newka-Oligo LS 55 (P)	Ensuiko Sugar Refining Co.,
Oligosacáridos de soja	Soya-oligo (L)	The Calpis Food Industry Co., (Japón)
Xilooligosacáridos	Xylo-oligo 20, 35, 95 (P) Xylo-oligo 70 (L)	Suntory Ltd, Japón

*Tomado de WGO 9. El resto de información tomado de Gibson y col.[10]
L: en jarabe; P: en polvo.

dobacterias (y en algunos casos lactobacilos) y hace descender algunos clostridios incluido el *Clostridium perfringens* y estafilococos[57-58]. En los escasos estudios clínicos publicados[59-60], también se ha observado el efecto bifidogénico.

Aunque se usa en Japón para elaborar alimentos funcionales y los resultados sobre su selectividad pueden ser prometedores, todavía no hay suficiente evidencia científica (hay pocos estudios y con poblaciones muy reducidas) como para ser considerado un prebiótico[61].

Isomaltoooligosacáridos (IMOS)

Los IMOS se obtienen a partir del almidón en un proceso que consta de dos etapas. En una primera, las enzimas α-amilasa y pululanasa generan α-(1→4)-maltooligosacáridos a partir de almidón y, en una segunda, una transglucosidasa transforma estos oligómeros en α-(1→6)-isomaltooligosacáridos, obteniéndose como producto una mezcla heterogénea de α-(1→4) y α-(1→6)-oligosacáridos[5].

Estos oligosacáridos se digieren lentamente, por lo que pueden alcanzar el colon donde son parcialmente fermentados[62]. Mediante la realización de estudios *in vitro*[63-66] e *in vivo*, con animales[67-70], y humanos[71-72] se han puesto de manifiesto sus propiedades bifidogénicas.

Por otra parte, también se les atribuyen otras propiedades tales como disminuir los niveles de colesterol total y triglicéridos en pacientes tratados con hemodiálisis[73] y la estimulación del sistema inmune en ratones[74].

Oligosacáridos de soja

Las semillas de soja son una fuente importante de oligosacáridos como rafinosa y estaquiosa. Estos oligosacáridos se denominan también α-galactósidos, α-galactooligosacáridos u oligosacáridos de la familia de la rafinosa. Estudios *in vitro* han demostrado que las enzimas digestivas humanas no pueden hidrolizar este tipo de oligosacáridos, por carecer de α-galactosidasa, por lo que pueden alcanzar el colon intactos donde son fermentados por las bifidobacterias[75-76]. Los trabajos realizados con humanos indican que estos oligosacáridos presentan actividad prebiótica[77-78] y, en un estudio *in vivo* llevado a cabo con animales, Chen y col.[79] sugirieron que estos oligosacáridos pueden reducir significativamente los niveles de glucosa y lípidos en sangre y el estrés oxidativo.

Glucooligosacáridos

Los glucooligosacáridos son carbohidratos lineales de unidades de glucosa unidas con enlaces α-(1→6) que presentan además ramificaciones en α-(1→2) y α-(1→3). Se pueden obtener a partir de sacarosa en presencia de maltosa por síntesis enzimática (usando dextranosacarasas) o por síntesis biológica mediante el microorganismo *Leuconostoc mesenteroides*. En ensayos con humanos y con animales, se ha puesto de manifiesto que estos enlaces glucosídicos son resistentes a la hidrólisis por las enzimas digestivas[80]. Además, en estudios de fermentación *in vitro*, se ha demostrado que presentan propiedades bifidogénicas, ya que favorecen el crecimiento de bifidobacterias frente al de bacterias perjudiciales[5,81-84].

Candidatos a prebióticos en fase de estudio

Pectooligosacáridos (POS)

Los POS se obtienen por despolimerización parcial de la pectina, heteropolisacárido ramificado de elevada complejidad estructural. Dada su estructura y composición (con distintos tipos de enlaces α y β, y hasta 14 monosacáridos diferentes), a partir de la pectina se pueden obtener distintos tipos de productos, incluyendo oligogalacturónidos (OGalA), GOS, arabinooligosacáridos (AraOS), ramnogalacturonoligosacáridos (RhaGalAOS) y arabinogalactooligosacáridos (AraGalOS). Además, pueden estar esterificados con grupos metilo y/o acetilo e incluso con ácido ferúlico.

Hasta el momento son muy escasos los estudios realizados sobre las propiedades prebióticas de estos oligosacáridos, realizándose, en la mayoría de los trabajos, ensayos *in vitro* utilizando mezclas complejas de oligómeros, por lo que no existen evidencias suficientes sobre todo su potencial. Sin embargo, se ha podido comprobar que los POS tienen propiedades prebióticas y que éstas dependen de sus características físico-químicas[85-86]. Estudios *in vitro,* usando tanto cepas puras representativas de los principales géneros de la microbiota intestinal[87-88] como cultivos con heces[89], permitieron comprobar que los oligómeros neutros (AraOS y GOS) presentan un fuerte efecto bifidogénico (incluso similar a la inulina). Actualmente, no hay publicados resultados de ensayos con animales y, en los pocos estudios de intervención humana que se han realizado, se utilizaron mezclas de POS ácidos, GOS y FOS. Se ha podido comprobar que la adición de POS a fórmulas infantiles potencia el efecto bifidogénico de los dos últimos prebióticos mencionados[90]; produce un aumento del número de bacterias totales y de bifidobacterias, en niños pretérmino[91]; y un incremento de las bifidobacterias y un descenso de patógenos pertenecientes al grupo *Clostridium lituseburense*/*Clostridium histolyticum*[92]. Además de su potencial prebiótico, se ha publicado que algunos tipos de POS tienen propiedades inmunológicas, anti-adherentes e incluso anticancerígenas.

Polidextrosa (PDX)

La PDX es un polímero de glucosa altamente ramificado con un DP medio de 12 y un amplio espectro de

enlaces y se emplea como ingrediente alimentario, considerándose seguro y bien tolerado. Se han realizado estudios *in vitro* e *in vivo* en los que se ha demostrado que la PDX es poco digerible y poco absorbible en el tracto gastrointestinal humano[93-95]. Existe también un número importante de estudios de intervención en humanos, aunque son muy pocos los que evalúan el efecto del consumo de PDX sobre microbiota. En general, parece claro que la adición de mezclas de PDX/GOS a fórmulas infantiles mejora la consistencia de las heces y tiene un efecto bifidogénico similar al de la leche materna[96-98], pero no está suficientemente demostrado que el efecto bifidogénico se deba a la PDX y no a los GOS, ya que, por ejemplo, también se ha observado un pobre crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos en PDX en comparación con el producido por GOS o lactulosa. Será necesario llevar a cabo más estudios orientados a valorar los efectos en la microbiota intestinal. La EFSA[99] rechazó las alegaciones relativas a la mejora de la salud intestinal y al efecto prebiótico/bifidogénico de la PDX por no encontrar lo suficientemente consistentes las relaciones causa-efecto entre el consumo de PDX y los beneficios producidos.

Exopolisacáridos bacterianos (EPS)

Los polímeros de carbohidratos de origen bacteriano, denominados exopolisacáridos por su acumulación en la superficie celular o en el medio de cultivo, son sustratos resistentes a la digestión gástrica y fermentables por la microbiota intestinal, por lo que podrían ser buenos candidatos prebióticos. En el caso de bacterias Gram-positivas, se han descrito dos tipos de polímeros según su composición química y modo de síntesis: homopolisacáridos (HoPS: α- y β-glucanos y β-fructanos) y heteropolisacáridos (HePS). Entre los HoPS, existe una clasificación secundaria en función del tipo y posición del enlace entre monosacáridos. A modo de ejemplo en el contexto de prebióticos, el dextrano es un α-glucano (D-glucosa (1→6) producido por *Leuconostoc mesenteroides*), y entre los β-fructanos están el tipo inulina [D-fructosa (2→1), de *Lactobacillus reuteri*] o tipo levano [D-fructosa (2→6), de *Lactobacillus sanfranciscensis*] que pueden asemejarse en su composición a FOS, aunque de mayor tamaño.

A excepción de algunos HoPS, la aplicación de estos EPS, como ingredientes prebióticos en alimentación, no es viable actualmente debido a la limitación que supone su escasa producción, pero son polímeros con un alto potencial debido a otras propiedades funcionales adicionales, por ejemplo, como moduladores de la respuesta inmune[100].

Polisacáridos de macroalgas

Dentro de los nuevos carbohidratos de interés por su potencial efecto prebiótico *in vitro* e *in vivo* se encuentran los polisacáridos de macroalgas marinas[101-103]. Su estructura química es muy variada. Las algas verdes (*Chlorophyta*) contienen heteropolisacáridos sulfatados denominados ulvanos[104]. Los principales polisacáridos de las algas pardas (*Heterokontophyta, Pheophyceae*) son laminarina, alginatos y fucoidanos/fucanos. Las algas rojas (*Rhodophyta*) poseen galactanos-sulfatados como agar o carragenanos, dependiendo de la especie.

Desde el punto de vista nutricional todos ellos son polisacáridos no digeribles, resistentes a las enzimas digestivas, y forman parte del complejo fibra, pudiendo ser fermentados por la microbiota colónica[103]. El potencial prebiótico de los polisacáridos de algas se ha estudiado *in vivo* en animales de laboratorio alimentados con algas enteras[105-106] o con polisacáridos purificados[102].

Tradicionalmente, las algas y sus polisacáridos se consumen en Oriente como parte de la dieta, mientras que en occidente se usan principalmente como ingredientes alimentarios por su capacidad espesante y gelificante. Para poder hacer alegaciones en salud hacen falta más estudios en humanos.

Análisis y caracterización de carbohidratos prebióticos

En general, cuando se lleva a cabo la síntesis enzimática o la extracción de fuentes naturales de los prebióticos, se obtienen mezclas complejas que pueden presentar carbohidratos con diferentes grados de polimerización e incluso isómeros que dificultan enormemente la caracterización de los mismos.

La estructura de los carbohidratos prebióticos, es decir la composición en monosacáridos, el tipo de enlace glicosídico y el peso molecular, ejerce una gran influencia en las propiedades que estos pueden presentar. En la hoja de ruta que establece la FAO[7] para evaluar y comprobar las propiedades de los prebióticos, para su utilización en alimentos, indica que deben de caracterizarse adecuadamente, además de considerar otros factores tales como la procedencia (origen y fuente de obtención), la pureza y la composición química del prebiótico. Por ello, es necesario disponer de técnicas analíticas adecuadas que permitan aislar, identificar y caracterizar los carbohidratos prebióticos facilitando de esta forma el estudio que permita relacionar la influencia de la estructura en la función de los mismos.

En primer lugar, es importante disponer de metodologías para realizar la preparación de la muestra (purificación, fraccionamiento, etc.) así como optimizarlas. En ocasiones, se emplean diversas técnicas de fraccionamiento, tales como cromatografía de exclusión molecular (SEC) o de intercambio iónico, tratamientos con carbón activo o con microorganismos (p.ej. levaduras) para el fraccionamiento de carbohidratos previo a su análisis[107], facilitando así su caracterización.

Actualmente, para la determinación de azúcares totales en los oligosacáridos, se utilizan métodos enzimáti-

cos o colorimétricos como el del fenol-sulfúrico, antrona-sulfúrico, dinitro-salicílico, etc[108]. Sin embargo, las técnicas cromatográficas (incluidas la cromatografía de gases y de líquidos), electroforéticas, espectrométricas o espectroscópicas son las más empleadas para la caracterización de carbohidratos prebióticos, tanto a nivel cualitativo (determinación de su estructura) como cuantitativo (determinación de su concentración).

La cromatografía de gases (GC) es una técnica con un alto poder de resolución, sensibilidad y selectividad y además, junto con el acoplamiento a espectrómetros de masas, hace que sea una técnica muy versátil para la caracterización de carbohidratos prebióticos[109]. La cromatografía de gases se emplea principalmente para el análisis de carbohidratos de bajo peso molecular (generalmente hasta tetrasacáridos) mediante columnas basadas en metilpolisiloxano[110-111]. Sin embargo, el empleo de columnas con grupos carborano presentes en la estructura principal del polisiloxano, resistentes a temperaturas elevadas, permite extender su aplicación a oligosacáridos con DP de hasta 8. Esta técnica también se emplea para determinar la composición monomérica de oligo- y polisacáridos mediante procesos de hidrólisis, tanto ácida como enzimática, seguidos por la derivatización de los monosacáridos liberados[112]. Es necesario también destacar el uso de la cromatografía de gases para el análisis estructural de carbohidratos prebióticos de alto peso molecular[107].

La cromatografía de líquidos (HPLC) es la técnica más utilizada para el análisis de oligosacáridos prebióticos por su alta versatilidad y múltiples modos de operación. Aunque la derivatización de los carbohidratos no es imprescindible para su análisis por HPLC, puede realizarse tanto antes (pre-columna) como después de la separación (post-columna) para facilitar su detección (inclusión de grupos cromóforos o fluoróforos que permiten la detección mediante ultravioleta o fluorescencia) e incluso la separación (aumento de la retención y la resolución). Se han utilizado muchos modos de operación para el análisis de carbohidratos prebióticos, sin embargo los más comunes son la cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia (HPAEC)[23,113-114], la cromatografía de intercambio iónico-exclusión molecular[115], y la cromatografía de interacción hidrofílica (HILIC)[109,116]. Los detectores más usados para el análisis de oligosacáridos prebióticos son el de índice de refracción (RID), el evaporativo de dispersión de luz (ELSD) y el detector amperométrico de pulsos (PAD), este último empleado para HPAEC. Los acoplamientos de HPLC con espectrometría de masas permiten además determinar el grado de polimerización de los oligosacáridos y en algunos casos obtener información sobre sus enlaces glicosídicos[109].

La espectrometría de masas (MS) se puede emplear mediante su acoplamiento a GC o HPLC o como técnica independiente para la caracterización de prebióticos. La fuente de ionización más común para acoplamientos con GC es el impacto electrónico (EI) que proporciona fragmentos *m/z* apropiados para la identificación de las estructuras, mientras que la ionización por electrospray (ESI) o la ionización química a presión atmosférica (APCI) son los más empleados en acoplamientos con HPLC, dando lugar únicamente a la formación del ion cuasi-molecular. En estos últimos casos, los analizadores de cuadrupolo (Q) únicamente proporcionan información del grado de polimerización de los oligosacáridos. Sin embargo, el empleo de analizadores híbridos o en tándem (QTOF, QqQ, etc.) da lugar a la obtención de datos de MS^2 y facilita la caracterización estructural de disacáridos[117]. Los analizadores de trampa iónica permiten además la obtención de datos de MS^n de oligosacáridos de mayor DP[109]. La disociación inducida por colisión (CID) es el método de fragmentación más común para la caracterización de prebióticos[118-119], aunque otros métodos como la disociación por transferencia de electrones (ETD), la disociación por captura de electrones (ECD) y la disociación por infrarrojo multifotón (IRMPD) pueden también aplicarse. La desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI) con el analizador de tiempo de vuelo (TOF) permite la determinación del grado de polimerización de oligosacáridos de alto peso molecular[120].

La resonancia magnética nuclear (NMR) es otra de las técnicas más empleadas para la caracterización estructural de carbohidratos prebióticos. Existen varios tipos de NMR basadas en relajación de spin nuclear, constantes de acoplamiento escalares o dipolares y simulaciones de dinámica molecular que permiten la caracterización fiable y eficaz de carbohidratos prebióticos[121]. Sin embargo, esta técnica es especialmente útil para la caracterización de carbohidratos puros, aunque ocasionalmente se ha aplicado a mezclas de oligosacáridos[107]. Por tanto, resulta altamente recomendable un proceso previo de fraccionamiento de dichos carbohidratos, que puede ser llevado a cabo mediante procedimientos tales como cromatografía de exclusión molecular, empleo de carbón activo, técnicas de membrana, etc[122] (Hernández y col., 2009).

Evaluación del efecto prebiótico

Se ha desarrollado un gran número de modelos para evaluar la fermentación (o biodegradabilidad) intestinal de los prebióticos previamente caracterizados (origen, fuente, pureza composición química y estructura). En la figura 3 se reflejan las diferentes fases a seguir para evaluar y validar el carácter prebiótico de un compuesto. En primer lugar, se realizan estudios *in vitro,* para el escrutinio y selección de sustratos con potencial prebiótico, que posteriormente serán validados en modelos animales. Para finalizar, el sustrato seleccionado con los modelos anteriores, sería candidato para llevar a cabo los estudios de intervención en humanos que permitan evaluar su eficacia en el sitio de acción y demostrar científicamente su capacidad prebiótica. La FAO[7] en su hoja de ruta para la evaluación de las propiedades de prebióticos también indica que debe de

realizarse una caracterización funcional del prebiótico mediante la utilización de diferentes modelos.

Resistencia de los prebióticos a la digestión gastro-intestinal

Se han desarrollado una serie de modelos para estudiar la resistencia de los candidatos a prebióticos a la digestión y absorción, al menos parcial, en el tracto gastrointestinal superior[123]. Los modelos *in vitro* siguen un diagrama común que consiste en simular las condiciones de acidez (pH < 2,0) y alto contenido en enzimas gástricas (incluyendo la saliva) y pancreáticas, empleando condiciones de temperatura (37 ºC), motilidad y tiempo de tránsito que mimeticen las condiciones fisiológicas humanas. En los estudios *in vivo* los candidatos a prebióticos son administrados por vía oral a animales (generalmente roedores) libres de microorganismos, o a animales que han sido previamente tratados con un antibiótico para suprimir la microbiota intestinal. Se usan marcadores indigeribles para valorar, por un lado, la digestibilidad ileal de los oligosacáridos (para cuantificar lo que llega sin digerir al comienzo del intestino grueso) y, por otro lado, para evaluar su fermentabilidad (en el intestino grueso) al cuantificar la presencia/ausencia de los oligosacáridos en las muestras fecales.

Fermentación de prebióticos en el colon

El estudio de la capacidad de prebióticos para modular la composición de la microbiota intestinal y/o la producción de compuestos que pudieran ser beneficiosos para la salud, como los SCFA, requiere el estudio de muestras de origen fecal y de tejidos o contenidos intestinales así como el manejo de una serie de técnicas analíticas que van desde las clásicas más simples a las nuevas "ómicas".

Tradicionalmente se han empleado técnicas microbiológicas dependientes de cultivo (medios selectivos y/o diferenciales) para el recuento de bacterias cultivables de la microbiota como *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y más recienttemente *Bacteroides* y *Clostridium*. Desde hace más de una década el empleo de técnicas moleculares, generalmente basadas en la secuencia del gen que codifica el 16S rRNA, ha permitido ampliar el conocimiento relativo a la composición de la microbiota intestinal cultivable y no cultivable[124]. Los métodos más utilizados para cuantificar (enumerar) distintos grupos y especies bacterianas son la PCR cuantitativa (qPCR) y FISH (hibridación fluorescente *in situ*), lo que requiere marcadores genéticos específicos (primers y sondas fluorescentes, respectivamente). En el caso de FISH, el recuento celular se puede realizar por microscopía de fluorescencia o mediante citometría de flujo.

El análisis funcional del metaboloma proporciona información relevante sobre la formación de metabolitos derivados de la actividad de la microbiota intestinal. Este análisis puede ser específico (centrado en un grupo de compuestos) o no selectivo, pudiéndose determinar y cuantificar un número elevado de compuestos de diversa naturaleza (SCFA, ácidos orgánicos, carbohidratos, péptidos, aminoácidos, vitaminas, etc.)[125]. Por otro lado, si hay disponibles sustratos prebióticos marcados (por ejemplo con ^{13}C) se pueden emplear en cultivos inoculados con homogenei-

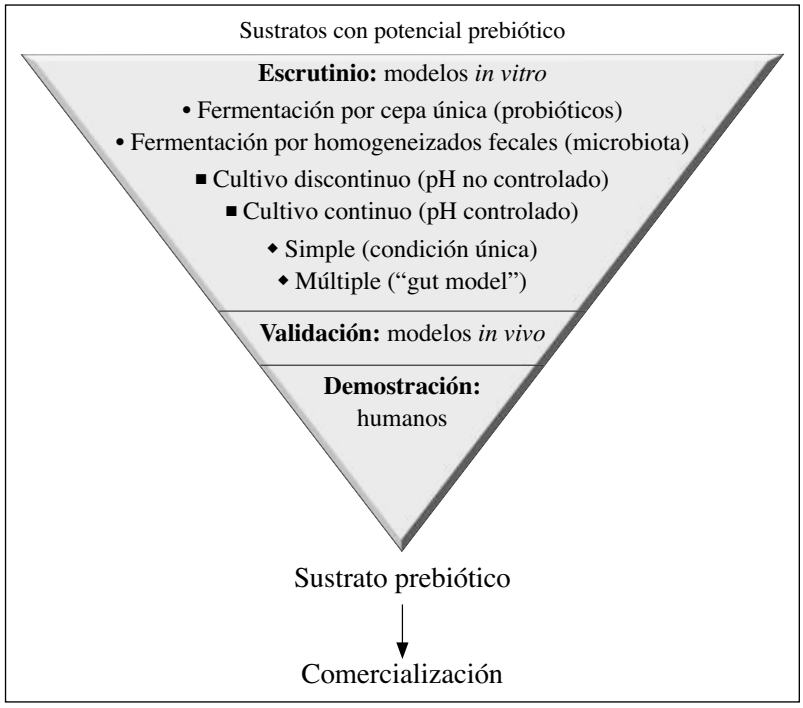

Fig. 3.—Hoja de ruta para la evaluación del potencial prebiótico de nuevos sustratos.

zados fecales para determinar las especies bacterianas que los están utilizando y cuantificar la generación de SCFA marcados. Además, este sistema se puede emplear en animales de experimentación y, dado que parte de los SCFA se absorben en el intestino y pasan a sangre, se podrían cuantificar los niveles de marcaje radioactivo circulantes.

Modelos de fermentación *in vitro*

Para estudiar la biodegradación de compuestos con potencial prebiótico es muy útil el empleo de sistemas de fermentación *in vitro* que pueden alcanzar diversos grados de complejidad. El modelo más simple, y ampliamente utilizado en el contexto de los primeros estudios con prebióticos, consiste en evaluar el comportamiento, como inóculo, de cultivos simples definidos (de cepa única) generalmente pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* en presencia del sustrato. Actualmente, se tiende a analizar la evolución de la microbiota intestinal en su conjunto empleando, principalmente, homogenizados de origen fecal de individuos donantes sanos que han dado su consentimiento informado para suministrar la muestra. Estos homogenizados fecales se utilizan para inocular un medio de cultivo basal que, después de un proceso de estabilización en condiciones anaeróbicas a 37 ºC, es suplementado con el prebiótico a estudiar para seguir, en tiempos definidos, la dinámica (diversidad y/o número) de las poblaciones microbianas así como su actividad metabólica (perfil de SCFA) por las técnicas descritas anteriormente. La tecnología empleada para llevar a cabo las fermentaciones *in vitro* implica la utilización de biorreactores, generalmente vasijas de volumen pequeño (< 250 mL), para realizar cultivos en discontinuo (*batch*) a pH no controlado, o para cultivos en continuo a pH controlado que pueden ser simples (para estudiar una condición única) o múltiples. Entre los sistemas múltiples, es frecuente la utilización de modelos de fermentación continuos o dinámicos (*gut model*) que constan de diversas vasijas para simular las condiciones de las distintas partes del colon en función de los valores de pH: colon ascendente (o proximal) pH ~5,6-5,9, colon transverso pH ~6,1-6,4 y colon descendente (o distal) pH ~6,6-6,9. Algunas versiones más complejas incluyen otros biorreactores que simulan las condiciones del estómago (pH < 2 y presencia de oxígeno) y las del intestino delgado (adición de jugo intestinal y subida progresiva del pH) previas a las condiciones del colon[126-128]. Finalmente, los nuevos modelos que se están desarrollando intentan incluir componentes del hospedador, como mucus o mucinas así como líneas celulares de colon (Caco2, HT29, etc.), para estudiar la posible interacción prebiótico, microbiota y hospedador[129-131]. Sin embargo, este último desarrollo metodológico para simular las condiciones *in vivo* es complejo y, por el momento, el siguiente paso sería el uso de modelos animales una vez seleccionado *in vitro* un candidato con potencial prebiótico.

Modelos de fermentación *in vivo* (animales)

Los ensayos *in vivo* con animales de experimentación son útiles para confirmar el efecto de los prebióticos sobre la dinámica y actividad de la microbiota intestinal y también para estudiar posibles mecanismos de acción[123]. Con estos objetivos, el modelo animal más empleado es el de roedor (ratón y rata), aunque también hay estudios con animales domésticos y de granja para validar potenciales prebióticos para su utilización en alimentación animal. En un estudio típico con roedores estándar "sanos", el candidato prebiótico se suministra por vía oral, en agua o en comida, o por sonda gástrica y durante el período de intervención se pueden recoger muestras de heces para analizar la dinámica de la microbiota intestinal. Tras sacrificar los animales al final del ensayo, se procede al análisis completo del contenido intestinal, contenido cecal y tejidos, pudiendo emplear estudios histológicos complementarios, además de las técnicas descritas anteriormente. Estos estudios también permiten descartar posibles efectos adversos debidos al consumo del prebiótico, por ejemplo, visualizando al microscopio el estado del tejido intestinal del grupo de animales alimentados con el prebiótico respecto al control.

Por otro lado, se han empleado animales libres de microorganismos (*germ-free animals*) que se colonizan con microbiota humana (*gnotobiotic* animals), permitiendo de este modo estudiar *in vivo* el efecto de potenciales prebióticos, considerando, además, las consecuentes diferencias debidas al organismo animal. Finalmente, para demostrar los efectos relacionados con la ingesta de determinados prebióticos, sobre ciertas disfunciones fisiológicas o enfermedades, se emplean modelos animales específicos modificados genéticamente o inducidos para simular, por ejemplo, cáncer de colón, enfermedades inflamatorias intestinales, síndrome metabólico, diabetes, u osteoporosis, entre otros[132].

Estudios de intervención en humanos

Para finalizar con la hoja de ruta que permite demostrar científicamente la eficacia de los prebióticos, sería necesario llevar a cabo estudios estándar de evaluación clínica de fase 2 (demostración de eficacia) en humanos. En primer lugar, hay que definir el resultado principal (y secundarios, si hubiera) que se espera conseguir con el estudio de intervención con el prebiótico. También hay que definir el tamaño de muestra (población) necesario para demostrar con significación estadística el resultado(s) que se espera obtener y hay que proponer los parámetros fisiológicos a medir para demostrar el efecto. El diseño experimental del estudio

de intervención debe ser doble-ciego, aleatorizado y controlado con placebo[7].

A modo de ejemplo, en el caso de que el estudio de intervención estuviera diseñado para evaluar la eficacia de un prebiótico sobre la función gastrointestinal, se pueden realizar estudios mecanísticos, que miden respuestas específicas a estímulos de prueba. Actualmente, existe la metodología para evaluar distintos tipos de respuestas digestivas: intraluminales (volumen de gas o heces, productos metabólicos, composición - actividad metabólica de la microbiota), sensitivas (cognitiva - hedonista), motoras (motilidad - tránsito) y de la función de membrana (secreción - absorción)[133-134].

Efectos beneficiosos de los prebióticos

Algunos estudios sugieren que los prebióticos podrían ejercer efectos fisiológicos beneficiosos para la salud y el bienestar del organismo, en relación con su capacidad para modular la microbiota intestinal. Estos efectos pueden ser ejercidos no sólo en el colon, sino también en todo el organismo contribuyendo, de esta forma, a reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades intestinales o sistémicas.

Entre los efectos producidos en el colon, cabe mencionar, que los prebióticos estimulan el crecimiento de bacterias fermentativas (bifidobacterias y lactobacilos) con efectos beneficiosos; generan SCFA que producen un descenso de pH, controlando el desarrollo de ciertas comunidades que pueden generar efectos perjudiciales (p. ej. algunas especies de *Bacteroides, Fusobacterium y Clostridium spp*.[135-136]). Las bifidobacterias no producen butirato pero estimulan el crecimiento de bacterias productoras de este SCFA en el colon, como son las eubacterias[137]. Además, los prebióticos actúan sobre determinadas funciones intestinales reduciendo el tiempo de tránsito intestinal, al producir un aumento del volumen del bolo fecal y del número de deposiciones. Esto es debido a que los SCFA se absorben eficazmente y son utilizados por las células epiteliales del colon estimulando la secreción de agua y de sales.

Además, existen datos que apoyan el hecho de que la ingesta de prebióticos podría reducir el riesgo de padecer ciertas enfermedades intestinales tales como el síndrome de intestino irritable (Irritable bowel syndrome IBS) y de enfermedades inflamatorias intestinales (Inflammatory bowel disease IBD) como la colitis ulcerosa, la enfermedad de Crohn y la pouchitis. El síndrome de intestino irritable es un desorden funcional del colon que se manifiesta por dolor abdominal, malestar, distensión, sensación de hinchazón, flatulencia y cambios variables en la frecuencia y en la forma de las deposiciones. Estudios recientes han descrito diferencias en la composición de la microbiota intestinal entre pacientes con síntomas digestivos funcionales y sujetos sanos, pero los resultados no son totalmente concordantes. Se ha observado, en estos pacientes, una reducción de la microbiota beneficiosa (lactobacilos y bifidobacterias) combinada con un incremento del número de enterobacterias, coliformes, bacteroides, y diferentes especies de firmicutes[138]. Por otra parte, no está muy claro que los prebióticos sean adecuados para el tratamiento o la mejoría de la sintomatología en esta enfermedad ya que, además de los SCFA originados por la microbiota durante la fermentación de los mismos, también se producen gases (dióxido de carbono, metano e hidrógeno), que pueden exacerbarla[137]. Por tanto, son necesarios más estudios para determinar el papel de los prebióticos en la fisiopatología y mejoría de los síntomas en la IBS.

Por otro lado, en la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa existe una inflamación de la pared intestinal que se manifiesta por síntomas tales como diarrea (frecuentemente con sangre y moco en las heces), dolor abdominal, fiebre, pérdida de peso y formación de fístulas. Y si bien, factores genéticos y ambientales parecen estar implicados, en el desarrollo de estas dos enfermedades inflamatorias, el papel de la microbiota intestinal en su génesis aún está por dilucidar. Así, algunos estudios han descrito niveles reducidos de bifidobacterias y un incremento de microorganismos con efectos potencialmente perjudiciales así como alteraciones de la respuesta inmune en estos pacientes. Además, en animales de experimentación se ha observado que la ingesta de prebióticos (inulina, GOS, FOS) produce un descenso en los niveles de marcadores inflamatorios, traduciéndose este hecho, en una mejora de la inflamación de la mucosa intestinal. En algunos ensayos en humanos se ha observado que la ingesta de inulina, FOS o la combinación de ambos se asocia con mejoría tanto en la exploración endoscópica como en la histología de las lesiones[12,137].

Los prebióticos podrían también tener un efecto protector frente a infecciones intestinales. Se han descrito varios mecanismos, uno de ellos se basa en la liberación, por parte de muchas especies de lactobacilos y bifidobacterias, de agentes antimicrobianos (SCFA y péptidos) de amplio espectro de acción. También se han utilizado prebióticos conjuntamente con probióticos, en estudios *in vitro*, obteniendo muy buenos resultados de inhibición de microorganismos patógenos. Otro mecanismo de acción se puede atribuir a las propiedades antiadherentes que presentan los prebióticos bloqueando los lugares donde se adhieren los microorganismos patógenos o sus toxinas en las células epiteliales, actuando por lo tanto, como análogos de los receptores[2]. Por ejemplo, los GOS contienen estructuras similares a las encontradas en las microvellosidades que intervienen en la unión con la adhesina bacteriana; así las bacterias se unen a los GOS evitando que se adhieran al epitelio colónico[40]. Los prebióticos podrían ejercer un efecto protector frente a la diarrea del viajero o la diarrea post tratamiento antibiótico. En el primer caso, se ha observado, en un grupo de personas que viajaban a destinos con alto o medio riesgo, que la ingestión de prebióticos dos semanas antes del viaje,

disminuye la duración de la diarrea así como la severidad de la sintomatología frente a un grupo al que se le administró placebo[11]. Los antibióticos pueden producir un desequilibrio en la microbiota intestinal (disbiosis intestinal). Diferentes estudios muestran que las dietas con prebióticos favorecen el crecimiento de las bacterias intestinales con efectos potencialmente beneficiosos[12].

También se ha especulado sobre la influencia que ejercen los carbohidratos prebióticos en la carcinogénesis. Diferentes estudios han puesto en evidencia la disminución del riesgo de padecer cáncer de colon, sin embargo son necesarios más ensayos para confirmar estos datos. La secuencia de las fases involucradas en el desarrollo de este tipo de cáncer es muy compleja y en su génesis están involucrados factores genéticos y ambientales. De los factores ambientales, la dieta parece jugar un papel fundamental, así varios estudios relacionan el consumo de dietas ricas en carne procesada o ingestas elevadas de alcohol con un incremento del riesgo, mientras que dietas ricas en fibra y leche lo reducen[12].

Por otra parte, se ha descrito que la microbiota puede interaccionar en la secuencia del desarrollo de un tumor, ya que puede producir, por sí misma, compuestos carcinogénicos y/o enzimas capaces de liberar sustancias carcinógénicas. Así, las β-glucuronidasas utilizan conjugados del ácido glucurónico; las azo- y nitrorreductasas reducen sustratos nitrogenados a aminas, que son generalmente más tóxicos que los productos de origen, y la nitrato reductasa genera el anión nitrito. También la producción de metabolitos en heces, tales como el amoníaco originado a partir de proteínas y de la urea, se relaciona con la formación de tumores. Otros como fenoles y cresoles son también potenciales promotores de enfermedades del colon. Las bifidobacterias y los lactobacilos no producen cantidades significativas de dichas enzimas[139].

A la vista de las investigaciones, la posible protección que ejercen los prebióticos frente al cáncer de colon puede deberse a la producción de metabolitos como los SCFA, especialmente butirato, en la fermentación por de la microbiota intestinal. El butirato está implicado en los mecanismos que controlan la apoptosis, la división y la proliferación celular. El propionato es otro metabolito originado en la fermentación de los carbohidratos prebióticos y se ha descrito que tiene propiedades anti-inflamatorias que pueden jugar un papel en la génesis del cáncer de colon[11,40,140].

También se ha estudiado ampliamente la capacidad inmunomoduladora de los prebióticos. Sin embargo no se ha establecido el mecanismo por el cual tiene lugar este efecto, ya que los marcadores a utilizar deben seleccionarse con mucho cuidado debido a su variación y a que dependen, en gran medida, de las condiciones del estudio. La respuesta inmune involucra a un número variable de células con diferente funcionalidad que dan lugar a, por ejemplo, eliminar al patógeno implicado en una infección. Por ello en esta respuesta no hay un único marcador inmunológico que refleje o permita predecir una resistencia individual a la infección. Existen varias hipótesis y una de ellas propone que las bacterias ácido lácticas, o bien la pared celular o los componentes citoplasmáticos de las mismas penetran en las células epiteliales intestinales activando el tejido linfático asociado al mismo[141]. Otras hipótesis están relacionadas con la propiedad que tienen los prebióticos de favorecer el crecimiento de determinados géneros o especies de microorganismos con efectos potencialmente beneficiosos frente a la disminución de otros, ya que este hecho podría cambiar el perfil colectivo inmuno-interactivo de la microbiota. Varios estudios que han utilizado animales libres de gérmenes y gnotobióticos han puesto de manifiesto que la microbiota es esencial para un óptimo desarrollo estructural y funcional del sistema inmune[6]. También, los SCFA originados a partir de la fermentación de los prebióticos pueden interactuar con las células relacionadas con la respuesta inmune. Se ha comprobado que el ácido butírico puede suprimir la proliferación de linfocitos e inhibir la producción de citoquinas[34]. Otra hipótesis indica que la modulación de la respuesta inmune, por parte de los prebióticos, podría ser debida a que éstos se unen a unos posibles receptores en las células relacionadas, sin embargo no hay evidencia suficiente de la presencia de estos receptores.

Por otra parte, en países desarrollados se ha observado un aumento de la prevalencia de las enfermedades alérgicas, en probable relación con un incremento de la protección de los niños frente a microorganismos (hipótesis de higiene excesiva) dando lugar a cambios en su microbiota, así como al aumento del uso y abuso de antibióticos. Diferentes estudios han puesto de manifiesto la relación existente entre microbiota colónica y desarrollo de alergias, especialmente en el eczema y la alergia a alimentos[142]. Se ha comprobado que niños alérgicos presentan una microbiota con menores niveles de lactobacilos y bifidobacterias. Por ello la ingesta de prebióticos podría disminuir el desarrollo de estas patologías favoreciendo el crecimiento de estos microorganismos. Recientemente se ha estudiado el efecto de una mezcla de prebióticos (Vivinal-GOS: inulina; 90:10) en la incidencia de la dermatitis atópica en lactantes demostrándose una reducción de la incidencia y un aumento significativo de bifidobacterias en la microbiota fecal, no observándose ningún cambio significativo en el número de lactobacilos[34].

Los prebióticos también favorecen la absorción de minerales tales como el calcio, magnesio, zinc y el hierro debido a la capacidad de unirse a ellos impidiendo, de este modo, su absorción en el intestino delgado alcanzando el colon donde son liberados y posteriormente absorbidos[141]. La deficiencia de calcio está asociada a una deficiente mineralización ósea y la de hierro a anemia microcítica e hipocrómica. Asimismo, el zinc es necesario para el desarrollo y maduración del esqueleto. Una mejor absorción del calcio está asociada a que la fermentación de los prebióticos, por parte

de la microbiota intestinal, produce SCFA y baja el pH luminal aumentando la biodisponibilidad y la absorción pasiva del calcio a través de los colonocitos[12]. También se ha comprobado que la biodisponibilidad del calcio mejora cuando se libera por hidrólisis del complejo "fitato de calcio" por la acción de las fitasas bacterianas presentes en la microbiota beneficiosa y cuando el calcio se vuelve más soluble gracias al aumento de agua en el colon, producido por el efecto osmótico que tienen los prebióticos[136]. El aumento de la absorción del calcio repercute favorablemente en la salud del hueso fortaleciendo la masa ósea y retardando la osteoporosis siendo este hecho de especial interés en períodos de crecimiento, donde se alcanza el pico de masa ósea, en mujeres postmenopáusicas y en personas mayores.

El hierro se encuentra unido al ácido fítico y existe una relación inversa entre cantidad de este ácido en la dieta y su absorción. Se necesitan muy pequeñas cantidades de este ácido (0,7%) en la dieta para reducir a la mitad la absorción de este mineral. Los prebióticos estimulan la absorción de hierro en el colon, por el aumento de la fracción soluble en las células. En el caso del zinc, también está unido al ácido fítico que inhibe su absorción. En estudios en humanos se ha comprobado que los fitatos están altamente relacionados con una disminución de la absorción de zinc en jóvenes sanos y personas mayores. Los prebióticos estimulan la biodisponibilidad del zinc. Por ello su administración en la dieta restablece la absorción de este mineral[137].

Además, se atribuyen a los prebióticos, otra serie de propiedades relacionadas con determinadas enfermedades sistémicas. Los carbohidratos prebióticos (GOS, FOS, inulina) reducen la presión arterial, así como los niveles de glucosa, colesterol, triglicéridos y fosfolípidos en sangre; además de la síntesis de triglicéridos y ácidos grasos en el hígado minimizando el riesgo de desarrollar diabetes, obesidad y ateroesclerosis[40,141]. Por otra parte, los cambios producidos en el metabolismo lipídico pueden ser una consecuencia de la producción de SCFA, que pueden inducir cambios metabólicos en el hígado.

Los prebióticos y concretamente la lactulosa, también se utilizan en el tratamiento de la encefalopatía portal sistémica, enfermedad que afecta al sistema nervioso central, por la elevación del contenido de amoníaco en sangre. Está provocada por el amoníaco y otras neurotoxinas generadas por ciertas bacterias gastrointestinales y puede deberse a una ingesta alta de proteínas en la dieta. Los prebióticos restablecen la microbiota beneficiosa e inhiben el crecimiento de bacterias productoras de amoníaco. En el caso de pacientes con cirrosis se han utilizado XOS[143] y lactulosa[144] para controlar los niveles de amoníaco y fenoles libres en sangre.

A pesar de los numerosos efectos beneficiosos que pueden ejercer los oligosacáridos prebióticos, hay que considerar la importancia que tiene el establecimiento de la ingesta adecuada para evitar efectos adversos ya que, si ésta es excesiva, podría provocar molestias intestinales, diarrea y flatulencia. Se ha demostrado que una ingesta por encima de 20 g/día de GOS podría provocar diarrea[3]. Para establecer la ingesta adecuada, hay que tener en cuenta el tipo de oligosacárido, aunque en la mayoría de los casos una ingesta de 15 g/día puede incrementar la población de bifidobacterias[145]. Por otra parte, también habría que tener en cuenta la microbiota de cada individuo, Roberfroid[146] estableció que una ingesta diaria de prebióticos no es tan determinante en el efecto bifidogénico, sino que está directamente relacionada con el número de bifidobacterias/g presentes en el organismo antes de empezar la suplementación con el prebiótico en la dieta. Hay estudios que han demostrado que una ingesta de 10 g/día de GOS, en individuos sanos de edad media, sería suficiente para ejercer el efecto bifidogénico. Sin embargo, si el número de bifidobacterias de partida es bajo, como podría ser el caso de personas mayores, la ingesta de 2,5 g/día sería suficiente para producir un aumento en la población de las bifidobacterias.

Perspectivas futuras de investigación

En este artículo se pone de manifiesto que la investigación existente sobre prebióticos, hasta el momento, es extensa y variada. De hecho se ha mostrado que ha de tenerse en cuenta un gran número de factores para asignar y demostrar las alegaciones de salud que se formulan en cada uno de los estudios realizados y para cada carbohidrato considerado. Sin embargo, a nuestro entender, todavía queda un importante trabajo multidisciplinar que realizar, orientado a profundizar en los aspectos siguientes:

i) Mejora de los métodos de análisis y de detección para caracterizar correctamente los carbohidratos prebióticos facilitando, de esta forma, la asignación de propiedades bioactivas y posible diseño de prebióticos de segunda generación con beneficios concretos de salud;

ii) Definición de biomarcadores para seleccionar los grupos microbianos, beneficiosos para la salud, en función de la fermentación del prebiótico;

iii) Ensayos de intervención en humanos bien diseñados, robustos y de buena calidad que permitan valorar el efecto del consumo de los prebióticos en la selectividad, incluyendo para ello un mayor número de grupos bacterianos. Los estudios mecanísticos utilizando biomarcadores objetivos podrían ser de gran utilidad;

iv) Establecimiento de la ingesta diaria del prebiótico para desarrollar la actividad o las actividades atribuidas al mismo, así como la monitorización de los posibles efectos adversos o secundarios a largo plazo del prebiótico ingerido;

v) Estudio de nuevas aplicaciones de los prebióticos en la prevención y tratamiento de enfermedades como la obesidad, la diabetes mellitus tipo 2, las alteraciones inmunitarias (alergias, etc.), entre otras.

Referencias

1. Mohammadi R, Mortazavian AM. Tehcnological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks *Food Rev Int* 2011; 27: 192-212.
2. Lamsal BP. Production, health aspects and potential food uses of dairy prebiotic galactooligosaccharides. *J Sci Food Agric* 2012; 92: 2020-2028.
3. Sako T, Matsumoto K, Tanaka R. Recent progress on research and applications of non-digestible galacto-oligosaccharides. *Int Dairy J* 1999; 9: 69-80.
4. Gibson GR., Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr* 1995; 125:1401-1412.
5. Gibson GR, Probert HM, Loo JV, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutr Res Rev* 2004; 17: 259-275.
6. Roberfroid M, Gibson GR, Hoyles L, McCartney AL, Rastall RA, Rowland I, Wolvers D, Watzl B, Szajewska H, Stahl B, Guarner F, Respondek F, Whelan K, Coxam V, Davicco MJ, Leotoing L, Wittrant Y, Delzenne NM, Cani PD, Neyrinck AM, Meheust A. Prebiotics effects: metabolic and health benefits. *Brit J Nutr* 2010; 104: S1-S63.
7. FAO Technical Meeting on prebiotics. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Food Quality and Standards Service (AGNS). September 15-16, 2007.
8. ISAPP (2008) 6th Meeting of the International Scientific Association of Probiotics and Prebiotics, London, Ontario.
9. World Gastroenterology Organisation (WGO) (2011). En: Guía Práctica de la Organización Mundial de Gastroenterología: Probióticos y prebióticos (http://www.worldgastroenterology.org). 2011.
10. Gibson GR, Ottaway PB, Rastall RA. Prebiotics. New developments in functional foods. ISBN 1-902423-43-7, Chadwick House Group Limited 2000, 1-108.
11. Gibson GR, Scott KP, Rastall RA, Tuohy KM, Hotchkiss A, Dubert-Ferrandon A, Gareau M, Murphy EF, Saulnier D, Loh G, Macfarlane S, Delzenne N, Ringel Y, Kozianowski G, Dickman R, Lenoir-Wijnkoop I, Wlaker C, Buddington R. Dietary prebiotics: current status and new definition. *Food Sci Technol Bull* 2010; 7: 1-19.
12. Rastall RA. Functional oligosaccharides: application and manufacture. *Annu Rev Food Sci Technol* 2010; 1: 305-339.
13. Van de Wiele T, Boon N, Possemiers S, Jacobs H, Verstraete W. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. *J Appl Microbiol* 2006; 102: 452-460.
14. Macfarlane GT, Steed H, Macfarlane S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. *J Appl Microbiol* 2008; 104: 305-344.
15. Rodríguez-Colinas B. Obtención enzimática, caracterización y propiedades prebióticas de oligosacáridos empleados en leches infantiles. Tesis Doctoral Noviembre 2013.
16. Birkett AM, Francis CC. Short-Chain Fructo-Oligosaccharide. A Low Molecular Weight Fructan. En: Handbook of prebiotics and probiotics ingredients. Health benefits and food applications (eds S.S. Cho & E.T. Finocchiaro) CRC Press Taylor & Francis Group Boca Raton New York , 2010 Capítulo 2, pp 13-42. ISBN-10: 1-4200-6213-1; ISBN-13: 978-1-4200-6213-7.
17. Villamiel M, Montilla A, Olano A, Corzo N "Production and bioactivity of oligosaccharides derived from lactose". En: Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity. ISBN: 978-1-118-42649-4. Eds F. Javier Moreno y M. Luz Sanz. Wiley-Blackwell, Chichester, United Kingdom. pp.137-167 (2014).
18. Petuely F. Lactobacillus bifidus flora produced in artificially-fed infants by bifidogenic substances (bifidus factor). *Z Kinderheilkd* 1957*;* 79: 174-179.
19. Adachi S, Patton S. Presence and significance of lactulose in milk products: A review. *J Dairy Sci* 1961*;* 44: 1375-1393.
20. Olano A, Corzo N. Lactulose as a food ingredient. *J Sci Food Agric* 2009; 89: 1987-1990.
21. Schuster-Wolff-Bühring R, Fischer L, Hinrichs J. (2010) Production and physiological action of the disaccharide lactulose. *Int Dairy J* 2010; 20: 731-741.
22. Panesar PS, Kumari S. Lactulose: Production, purification and potential applications. *Biotechnol Adv* 2011; 29: 940-948.
23. Cardelle-Cobas A, Martínez-Villaluenga C, Villamiel M, Olano A, Corzo N. Synthesis of oligosaccharides derived from lactulose and Pectinex Ultra SP-L. *J Agric Food Chem* 2008; 56*:* 3328-3333.
24. Martínez-Villaluenga C, Cardelle-Cobas A, Olano A, Corzo N, Villamiel M, Jimeno, ML. Enzymatic synthesis and identification of two trisaccharides produced from lactulose by transgalactosylation. *J Agric Food Chem* 2008; 56: 557-563.
25. Cardelle-Cobas A, Fernández M, Salazar N, Martínez-Villaluenga C, Villamiel M, Ruas-Madiedo P, de los Reyes-Gavilán C. Bifidogenic effect and stimulation of short chain fatty acid production in human faecal slurry cultures by oligosaccharides derived from lactose and lactulose. *J Dairy Res* 2009; 76: 317-325.
26. Cardelle-Cobas A, Corzo N, Olano A, Peláez, C, Requena T, Ávila M. (2011b) Galactooligosaccharides derived from lactose and lactulose: influence of structure on *Lactobacillus*, *Streptococcus*, and *Bifidobacterium* growth. *Int J Food Microbiol* 2011; 149: 81-87.
27. Cardelle-Cobas A, Olano A, Corzo N, Villamiel M, Collins M, Kolida S, Rastall, RA (2012) In vitro fermentation of lactulose-derived oligosaccharides by mixed fecal microbiota. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 2024-2032.
28. Marín-Manzano MC, Abecia L, Hernández-Hernández O, Sanz ML, Montilla A, Olano A, Rubio LA, Moreno FJ, Clemente A. Galacto-oligosaccharides derived from lactulose exert a selective stimulation on the growth of *Bifidobacterium animalis* in the large intestine of growing rats. *J Agric Food Chem* 2013; 61: 7560-7567.
29. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2010. Scientific opinion on the substantiation of health claims related to lactulose and decreasing potentially pathogenic gastro-intestinal microorganisms (ID 806) and reduction in intestinal transit time (ID 807) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 8, 1806-1821.
30. Playne MJ, Crittenden RG (2009) Galacto-oligosaccharides and Other Products Derived from Lactose. In: *Advanced Dairy Chemistry, Volume 3, Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*. (eds, P.L.H. McSweeney & P.F. Fox), pp. 121-201. Espringer, New York.
31. Miller JN, Whistler RL. 2000. Carbohydrates. In O. Fennema (ED). Food Chemistry (pp207) New York: Marcel Dekker.
32. Boon MA, Janssen AEM, Van't Riet K. Effect of temperature and enzyme origin on the enzymatic synthesis of oligosaccharides. *Enzyme Microb Technol* 2000; 26: 271-281.
33. Splechtna B, Nguyen TH, Steinböck M, Kulbe KD, Lorenz W, Haltrich D. Production of prebiotic galacto-oligosaccharides from lactose using β-galactosidases from *Lactobacillus reuteri*. *J Agric Food Chem* 2006; 54: 4999-5006.
34. Tzortzis G, Vulevic J. Galactooligosaccharide prebiotics, In: *Prebiotics and Probiotics: Science and Technology* (eds D. Charalampopoulos & R.A. Rastall), Springer Science, New York, 2009, pp. 207-244.
35. Gaur R, Pant H, Jain R, Khare SK. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized Aspergillus oryzae beta-galactosidase. *Food Chem* 2006; 97:426-430.
36. Sears P, Wong CH. Toward automated synthesis of oligosaccharides and glycoproteins, *Science* 2001; 291: 2344-2350.
37. Padilla B, Ruiz-Matute A.I, Belloch C, Cardelle-Cobas A, Corzo N, Manzanares, P. Evaluation of oligosaccharide synthesis from lactose and lactulose using β-galactosidases from *Kluyveromyces* aisolated from artisanal cheeses. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 5134-5141.
38. Rodríguez-Colinas B, Poveda A, Jiménez-Barbero J, Ballesteros AO, Plou FJ (2012) Galacto-oligosaccharide synthesis from lactose solution or skim milk using the β-galactosidase from *Bacillus circulans*. *J Agric Food Chem* 2012; 60: 6391-6398.

39. Torres D, Gonçalves M, Teixeira J, Rodrigues L. (2010) Galacto-oligosaccharides: production, properties, applications, and significance as prebiotics. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2010; 9: 438-454.
40. Sangwan V, Tomar SK, Singh RRB, Singh AK, Ali, B. (2011) Galactooligosaccharides: novel components of designer foods. *J Food Sci* 2011; 76: R103-R111.
41. Ito M, Deguchi Y, Miyamori A, Matsumoto K, Kikuchi H, Matsumoto K, Kobayashi Y, Yajima T, Kan T. Effects of administration of galactooligosaccharides on the human faecal microflora, stool weight and abdominal sensation. *Microb Ecol Health Dis* 1990; 3: 285-292.
42. Otieno DO. Synthesis of β-galactooligosaccharides from lactose using microbial β-galactosidases. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 2010; 9: 471-482.
43. Bode L. Recent advances on structure, metabolism, and function of human milk oligosaccharides *J Nutr* 2006; 136 (8):2127-30.
44. Venema K. Intestinal fermentation of lactose and prebiotic lactose derivatives, including human milk oligosaccharides. *Int Dairy J* 2012; 22: 123-140.
45. Barile D, Rastall RA. Human milk and related oligosaccharides as prebiotics. *Curr Opin Biotechno* 2013; 24: 214-219.
46. Kunz C, Kuntz S, Rudloff S. "Bioactivity of human milk oligosaccharides". En: Food Oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity. ISBN: 978-1-118-42649-4. Eds F. Javier Moreno y M. Luz Sanz. Wiley-Blackwell, Chichester, United Kingdom. pp. 5-20, 2014.
47. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Jiang X, Newburg DS. Human-milk glycans that inhibit pathogen binding protect breast-feeding infants against infectious diarrhea". *J Nutr* 2005; 135: 1304-1307.
48. Mäkeläinen H, Forssten S, Saarinen M, Stowell J, Rautonen N, Ouwehand AC. Xylo-oligosaccharides enhance the growth of bifidobacteria and Bifidobacterium lactis in a simulated colon model. *Beneficial Microbes* 2010; 1: 81-91.
49. Muralikrishna G, Schwarz S, Dobleit G, Fuhrmann H, Krueger M. Fermentation of feruloyl and non-feruloyl xylooligosaccharides by mixed fecal cultures of human and cow: a comparative study in vitro *Eur Food Res Technol* 2011*;* 232: 601-61.
50. Van Craeyveld V, Swennen K, Dornez E, Van de Wiele T, Marzorati M, Verstraete W, Delaedt Y, Onagbesan O, Decuypere E, Buyse J, De Ketelaere B, Broekaert WF, Delcour JA, Courtin Ch M. Structurally different wheat-derived arabinoxylooligosaccharides have different prebiotic and fermentation properties in rats *J Nutr*, 2008; 138: 2348-2355.
51. Chung Y, Hsu, C, Ko C, Chan Y. Dietary intake of xylooligosaccharides improves the intestinal microbiota, fecal Moisture, and pH Value in the elderly, *Nutr Res* 2007; 27: 756-761.
52. Lecerf JM, Depeint F, Clerc E, Dugenet Y, Niamba CN, Rhazi L, Cayzeele A, Abdelnour G, Jaruga A, Younes H, Jacobs H, Lambrey G, Abdelnour AM, Pouillart PR. Xylo-oligosaccharide (XOS) in combination with inulin modulates both the intestinal environment and immune status in healthy subjects, while XOS alone only shows prebiotic properties. *Br J Nutr* 2012; 108: 1847-1858.
53. Francois IEJA, Lescroart O, Veraverbeke WS, Marzorati M, Possemiers S, Evenepoel P, Hamer H, Houben E, Windey K, Welling GW, Delcour JA, Cour tin Ch M, Verbeke, K, Broekaert WF. Effects of a wheat bran extract containing arabinoxylan oligosaccharides on gastrointestinal health parameters in healthy adult human volunteers: a double-blind, randomised, placebo-controlled, cross-over trial. *Br J Nutr* 2012;, 108: 2229-2242.
54. Sheu WHH, Lee IT, Chen W, Chan YC. Effects of xylooligosaccharides in type 2 diabetes mellitus. *J Nutr Sci Vitaminol* 2008; 54: 396-401.
55. Moure A, Gullón P, Dominguez H Parajó JC. Advances in the manufacture, purification and applications of xylo-oligosaccharides as food additives and nutraceuticals. *Process Biochem* 2006; 41: 1913-1923.
56. Chen HH, Chen YK, Chang HC, Lin SY. Immunomodulatory effects of xylooligosaccharides. *Food Sci Techol Res 2012;* 18(2): 195-199.57.- Terada A, Hara H, Kato S, Kimura T, Fujimori I, Hara K, Maruyama T, Mitsuoka T. Effect of lactosucrose (4^G-β-D-galactosylsucrose) on fecal flora and fecal putrefactive products of cats. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 291-295.
57. Terada A, Hara H, Kato S, Kimura T, Fujimori I, Hara K, Maruyama T, Mitsuoka T. Effect of lactosucrose (4^G-β-D-galactosylsucrose) on fecal flora and fecal putrefactive products of cats. *J Vet Med Sci* 1993; 55: 291-295.
58. Terada A, Hara H, Sakamoto J, Sato N, Takagi S, Mitsuoka T, Mino R, Hara, K, Fujimori I, Yamada T. Effects of dietary supplementation with lactosucrose (4^G-β-D-galactosylsucrose) on cecal flora, cecal metabolites, and performance in broiler-chickens. *Poult Sci* 1994; 73: 1663-1672.
59. Ohkusa T, Ozaki Y, Sato C, Mikuni K, Ikeda H. (1995) Long-term ingestion of lactosucrose increases *Bifidobacterium* sp. in human fecal flora. *Digestion* 1995; 56: 415-420.
60. Takei K, Akakura K, Ueda T, Mikami, K, Haruo I. Effect of oral lactosucrose supplementation on human enteric oxalate-degrading bacteria. *Hinyokika kiyo*. *Acta Urologica Japonica* 2006; 52: 687-691.
61. Monsan P, Ouarné F. *Oligosaccharides derived from sucrose*. In: Prebiotics and Probiotics, Science and Technology, Eds. D. Charalampopoulus and R. A. Rastall, Springer. Science New York Ch 10 pp 293-336, 2009.
62. Kaneko T, Yokoyama A, Suzuki M. Digestibility characteristics of isomalto-oligosaccharides in comparison with several saccharides using the rat jejunum loop method. *Biosci Biotechnol Biochem* 1995; 9: 1190-1194.
63. Rycroft C E, Jones M E, Gibson G R, Rastall R A A comparative in vitro evaluation of the fermentation properties of prebiotic oligosaccharides. *J. Appl. Microbiol.* 2001; 91: 879-887.
64. Makelainen H, Hasselwander O, Rautonen N, Ouwehand AC. Panose, a new prebiotic candidate. *Lett Appl Microbiol* 2009; 49: 666-672.
65. Ketabi A, Dieleman LA, Gänzle MG. Influence of isomalto-oligosaccharides on intestinal microbiota in rats. *J Appl Microbiol* 2011; 110: 1297-1306.
66. Hu Y, Ketabi A, Buchko A, Gänzle MG. Metabolism of isomalto-oligosaccharides by Lactobacillus reuteri and bifidobacteria. *Lett Appl Microbiol* 2013; 57: 108-114.
67. Gu Q, Yang Y, Jiang G, Chang G. Study on the regulative effect of somaltooligosaccharides on human intestinal flora]. *Wei Sheng Yan Jiu* 2003; 32: 54-55.
68. Zhang F, Li DF, Lu WQ. and Yi, G.F. Effects of isomalto-oligosaccharides on broiler performance and intestinal microflora. *Poult Sci* 2003; 82: 657-663.
69. Thitaram SN, Chung CH, Day DF, Hinton A, Bailey JS, Siragusa GR Isomaltooligosaccharide increases cecal bifidobacterium population in young broiler chickens. *Poult Sci* 2005; 84: 998-1003.
70. Rehman H, Vahjen W, Kohl-Parisini A, Ijaz A, Zentek J. Influence of fermentable carbohydrates on the intestinal bacteria and enteropathogens in broilers. *Worlds Poult Sci J* 2009; 65: 75-90.
71. Chen HL, Lu YH, Lin JJ, Ko LY. Effects of isomalto-oligosaccharides on bowel functions and indicators of nutritional status in constipated elderly men. *J Am Coll Nutr* 2001; 20: 44-49.
72. Yen CH, Tseng YH, Kuo YW, Lee MC, Chen HL. Long-term supplementation of isomalto-oligosaccharides improved colonic microflora profile, bowel function, and blood cholesterol levels in constipated elderly people-a placebo-controlled, diet-controlled trial. *Nutrition* 2011; 17: 445-450.
73. Wang HF, Lim P-S, Kao MD, Chan EC, Lin LC, Wang NP. Use of isomalto-oligosaccharide in the treatment of lipid profiles and constipation in hemodialysis patients. *J Renal Nutr* 2001; 11: 73-79.
74. Watanabe T, Watanabe M, Kageyama, S. Prophylactic or ameliorating agent for immunological dysfunction, Prophylactic or ameliorating agent for microbism, tumor immunological enhancer and Prophylacticor ameliorating agent for in vivo various dysfunctions and functional food comprising α(1→6)-bonded chain glucose oligomer as active ingredient. *Japanese Patent*, JP 2002161039 (2002).

75. Espinosa-Martos I, Rupérez P. Soybean oligosaccharides. Potential as new ingredients in functional foods. *Nutr Hosp* 2006; 21: 92-96.
76. Hayakawa K, Mizutani J, Wad K, Masai T, Yoshihara I, Mitsuoka T. Effects os soybean oligosaccharides on human fecal microflora. *Microb Ecol Health Dis* 1990; 3: 293-303.
77. Crittenden R. Emerging Prebiotic Carbohydrates. En: Prebiotics. Development & Application. Gibson, G.R. & Rastall, R.A. (Eds). John Wiley & Sons, Ltd. Chichester. England, 2006 pp 111-33.
78. Leach JD, Rastall RA, Gibson GR. Prebiotics: Past, Present and Future. En: Prebiotics. Development & Application. Gibson, G.R. & Rastall, R.A. (Eds). John Wiley & Sons, Ltd. Chichester. England, 2006.
79. Chen H, Liu LJ, Zhu JJ, Xu B, Li R. Effects of soybean oligosaccharides on blood lipid, glucose levels and antioxidant enzymes activity in high fat rats. *Food Chem* 2010; 119: 1633-1636.
80. Valette JP, Franquet B, Wolter R. Calcul de la ration du cheval trotteur (Calculation of the daily ration of the horsetrotter). *Equathlon* 1993; 5: 8-9.
81. Chung CH, Day DF. Glucooligosaccharides fromLeuconostocmesenteroides B-742 (ATCC 13146): a potential prebiotic. *J Indus Microbiol Biotechnol* 2002; 29: 196-199.
82. Wichienchot S, Prasertsan P, Hongpattarakere T, Gibson GR, Rastall RA. In vitro Fermentation of Mixed Linkage Glucooligosaccharides Produced by Gluconobacteroxydans NCIMB 4943 by the Human Colonic Microflora. *Curr Issues Intestinal Microbio*l 2006; 7: 7-12.
83. Wichienchot S, Prasertsan P, Hongpattarakere T, Gibson GR, Rastall RA. In vitro Three-stage Continuous Fermentation of Gluco-oligosaccharides Produced by Gluconobacteroxydans NCIMB 4943 by the Human Colonic Microflora. *Curr Issues Intestinal Microbiol* 2006; 7: 13-18.
84. Sarbini SR, Kolida S, Gibson GR, Rastall RA. In vitro fermentation of commercial α-gluco-oligosaccharide by faecal microbiota from lean and obese human subjects. *Bri J Nutr* 2013; 109: 1980-1989.
85. Gulfi M, Arrigoni E, Amadò R. The chemical characteristics of apple pectin influence its fermentability in vitro. *LWT-Food Sci Technol* 2006; 39: 1001-1004.
86. Gullón B, Gómez, B, Martínez-Sabajanes M, Yañez R, Parajo JC. Pectic oligosaccharides: Manufacture and functional properties. *Trends Food Sci Technol* 2013; 30: 153-161.
87. Van Laere KMJ, Hartemink R, Bosveld M, Schols HA Voragen AG. Fermentation of plant cell wall derived polysaccharides and their corresponding oligosaccharides by intestinal Bacteria. *J Agric Food Chem* 2000; 48: 1644-52.
88. Suzuki Y, Tanaka K, Amano T, Asakura T, Muramatsu, N. Utilization by intestinal bacteria and digestibility of arabino-oliogsaccharides in vitro. *J Japan Soc Hort Sci* 2004*;* 73: 574-79.
89. Onumpai C, Kolida S, Bonnin E, Rastall RA. Microbial utilization and selectivity of pectin fractions with various structures. *Appl Environ Microbiol* 2011; 77: 5747-5754.
90. Magne F , Hachelaf W, Suau A, Boudraa G, Bouziane-Nedjadi K, Rigottier-Gois L, Touhami M, Desjeux JF, Pochart P. Effects on faecal microbiota of dietary and acidic oligosaccharides in children during partial formula feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008; 46: 580-588.
91. Westerbeek EAM, Slump RA, Lafeber HN, Knol J, Georgi G, Fetter WPF, van Elburg RM. The effect of enteral supplementation of specific neutral and acidic oligosaccharides on the faecal microbiota and intestinal microenvironment in preterm infants. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32: 269-276.
92. Gori A, Rizzardini G, van't Land B, Amor KB, van Schaik J, Torti C, Quirino T, Tincati C, Bandera, A Knol J, Benlhassan-Chahour K, Trabattoni D, Bray D, Vriesema A, Welling G, Garssen J, Clerici M. Specific prebiotics modulate gut microbiota and immune activation in HAART-naive HIV-infected adults: results of the " COPA " pilot randomized trial. *Mucosal Immunol* 2011; 4: 554-563.
93. Mäkivuokko H, Nurmi J, Nurminen P, Stowell J, Rautonen N. In vitro effects on polydextose by colonic bacteria and Caco-2cell cyclooxygenase gene expression, 2005 *Nutrition Cancer*, 2005; 52: 94-104.
94. Beards E, Tuohy K, Gibson G. A Human volunteer study to assess the impact of confectionery sweeteners on the gut microbiota composition. *Br J Nutr* 2010; 104: 701-708.
95. Costabile A; Fava F; Roytio H. Forssten SD, Olli K, Klievink J, Rowland IR, Ouwehand AC, Rastall RA, Gibson GR, Walton GE(2012). Impact of polydextrose on the faecal microbiota: a double-blind, crossover, placebo-controlled feeding study in healthy human subjects. *Brit J Nutr* 2012; 108: 471-481.
96. Ashley C, Johnston W H, Harris Ch L, Stolz S I, Wampler, J L, Berseth C L. Growth and tolerance of infants fed formula supplemented with polydextrose (PDX) and/or galactooligosaccharides (GOS): double-blind, randomized, controlled trial. *Nutr J* 2012; 11:1-10.
97. Ribeiro T C M, Costa-Ribeiro HJr, Almeida PS, Pontes MV, Leite MEQ, Filadelfo LR, Khoury J C, Bean JA, Mitmesser SH, Vanderhoof JA, Scalabrin DMF. Stool pattern changes in toddlers consuming a follow-on formula supplemented with polydextrose and galactooligosaccharides. *J Pedr Gastroenterol Nutr* 2012; 54: 288-290.
98. Scalabrin DMF, Mitmesser SH, Welling GW, Harris, CL, Marunycz JD, Walker DC, Bos NA, Tolkko S, Salminen, S, Vanderhoof, JA New prebiotic blend of polydextrose and galacto-oligosaccharides has a bifidogenic effect in young infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2012, 54: 343-352.
99. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), 2011. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polydextrose and changes in bowel function (ID 784), changes in short chain fatty acid (SCFA) production and/or pH in the gastro-intestinal tract (ID 784), decreasing potentially pathogenic gastro-intestinal microorganisms (ID 785) and reduction of gastro-intestinal discomfort (ID 784) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/20061. *EFSA Journal*. 2011, 9(6), 2256.
100. Nikolic M, López P, Strahinic I, Suárez A, Kojic M, Fernández-García M, Topisirovic L, Golic N, Ruas-Madiedo P. Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum BGCG11* and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *Int J Food Microbiol* 2012 ; 17: 158:155-62.
101. O'Sullivan L, Murphy B, McLoughlin P, Duggan P, Lawlor PG, Hughes H, Gardiner GE. Prebiotics from marine macroalgae for human and animal health applications. *Marine Drugs* 2010; 8: 2038-2064.
102. Gupta S, Abu-Ghannam N. Bioactive potential and possible health effects of edible brown seaweeds (Review). *Trends Food Sci Technol* 2011; 22: 315-326.
103. Rupérez P, Gómez-Ordóñez E, Jiménez-Escrig A. Biological activity of algal sulfated and non-sulfated polysaccharides. In: *Bioactive Compounds from Marine Foods: Plant and Animal Sources*. Hernández-Ledesma B. and Herrero M. (Eds), Wiley-Blackwell's Food Science and Technology book, 2013, pp. 219-248, ISBN: 978-1-118-41284-8.
104. Lahaye M, Robic A. Structure and function properties of ulvan, a polysaccharide from green seaweeds. *Biomacromolecules* 2007; 6: 1765-1774.
105. Gómez-Ordóñez E, Jiménez-Escrig A, Rupérez P. Effect of the red seaweed *Mastocarpus stellatus* intake on lipid metabolism and antioxidant status in healthy Wistar rats. *Food Chem* 2012; 135: 806-811.
106. Jiménez-Escrig A, Gómez-Ordóñez E, Tenorio MD, Rupérez P. Antioxidant and prebiotic effects of dietary fiber co-travelers from sugar Kombu in healthy rats. *J Appl Phycol* 2013; 25: 503-512.
107. Sanz ML, Ruiz-Matute AI, Corzo N, Martínez-Castro I. Analysis of prebiotic oligosaccharides. In: *Prebiotics and Probiotics Science and Technology* (eds D. Charalampopoulos & R.A. Rastall), Springer Science, New York, 2009, Ch 13, pp. 465-534.
108. Brummer Y, Cui SW. Understanding carbohydrate analysis. In: Cui, S.W. (Ed) Food Carbohydrates: Chemistry, Physical

Properties, and Applications. CRC Press: West Palm Beach, 2005.
109. Hernández-Hernández O., I. Calvillo, R. Lebrón-Aguilar, F.J. Moreno, M.L. Sanz Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographic (HILIC) coupled to mass spectrometry for the characterization of prebiotic galactoligosaccharides. *J Chromatogr* A 2012; 1220: 57-67.
110. Sanz M.L., J. Sanz, I. Martínez-Castro. Characterization of O-Trimethylsilyl oximes of disaccharides by gas chromatography-mass spectrometry. *Chromatographia* 2002; 56: 617-622.
111. Cardelle-Cobas A, Martínez-Villaluenga C, Sanz, ML, Montilla A. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of galactosyl derivatives obtained by the action of two different β-galactosidases. *Food Chem* 2009; 114: 1099-1105.
112. Marry M., D.M. Cavalier, J.K. Schnurr, J. Netland, Z.Y. Yang, V. Pezeshk, W.S. York, M. Pauly, A.R. White Structural characterization of chemically and enzymatically derived standard oligosaccharides isolated from partially purified tamarind xyloglucan. *Carbohydr Polym* 2003*;* 51: 347-356.
113. Ávila-Fernández A, Galicia-Lagunas N, Rodriguez-Alegría ME, Olvera C, López Munguia A. Production of functional oligosaccharides through limited acid hydrolysis of agave fructans. *Food Chem* 2011; 129: 380-386.
114. Blanch M, Sanchez-Ballesta MT, Escribano MI, Merodio C Fructo-oligosaccharides in table grapes and response to storage. *Food Chem* 2011; 129: 724-730.
115. Mateos-Aparicio I, Redondo A, Villanueva MJ, Zapata-Revilla MA, Tenorio-Sanz MD. Pea pod, brad bean pod and okara, potential sources of functional compounds. *LWT-Food Sci Technol* 2010; 43: 1467-1470.
116. Alpert A.J. Hydrophilic-Interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic-acids and other polar compounds. *J Chromatogr* 1990; 499: 177-196.
117. Zaia J. Mass spectrometry of oligosaccharides. *Mass Spectrom Rev* 2004; 23: 161-227.
118. Pasanen S, Janis J, Vainiotalo P. Cello-, malto- and xylooliogosaccharide fragmentation by collision-induced dissociation using QIT and FT-ICR mass spectrometry: a systematic study. *Int J Mass Spectrom* 2007; 263: 22-29.
119. Matamoros-Fernández LE, Obel N, Scheller HV, Roepstorff P. Characterization of plant oligosaccharides by matrix assisted laser desorption/ionization and electrospray mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2003; 38: 427-37.
120. Dreisewerd K, Kolbl S, Peter-Katalinic J, Berkenkamp S, Pohlentz G. Analysis of native milk oligosaccharides directly from thin-layer chromatography plates by matrix-assisted laser desorption/ionization orthogonal-time-of-flight mass spectrometry with a glycerol matrix. *J Am Soc Mass Spectrom* 2006; 17: 139-150.
121. Kajihara Y, Sato H. Structural analysis of oligosaccharides by nuclear magnetic resonance method. *Trends Glycosci Glycotechnol* 2003; 15: 197-220.
122. Hernández O, A.I. Ruiz-Matute AI, Olano A, Moreno FJ, Sanz ML. Comparison of fractionation techniques to obtain prebiotic galactooligosaccharides. *Int Dairy J* 2009; 19: 531-536.
123. Clemente A. *In vivo* assessment of the bioactivity of food oligosaccharides. *In*: "Food oligosaccharides: Production, Analysis and Bioactivity". ISBN: 978-1-118-42649-4. Eds F. Javier Moreno y M. Luz Sanz., John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, England Ch 14, pp. 238-252.
124. Gueimonde M, de los Reyes-Gavilán CG. Detection and enumeration of gastrointestinal microorganisms. *En*: "Handbook of probiotics and prebiotics". Lee, YK, and Salminen S. (eds). John Wiley & Sons, Inc. (Ed.), Hoboken, New Jersey, USA. pp. 25-43, 2009.
125. Martin FP, Collino S, Rezzi S, Kochhar S. Metabolomics applications to decipher gut microbial metabolic influence in health and disease. *Front Physiol* 2012; 3: 1-11.
126. Van den Abbeele P, Grootaert C, Marzorati M, Possemiers S, Verstraete W, Gérard P, Rabot S, Bruneau A, El Aidy S, Derrien M, Zoetendal E, Kleerebezem M, Smidt H, Van de Wiele T. (2010). Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for *Bacteroidetes* and *Clostridium* cluster IX. *Appl Enviro Microbiol* 2010; 76: 5237-5246.
127. Marzorati M, Van Den Abbeele P, Possemiers S, Benner J, Verstraete W, Van De Wiele T. Studying the host-microbiota interaction in the human gastrointestinal tract: basic concepts and *in vitro* approaches. *Ann Microbiol* 2011; 61: 709-715.
128. Tabernero M, Venema K, Maathuis AJH, Saura-Calixto FD. Metabolite production during *in vitro* colonic fermentation of dietary fiber: analysis and comparison of two European diets. *J Agric Food Chem* 2011; 59: 8968-8975.
129. Cencič A, Langerholc T. Functional cell models of the gut and their application in Food microbiology – A review. *Int J Food Microbiol* 2010; 141:S4-S14.
130. Van den Abbeele P, Roos S, Eeckhaut V, MacKenzie DA, Derde M, Verstraete W, Marzorati M, Possemiers S, Vanhoecke B, van Immerseel F, van de Wiele T. Incorporating a mucosal environment in a dynamic gut model results in a more representative colonization by lactobacilli. *Microb Biotechnol* 2012; 5: 106-115.
131. Yu J, Peng S, Luo D, March JC. *In vitro* 3D human small intestinal villous model for drug permeability determination. *Biotechnol Bioeng* 2012; 109: 2173-2178.
132. Parnell JA, Reimer RA. Prebiotics fibres dose-dependently increase satiety hormones and alter Bacteroidetes and Firmicutes in lean and obese JCR:LA –cp rats. *Br J Nutr* 2012; 107: 601-613.
133. Guarner F, Azpiroz F. La evaluación científica de los alimentos funcionales. En: Juarez M, Olano A, Morais F, eds. Alimentos Funcionales. Madrid: FECYT, 2005: 11-22.
134. Azpiroz F. From sensation to perception: the gut brain connection. En: Pasricha J, Willis WD, Gebhart GF. Chronic Abdominal and Visceral Pain. Theory and Practice. Boca Raton FL: CRC Press, 2007: 193-203.
135. Mussato SL, Mancilha IM. Non-digestible oligosaccharide: a review. *Carbohydr Polym* 2007; 68: 587-507.
136. Caselato de Sousa VM, Freitas dos Santos E, Sgarbieri VC The importance of prebiotics in functional foods and clinical practice. *Food Nutr Sci* 2011; 2: 133-144.
137. Steed H, Macfarlane, S. Mechanisms of prebiotic impact on health. En: Charalampopoulos, D., Rastall, R. A., (Eds.), En: *Prebiotics and Probiotics: Science and Technology* (eds D. Charalampopoulos & R.A. Rastall), Springer Science, New York, 2009, pp. 135-161.
138. Aziz Q, Doré J, Emmanuel A, Guarner F, Quigley EMM. Gut microbiota and gastrointestinal health: current concepts and future directions. *Neurogastroenterol Motil* 2013; 25: 4-15.
139. Corzo N, Montilla A, Cardelle-Cobas A, Olano A. "Carbohidratos prebióticos derivados de la lactosa". En: Funcionalidad de componentes lácteos. Capítulo 8, pp 159-178. Proyecto CYTED: N° XI.24. Ed. Universidad Miguel Hernández, 2009.
140. Bornet FRJ, Brouns F. Immune-stimulating and gut health-promoting properties of short-chain fructo-oligosaccharides. *Nutr Rev* 2002; 60: 326-334.
141. Maning TS, Gibson, GR. Prebiotics. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004; 18: 287-298.
142. Martin R, Nauta AJ, Ben Amor K, Knippels LMJ, Knol J, Garssen J. Early life: gut microbiota and immune development in infancy. *Beneficial Microbes* 2010; 1: 367-382.
143. Kajihara M, Kato S, Konishi M, Yamagishi Y, Horie Y, Ishii H. Xylooligosaccharide decreases blood ammonia levels in patients with liver cirrhosis. *Am J Gastroenterol* 2000; 95:2514.
144. Szilagyi A. Functional Disaccharides: Lactulose, Lactitol, and Lactose. En<. Handbook of prebiotics and probiotics ingredients. Health benefits and food applications (eds S.S. Cho & E.T. Finocchiaro) CRC Press Taylor & Francis Group Boca Raton New York , 2010 Capítulo 5, pp 95-122. ISBN-10: 1-4200-6213-1; ISBN-13: 978-1-4200-6213-7.
145. Crittenden RG, Playne MJ. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. *Trends Food Sci Technol* 1996; 7: 353-61.
146. Roberfroid M. Prebiotics: The concept revisited. *J Nutr* 2007; 137: 830S-837S.

VI Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica

Oviedo 5 y 6 de febrero de 2015

SESIÓN DE MICROBIOLOGÍA Y VETERINARIA

VI Workshop Probiotics, Prebiotics and Health: Scientific Evidence

Oviedo, 5 and 6 February, 2015

MICROBIOLOGY AND VETERINARY MEDICINE

Moderador/Moderator: Teresa Requena

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8716

MICROBIOLOGÍA

Aprovechamiento de subproductos de la industria láctea y de soja para la obtención de oligosacáridos prebióticos

Marta Corzo-Martínez, Gema García-Campos, Alice Luscher, Blanca de las Rivas, Rosario Muñoz, Antonia Montilla y F Javier Moreno
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación CIAL (CSIC-UAM). C/Nicolás Cabrera 9, Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, España.

Resumen
El aprovechamiento de subproductos de la industria agroalimentaria se ha convertido en los últimos años en una actividad de gran importancia económica. Dos de los subproductos más abundantes son el suero de quesería (SQ) y el suero de tofu (ST). El SQ, rico en lactosa, ha sido previamente utilizado para la síntesis enzimática de galacto- y glucooligosacáridos potencialmente prebióticos[1,2]. Sin embargo, el ST, fuente de sacarosa y α-galactósidos, no se ha empleado hasta ahora para este fin. Por ello, podría resultar interesante el desarrollo de una nueva vía de revalorización del ST, consistente en su utilización como sustrato único o en presencia de SQ, para la síntesis de derivados fructosilados (DF) potencialmente prebióticos, incluyendo FOS, o lactosacarosa, con efecto prebiótico científicamente reconocido[3,4]. Así, el objetivo del presente trabajo ha sido la obtención eficiente de lactosacarosa, a partir de SQ:ST, y DF, a partir de ST, mediante transfructosilación enzimática. La síntesis de lactosacarosa se llevó a cabo en presencia de la levansacarasa SacB de *Bacillus subtilis* CECT 39 a 37 ºC y pH 6, durante 180 min. Para la síntesis de DF se empleó el preparado enzimático Pectinex Ultra SP-L de *Aspergillus aculeatus* (60 ºC, pH 5,5 y 24 h). Ambas reacciones, monitorizadas por LC-RID, dieron lugar a altos rendimientos y una elevada producción de DF y lactosacarosa, tras un tiempo reducido. En conclusión, se ha desarrollado una alternativa novedosa, sostenible y eficaz de revalorización del ST y SQ mediante la síntesis enzimática de lactosacarosa y DF, con alto valor añadido.

Análisis proteómico de las interacciones de exopolisacaridos aislados de bifidobacterias con *bacteroides fragilis*

David Ríos-Covián, Borja Sánchez, Noelia Martinez, Nuria Salazar, Miguel Gueimonde y Clara G de los Reyes Gavilán
Departamento de microbiología y bioquímica de productos lácteos. Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias, España.

Resumen
El género *Bacteroides* representa hasta un 25% de la microbiota intestinal de adultos, mientras que el género *Bifidobacterium* constituye un 3% de ésta. Algunos microorganismos son capaces de producir carbohidratos complejos, exopolisacáridos (EPS), cuya función no está completamente elucidada. En estudios previos observamos que algunos EPS producidos por bifidobacterias tienen la capacidad de modular la microbiota intestinal humana en cultivos fecales. Sabemos también que el patrón de comportamiento de *Bacteroides* durante la fermentación de estos EPS es dependiente del EPS utilizado y diferente a lo que ocurre con glucosa. El objetivo de este trabajo fue profundizar en las interacciones moleculares de la cepa *Bacteroides fragilis* DSMZ2151 con EPS aislados de las cepas *B. longum* IPLA E44 y *Bifidobacterium animalis* IPLA R1 mediante una aproximación proteómica. Para ello, se realizaron geles de proteínas mediante la técnica 2D-DIGE comparando los proteomas de *Ba. fragilis* obtenidos en presencia de EPS o glucosa como fuentes de carbono. Las proteínas que mostraron diferencias significativas de producción fueron identificadas por huella peptídica mediante MALDI-TOF. Se observó una sobreproducción en el enzima metilmalonil-CoA mutasa, implicado en la síntesis de ácido propiónico en presencia de EPS. Además se obtuvo una mayor producción de proteínas de membrana, del enzima α-glucosidasa y una inhibición en la producción de enzimas relacionados con el metabolismo y la biosíntesis de aminoácidos. Algunos de los resultados obtenidos fueron corroborados mediante qPCR y cromatografía e indican que la presencia de EPS producidos por bifidobacterias causa modificaciones en el metabolismo energético y proteíco de *Bacteroides fragilis*.

Internalización de vesículas de membrana externa de cepas probióticas y comensales en células de epitelio intestinal

MA Cañas, J Badia, R Giménez y L Baldomà
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Institut de Biomedicina de la UB (IBUB).

Resumen
Las vesículas de membrana externa (OMVs) son producidas por todas las bacterias Gram negativas como mecanismos de transporte y liberación de moléculas, permitiendo interacción a distancia de la bacteria con el entorno y con las células huésped evitando el riesgo del contacto intercelular directo. Se han propuesto varios mecanismos para la interacción y entrada de las OMVs a la células huésped: (i) fusión con la membrana plasmática de la célula huésped, (ii) internalización mediada por endocitosis.
En este estudio se han realizado ensayos de internalización de OMVs de la cepa probiótica *Escherichia coli Nissle* 1917 (EcN) y la cepa comensal EcoR12 marcadas con la sonda fluorescente *Rhodamine-18* en células de epitelio intestinal HT-29 incubadas hasta 3 h a 37°C o 4°C. Los ensayos se realizaron también en presencia de inhibidores de las vías de internalización, filipina (vía *lipid rafts*) y clorpromazina (vía clatrina). Tras la incubación, las células fueron marcadas con WGA (marcador de membrana) y DAPI (marcador de núcleo) Usando microscopia confocal de fluorescencia observamos que las vesículas de EcN y EcoR12 son internalizadas por la célula huésped y se acumulan a nivel citoplasmático, siendo este un proceso dependiente de temperatura y sensible a clorpromazina pero no a filipina. Esto sugiere que la internalización de las OMVs a células epiteliales tiene lugar mediante endocitosis mediada por clatrina. Estos resultados fueron confirmados por cuantificación de la fluorescencia emitida en células HT-29 o en células HT-29-Mtx (productoras de

mucina) incubadas con OMVs marcadas con R-18 usando el equipo Modulus™ Microplate Fluorometer.

Estudio de los efectos inmunomoduladores del (1-3)-β-D-glucano sustituido en posición *O*-2 en modelos *in vitro* y *ex vivo*

Sara Notararigo[1], Maria Antolín[2], Encarnación Varela[2], Ángel Corbí[1], Francisco Guarner[2] y Paloma López[1]

[1]Centro de Investigaciones Biológicas-CSIC, Departamento de Microbiología molecular y biología de las infecciones, c/Ramiro de Maeztu, 9 28040 Madrid España. [2]Vall d'hebron Institut de Recerca, Departamento de Fisiologia i Fisiopatologia Digestiva, Ed. Recerca Mediterrània, Passeig de la Vall d'Hebron 1, 08035 Barcelona, España.

Resumen

Los β-glucanos son polisacáridos aislados de cereales, de hongos y de bacterias y tienen un creciente interés en el desarrollo de alimentos funcionales ya que se ha demostrado su eficacia en la reducción de los niveles del colesterol sérico, su efecto como anticancerígenos, antioxidantes e inmunomoduladores.

Hemos demostrado previamente que el (1-3)-β-D-glucano sustituido en posición *O*-2 producido por bacterias lácticas, es capaz de inmunomodular macrófagos humanos *in vitro*. Para caracterizar la funcionalidad de dicho β-D-glucano se ha estudiado su efecto en macrófagos, y en modelos *in vitro* y *ex vivo* de mucosa intestinal inflamada. Se ha valorado, el nivel de 43 proteínas fosforiladas en macrófagos tratados con el polisacarido o con lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* cómo control de activación positivo. El primero activó la vía PI3K/mTOR y la fosforilación de proteínas Src, mientras que LPS activó las vías de la MAPK y p38. Se han evaluado 84 genes, involucrados en las vías de señalización del NFkB utilizado el kit NFkB Signaling Pathway PCR Array Qiagen, en modelo *ex vivo,* y se detectó regulación diferencial de la expresión de 14 genes por el β-D-glucano Finalmente, la valoración en el modelo *in vitro* de los niveles de citoquinas pro- y anti-inflamatorias (TNF-α, IL-8, e IL-10) y los niveles de expresión de sus genes, reveló un efecto anti-inflamatorio del β-D-glucano tras 6 horas de tratamiento.

Estos resultados sugieren que el (1-3)-β-D-glucano sustituido en posición *O*-2, podría tener un efecto beneficioso en individuos inmunodeprimidos y en pacientes afectados por la Enfermedad de Crohn.

Papel de los exopolisacáridos producidos por *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* en las interacciones bacteria-hospedador

C Hidalgo-Cantabrana[1,3,4], P López[2], E Varela[3], F Algieri[4], A Rodriguez-Nogales[4], A Suárez[2], M Antolín[3], F Guarner[3], J Gálvez[4], A Margolles[1] y P Ruas-Madiedo[1]

[1]Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Asturias, España. [2]Área de Inmunología, Departamento de Biología funcional, Universidad de Oviedo, Asturias, España. [3]Departamento de Gastroenterología, Instituto de Recerca Vall d'Hebron, Barcelona, España. [4]Departamento de Farmacología, Universidad de Granada, Granada, España.

Resumen

Los exopolisacáridos (EPS) bacterianos son polímeros de naturaleza glicosídica que se encuentran rodeando la bacteria o unidos débilmente formando una matriz en el exterior. Estos polímeros confieren una ventaja adaptativa a la bacteria en el tracto gastrointestinal (TGI). En bifidobacterias, se ha demostrado que las cepas productoras de EPS pueden modificar el perfil de la microbiota, ejercer un papel protector frente a patógenos y sustancias tóxicas y modular la respuesta del sistema inmune. En nuestro grupo hemos obtenido un modelo de cepas isogénicas de B. animalis subsp. lactis productoras de distinto EPS (mucoide y ropy), que nos ha permitido estudiar la relevancia fisiológica que tienen estos polímeros. Hemos demostrado que la cepa productora de un EPS de alto peso molecular (HMW-EPS, 106 Da), responsable del fenotipo ropy, tiene mayor adhesión a la línea celular intestinal HT29 y sobrevive mejor a las condiciones del TGI simulado que la cepa mucoide. Además, los co-cultivos *in vitro* de las cepas con PBMCs humanos y los co-cultivos *ex vivo* con tejido de colon humano mostraron un efecto anti-inflamatorio, para la cepa ropy productora del HMW-EPS. En vista de estos esperanzadores resultados, hemos llevado a cabo una intervención *in vivo* empleando un modelo murino con colitis inducida. Los resultados preliminares muestran que nuestras cepas de *B. animalis subsp. lactis* son capaces de sobrevivir a las condiciones del TGI y la cepa ropy es capaz de producir una disminución del índice de actividad de la enfermedad. Actualmente estamos analizando los parámetros inmunes y la expresión génica para estudiar la posible relación de la cepa ropy con la disminución en la severidad de la enfermedad.

Síntomas y cambios en la colonización microbiana intestinal en pacientes con síndrome del intestino irritable

Marta Pozuelo[1], Suchita Panda[1], Alba Santiago[1], Sara Mendez[2], Anna Accarino[2], Francisco Guarner[1,2,3], Fernando Azpiroz[1,2,3] y Chaysavanh Manichanh[1,3]

[1]Digestive System Research Unit, Vall d'Hebron Research Institute, Passeig Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain. [2]Digestive Unit, University Hospital Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, Barcelona 08035, Spain. [3]Centro de Investigacion Biomedica en Red en el Área tematica de Enfermedades Heptaticas y Digestivas, CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain.

Resumen

Antecedentes y objetivos: Dada la gran heterogeneidad clínica del síndrome de intestino irritable (IBS) y los múltiples factores que afectan el microbioma intestinal, aunque se han identificado cambios en el perfil microbiano de estos pacientes, no existe un patrón consistente entre los distintos estudios. Nuestro objetivo ha sido abordar una cohorte amplia de pacientes y controles para detectar marcadores microbianos asociados a la expresión sintomática y subtipo de IBS.

Métodos: Se han analizado más de 20 millones de secuencias de 16S rRNA, generadas de un total de 290 muestras de heces, que fueron obtenidas de 113 pacientes con IBS y 66 controles sanos.

Resultados: La caída de diversidad microbiana característica de los pacientes con IBS incluye la pérdida de algunos grupos poco abundantes del filo Firmicutes y del dominio Archaebacteria. Cuatro grupos microbianos discriminan IBS-A e IBS-D de IBS-C y sujetos sanos. La producción excesiva de gas y el dolor abdominal se correlaciona con varias especies bacterianas. Los niveles de *Barnesiellaceae*, que es más abundante en mujeres sanas que en hombres sanos, se correlacionan significativamente con los índices de dolor abdominal. Por último, los pacientes con IBS tratados con inhibidores de la bomba de protones presentan una mayor abundancia relativa de *Haemophilus*.

Conclusiones: La caracterización espectral del microbioma intestinal de pacientes con IBS ha identificado posibles firmas microbianas asociadas a género, síntomas, subtipos de IBS, y uso de medicamentos.

Aplicación de gradientes de densidad en el aislamiento de microbiota fecal

Arancha Hevia[1], Abelardo Margolles[1] y Borja Sánchez[2]
[1]Instituto de Productos Lácteos de Asturias - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC). Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias, España. [2]Grupo de Nutrición y Bromatología, Departamento de Quimica Analitica y Alimentaria; Facultad de Ciencia y Tecnologia de la Alimentación, Universidad de Vigo - Campus Ourense, E-32004 Ourense, España.

Resumen
En este trabajo se muestra que la separación de microorganismos del resto de matriz fecal presente en las heces, mediante el uso de gradientes de densidad con resina Nycodenz®, no afecta globalmente al perfil de microbiota del donante comparado con la muestra sin tratar. Para ello se obtuvieron muestras fecales de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico (LES) y donantes sanos. La microbiota se separó del resto del material fecal en un solo paso de centrifugación a través del gradiente de densidad, se extrajo el ADN, y se utilizó un método optimizado de análisis basado en la amplificación parcial del gen del 16S rRNA para determinar el perfil microbiano. La comparación de estos perfiles evidenció una ausencia de efecto de la extracción en gradiente sobre los grupos bacterianos mayoritarios.
Complementariamente, los perfiles microbianos se agruparon usando diferentes métodos de ordenación y reducción dimensional y se calcularon las matrices de similitud entre muestras. Como regla general, se observó un agrupamiento entre sí de las muestras aisladas/no aisladas, lo que sugiere que las comunidades microbianas aisladas utilizando gradientes de Nycodenz® son representativas de aquellas presentes en las heces de origen. En resumen, este trabajo proporciona un protocolo sencillo para la separación de microbiota fecal del resto de materia fecal.

Estudio de la evolución de la microbiota fecal durante la ingesta de isoflavonas de soja mediante metagenómica filogenética

Lucía Guadamuro[1], M Andrea Azcárate-Peril[2], Pedro Belda-Ferre[3], Ana Belén Flórez[1], Baltasar Mayo[1] y Susana Delgado[1]
[1]Departamento de Microbiología y Bioquímica, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares, s/n, 33300-Villaviciosa, Asturias, Spain. [2]Department of Cell Biology and Physiology and Microbiome Core Facility, School of Medicine, University of North Carolina (UNC), Chapel Hill, NC 27599-7545, North Carolina, USA. [3]Laboratorio del Microbioma Oral, Centro Superior en Salud Pública (FISABIO-CSISP), Avenida de Cataluña, nº 21, 46020-Valencia, Spain.

Resumen
Las isoflavonas de la soja se emplean en el tratamiento de los síntomas de la menopausia debido a su actividad estrogénica. Sin embargo, la ingesta de estos compuestos produce efectos poco caracterizados en las poblaciones microbianas intestinales. Algunos microorganismos intestinales están relacionados con el metabolismo de estas sustancias y podrían mediar en sus efectos beneficiosos.
En este trabajo se han estudiado los cambios en la microbiota fecal de una mujer menopáusica productora de equol en tratamiento con isoflavonas durante seis meses mediante pirosecuenciación de amplicones del ADNr 16S bacteriano. Para distinguir las poblaciones viables de las muertas, las muestras fecales se trataron o no con monoazida de etidio (EMA). Se obtuvieron alrededor de 3.700 secuencias de calidad por muestra, que tras su agrupamiento al 95% de identidad correspondieron con alrededor de 500 unidades taxonómicas operacionales (OTUs). Tras la asignación taxonómica se comprobó que mientras que el género *Bifidobacterium* disminuyó drásticamente, otros géneros bacterianos se incrementaron significativamente durante el tratamiento ya desde el primer mes como *Ruminococcus*, *Blautia, Faecalibacterium* y *Coprococcus*. Entre ellos destacan los pertenecientes a la familia *Coriobacteriaceae* (*Eggerthella*, *Collinsella*), relacionada con el metabolismo de las isoflavonas. Con el empleo de EMA la diversidad bacteriana, determinada mediante estimadores no paramétricos (ACE, Chao1), se redujo hasta unas 200 OTUs por muestra, y los cambios en algunos de estos grupos microbianos no fueron tan notables. Esto sugiere que muy posiblemente estos tipos bacterianos se encuentran en estados poco viables, lo que dificultará su aislamiento en cultivo y su propagación *in vitro*.

Transposon mutagenesis in *Bifidobacterium breve*: construction and characterization of a tn5 transposon mutant library in *Bifidobacterium breve* UCC2003

Lorena Ruiz, Mary O´Connell-Motherway, Noreen Lanigan and Douwe van Sinderen
Alimentary Pharmabiotic Centre and Department of Microbiology, National University of Ireland, Cork, Western Road, Cork, Ireland.

Abstract
Bifidobacteria are claimed to contribute positively to human health through a range of beneficial or probiotic activities, including amelioration of gastrointestinal and metabolic disorders, and therefore this particular group of gastrointestinal commensals has enjoyed increasing industrial and scientific attention in recent years. However, the molecular mechanisms underlying these probiotic mechanisms are still largely unknown, mainly due to the fact that molecular tools for bifidobacteria are rather poorly developed, with many strains lacking genetic accessibility. Indeed transformation efficiencies in bifidobacteria are generally too low and only targeted mutations based on homologous recombination had been successfully achieved in some strains. In this work, we describe the generation of transposon insertion mutants in two bifidobacterial strains, *B. breve* UCC2003 and *B. breve* NCFB2258. We also report the creation of the first transposon mutant library in a bifidobacterial strain, employing *B. breve* UCC2003 and a Tn5-based transposome strategy. This collection of mutants was found to be composed of clones containing single transposon insertions which appear to be randomly distributed along the genome. The usefulness of the library to perform phenotypic screenings was confirmed through identification and analysis of mutants displaying defects in carbohydrate metabolism features. Further applications of this kind of mutants' collection will be discussed.

Participación de proteínas bacterianas multifuncionales en la regulación de la inflamación de las células epiteliales

*Christine Bäuerl, José María Coll, M Carmen Collado, Jesús Rodriguez Diaz, Vicente Monedero and Gaspar Pérez Martínez**
*Laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Valencia.

Resumen
En la microbiota intestinal existen especies bacterianas que interaccionan de forma beneficiosa con el intestino humano, desarrollando mecanismos de comunicación molecular con la mucosa intestinal. Hemos clonado y purificado varias proteínas de *Lactobacillus casei* BL23. Las autolisinas p40 y p75, responsables de la actividad antiapoptótica de *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus casei*, y que poseen gran capacidad de adhesión a cultivos de células epiteliales. Ambas proteínas poseen diferente patrón antiinflamatorio cuando se ensayó la expresión de quimioquinas proinflamatorias (I-TAC, IP10, IL-8, CCL20, CXCL6) en células HT29. Por otro lado, se comprobó la capacidad de unión a fibronectina, fibrinógeno, colágeno y mucina de p40, p75, y de diversas proteínas seleccionadas por su capacidad de adhesión a colágeno y fibronectina, como la proteína de unión a fibronectina (FbpA), gliceraldehído-3P deshidrogenasa (GAPDH) y enolasa (Eno), mediante un biosensor de plasmón de superficie (Biacore T100). Sólo la FbpA mostró gran capacidad de unión a fibronectina y las otras matrices, no obstante, el resto de las proteínas seleccionadas mostraron valores altos del componente de resolución del complejo (K_d), lo que hace la unión muy estable en el tiempo. Finalmente, se analizó la actividad antiinflamatoria de todas las proteínas purificadas en un sistema de células transfectadas con el vector pNIFTY, que aporta a los cultivos un gen trazador que se expresa a partir de un promotor regulado por NF-κB. Se observó efecto proinflamatorio de p40 y p75, y antiinflamatorio para Eno y GADPH.

VETERINARIA

Actividad probiótica de la bacteria ácido láctica *Lactobacillus pentosus* LB-31 en pollos de ceba

Yaneisy García-Hernández[1], Tania Pérez-Sánchez[2], Mayriulis Pérez[1], Yanelys García-Curbelo[1], Bárbara Rodríguez[1], Ramón Boucourt[1], Verena Torres[1], Nereyda Albelo[1], Odalys Núñez[1], Juan A Guzmán[1], Milagro Febles[1] y Aida C Noda[1]
[1]Instituto de Ciencia Animal (ICA). Carretera Central km 47 ½, 32700, San José de las Lajas, Mayabeque, Cuba. e-mail: yaneisyg@ica.co.cu. [2]Departamento de Patología Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza, España.

Resumen
Para evaluar la actividad probiótica de la bacteria ácido láctica *Lactobacillus pentosus* LB-31 en algunos indicadores fisiológicos y productivos de pollos de ceba, se utilizó un diseño completamente aleatorizado y se establecieron dos grupos de animales, cada uno con cien pollos. El primer grupo consumió una dieta basal de maíz y soya, y el segundo la dieta basal con la adición de *L. pentosus* LB-31, a una concentración de 10^8 ufc/g^{-1} de alimento. Con la inclusión de este lactobacilo se observaron variaciones en los indicadores morfológicos como incremento del peso relativo (g/kg^{-1} de peso vivo) del intestino grueso e intestino delgado a los 21 d, disminución de este último órgano a los 42 d (38,71 *vs* 34,26; P<0,01) e incremento de los ciegos a los 35 d (5,27 *vs* 6,00; P<0,05). Al final de la experimentación, incrementó el rendimiento de la canal (53,81 *vs* 55,25 %; P<0,01) y la pechuga (24,86 *vs* 27,05 %; P<0,01) con respecto al control, así como se observó buen estado de salud de los animales y mejora de la respuesta vacunal de los animales tratados (P<0,05). No se encontraron diferencias para el peso relativo de los órganos anexos al tubo digestivo ni para la concentración de ácidos grasos volátiles totales y el pH del contenido cecal. Se concluye que la adición de *L. pentosus* LB-31 en la dieta de los pollos produce una respuesta de tipo probiótica en el comportamiento de algunos indicadores fisiológicos y productivos de estos animales.

Impact of fishmeal replacement in diets for gilthead seabream (*Sparus aurata*) on gastrointestinal microbiota by pyrosequencing the 16S rRNA gene

G Estruch[2], MC Collado[1], DS Peñaranda[2], A Tomás Vidal[2], M Jover Cerdá[2], S Martinez-Llorens[2] y G Pérez Martínez[1]
[1]Institute of Agrochemistry and Food Technology, Spanish National Research Council (IATA-CSIC), Department of Biotechnology. Av. Agustin Escardino 7, 46980 Valencia, Spain. [2]Grupo de Acuicultura y Biodiversidad del Instituto de Ciencia y Tecnología Animal (ICTA). Universitat Politècnica de València. Camino de Vera, s/n 46022. Valencia, Spain.

Abstract
Huge research efforts are invested to replace fishmeal in aquafeeds to keep fish production profitable. Gastrointestinal microbiota has been studied in the seabream (*Sparus aurata*) to understand the effect of total fishmeal replacement in feed by vegetable meal. Growth, survival and nutrient utilisation indices were considered and microbial composition from stomach, foregut, midgut and hindgut was analysed by using high-throughput 16S rDNA sequencing, as well as the microbial profiles of the recirculating water. We found that in the stomach the dominant phylum was *Proteobacteria*, followed by *Firmicutes*, and *Actinobacteria*, while *Actinobacteria*, *Protebacteria* and *Firmicutes* were predominant in the gut. The microbial composition of the recirculating water system was totally different to the seabream gastrointestinal tract. Total fishmeal replacement had an important impact on the microbiota profile: (i) the microbiota of fish fed fishmeal diet was more homogeneous throughout gut; (ii) fish fed with the vegetable meal mixture diet had a high proportion of chloroplasts and mitochondria from vegetable dietary ingredients in the stomach; and (iii) *Streptococcus* (p-value: 0,006) and *Photobacterium* (p-value: 0,032) dominated in the fishmeal and vegetable-meal diets, respectively. Both diets were very different in the hindgut, as shown by Principal Component Analysis, supporting the association of specific bacterial consortia to diet. Differences in growth and nutritive parameters were not observed, however there was a negative effect of vegetable feed on the survival rate. Further studies will try to modulate the microbiota associated to the gastrointestinal tract of the seabream fed plant-based diets with pro or prebiotics in order to reduce mortality.

VI Workshop Probióticos, Prebióticos y Salud: Evidencia Científica

Oviedo 5 y 6 de febrero de 2015

PRESENTACIÓN POSTERS

VI Workshop Probiotics, Prebiotics and Health: Scientific Evidence

Oviedo, 5 and 6 February, 2015

POSTERS PRESENTATION

DOI:10.3305/nh.2015.31.sup1.8717

INMUNONUTRICIÓN

Association between lipid peroxidation marker, C-reactive protein, serum trace elements and fecal microbiota in lupus

*Adriana Cuervo[1], Arancha Hevia[2], Claudia Gómez[1], Patricia López[1], Ana Suárez[1], Borja Sánchez[2], Abelardo Margolles[2] and Sonia González[1]**
[1]Department of Functional Biology, University of Oviedo, Oviedo, Asturias, Spain. [2]Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Villaviciosa, Asturias, Spain.

Abstract
Our group has recently reported an intestinal dysbiosis, with a lower *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio, in systemic lupus erythematosus (SLE), autoimmune disease in which inflammation and oxidative stress could be involved. The aim of this study was to compare the serum levels of antioxidants, malondialdehyde (MDA) and C-reactive protein (CRP), and to evaluate their association with intestinal microbiota, in 26 women suffering from SLE and 27 age-matched controls. Serum concentration of CRP was determined by enzymatic methods, folic acid and vitamin B_{12} by chemiluminescence; copper, zinc and selenium by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) and MDA and total antioxidant capacity (TAC) by spectrophotometric methods. Intestinal microbiota profile was evaluated by Ion Torrent 16S rRNA gene-based analysis. Results did not reveal increased levels of lipoperoxidation and CRP in SLE subjects compared to controls. Higher concentration of serum copper and lower of zinc was found in these patients in comparison with controls. Also, CRP was found directly associated with serum copper and *Verrucomicrobia* levels, whereas zinc was indirectly associated with *Fimicutes*. These results could be useful in the future to go deeper into the understanding of this complex disease.

Intestinal effects after the consumption of *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 strain by healthy adults

Noemi Redondo[1], Alina Georghe[1], Ruth Serrano[1], Mª Paz Díaz-Ropero[2], Mónica Olivares[2], Esther Nova[1] y Ascensión Marcos[1]
[1]Immunonutrition Group (Metabolism and Nutrition Department) - Institute of Food Science, Technology and Nutrition, Spanish National Research Council (ICTAN-CSIC). José Antonio Novais st, 10 - 28040 - Madrid. [2]Biosearch S.A. Purchil st, 66 - 18004 - Granada. Spain.

Abstract
A good functionality of the gastrointestinal tract is essential to the individual wellbeing, highlighting the biological importance of the bacteria that colonize our intestine. Research studies have shown a positive effect on the intestinal transit, the microbial composition and the resistance against pathogens after probiotics intake. These beneficial bacteria are also able to produce short chain fatty acids (SCFA), which promote intestinal health. For this purpose, we performed this study in one hundred twenty three healthy adults to analyze the gastrointestinal (GI) effects after the oral intake of a probiotic strain, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 during six weeks. Volunteers were randomized into 3 groups: placebo, probiotic or mixed (consuming probiotic during two weeks and placebo during the last four weeks). Stool samples were taken at the beginning, after two weeks and at six weeks of treatment. Microbiota composition was analyzed by quantitative PCR, SCFA production by gas chromatography and frequency and intensity of GI symptoms (borborigms, flatulence, bloating, nausea and abdominal pain) by a specific questionnaire.
There were no differences between groups regarding microbiota composition and SCFA production. This could be due to the fact that microbial composition remains stable throughout life in healthy individuals, and SCFA production depends on the type of strain ingested. However, probiotic and mixed groups showed a high trend to reduce the frequency of symptoms at the end of the study (P=0.054) compared to the placebo group, suggesting that probiotic intake could exert a positive effect on intestinal wellness even in a healthy state on which these symptoms are normally absent.

El consumo de una leche fermentada con la presencia de bacterias probióticas por un corto período de tiempo mejora la función conductual e inmunitaria de ratones viejos

C Hunsche, J Cruces, A Garrido, O Hernández y M De La Fuente
Departamento de Fisiología Animal II. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.

Resumen
El envejecimiento supone un deterioro progresivo de los sistemas homeostáticos como el nervioso e inmunológico. Dado que el mantenimiento de la homeostasis es la base de la salud, los cambios funcionales en esos sistemas con la edad explican el aumento de la morbilidad y mortalidad al envejecer. Los probióticos parecen ser una buena estrategia nutricional en el proceso de envejecimiento, principalmente en las funciones neurológica e inmunológica. El objetivo del presente trabajo fue investigar en ratones viejos los efectos del consumo de un alimento con probiótico, por un periodo corto de tiempo, en parámetros conductuales e inmunológicos. Se usaron 3 grupos de ratones hembras viejas ICR-CD1: 1) Bebieron leche fermentada con *L. casei* DN114001 y vitaminas B6 y D; 2) leche desnatada con esas vitaminas; 3) sólo agua (controles) y un grupo de ratonas adultas (control de edad). Tras 1 y 4 semanas se evaluaron una serie de parámetros conductuales y de funcionalidad de las células inmunitarias peritoneales. Además, también fue estudiado el efecto *in vitro* de esas leches en la funcionalidad de los linfocitos. Los resultados mostraron una mejor conducta (disminución de la ansiedad) y función inmunitaria (fagocitosis, actividad NK, linfoproliferación,..) tras una semana de consumo de leche con probiótico, en muchos parámetros y en todos tras 4 semanas. Los valores de estos parámetros, que estaban deteriorados en los controles viejos, se acercaron a los de los adultos. Se podría concluir que el consumo de probióticos es una buena estrategia para promover una longevidad saludable.

A pea (*Pisum sativum L.*) Seed extract exhibits intestinal anti-inflammatory effect in the DSS model of mouse colitis

Teresa Vezza[1], Francesca Algieri[1], Alba Rodríguez-Nogales[1], Pilar Utrilla[1], Luis A Rubio[2], M Jesús Peinado[2], Raquel Ruiz[2], Alfonso Clemente[2], María Elena Rodríguez-Cabezas[1] y Julio Gálvez[1]

[1]Department of Pharmacology, CIBER-EHD, CIBM, ibs. GRANADA, University of Granada, Spain. [2]Physiology and Biochemistry of Animal Nutrition (EEZ, CSIC), Granada, Spain.

Abstract

Introduction: Nutritional management of IBD patients is key for the amelioration of the disease together with drug therapy. Pea (*Pisum sativum L.*) seed extracts have revealed to possess anti-inflammatory and immunomodulatory activities. The present study evaluates the preventative effects of a pea seed extract (PSE) in the mouse model of DSS-induced colitis, and the contribution of its purified albumin fraction (AF-PSE), which contains a serine protease inhibitor (pea BBI), in its beneficial activity.

Material and Methods: Male C57BL/6J mice were assigned to four groups: Non colitic and DSS controls, and three treated groups which received PSE (300 mg/animal/day), AF-PSE (30 mg/animal/day) or soybean BBI (1 mg/animal/day) starting 14 days before DSS (3.5% in drinking water for 5 days) colitis induction. Colonic damage was evaluated measuring the expression by qPCR of pro-inflammatory cytokines (TNFα, IL-6 and IL-12), the enzymes iNOS and COX-2, metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and MMP-14, the adhesion molecule ICAM-1, and markers of intestine epithelial integrity (mucin MUC-3 and occludin).

Results: The administration of PSE, AF-PSE or soybean BBI showed intestine anti-inflammatory effects as evidenced by an improvement in DAI values. Biochemically, PSE, AF-PSE and soybean BBI were able to reduce the expression of different proinflammatory markers, including cytokines, iNOS, COX-2, metalloproteinases and the adhesion molecule ICAM-1; however, only PSE increased the expression of MUC-3 and occludin.

Discussion: PSE and AF-PSE showed beneficial effects in the DSS model of mouse colitis by down-regulating the immune response and improving the intestine barrier function. The protease inhibitor (pea BBI) present in the seed albumin fraction is likely to be mainly responsible for this immunomodulatory activity.

Optimización del análisis de carbohidratos prebióticos por cromatografía líquida y detector evaporativo de luz difusa

Elena Pérez-López, Luis Condezo-Hoyos y Pilar Rupérez

Departamento de Metabolismo y Nutrición, Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), José Antonio Novais 10, Ciudad Universitaria, ES 28040-Madrid, Spain.

Resumen

Los carbohidratos indigeribles tienen capacidades prebióticas al ser fermentados selectivamente por las bacterias del colon y los solubles son más efectivos que los insolubles. En este trabajo, se propone un método de análisis de carbohidratos solubles de un amplio rango de masas moleculares mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) y un detector evaporativo de luz difusa (ELD). Este detector, de creciente uso en el análisis individual de carbohidratos, no ha sido aplicado en el análisis simultáneo de carbohidratos, como los presentes en muestras reales. El método HPLC-ELD fue optimizado utilizando un modelo de respuesta-superficie (MRS) y patrones de monosacáridos, disacáridos, oligosacáridos (incluyendo fructo- o α-galacto-oligosacáridos) y polisacáridos. El método HPLC-ELD muestra linealidad en un amplio rango de concentraciones, una alta sensibilidad y repetitividad para el análisis cuantitativo (concentración) y cualitativo (masa molecular) en muestras que incluyen pectina de manzana, inulina, verbascosa, estaquiosa y rafinosa, El método propuesto puede ser de utilidad para el análisis simultáneo de carbohidratos solubles con potencial prebiótico presentes en alimentos y suplementos dietéticos.

Modulación de la producción de citokinas *in vivo* por *Lactobacillus plantarum* C4

S De Montijo[1], T Bergillos-Meca[2], E Moreno[1], A Lasserrot[3], MD Ruiz-López[2,4], A Ruiz-Bravo[1] y M Jiménez-Valera[1]

[1]Departamento de Microbiología, Universidad de Granada. [2]Departamento de Nutrición y Bromatología, Universidad de Granada. [3]Biotmicrogen S.L., Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Granada. [4]Instituto de Nutrición y Tecnología de los alimentos. Universidad de Granada. España.

Resumen

La cepa C4 de *Lactobacillus plantarum* se ha caracterizado como microorganismo probiótico, capaz de sobrevivir en el tracto gastrointestinal y de ejercer efectos beneficiosos en animales de experimentación. En este trabajo se ha investigado la modulación por C4 de los niveles de citokinas en plasma y contenido cecal de ratones. La cepa C4, incorporada a un vehículo lácteo fermentado, se administró por vía intragástrica durante 15 días. Como controles, se utilizaron grupos de ratones a los que se administró, durante el mismo periodo, agua o el vehículo lácteo fermentado. Al finalizar el tratamiento, una fracción de los animales de cada grupo se sometió a desafío con una cepa virulenta de *Yersinia enterocolitica* O9 por vía intragástrica. Los niveles plasmáticos de TNF-α no experimentaron modificaciones significativas en ninguno de los grupos. Los valores más altos de IFN-γ en plasma correspondieron a los grupos que recibieron probiótico. Tanto el probiótico como *Y. enterocolitica* tendieron a aumentar los niveles plasmáticos de IL-10, pero los incrementos solo fueron significativos en el grupo que recibió ambas bacterias. En cuanto a las medidas en contenido cecal, la infección con *Y. enterocolitica* incrementó el nivel de TNF-α; el probiótico solo no lo modificó, pero potenció el incremento debido a *Y. enterocolitica*. Tanto el probiótico como *Y. enterocolitica* disminuyeron los niveles cecales de IL-10. En conclusión, en este modelo experimental la cepa C4 tiene efecto antiinflamatorio a nivel sistémico pero no intestinal, y potencia la respuesta defensiva frente a *Y. enterocolitica.*

La suplementación con proteínas de plasma animal reduce la respuesta inflamatoria en un modelo murino de inflamación pulmonar e intestinal

Lluïsa Miró[1,2], Mònica Maijó[1], Javier Polo[2], Miquel Moretó[1] y Anna Pérez-Bosque[1]

[1]Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia; Institut de Nutrició i Seguretat Alimentària, Universitat de Barcelona. [2]APC Europe, Granollers, Barcelona.

Resumen

Estudios previos demostraron que la suplementación dietética con proteínas plasmáticas reduce la respuesta inmunitaria intestinal inducida por la enterotoxina B de *S. aureus* (SEB), así como la inflamación pulmonar aguda inducida por lipopolisacárido (LPS). En este trabajo nos hemos planteado si las dietas suplementadas con plasma porcino atomizado (*spray-dried plasma*, SDP, al 8%) o con un concentrado de inmuno-

globulinas (IC al 2%) pueden modular la respuesta inflamatoria frente a una inflamación pulmonar e intestinal. Se han utilizado ratones que recibieron las dietas experimentales (Control, SDP o IC) durante 14 días después del destete. La inflamación pulmonar se indujo mediante la administración intranasal de LPS (12,5 µg) el día 32 y transcurridas 6 h se les administró SEB (25 µg) por vía intraperitoneal. La respuesta inflamatoria se caracterizó por un aumento del reclutamiento de leucocitos en el lavado broncoalveolar y en los ganglios linfáticos mesentéricos (GLM), del porcentaje de monocitos y neutrófilos activados (P<0,05) y de la expresión de TNF-α e IFN-γ en ambas mucosas. Los dos suplementos atenuaron los efectos de la estimulación con SEB y LPS sobre los GLM (P<0,05) y la expresión de citoquinas pro-inflamatorias en la mucosa pulmonar, pero sólo el SDP redujo la activación de neutrófilos y monocitos pulmonares (P<0,05). Estos efectos se acompañaron de un incremento de la IL-10 en ambas mucosas (P<0,05), aunque sólo el SDP incrementó la expresión de TGF-β (P<0,05). La suplementación con proteínas plasmáticas atenúa la inflamación intestinal y pulmonar mediante el incremento de la expresión de citoquinas anti-inflamatorias.

La suplementación dietética con proteínas plasmáticas modula la respuesta inmunitaria intestinal frente a la enterotoxina B de *Staphyloccus aureus* en un modelo murino

Lluïsa Miró[1,2], Mònica Maijó[1], Javier Polo[2], Miquel Moretó[1] y Anna Pérez-Bosque[1]

[1]Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia; Institut de Nutrició i Seguretat Alimentària, Universitat de Barcelona. [2]APC Europe, Granollers, Barcelona.

Resumen

En animales de granja, la suplementación dietética con proteínas plasmáticas de origen animal se utiliza como alternativa al uso de antibióticos como promotores del crecimiento. Esta suplementación reduce la respuesta inflamatoria del tejido linfoide asociado al intestino (GALT) inducida por la enterotoxina B de *S. aureus* (SEB). El objetivo es estudiar como la suplementación con plasma atomizado (*spray-dried plasma*, SDP, al 8%) modula los efectos del SEB. Se emplearon ratones C57BL/6, alimentados con la dieta durante 14 días a partir del destete (día 19). El día 32 se les administró 25 µg de SEB por vía intraperitoneal para inducir una inflamación intestinal aguda. Transcurridas 24 h de la administración de la toxina, los animales presentaron un mayor reclutamiento de leucocitos en los ganglios linfáticos mesentéricos, y un incremento en la activación de linfocitos Th, así como un mayor porcentaje de poblaciones pro-inflamatorias (Th1, Th2 y Th17, P<0,05) sin alterar el porcentaje de linfocitos Th reguladores (Treg). La suplementación con SDP previno estos efectos e incrementó el porcentaje de Treg. En los animales tratados con SEB, aumentó la expresión de TNF-α y de IFN-γ (P<0,05) mientras que no se modificó la expresión de la citoquina anti-inflamatoria IL-10. Los animales que recibieron el SDP presentaron una menor expresión de estas citoquinas pro-inflamatorias y mostraron una mayor expresión de IL-10. La suplementación con el SDP atenúa la respuesta inflamatoria intestinal del GALT mediante el incremento de los mediadores anti-inflamatorios como la IL-10 y los Treg.

Eficacia de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 frente a una inoculación oral con *Salmonella typhimurium* o ETEC K88 en lechones

E Barba-Vidal[1], L Castillejos[1], A Busquets[1], M Rivero[2], JA Moreno[2] y SM Martín-Orúe[1]

[1]Servicio de Nutrición y Bienestar Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Spain: Emili.Barba@uab.cat. [2]Laboratorios Ordesa S. L., Parc Científic de Barcelona, C/Baldiri Reixac 15-21, 08028 Barcelona, Spain.

Resumen

Se evaluó un nuevo probiótico, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 (Laboratorios Ordesa S.L.) frente a patógenos digestivos utilizando dos modelos experimentales en lechón de salmonelosis o colibacilosis.

En cada ensayo se utilizaron 72 animales de 21 y 24 (±2) días respectivamente, distribuidos en 24 corrales y 4 grupos experimentales en un diseño 2x2: con o sin probiótico, e inoculados o no oralmente con el patógeno. El probiótico fue administrado diariamente vía oral (10^9ufc/d) y tras una semana de adaptación, se realizó una doble-inoculación con *Salmonella typhimurium* ($2x10^9$ y $6x10^9$ ufc/d) (ensayo 1) o *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) *K88* ($5x10^9$ y $6x10^{10}$ ufc/d) (ensayo 2).

Durante 8 días post-inoculación (PI) se controló la evolución clínica (consumos, peso y consistencia fecal) y se tomaron muestras fecales para microbiología. Los días 4 y 8 PI se recogió sangre para el análisis de TNF-α y muestras de raspados de mucosa ileal para analizar enterobacterias y coliformes adheridos.

La inoculación produjo en ambos casos un cuadro clínico leve con un empeoramiento de la consistencia fecal (P<0,001) y un incremento en los niveles plasmáticos de TNF-α (P<0,05). El probiótico no consiguió contrarrestar estos signos clínicos aunque sí redujo la excreción fecal de *Salmonella* (especialmente el día 3PI; P=0,04) y disminuyó el porcentaje de animales con contajes $>10^5$ufc/gr de coliformes en mucosa ileal a día 4 PI (58 *vs* 91%; P=0,07).

Los resultados demuestran que *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* CECT 7210 puede reducir la colonización intestinal por *Salmonella* y ETEC durante procesos entéricos leves.

MICROBIOLOGÍA Y VETERINARIA

Microbiota, microbioma y proteoma de origen bacteriano de la bilis y vesícula biliar porcina

Esther Jiménez[1], Borja Sánchez[2], Annarita Farina[3], Abelardo Margolles[4] y Juan M Rodríguez[1]

[1]Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid. [2]Departamento de Química Analítica y Alimentaria. Universidad de Vigo – Campus de Ourense, 32004 Ourense. [3]Department of Human Protein Sciences, University of Geneva, CH-1211 Geneva, Switzerland. [4]Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Paseo Río Linares s/n. 3330 Villaviciosa.

Resumen

En los últimos años, se han realizado numerosos estudios sobre la microbiota y el microbioma de las heces y de diferentes partes del tracto gastrointestinal de los mamíferos (estómago, intestino delgado y grueso); sin embargo, la microbiota de la bilis y de la vesícula biliar de hospedadores sanos no había sido caracterizada hasta el momento. La bilis es un fluido biológico sintetizado en el hígado, que se almacena y concentra en la vesícula biliar durante la digestión y que se libera en el duodeno tras la ingesta de los alimentos. Los ob-

jetivos de este trabajo han sido: (1) determinar la diversidad bacteriana presente en la bilis y en la mucosa de la vesícula biliar de cerdas sanas mediante técnicas dependientes e independientes de cultivo; y (2) conocer si existen proteínas de origen bacteriano en la bilis porcina. Los datos obtenidos revelaron que el ecosistema biliar porcino está poblado principalmente por miembros de los Filos Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes. Las técnicas de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) y de microscopía electrónica de transmisión (TEM) permitieron la visualización de bacterias de diferentes morfologías en estrecha asociación con células del epitelio biliar y eritrocitos. De entre las 214 proteínas identificadas en las muestras de bilis, 22 eran de origen bacteriano. En conclusión, la bilis y la vesicular biliar de hospedadores sanos parece contener su propia microbiota. Este trabajo podría servir de base para futuros estudios sobre la relación entre la microbiota biliar, la microbiota intestinal y la salud.

Evaluación de propiedades probióticas de *Lactobacillus paraplantarum* LC29, una cepa aislada a partir de leche humana, para su aplicación en el tratamiento de mastitis

Nivia Cárdenas, Rebeca Arroyo, Virginia Martín y Juan M Rodríguez
Dpto. de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid.

Resumen
Las mujeres lactantes constituyen una población en la que la administración de probióticos es particularmente interesante dado que la modulación de su microbiota puede tener un impacto relevante sobre su salud y la de sus hijos. En este sentido, la leche humana parece una fuente ideal de bacterias para su aplicación como probióticos en el tratamiento de las mastitis. El objetivo del trabajo fue la evaluación de diversas propiedades probióticas de *Lactobacillus paraplantarum* LC29, una cepa previamente aislada a partir de leche humana. La cepa se identificó al nivel de cepa y se secuenció su genoma. *Lb. paraplantarum* LC29 mostró una amplia actividad antimicrobiana frente a bacterias patógenas relevantes en al ámbito materno-infantil (*Listeria monocytogenes, E. coli, Klebsiella pneumoniae, Salmonella spp.*) y fue especialmente activa frente a diversas bacterias frecuentemente asociadas con mastitis, incluyendo *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis* o *Enterococcus faecalis*. Paralelamente, mostró una gran capacidad de coagregación con diversas cepas de estas mismas especies. La viabilidad de la cepa durante su tránsito gastrointestinal y su capacidad para adherirse a células Caco-2, HT-29 y mucinas fueron elevadas. Por otra parte, no fue capaz de degradar mucinas, no produjo aminas biógenas y no mostró actividades enzimáticas potencialmente nocivas. El genoma de la cepa carece de genes transmisibles asociados con resistencia a antibióticos. Los ensayos de toxicidad mostraron que la cepa es segura en modelos animales. Globalmente, los resultados obtenidos sugieren que la cepa puede ser útil para su aplicación como probiótico en el tratamiento de las mastitis.

In vitro evaluation of the effect of glycosyl inositols on human gut microbiota

L Ruiz-Aceituno[1], ML Sanz[1], L Ramos[1], M Blaut[2] and A Braune A[2]
[1]Institute of Organic Chemistry - Spanish Research Council (CSIC). Department of Instrumental Analysis and Environmental Chemistry, Madrid (Spain). [2]German Institute of Human Nutrition Potsdam-Rehbruecke, Department of Gastrointestinal Microbiology, Nuthetal (Germany).

Abstract
In recent years, there is much interest in dietary approaches that modulate the gut microbiota composition towards improving health. Prebiotics are mainly oligosaccharides that are not digested by the human host and reach the large intestine where they are selectively fermented by beneficial bacteria (lactobacilli and bifidobacteria) and not by those that apparently can be harmful (Bacteroides and Clostridium species) (1).
Several studies have revealed the presence of different glycosyl inositols in legumes (2). However, to the best of our knowledge, there have been no studies investigating the prebiotic activity of these compounds. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effects of glycosyl inositols on the composition and activity of the human intestinal microbiota.
Galactinol commercial standard and ciceritol isolated by semipreparative HPLC from an inositol-enriched chickpea extract (2) were submitted to *in vitro* fermentation using batch culture systems at 37 ºC under strict anoxic conditions with human fecal suspensions for 6 and 24 h. Galactooligosaccharides (GOS) were used as positive controls.
Quantitative changes in the bacterial community were evaluated by qRT-PCR. The bifidobacteria population experienced a significant increase during incubation when galactinol or ciceritol were used as carbon source and similar to that found for GOS. In addition, an increase of acetic, propionic and butyric acid concentrations, measured by GC, was observed during fermentation of the glycosyl inositols.
This is the first time that bifidogenic properties are attributed to glycosyl inositols, suggesting their possible application as prebiotics.

Estudio de la resistencia gastrointestinal *in vitro* de un Simbiótico y su capacidad de modulación de la microbiota Intestinal

B Viadel[1], S Porta[1] y A Monsell[2]
[1]AINIA Centro Tecnológico. C/ Benjamín Franklin, 5-11 Paterna (Valencia). [2]LABINDERB C/Alfauir s/n P.I. Les Mases Rótova (Valencia).

Resumen
Los simbióticos constituyen una mezcla de probióticos y prebióticos destinada a aumentar la supervivencia de las bacterias que promueven la salud. Para lograr los efectos beneficiosos que aportan se requiere que los microorganismos lleguen viables al intestino. El *objetivo* del presente trabajo es el estudio de la capacidad de modulación de la microbiota intestinal de un simbiótico mediante la aplicación de un sistema dinámico *in vitro.*
Metodología: Los ensayos de fermentación colónica se llevan a cabo mediante la utilización del Digestor *in vitro* de Fermentación Colónica, constituido por 5 reactores: estómago, intestino y colon ascendente, trasversal y descendente. Durante el periodo basal se inocula flora fecal humana en los 3 reactores del colon y se simula el ambiente colónico. Una vez estabilizada la microbiota, durante el periodo de tratamiento se alimenta el primer reactor (estómago) tres veces al día con el simbiótico objeto de estudio. Se lleva a cabo la toma de muestras a diferentes tiempos y se cuantifica la población bacteriana mediante la siembra en medios de cultivos generales y selectivos para los siguientes grupos microbianos: *Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterobacteriaceae, Anaerobios totales y Clostridium.*

Resultados: tras el periodo de tratamiento se observa un incremento en los niveles de bifidobacterias y lactobacilos, superando los dos y tres ciclos logarítmicos, respectivamente respecto a los niveles basales.
Conclusiones: la incorporación diaria del simbiótico tiene una influencia notable en la flora fecal humana, ya que produce un incremento de aquellos grupos microbianos con efecto beneficioso para la salud, respecto al resto de microbiota fecal.

Changes in fecal microbiota composition and prebiotic effect of cocoa fiber in wistar rats

Malén Massot-Cladera[1], Àngels Franch[1], Margarida Castell[1] y Francisco J Pérez-Cano[1]
[1]Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain. Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA), Barcelona, Spain.

Abstract
Cocoa contains fiber and polyphenols that can directly influence the intestinal ecosystem. In this sense, previous studies performed in our laboratory showed that a diet containing distinct doses and profile of cocoa polyphenols were able to affect the growth of certain species of rat's gut microbiota[1,2]. As cocoa is also considered a rich source of fiber, the aim of the present study was to ascertain whether cocoa fiber could also contribute to this microbiota modulatory effect. For this purpose, Wistar rats were fed, for three weeks, either a standard diet, a diet containing 10% cocoa (with 0.4% polyphenols, 5.5% soluble fiber and 16.5% insoluble fiber), or two other diets with same proportion of insoluble fiber: one based on cocoa fiber and other containing inulin. Fecal samples were collected the last day of the intervention to characterize the microbiota composition by FISH-coupled to flow cytometry analysis using specific probes directed to 16S rRNA of main bacteria groups. Both diets containing cocoa compounds produced differential changes in microbiota composition at the end of the study. The intake of the cocoa fiber-based diet without polyphenols, similarly to that happens in the inulin group, significantly reduced the proportion of *Bacteroides* whereas increased the percentage of *Bifidobacterium and Lactobacillus* groups compared to those in reference animals. However, these effects were not found with the intervention with cocoa diet. These results demonstrate that the fiber present in cocoa exerts a prebiotic effect by promoting the growth of the beneficial bacteria present in rat intestine.

Referencias:
1. M. Massot-Cladera, et al. (2012) Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk, *Arch Biochem Biophys* 15, 105-112.
2. M. Massot-Cladera et al. (2014) Impact of cocoa polyphenol extracts on the immune system and microbiota in two strains of young rats. *Br J Nutr. (in press).*

Análisis de los genes implicados en la utilización de L-fucosa en *Lactobacillus rhamnosus* GG

JE Becerra, MJ Yebra y V Monedero
Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos. IATA-CSIC. Av. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia, Spain.

Resumen
La L-fucosa es un azúcar presente en secreciones humanas formando parte de los oligosacáridos de la leche materna, mucinas y otros glicoconjugados de la superficie del epitelio intestinal. Así, su concentración es relativamente alta en el intestino y su utilización como fuente de carbono proporciona a algunas especies de bacterias una ventaja para su desarrollo en este nicho. *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) es un importante probiótico que posee en su genoma una agrupación de genes que codifican una permeasa (*fucP*) y una ruta catabólica para L-fucosa (*fucI, fucK, fucU* y *fucA*) putativas, junto a un regulador transcripcional (*fucR*). Mutantes en *fucI*, *fucP* y *fucR* en la cepa LGG confirman el papel de estos genes en el metabolismo de este carbohidrato. Un análisis transcripcional mostró que los genes *fuc* se inducen por la presencia de L-fucosa y están sujetos a una fuerte regulación por represión por catabolito. La inducción por L-fucosa está mediada por el regulador transcripcional FucR, que funciona como un activador transcripcional y es necesario para el crecimiento con este azúcar. LGG también es capaz de utilizar fucosil-disacáridos, probablemente debido a la presencia de genes de α-L-fucosidasas en su genoma. El crecimiento sobre fucosil-(α-1,3)-*N*-acetilglucosamina induce los genes *fuc* y, contrariamente a otros lactobacilos capaces de utilizar este disacárido, LGG es capaz de metabolizar la porción de L-fucosa generada. Esta es la primera vez que un operón para la utilización de L-fucosa se caracteriza en lactobacilos y constituye un nuevo ejemplo de las múltiples características presentes en LGG que permiten a esta cepa adaptarse al tracto gastrointestinal.

Influencia del prebiótico FOS G como aditivo en crías porcinas

Yanelys García[1], Lazara Ayala[1], Nereyda Alvelo[1], Ramón Bocourt Salabarría[1], Manuel J Castro[1], Lázaro Hernández[2], Luis E Trujillo[2], Juan Arrieta[2] y Luis E Hernández[1]
[1]Instituto de Ciencia Animal. Carretera Central, km 47½, apartado 24, San José de las Lajas, Mayabeque. Email: ygarcia@ica.co.cu. [2]Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, playa. La Habana.

Resumen
El trabajo tuvo como objetivo evaluar el prebiótico FOS-G en crías porcinas. Para ello se emplearon cerdos en la etapa de cría, mestizos provenientes del cruzamiento entre hembras York-Land con machos CC_{21} y Duroc, 4 tratamientos y 5 camadas por tratamientos (140 animales), en la unidad porcina del ICA. Se empleo un diseño de bloques al azar y se determinaron los siguientes indicadores productivos: peso al nacer, peso al inicio del experimento, peso al destete, GMD desde el inicio hasta el final del experimento, consumo y conversión. En los indicadores de salud se determinó hemoglobina y hematocrito, mortalidad y presencia de diarreas. El empleo del prebiótico FOS G, logró incrementos en los indicadores productivos: el peso final y la GMD fue superior en el grupo tratado con FOS G 0,25%, con respecto al resto de los tratamientos (P<0,001). Los grupos tratados con prebiótico lograron un menor consumo de alimento con una mejor conversión con respecto al grupo control (P<0,001). También en los tratamientos con prebióticos disminuyeron las incidencias de diarreas con respecto al control. Por lo que, el empleo de aditivos prebióticos como el FOS G en cría porcinas mejora el estado de salud y productivo en esta categoría animal y constituye una alternativa promisoria en porcicultura.

Intestinal epithelial barrier function disrupted by *Salmonella* dublin is protected by salmosan

M Teresa Brufau[1], Sergi Carné[2], Josep Mascarell[2], Ruth Ferrer[1] and Raquel Martín-Venegas[1]

[1]Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. [2]Industrial Técnica Pecuaria S.A. (ITPSA), Barcelona. raquelmartin@ub.edu.

Abstract
Salmonellosis is the second most commonly reported foodborne disease in the European Union. Although *Salmonella* Enteritidis and Typhimurium are the serovars most frequently associated with human illness, *Salmonella* Dublin is more invasive in humans and the clinical course more severe (EFSA, 2009, EFSA J, 1036:36-68). Mannan oligosaccharides (MOS) are mannose rich substrates with beneficial effects on intestinal function by enhancing the mucosal immune system (Gaggia et al., 2010, Int J Food Microbiol, 141:S15-S28). Recently, we have observed that Salmosan®, a leguminous gum rich in MOS (ITPSA, Barcelona), is able to reduce the expression of proinflammatory cytokines induced by *Salmonella* Typhimurium infection in ileal pig cells *in vitro* (Badia et al., 2012, Clin Vaccine Immunol 19:368-376). The aim of this study was to investigate the role of Salmosan® in the prevention of the disruption of epithelial barrier function induced by *Salmonella* Dublin (CReSA, Bellaterra). Epithelial barrier function was assessed from transepithelial electrical resistance and D-mannitol and FD-4 fluxes in an *in vitro* model of intestinal Caco-2 cell cultures. The localization of tight junction proteins was studied by immunofluorescence. The results show that Salmosan® was able to prevent the increase in paracellular permeability induced by *Salmonella* Dublin avoiding tight junction protein delocalization. In conclusion, the data indicating that Salmosan® protects epithelial barrier function, thus reducing paracellular passage of potentially harmful agents, would give an additional value to the use of this MOS as a prebiotic.

Intestinal infection by *Salmonella* enteritidis is prevented by salmosan

M Teresa Brufau[1], Sergi Carné[2], Josep Mascarell[2], Ruth Ferrer[1] and Raquel Martín-Venegas[1]
[1]Departament de Fisiologia, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona. [2]Industrial Técnica Pecuaria S.A. (ITPSA), Barcelona. raquelmartin@ub.edu.

Abstract
Mannan oligosaccharides (MOS) are mannose rich substrates derived from yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell walls which are described to agglutinate Gram negative bacteria thus exerting beneficial effects in the prevention of intestinal infections. *Salmonella* can adhere to mannan oligosaccharides (MOS) by mannose-specific lectins in type-1 fimbriae, thus competing for adhesion to glycoproteins of the intestinal epithelium, which are also rich in mannose (Spring et al., 2000, Poult Sci, 79:205-211). The aim of this study was to investigate the potential role of Salmosan®, a leguminous gum rich in MOS (ITPSA, Barcelona), to prevent intestinal infection by *Salmonella* Enteritidis in an *in vitro* model of Caco-2 cells in culture. Caco-2 cells inoculated with *Salmonella* Enteritidis (CReSA, Bellaterra) were processed to be observed by scanning electron microscopy (SEM). To investigate monolayer infection, the homogenates of inoculated cultures were plated in tryptone soy agar to count the number of colony former units. SEM images reveal the spherical structure Salmosan® with salmonellae attached to the surface and thus reducing the density in surrounding bacteria adhered to the epithelium. Salmosan® is also able to significantly reduce the number of bacteria inside the epithelium. These results indicate that feed supplementation with this product could be a nutritional strategy to reduce the intestinal prevalence of *Salmonella* Enteritidis which is one of the leading causes of salmonellosis.

¿Puede convertirse la aceituna de mesa en un alimento simbiótico?

Francisco Noé Arroyo López, Francisco Rodríguez Gómez, Verónica Romero Gil, Antonio Benítez Cabello, Beatriz Calero, Antonio Garrido Fernández y Rufino Jiménez Díaz
Departamento de Biotecnología de Alimentos. Instituto de la Grasa. Agencia Estatal Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Sevilla.

Resumen
La aceituna de mesa posee todas las características saludables del aceite de oliva así como otros componentes de alto valor biológico. De este modo, las aceitunas de mesa aportan lípidos cardiosaludables, vitaminas A y E, antioxidantes naturales, fibra dietética, ácido maslínico, etc., por lo que puede considerarse como un alimento funcional. Pero a este alimento fermentado se le podría dotar de un mayor valor añadido, demostrando además que los microorganismos asociados a la epidermis de los frutos durante la fermentación presentan características saludables para el consumidor final (probióticos), y que ciertos componentes de la aceituna (fibra dietética, exopolisacaridos del biofilm, etc.) pueden favorecer el desarrollo de la flora intestinal humana o de los mismos microorganismos que transporta (prebióticos). De este modo, la aceituna de mesa, como vegetal fermentando, podría convertirse en vehículo de entrada de microorganismos probióticos al cuerpo humano, especialmente interesante para personas intolerantes a la lactosa o que necesitan de una dieta baja en colesterol.
En este sentido, el estudio de las principales características tecnológicas, funcionales y potencialmente probióticas de aislamientos autóctonos de la aceituna de mesa es de especial interés y puede conducir al desarrollo de cultivos mixtos multifuncionales (levaduras-bacterias lácticas) capaces de dirigir la fermentación. Los trabajos también deben ir encaminados al desarrollo de ensayos clínicos que demuestren las características saludables de aceitunas portadoras de microorganismos seleccionados en base a sus características probióticas. Estos trabajos requieren de equipos multidisciplinares, ya que se emplean técnicas de metagenómica, microbiología, bioestadística, biomedicina, microscopía electrónica y química analítica.

El modelo *in vivo* pez cebra para evaluar las propiedades probioticas de bacterias en acuicultura

Iñaki Iturria[1], Montserrat Nacher-Vazquez[2], David G-Valcarce[3], Vanesa Robles[3], Sandra Rainieri[1], Paloma López[2] y Miguel Ángel Pardo[1]
[1]Unidad de Investigación Alimentaria. AZTI-Tecnalia, Parque Tecnológico de Bizkaia, Astondo Bidea, Edificio 609 E-48160 Derio, Bizkaia, Spain. E-mail: mpardo@azti.es [2]Departamento de Microbiología Molecular Centro de Investigaciones Biológicas CSIC-CIB, C/ Ramiro de Maeztu 9 28040 Madrid Spain. [3]Departamento de Biología Molecular, Área de Biología Celular, Universidad de León, 24071, León, Spain.

Resumen
La acuicultura es uno de los sectores de producción de alimentos de más rápido crecimiento con un máximo histórico de producción en 2012, proporcionando casi la mitad del pescado destinado a la alimentación humana. Una de

las mayores limitaciones a la expansión de este sector son las pérdidas causadas por brotes infecciosos, generalmente oportunistas, provocados primordialmente por la presión medioambiental, el hacinamiento, etc. Durante las últimas décadas, se han utilizado sobretodo antibióticos para minimizar las pérdidas económicas causadas por enfermedades. Sin embargo, su uso no es aconsejable debido al riesgo potencial de transferir resistencias bacterianas desde el medio ambiente acuático al ser humano. Una alternativa es suplementar la dieta con probióticos que mejoren el bienestar general de los peces, aunque en la actualidad solo hay una cepa probiótica (*Pediococcus acidilactici* MA 18/5M; BACTOCELL®) autorizada en la Unión Europea para su uso en acuicultura. El uso del modelo de pez cebra (*Danio rerio*) es una potente herramienta que puede ayudar a dilucidar las propiedades probióticas de un microrganismo *in vivo*. Durante los últimos años, hemos establecido varias colaboraciones con el objetivo de optimizar modelos *in vivo*, en larvas y adultos de pez cebra, para estudiar la capacidad colonizadora de bacterias en sistemas "*germ-free*", su efecto inmunomodulador, mejora en la reproducción, capacidad anti-inflamatoria y capacidad protectora frente a una infección oportunista producida por el patógeno *Vibrio anguillarum*. En esta presentación se expondrán los principales resultados y logros alcanzados en el uso del modelo pez cebra para evaluar la capacidad probiótica de microorganismos.

Evaluación del efecto probiótico de un cultivo concentrado de *Lactobacillus casei* CECT 4043 en lechones destetados, durante los períodos de administración y postadministración

Paula Fajardo Bernárdez[1], Jesús Méndez Batán[2], Lorenzo Pastrana Castro[3] y Nelson Pérez Guerra[3]
[1]ANFACO-CECOPESCA, Campus Universitario de Vigo, 36310 Vigo, España. [2]Cooperativas Orensanas Sociedad Cooperativa Ltda (COREN), Polígono San Ciprián de Viñas, 32901 Ourense, España. [3]Departamento de Química Analítica y Alimentaria, Facultad de Ciencias de Ourense, Universidad de Vigo. As Lagoas s/n, 32004, Ourense. España.

Resumen
En el presente trabajo se estudia el potencial de un preparado probiótico de *Lactobacillus casei subsp. casei* CECT 4043 (conteniendo tanto las células como los productos de la fermentación), para ser utilizado como aditivo en piensos para lechones destetados.
Para estudiar el efecto del preparado sobre la ganancia de peso corporal (GPC), el consumo de pienso (CP), la eficiencia de conversión de alimento (ECP) y en los conteos de coliformes fecales (CCF), los animales se dividieron en tres grupos que recibieron respectivamente, pienso suplementado con el preparado probiótico, avilamicina o pienso no suplementado (control), durante un período de 28 días. Al final del periodo de administración, los grupos que recibieron probiótico y avilamicina exhibieron los valores de GPC más elevados, aunque no se observaron diferencias significativas en los valores de CP y ECP entre los tres grupos ($P < 0,05$).
Al final de todo período experimental (42 días), el grupo control presentó el valor de CP más bajo, el grupo probiótico presentó la mayor ECP, mientras que el grupo antibiótico presentó la GPC más alta ($P < 0,05$). Adicionalmente, los cerdos alimentados con pienso probiótico presentaron valores de GPC similares a los del grupo control ($P < 0,05$).
Durante el periodo de administración, los conteos de coliformes fecales disminuyeron (aunque no significativamente) en los tres grupos. Sin embargo, durante el periodo de postadministración (29-42 días) los CCF se incrementaron nuevamente hasta valores muy similares a los obtenidos antes del inicio del experimento.

Efecto de las vesículas de membrana externa de *Escherichia coli* comensal y probiótic sobre la regulación de la respuesta inmunitaria en PBMCs

Laura Aguilera[1], Maria José Fábrega[1], Josefa Badia, Laura Baldomà y Rosa Giménez[2]
[1]Estos autores han contribuido por igual. [2]Departamento de Bioquímia y Biología Molecular, Facultad de Farmacia, Universidad de Barcelona, Instituto de Biomedicina de la UB (IBUB).

Resumen
Escherichia coli Nissle 1917 (EcN) es un excelente colonizador del intestino humano y un probiótico ampliamente utilizado en el tratamiento de patologías inflamatorias intestinales. Diversos estudios han demostrado que no existe un contacto directo entre la microbiota y el epitelio intestinal. En este sentido, las vesículas de membrana externa (OMVs) liberadas por bacterias gram-negativas constituyen un mecanismo de interacción a distancia entre la microbiota y el epitelio. El objetivo de este trabajo es determinar si el transporte de mediadores a través de OMVs es uno de los mecanismos mediante los cuales la cepa EcN, así como la cepa comensal EcoR12, ejercen sus efectos sobre la respuesta inmunitaria. Con este fin se han incubado OMVs y lisados obtenidos de estas cepas con células mononucleares aisladas de sangre periférica (PBMCs) como modelo de barrera intestinal dañada. Tras 24h de incubación, se ha analizado la liberación de diversas citoquinas mediante ELISA y/o citometría de flujo. Los resultados muestran un aumento estadísticamente significativo para la liberación de TNFα, MIP1α e IL-6 tanto en las estimulaciones con OMVs como con lisados de ambas cepas. No se observaron diferencias en la secreción de IL-2, IL-8, IL-10 e IL-12. Como modelo de barrera intestinal íntegra, actualmente se están realizando estimulaciones con co-cultivos de células Caco-2 polarizadas en filtros de policarbonato transwell (apical) sobre PBMCs (basolateral). Este estudio demuestra que las OMVs de cepas comensales y probióticas contienen factores capaces de estimular la respuesta inmunitaria del huésped a nivel intestinal.

Prevalencia del gen Sat en aislados naturales de *Escherichia coli* de origen intestinal

Carina Alvarez, Lorena Toloza, Rosa Giménez, Laura Baldomà y Josefa Badía
Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, Institut de Biomedicina de la UB (IBUB).

Resumen
E. coli Nissle 1917 (EcN) es un probiótico utilizado en patologías intestinales por sus efectos positivos sobre la barrera y el sistema inmune intestinal. EcN es un excelente colonizador del intestino, si bien está evolutivamente relacionada con cepas uropatógenas y mantiene en su genoma genes considerados de virulencia, como el gen que codifica a la serin-proteasa Sat.
Estudios previos de nuestro grupo mostraron sin embargo que la expresión de *sat* en la cepa probiótica no produce citotoxidad ni comporta alteraciones en la permeabilidad pa-

racelular de células Caco-2. En este trabajo analizamos la prevalencia del gen *sat* en 35 cepas de *E. coli* de la colección de referencia EcoR aisladas de heces de individuos sanos. El análisis por PCR, utilizando oligonucleótidos que amplifican la región interna del gen que codifica el dominio secretado de la proteasa, mostro 10 aislados positivos (28,6%). Estos pertenecen mayoritariamente a grupos filogenéticos asociados a cepas que causan infecciones extraintestinales (7 del grupo D y 2 del grupo B2); el otro pertenece al grupo filogenético A. La expresión de *sat* fue evaluada mediante inmunodetención de la proteína secretada al medio de cultivo con anticuerpos anti-Sat. De los 10 aislados, 9 dieron positivos en el análisis por *Western blot*. El análisis de 4 cepas aisladas de orina de pacientes con infección urinaria mostró la presencia y expresión de *sat* en todas ellas. Aunque Sat contribuye a la patogenicidad en el tracto urinario, la elevada prevalencia de *sat* en cepas de la microbiota intestinal de individuos sanos sugiere que esta proteína no actuaría como factor de virulencia en el entorno intestinal.

Prueba de campo de nuevo producto probiótico experimental para lechones lactantes

Lorena Álvarez, Marta García, Rubén Miranda, Sara Costillas, Ana Carvajal y Pedro Rubio
Aquilón CyL S.L. y Departamento de Sanidad Animal (Enfermedades Infecciosas), Facultad de Veterinaria, Universidad de León.

Resumen
La presión regulatoria en el uso de antibióticos en producción animal hace imprescindible encontrar alternativas. En lechones recién nacidos son comunes los problemas de diarrea con deshidratación de los animales, retraso del crecimiento y aumento de la mortalidad, que puede ser elevado y que suelen estar causadas por bacterias habituales en la flora intestinal del lechón, principalmente *Escherichia coli* y *Clostrium difficile* que pueden actuar solos o asociados a otros microorganismos. En condiciones de disbiosis intestinal, los tratamientos antibióticos generalmente contribuyen a alterar la microbiota intestinal agravando el cuadro clínico.
Aquilón CyL, una spin-off de la Universidad de León, ha desarrollado un probiótico específico para el control de este tipo de diarreas. Se realizó un estudio en una granja situada en la CA de Aragón con un problema generalizado de diarreas en lechones de menos de 3 días de vida para probar en condiciones de campo la eficacia del probiótico. Se utilizaron lechones recién nacidos de 20 camadas. La mitad (10 camadas) recibieron el tratamiento probiótico y la otra mitad se dejó como control. En ambos grupos se registraron los parámetros principales: peso inicial y final, mortalidad, porcentaje de diarreas e índice de tratamientos antibióticos. Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo tratado y el control en los parámetros citados. En conclusión, un producto probiótico adecuadamente diseñado y aplicado es una herramienta útil para el control de las diarreas neonatales en lechones y contribuye significativamente a un menor empleo de antibióticos en la producción porcina.

Cambios en la expresión génica de *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* productoras de EPS inducidos por la presencia de células epiteliales humanas

Noelia Martínez[1], Borja Sánchez[2], Abelardo Margolles[1] y Patricia Ruas-Madiedo[1]
[1]Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC). Paseo Río Linares s/n. 33300 Villaviciosa (Asturias). [2]Grupo de Nutrición y Bromatología, Departamento de Química Analítica y Alimentaria, Facultad de Ciencias, Universidad de Vigo. Campus de Ourense, 32004 (Ourense).

Resumen
En los ultimos años han aumentado las evidencias sobre la relación existente entre la *microbiota intestinal* y la salud. No se conoce con certeza en qué consiste esta *microbiota saludable* pero se sabe que un desbalance de la misma está relacionado con ciertas enfermedades. Esto, junto con el aumento de evidencias cientificas sobre su eficacia, ha incrementado el uso de probióticos para intentar equilibrar la microbiota. Las bacterias probioticas de mayor uso pertenecen a los géneros *Lactobacillus y Bifidobacterium.* Entre las bifidobacterias destaca la utilización comercial de la especie *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.
Resulta de gran importancia profundizar en el conocimiento del efecto de la interacción hospedador – probiótico para lo que se pueden utilizar modelos de lineas celulares intestinales. En el caso del probiótico es recomendable trabajar con aquella fracción bacteriana que ha estado intimamente unida a la célula eucariota, que será la que, en teoría, ejerza el mayor efecto. El porcentaje de adhesión a la célula eucariota así como la facilidad para separar la población adherida, tanto de la bacteria no adherida como de la línea celular, son claves para abordar estudios transcriptomicos. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue optimizar un protocolo de extracción del RNA de la población de cepas de *B. animalis* subsp. *lactis,* productoras de distintos exopolisacáridos (EPS), adherida a la línea celular de colon HT29. Este hecho nos permitió estudiar la expresión génica diferencial entre dos cepas isogénicas que únicamente difieren en el tipo de EPS que producen, los cuales inducen respuestas inmunes diferentes.

Obtención de cepas recombinantes de *B. animalis* subsp. *Lactis* productoras de exopolisacáridos

Nuria Castro-Bravo[*1], Claudio Hidalgo-Cantabrana[1,2], Pablo Álvarez-Martín[2], Michele Delley[2], Bernard Berger[2], Patricia Ruas-Madiedo[1] y Abelardo Margolles[1]*
[1]Departamento de Microbiología y Bioquímica, Instituto de Productos Lácteos de Asturias – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC. [2]Department of Food and Health Microbiology, Nestlé Research Center, Ver-chez-les-Blanc, Lausanne, Switzerland nuria.castro@ipla.csic.es.

Resumen
Los exopolisacáridos (EPS) son carbohidratos sintetizados por algunas bacterias, que pueden permanecer anclados a la pared o formar una matriz extracelular. Suponen cambio adaptativo para la cepa productora ya que modifican su supervivencia y colonización del tracto gastrointestinal.
En nuestro grupo hemos comprobado que la cepa de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* A1dOxR, productora de EPS y con fenotipo ropy, presenta una mutación puntual en el gen *wzz*, que genera la síntesis de un EPS de alto peso molecular con elevado porcentaje en ramnosa, el cual tiene un efecto activador del sistema inmune 1. Hemos desarrollado un modelo de trabajo basado en el uso de cepas recombinantes de *B. animalis* subsp. *lactis*, que nos permitirá comparar *in vitro* los efectos de diferentes EPS, tanto desde el punto de vista de la bacteria productora como de las líneas celulares humanas con las que puede interaccionar. Para ello, a partir

de la cepa tipo DSM10140, y mediante reemplazamiento génico, hemos generado un mutante en el que se ha sustituido en el cromosoma bacteriano el gen *wzz* por el gen *wzzS89L* (proveniente de la cepa A1dOxR). De esta manera hemos obtenido una cepa ropy isogénica, que difiere genéticamente de la parental en un sólo nucleótido. Este modelo servirá para evaluar el potencial probiótico de las cepas productoras de distintos EPS, así como la función biológica de éstos.

Pectins and pectic oligosaccharides derived from Lemon peel wastes and sugar beet pulp: comparative *in vitro* evaluation of the prebiotic effects

*B Gómez[1,3], B Gullón[2], R Yáñeza[3], J C Parajó[1,3] and J L Alonso[1,3]**
[1]Department of Chemical Engineering. Faculty of Science. University of Vigo (Campus Ourense). As Lagoas, 32004 Ourense, Spain, [2]CBQF, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa. Rua Dr. António Bernardino de Almeida 4200-072 Porto, Portugal, [3]CITI-Tecnopole. San Ciprián de Viñas, 32901 Ourense, Spain. *Author for correspondence (phone: +34988387233, fax: +34988387001, email: xluis@uvigo.es).

Abstract
Prebiotics are non-digestible dietary compounds that stimulate the growth or activity of the indigenous microbiota, resulting in health benefits. Recently, pectin derived oligosaccharides (POS) have been proposed as promising prebiotic candidates as they can have improved and additional biological properties.
Several studies have been carried out for obtaining POS mixtures from multiple sources (citrus peels, apple pomace or sugar beet pulp) using a variety of techniques including enzymatic hydrolysis or hydrothermal processing followed by a sequence of purification steps such as membrane filtration. As a result, mixtures of oligomers are obtained with a variable purity degree, sugar composition, molecular weight and degree of esterification, and, as it was reported, the physic-chemical properties can play an important role on their biological properties. This work deals with: a) the chemical characterization of POS obtained from lemon peel wastes and sugar beet pulp and, b) the *in vitro* evaluation of their prebiotic potential using fecal inocula from healthy adult volunteers. Commercial FOS and pectins were also used for comparisons.

In vitro evaluation of the effects of pectic oligosaccharides obtained from orange peel wastes on the human microbiota

B Gómez[1,3], B Gullón[2], R Yáñeza[1,3], J C Parajó[1,3] and J L Alonso[1,3]*
[1]Department of Chemical Engineering. Faculty of Science. University of Vigo (Campus Ourense). As Lagoas, 32004 Ourense, Spain. [2]CBQF, Escola Superior de Biotecnologia, Universidade Católica Portuguesa. Rua Dr. António Bernardino de Almeida 4200-072 Porto, Portugal. [3]CITI-Tecnopole. San Ciprián de Viñas, 32901 Ourense, Spain. *Author for correspondence (phone: +34988387075, email: bgomez@uvigo.es).

Abstract
The increasing interest for accessing to healthy and quality food has boosted the research in the field of prebiotics, ingredients that beneficially stimulate the intestinal microbiota of the consumer.
Nowadays, there are many types of prebiotics under study and a variety of new processes and raw materials are being employed in their production.
Huge amounts of citrus peels are generated as a byproduct every year in juice industries and used as animal feed and as a source of pectin (a heteropolysaccharide of highly complex structure that is used as food additive). However, it can also be used as starting material for producing mixtures of non-digestible pectic-oligosaccharides (POS), a type of oligosaccharides considered as new prebiotic candidates but whose study is still in an early stage.
This work is a contribution to the development of production processes of new prebiotics derived from agroindustrial byproducts rich in pectin. The specific targets were: a) the chemical and structural characterization of POS mixtures obtained from orange peel wastes (OPW) by hydrothermal treatment and purified by membrane technology, and b) the comparative evaluation (against commercial pectin and FOS) of their prebiotic potential by *in vitro* fermentation assays using human fecal inocula in which the generation of short-chain fatty acids was determined by HPLC and a large number of bacterial groups (*Bifidobacterium, Lactobacillus, Bacteroides, Clostridium, Atopobium, Eubacterium, Faecalibacterium and Roseburia*) were quantified by fluorescent *in situ* hybridization (FISH).

Protective effects of Lactococci strains delivering either IL-10 protein or cDNA in a TNBS-induced chronic colitis model

Rebeca Martín[2,3,+], Silvina del Carmen[1,+], Tessália Saraiva[4], Meritxell Zurita-Turk[4], Anderson Miyoshi[4], Vasco Azevedo[4], Alejandra de Moreno de LeBlanc[1], Philippe Langella[2,3], Luis G Bermúdez-Humarán[2,3,] and Jean Guy LeBlanc[1]*
[1]Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET). Chacabuco 145, San Miguel de Tucumán, Argentina (T4000ILC). [2]INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France. [3]AgroParisTech, UMR Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France. [4]Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (UFMG-ICB), Belo Horizonte, MG, Brazil.

Abstract
Oral treatment with *Lactococcus (L.) lactis* strains secreting the anti-inflammatory cytokine IL-10 has previously shown success as a therapy for inflammatory bowel diseases (IBD). Our aim was to compare the protective effects of IL-10, delivered by recombinant lactoccoci using two novel expression systems, in a murine colitis model mimicking the relapsing nature of IBD. The first system is based on a Stress-Inducible Controlled Expression (SICE) system for the production and delivery of heterologous proteins at mucosal surfaces and the second allows the delivery to the host cells of an *il-10* cDNA cassette, harbored in a eukaryotic DNA expression vector (pValac). Colitis was induced in female BALB/c mice by intrarectal injection of 2,4,6-trinitrobenzenesulphonic acid (TNBS). Mice that recovered received one of the bacteria treatments or saline solution orally during 14 days. Colitis was reactivated 25 days after the first TNBS injection with a second TNBS challenge. Three days after colitis reactivation, cytokine profiles and inflammation in colon samples were evaluated. Animals (N=9) receiving *L. lactis* strains secreting IL-10 using SICE system or delivering pValac:*il-10* plasmid showed lower weight loss ($p<0.005$), lower damage scores ($p<0.005$) and immune activation in their large intestines compared to inflamed non-treated mice. Our results confirm the protective effect of IL-10 delivered either as a protein or as a cDNA in a colitis model mimicking the relapsing nature of IBD and provides a step further in the "proof-of-concept" of genetically engineered bacteria as a valid system to deliver therapeutic molecules at mucosal level.

Purificación a escala semi-preparativa de lacto/galacto-N-biosa y su evaluación *in vitro* como potenciales prebióticos

Autores: Gonzalo N Bidart[1], Jesús Rodríguez-Díaz[1], Francisca Gallego[2], Alberto Marina[2] y María Jesús Yebra[1]
[1]Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, Av. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna. [2]Unidad de Cristalografía de Moléculas, Instituto de Biomedicina de Valencia, CSIC, Jaime Roig 11, 46010 Valencia

Resumen
La lacto-N-biosa (LNB) y galacto-N-biosa (GNB) forman parte de la estructura de oligosacáridos presentes en la leche humana, de glicoconjugados presentes en mucosas, de los antígenos sanguíneos Lewis, y del antígeno T. Como consecuencia de ello están implicados en diversos procesos biológicos, como adhesión celular y la colonización del tracto gastrointestinal por la microbiota simbiótica, proceso que depende en gran medida de la habilidad de competir por los substratos allí disponibles.
En *Lactobacillus casei* BL23 se ha caracterizado previamente el cluster *gnbREFGBCDA* implicado en el metabolismo de LNB y GNB. El gen GnbG codifica para una fosfo-beta-galactosidasa de la familia GH35 y con el objeto de caracterizar esta enzima, ese gen fue clonado y la proteína purificada a homogeneidad. Entre los oligosacáridos naturales ensayados, GnbG es capaz de hidrolizar LNB y GNB, y de liberar galactosa de la lacto-N-tetraosa. GnbG se ha cristalizado y determinado su estructura.
La síntesis *in vitro* de GNB y LNB fue ensayada exitosamente utilizando para ello la capacidad de transglicosilación de GnbG. A fin de obtener cantidades adecuadas de éstos para ensayar su actividad biológica, las reacciones de transglicosilación se escalaron y los productos resultantes se purificaron por HPLC semipreparativa. Se obtuvieron rendimientos de 12.4 mg/ml de GNB y 12.3 mg/ml de LNB. Ambos disacáridos fueron utilizados *in vitro* para determinar sus propiedades prebióticas potenciales con 27 cepas de *Lactobacillus* correspondientes a 10 especies diferentes. Se determinó que 19 de las cepas correspondientes a 5 especies diferentes fueron capaces de metabolizar tanto GNB como LNB.

The use of multiple restriction enzymes in T-RFLP analysis and identification of performance-related cecal bacterial groups in growing broiler chickens

R Ruiz[1], A Barroso-delJesús[2], L Lara[1] and L A Rubio[1]
[1]Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal (EEZ, CSIC), Profesor Albareda 1, 18008 Granada, Spain. [2]Unidad de Genómica, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, IPBLN-CSIC, PTS Granada, Avda. del Conocimiento s/n, Armilla, 18016 Granada, Spain.

Abstract
The cell density of the gastrointestinal microbiota in poultry ranges from 107 to 1011 bacteria per g of gut content, and plays key roles in the normal physiological functions including nutritional, immunological and protective functions of the host animals. Accordingly, the understanding of the mechanisms implicated and how changes in the gut microbiota composition may influence the host's nutrient and energy utilization efficiency and health is currently an important issue for intensive animal production industries. In the present work, four restriction enzymes (AluI, HhaI, MspI and RsaI), either individually or in combination, were used in T-RFLP analysis to: i) characterize the chicken intestinal bacterial community; and ii) tentatively identify intestinal bacterial groups related to increased performance parameters in broiler chickens. Balanced commercial diets free of any feed antibiotics were offered to broilers randomly assigned to 1 of 5 dietary treatments: control (C) (commercial diet with no additive), Inulin (I), fructose caramel (FC), PTS-O (propyl propane thiosulfonate) -45 and PTS-O (propyl propane thiosulfonate) -90. Except for the Inulin supplemented diet, multivariate statistical analysis of T-RFLP profiles based on individual enzymes or their combinations showed that the cecal bacterial community composition was significantly different among diets. Individual RsaI and the combination AluI + RsaI proved to be the most useful to discriminate between dietary treatments. *Clostridiaceae* 1, *Lachnospiraceae*, *Ruminococcaceae* and *Micrococcaceae* were tentatively identified as those families most likely implicated in defining the cecal microbiota composition of growing broiler chickens, and also as those most closely related to differences in productive parameters.

The fecal and sputum microbiota of cystic fibrosis patients

Arancha Hevia[1], Christian Milani[2], Marta G Clemente[3], Sabrina Duranti[2], Francesca Turroni[2], Miguel Gueimonde[1], Marco Ventura[2], Borja Sánchez[4] and Abelardo Margolles[1]
Dairy Research Institute (IPLA-CSIC). Department of Microbiology and Biochemistry of Dairy Products, Paseo Río Linares s/n, 33300 Villaviciosa, Asturias, Spain. Laboratory of Probiogenomics, Department of Life Sciences, University of Parma, Parma. Italy. Respiratory Department, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA), 33006 Oviedo, Asturias, Spain. Department of Analytical Chemistry and Food Science, Faculty of Food Science and Technology, University of Vigo, Ourense, Spain.

Abstract
Cystic fibrosis (CF) is characterized by the lack of a proper functionality of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), a membrane transport protein, causing a decreased secretion of chloride and dense mucus production. As a result, an aberrant mucosa and chronic inflammation are generated in the respiratory and digestive systems. In this work we have analyzed sputum and fecal samples of CF patients using a 16S rRNA gene-based protocol. We have compared the fecal microbiota of healthy subjects *vs* the fecal microbiota of CF patients, and we have tried to establish correlations between the fecal microbiota of CF patients and the microbial populations found in the sputum of the same individuals. Our preliminary data suggest that there are quantitative differences in the families *Bacteroidaceae, Ruminococcaeae* and *Lachnospiraceae* in the feces of CF patients. The dysbiosis detected in this study suggests that the intestinal microbiota of CF patients is a potential target in which we can act in order to modify its energy harvest capacity or its mucus hydrolysing capabilities, with the aim of improving the symptomatology associated with CF.

Comparative proteomic analysis of *Lactobacillus* pentosus MP-10 for the identification of key proteins involved in antibiotic resistance

María del Carmen Casado Muñoz[1], Said Ennahar[2], Nabil Benomar[1], Leyre Lavilla Lerma[1], Magdalena Martínez Cañamero[1], Antonio Gálvez[1] and Hikmate Abriouel[1]
[1]Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Facultad de Ciencias Experimentales, Universidad de Jaén, 23071-Jaén, España. [2]Equipe de Chimie Analytique des Molécules Bio-Actives,

UMR 7178, IPHC-DSA, Université de Strasbourg, CNRS, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France.

Abstract
Lactobacillus pentosus MP-10 isolated from brines of naturally fermented Aloreña green table olives has potential probiotic traits including inhibition of human pathogenic bacteria, survival at low pH (1.5) and bile salt tolerance (3%). *Lactobacillus pentosus* MP-10 showed intrinsic resistance to some antibiotics such as cefuroxime, ciprofloxacin, teicoplanin, trimethoprim, sulfamethoxazol and vancomycin. However, *Lb. pentosus* MP-10 was sensitive to ampicillin, amoxicillin, chloramphenicol, clindamycin, erythromycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin and tetracycline. In this study, the proteome response of *Lb. pentosus* MP-10 induced or not by amoxicillin, tetracycline and chloramphenicol has been analyzed with the aim to identify the key proteins involved in antibiotic resistance. Qualitative and quantitative differences in proteomes were analyzed using two-dimensional electrophoresis (2-DE), tryptic digestion, liquid chromatography-mass spectrometry analysis and database search for protein identification. The results obtained showed that at least four different proteins were differentially expressed in the induced cells comparing with controls without induction such as acetaldehyde dehydrogenase, linoleic acid isomerase, phosphocarrier protein Hpr and PTS system which were down-regulated after induction with antibiotics. However, proteomic analysis of induced cells showed an over-expression of glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase and 6-Phosphogluconate dehydrogenase. These results suggest that sustaining energy supply by carbohydrate metabolism is a major way of leading to antibiotic resistance in *Lb. pentosus* MP-10.
Acknowledgments
This work was supported by grants AGL2009-08921, AGL2013-43571-P and UJA2011/12/34.

Simulación colónica del efecto microbiológico causado por el empleo de oligosacáridos de lactulosa en la transición entre dietas con diferente contenido energético

Elvira Barroso, Antonia Montilla, Iván Álvarez Rodríguez, Ignacio Sánchez García, Agustín Olano, Nieves Corzo, M Carmen Martínez-Cuesta, Carmen Peláez y Teresa Requena
Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM), Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid.

Resumen
La ingesta excesiva de energía en la dieta, junto a un reducido gasto calórico, contribuye al desarrollo del sobrepeso y la obesidad. El empleo de prebióticos puede constituir una alternativa para modular la homeostasis energética, así como favorecer cambios microbiológicos y/o metabólicos beneficiosos para la salud. En este estudio se ha empleado el simulador dinámico gastrointestinal SIMGI desarrollado en el CIAL para evaluar el efecto microbiológico causado por la sustitución de carbohidratos fácilmente digeribles de una dieta hipercalórica por oligosacáridos derivados de lactulosa (OsLu). La estabilización de una microbiota asociada a obesidad en el SIMGI se alcanzó después de la alimentación del sistema durante dos semanas con una dieta rica en fructosa y almidón digestible, simulando un elevado consumo de refrescos azucarados y carbohidratos sencillos. Se observó que los OsLu añadidos a la dieta con reducido contenido energético no eran hidrolizados por las enzimas del intestino delgado y se fermentaban completamente en la región del colon ascendente del SIMGI. Los resultados microbiológicos mostraron incrementos en la proporción de algunos grupos como *Lactobacillus* y microorganismos butirato-productores en la dieta suplementada con OsLu. Esta dieta mantuvo unos niveles altos de ácido butírico y redujo la formación de amoníaco en comparación con la dieta de bajo contenido energético. Los resultados indican que la sustitución de carbohidratos fácilmente digeribles por OsLu permite el desarrollo de una comunidad bacteriana intestinal fermentativa con potencial efecto beneficioso sobre la salud., evitando una transición completa a perfiles metabólicos proteolíticos.

Aislamiento de lactobacilos de nasofaringe humana y caracterización preliminar de su potencial probiótico

A Casado[1], A Lasserrot[2], M Hormigo[2], A Ruiz-Bravo[1] y M Jiménez-Valera[1]
[1]Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. [2]BIOT Microbiology and Biotechnology, Granada.

Resumen
El tracto respiratorio es una importante vía de entrada de microorganismos patógenos, llegando a representar las infecciones respiratorias una de las causas más frecuente de consulta médica. Aunque el término probiótico se refiere únicamente a microorganismos que actúan en el tracto gastrointestinal, en los últimos tiempos se han encontrado evidencias científicas del empleo de bacterias probióticas para mejorar la defensa del hospedador frente a desafíos en otras zonas del cuerpo, como en el tracto respiratorio. Ensayos clínicos previos han demostrado que la administración de probióticos, ya sea por la tradicional vía oral o intranasalmente, pueden ser utilizados como agentes preventivos y terapéuticos en infecciones respiratorias. Esto abre la posibilidad de utilizar microorganismos con efectos beneficiosos aislados de la propia microbiota nasofaríngea. Los reportes sobre presencia de lactobacilos en la nasofaringe son muy escasos y no aportan identificación de especies. En el presente trabajo, se han aislado tres cepas de *Lactobacillus* a partir de muestras nasofaríngeas de personas sanas. Para ello fue necesario diseñar un medio de aislamiento que evitase la interferencia de otras bacterias indígenas de nasofaringe, capaces de crecer en Agar MRS. Dos de las cepas se clasificaron como *Lactobacillus plantarum* y la tercera como *Lactobacillus fermentum*. Se realizó un estudio preliminar sobre el potencial probiótico de las cepas aisladas.

Distribución de la adhesina OppA en cepas de *Lactobacillus* de origen humano

Carla Martín, Susana Escobedo, Luis M Quirós y Evaristo Suárez
Área de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.

Resumen
Previamente habíamos descrito que la adherencia de *Lactobacillus salivarius* Lv72 a células de la mucosa digestiva (HT29) y urogenital (HeLa) ocurría a través del reconocimiento específico entre la proteína OppA de la superficie bacteriana y los glicosaminoglicanos(GAGs) del glicocáliz eucariótico.
El papel de OppA como adhesina podría ser una característica peculiar de *L. salivarius* Lv72, ser extensible a la especie o incluso todo el género *Lactobacillus*. Para dilucidar esta cuestión, se tomaron 12 cepas (*L. salivarius* CELA2, *L. reuteri*

PYD7, H9 y RC14, *L. rhamnosus* GR1, *L. vaginalis* ZL69-22, *L. jensenii* Lv62, Lv63 y Lv64, *L. crispatus* Lv25 y Lv54 y *L. gasseri* Lv21) que se incubaron con cultivos de células HeLay concentraciones crecientes de mezcla de heparán y condroitín sulfato. En ocho casos, la presencia de GAGs provocó la disminución de la adherencia, siendo *L crispatus* Lv25 la que se vio más afectada. En las otras cuatro aumentaba la adherencia. Curiosamente, cepas de la misma especie podían manifestar efectos opuestos.Para determinar si la inhibición de la adherencia era debida a la unión deOppA a los GAGs, se tomaron cultivos de *L. crispatus* Lv25 y *L. reuteri* RC14 (forma parte de un probiótico vaginal comercializado), se obtuvieron protoplastos y las proteínas de pared liberadas se pasaron por una columna del GAG heparina. Las proteínas que eluyeron a concentraciones superiores a 0,5 M NaCl, se separaron por SDS-PAGE y se sometieron a MALDI-TOF-TOF. Ambas cepas expresaban OppA en su superficie, lo que se comprobó por unión a anticuerpos policlonales anti-OppA (Western). En *L. reuteri* RC14 se detectó otra proteína, que había sido previamente descrita como adhesina, que presenta homología con proteínas de unión a colágeno (Hsueh et al. 2010).

Hsueh HY[1], Yueh PY, Yu B, Zhao X, Liu JR. 2010. Expression of *Lactobacillus reuteri* Pg4 Collagen-Binding Protein Gene in *Lactobacillus casei* ATCC 393 Increases ItsAdhesion Ability to Caco-2 Cells.J Agric Food Chem. 58:12182-12191.

Estudio de la interacción virus-probiótico. Uso de partículas p como modelo de norovirus

Rubio-del Campo A[1], Coll-Marqués JM[1], Yebra MJ[1], Buesa J[2], Pérez-Martínez G[1], Monedero V[1] y Rodríguez-Díaz J[1]

[1]Laboratorio de Bacterias Lácticas y Probióticos, Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), Paterna, Valencia. [2]Departamento de Microbiología, Facultad de Medicina, Universidad de Valencia, Valencia.

Resumen

Los norovirus (NoV) son unos de los principales agentes causales de gastroenteritis. El efecto beneficioso que algunos probióticos han mostrado sobre esta patología nos ha llevado a estudiar su interacción con los NoV humanos, para los cuales no existe un sistema de cultivo *in vitro*. Los dominios P de la proteína VP1 de la cápside de NoV de los genotipos GI.1 y GII.4 se purificaron, mostrando que son capaces de organizarse en estructuras subvirales denominadas partículas-P, que retienen la capacidad de reconocer los receptores víricos en las células epiteliales de igual manera que los virus completos. Se comprobó que varias cepas de bacterias probióticas y no probióticas son capaces de unir partículas-P de ambos genotipos en su superficie. La unión de partículas-P del genotipo GII.4 a cultivos de la línea epitelial intestinal HT-29 se llevó a cabo en experimentos de competición, bloqueo y desplazamiento en presencia de cepas de probióticos. Los resultados mostraron que los probióticos son capaces de disminuir la unión de partículas P a sus receptores en las células diana en experimentos de competición. Sin embargo, la incubación de las bacterias con las células HT-29 antes o después de la exposición a las partículas-P aumentó la retención de las partículas víricas en la superficie celular. Estos resultados muestran que la hipótesis del bloqueo de los receptores virales por parte de los probióticos como un mecanismo de inhibición viral debe de evaluarse cuidadosamente. Por otro lado, las partículas-P se perfilan como una buena herramienta para el estudio de la interacción NoV-probiótico.

Akkermansia muciniphila y *Faecalibacterium prausnitzii* como bacterias reguladoras. En el contenido intestinal de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal

S Saldaña[1], E Varela[1], M Llopis[1], M Gallart[1], E Espin[2], M Martí[2], F Guarner[1] y M Antolin[1]

[1]Unidad de Investigación de Aparato Digestivo. Institut de Recerca Vall d'Hebron. [2]Servicio de Cirurgia. Hospital Universitario Vall d'Hebrón.UAB. ClBERehd. ISC III (PI12/00263).

Resumen

La microbiota intestinal juega un papel esencial en la homeostasis intestinal. *Akkermansia muciniphila* (*Akm)* y *Faecalibacterium prausnitzii (Fp)* son bacterias que se encuentra en elevada proporción en el intestino humano y cuya presencia parece estar disminuida en las heces de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (EII).

Objetivo: Estudiar si *Akkermansia muciniphila* y *Faecalibacterium prausnitzii* se encuentran disminuidos en el contenido intestinal de pacientes con EII sometidos a resección quirúrgica del segmento afectado.

Material y métodos: Se obtuvieron 36 muestras de contenido intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn (EC, n=25 contenido ileal, n=11 contenido colónico), 10 de pacientes con Colitis Ulcerosa (CU) y 19 de pacientes control intervenidos de cáncer colorectal (n= 5 contenido ileal, n= 14 contenido colónico). En todas las muestras se extrajo el DNA bacteriano mediante el método de Godon y se determinaron niveles de *Akm, Fp* y Bacterias totales mediante qPCR con Syber Green.

Resultados: Akm esta disminuida en contenido colónico de pacientes intervenidos de CU respecto a pacientes control ($4{,}0x10^4$ copias/g vs. $3{,}9x10^6$ copias/g, medianas, p=0,0017) pero no alcanza la significación estadística en pacientes con EC ($4{,}6x10^4$ copias/g vs. $6{,}4x10^5$ copias/g; p=0,06). *Fp* se encuentra claramente disminuido tanto en contenido intestinal de pacientes con CU ($6{,}0\ x10^3$ copias/g *vs* $3{,}2x10^7$ copias/g, p=0,019) como en pacientes con EC ($7{,}2x10^3$ copias/g *vs* $2{,}6x10^7$ copias/g, p=0,0008).

Conclusión: La pérdida de *Akkermansia muciniphila* y *Faecalibacterium prausnitzii* en el contenido intestinal de pacientes con EII puede estar asociada a una falta de modulación de la respuesta del sistema inmune intestinal.

Colonización del tracto gastrointestinal de lechones por *Megasphaera elsdenii*: evaluación temporal

Sara Costillas-Alonso, Rubén Miranda-Hevia, Ana Carvajal-Urueña y Pedro Rubio-Nistal

scosa@unileon.es Grupo Digesporc, Enf. Infecciosas, Dpto. Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad de León. Campus de Vegazana s/n 24071 León.

Resumen

Megasphaera elsdenii es una bacteria anaerobia estricta que coloniza el tracto gastrointestinal de una amplia variedad de especies domésticas, incluido el ser humano. En los cerdos, *M. elsdenii* coloniza el intestino grueso y es una de las principales bacterias responsables de la producción de ácidos grasos volátiles de cadena corta, siendo esta producción de ácidos grasos, fundamentalmente de ácido butírico, donde radica el potencial probiótico de esta bacteria. El objetivo del presente estudio fue determinar el momento en el que tiene lugar la colonización del tracto gastrointestinal de los lechones por parte de esta bacteria.

Se emplearon lechones recién nacidos a los que se les realizó un seguimiento en el tiempo, recogiendo muestras de heces, directamente del recto, cada 24 h. Así mismo, se tomaron muestras de meconio, de calostro y de leche de las madres. Mediante la utilización de un método selectivo con pre-enriquecimiento previo para favorecer el crecimiento e identificación de *Megasphaera* pudimos detectar su presencia en las heces de los lechones a partir del primer día de vida del animal. Este resultado se contrapone al reportado en estudios previos que concluían que *M. elsdenii* colonizaba el tracto digestivo de los lechones en momentos más avanzados, por encima de la semana 1 o 2 de vida.

Caracterización de moléculas inhibidoras producidas por *Streptoccocus dentisani sp. Nov,* como potencial probiótico

Anny Camelo-Castillo[1], Rubén Cebrián Castillo[2], Manuel Martinez Bueno[2] y Alex Mira[1]
Fundación FISABIO, Centro Superior de Investigación en Salud Pública (CSISP). Área de Genómica y Salud- Grupo Microbioma Oral. Universidad de Granada. Facultad de Ciencias. Departamento de Microbiología.

Resumen
Una nueva especie aislada en nuestro laboratorio proveniente de muestras de pacientes sin antecedentes de caries dental, denominada como *Streptococcus dentisani sp. nov*, ha demostrado que tiene una potencial actividad probiótica, ya que inhibe el crecimiento de bacterias cariogénicas como *Streptoccocus mutans.* Análisis bioquímicos, genómicos y filogenéticos demuestran claramente que es una especie diferente a otras de estreptococos anteriormente descritas. Es importante para el desarrollo del probiótico identificar los mecanismos por los cuales *S. dentisani* inhibe a bacterias acidogénicas. Por ello, a partir de la información genómica disponible de *S. dentisani* hemos podido delimitar una región de unas 20 kb en las que se han identificado posibles ORFs que por similitud aminoacídica y contexto genómico, podrían corresponderse con diferentes bacteriocinas. Mediante técnicas cromatográficas de fase reversa y el uso de resinas de intercambio iónico e hidrofobicidad, se purificaron dichos compuestos inhibitorios a partir de los sobrenadantes del probiótico. El análisis de masa molecular de estas posibles bacteriocinas fue determinado por MALDI-TOF-MS y la identificación de las proteínas se realizó mediante huella peptídica, incluyendo espectros de fragmentacion para cada una de las huellas. Utilizando como motor de búsqueda MASCOT frente a bases de datos públicas de secuencias de proteínas y frente al genoma de *S. dentisani* hemos logrado identificar al menos cinco péptidos que coinciden con las secuencias de bacteriocinas de la región de 20 Kb indicada anteriormente, que hemos denominado "Anti-Caries Defense Island" (ACDI). Consideramos que ACDI es determinante para el efecto positivo del probiótico en la salud bucodental.

Dieta alta en mantequilla y modificaciones en la microbiota intestinal. Papel en el desarrollo del síndrome metabólico

*Isabel Prieto[1], Marina Hidalgo[2], Antonio Cobo[2], Ana Belén Segarra[1], Manuel Ramírez[1], Antonio Gálvez[2] y Magdalena Martínez Cañamero[2]**
[1]Área de Fisiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén. Paraje de las Lagunillas s/n, 23071 Jaén. [2]Área de Microbiología, Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad de Jaén. Paraje de las Lagunillas s/n, 23071 Jaén. *canamero@ujaen.es

Resumen
Ratones swiss western se alimentaron durante tres meses con dos dietas altas en grasa (aceite de oliva virgen extra y mantequilla) y con dieta estándar. A lo largo del periodo experimental se monitorizaron diferentes variables fisiológicas relacionadas con el control de la glucosa en plasma, metabolismo de lípidos, balance energético, peso corporal, presión arterial y función endotelial. Al final del experimento se extrajo ADN de las heces, se llevó a cabo secuenciación masiva de las regiones V3-V5 del gen del ARNr 16S y se tomaron muestras de intestino grueso para su estudio mediante microscopio confocal.
La dieta enriquecida en mantequilla produjo un mayor acúmulo de grasa visceral, peso corporal y presión arterial, correlacionando significativamente con el porcentaje de secuencias de diferentes taxones en heces. Uno de estos taxones, una cepa de *Enterococcus faecalis*, pudo ser aislada de las heces y utilizada en un estudio de intervención realizado durante seis semanas sobre diez ratones inoculados, frente a otros diez tratados con placebo. El resultado fue un aumento de la presión arterial en los ratones inoculados que correlacionaba con la presencia en heces de la cepa utilizada.
Por su parte, muestras de mucosas de intestino grueso fueron estudiadas mediante microscopio confocal de fluorescencia, con objeto de localizar posibles bacterias metanógenas. El recuento de formas bacilares con fluorescencia típica de este grupo microbiano fue mayor de manera significativa en mucosas de ratones alimentados con mantequilla frente a las otras dietas, correlacionando positivamente con el peso corporal, colesterol total, ingesta e insulina en plasma.
Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado utilizando las instalaciones del CPEA y CICT de la Universidad de Jaén y ha sido subvencionado por la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia Ref. AGR 6340) y por el Programa Operativo FEDER Andalucía (UJA2014/02_FT49).

Efecto del aceite de oliva virgen extra sobre el desarrollo de la hipertensión en ratas SHR. Implicaciones de los cambios en la microbiota intestinal

Magdalena Martínez-Cañamero[1], Marina Hidalgo[1], Ana Belén Villarejo[2], Ana Belén Segarra[2], Manuel Ramírez[2] e Isabel Prieto[2]
[1]Áreas de Microbiología y [2]Fisiología del Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén. Paraje de las Lagunillas s/n, 23071 Jaén.

Resumen
La hipertensión arterial es una de las principales patologías responsable de la aparición de eventos cardiovasculares. Las dietas altas en grasa se han vinculado con los aumentos de presión arterial, aunque parece que el tipo de ácidos grasos es determinante. El aceite de oliva virgen ha demostrado tener un papel protector, aunque los mecanismos subyacentes aún no están aclarados. Por otro lado, las dietas altas en grasa tienen un marcado efecto sobre la microbiota intestinal, y dichos cambios condicionan la aparición de obesidad y alteraciones metabólicas. Además, resultados obtenidos por nuestro grupo indican que cambios en determinadas poblaciones podrían estar asociados a modificaciones en la presión arterial. En el presente estudio, ratas SHR pre-hipertensas fueron alimentadas con una dieta estándar, o con una

dieta suplementada con aceite de oliva virgen, durante un periodo de 12 semanas. En el grupo de recibió el aceite de oliva el desarrollo de la hipertensión se retrasó hasta la 6º semana (la 4ª en el control) y los valores de presión arterial fueron siempre inferiores a los de los animales que recibieron la dieta estándar. El estudio de las poblaciones microbianas intestinales mediante PCR cuantitativo demostró un aumento en el grupo taxonómico *Clostridia XIVa*, correlacionando negativamente con los valores de presión arterial. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el efecto protector del aceite de oliva virgen frente al desarrollo de la hipertensión estaría relacionado, al menos en parte, con cambios en la microbiota intestinal.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido realizado utilizando las instalaciones del CPEA y CICT de la Universidad de Jaén y ha sido subvencionado por la Consejería de Economía, Innovación y Ciencia de la Junta de Andalucía (Proyecto de Excelencia Ref. AGR 6340) y por el Programa Operativo FEDER Andalucía (UJA2014/02_FT49).

Beneficial modulation of the gut microbiota by a hypersaline sodium-rich naturally sparkling mineral water in fructose-fed ovariectomized female sprague-dawley rats

L Mira-Pascual[1], C Pereira[2], M Severo[3], R Monteiro[2], M J Martins[2] and MC Collado[1]*

[1]Department of Biotechnology, Institute of Agrochemistry and Food Technology-Spanish National Research Council (IATA-CSIC), Paterna, Valencia, Spain. [2]Department of Biochemistry (U38/FCT), Faculty of Medicine, University of Porto, 4200-319 Porto, Portugal. [3]Department of Clinical Epidemiology, Predictive Medicine and Public Health, Faculty of Medicine, University of Porto, 4200-319 Porto, Portugal. *Equally contributed to this work.

Abstract

Recent research has shown that microbiota has an important role in metabolic disorders, such as obesity and metabolic syndrome (MS). Menopause substantially increases MS incidence; further, obesity is a relevant cardiovascular risk factor in both. So, we aimed to characterize the effects of natural mineral-rich water ingestion in an animal model of menopause with fructose-induced MS [considering one sham-operated and four ovariectomized rat groups: tap-water treated (TW), natural mineral-rich water treated (MW), 10% fructose in tap-water treated (TWF) and 10% fructose in natural mineral-rich water treated (MWF)]. Microbial composition was analysed using high-throughput 16S rDNA sequencing, in parallel to evaluation of feces short chain fatty acids levels, plasma metabolic profile and body weight. The dominant phyla were Bacteroidetes and Firmicutes, followed by Proteobacteria and Actinobacteria. Natural mineral-rich water consumption substantially reduced Firmicutes to Bacteroidetes ratio in fructose-treated rats. Unweighted UNIFRAC analysis grouped samples being clear a subcluster with TW and TWF in comparison with MW and MWF groups. Natural mineral-rich water consumption was able to reduce acetate to butyrate ratio in MW groups compared to the corresponding TW groups. MW groups showed a tendency for lower body weight increase than the corresponding TW groups, more evidently in fructose-treated rats, as well as a tendency for lower plasma lipid profile modification. Total-cholesterol levels were significantly increased in the TW group *versus* sham-operated rats. Natural mineral-rich water consumption modulates microbiota composition in simultaneous menopause and MS rat model towards control rats.

USOS CLÍNICOS

Estudio clínico piloto tipo prueba de concepto en la fortificación con un probiótico y su eficiencia en la modificación del perfil lipídico

R Guerrero, F Rodríguez y E Hernández García
Universidad de Extremadura. Centro Universitario de Mérida.

Resumen

Introducción: Los alimentos funcionales son productos alimenticios que proveen beneficios a la salud más allá de la nutrición, una forma de incrementar dichos beneficios es la fortificación. La fortificación con probióticos es una estrategia de mejor costo-efectividad, y a diferencia de la dieta, no afecta los hábitos alimentarios de la población.

Objetivo: En la literatura encontramos algún estudio de eficacia de cepas de *Lactobacillus* (LBP) y la disminución de colesterol en adultos con hipercolesterolemia (Fuentes M., et al BJN 2012). Como complemento nutricional el monascus purpureus (MP) ejerce un efecto normalizador en la C-LDL.

Objetivo: analizar la eficiencia de (LBP+MP) en hipercolesterolemia.

Material y Métodos: Se seleccionaron 14 sujetos, colesterol entre 200 y 300 mg/ml, sin tratamiento hipocolesterolemiante o dieta y sin antecedentes de enfermedades cardiovasculares Tras aprobación comité ético y consentimiento de participación, inician la toma de un comprimido (LBP+MP)/ día, durante 6 semanas, valorándose basal vs. Periodo exposición. Se valoró antropometría, bioquímica hemática, perfil colesterol y fracciones, TA, composición corporal y tolerabilidad.

Resultados: Se obtuvieron resultados significativos estadística y clínicamente en la disminución de parámetros lipídicos, salvo HDL, con dicha asociación y superiores a los obtenidos con solo LBP, llama la atención la disminución en los valores de trigliceridemia.

Conclusiones: Si bien sería necesario estudios con una mayor población, la fortificación con un probiotico se muestra eficaz en la reducción de los perfiles lipídicos incrementados.

Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT7765 induce la repolarización de macrófagos de pacientes con cirrosis y un descenso de su actividad proinflamatoria

Oriol Juanola[1], Alba Moratalla[1], Esther Caparrós[1,2], Ángela Moya-Pérez[3], Pablo Bellot[1], Pedro Zapater[1,2], Paula Giménez[1], José M González-Navajas[1], José Such[1,2], Yolanda Sanz[3] y Rubén Francés[1,2]

[1]CIBERehd, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, España. [2]Dpto. Medicina Clínica, Universidad Miguel Hernández, Alicante. [3]Grupo de Ecofisiología Bacteriana, IATA-CSIC, Valencia.

Resumen

Introducción: Los pacientes con cirrosis muestran un estado inflamatorio sistémico asociado con complicaciones que empeoran su pronóstico. *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 es un probiótico que reduce la inflamación en la cirrosis experimental.

Hipótesis: Bifidobacterium pseudocatenulatum CECT7765 induce la repolarización de macrófagos de pacientes con cirrosis hacia un perfil anti-inflamatorio.

Diseño y Métodos: Estudio *in vitro* sobre macrófagos diferenciados a partir de sangre periférica de pacientes cirróticos.

Las células se inmunofenotiparon por citometría de flujo y se cuantificó la producción de citocinas en los sobrenadantes de cultivo mediante ELISA.
Resultados: Los macrófagos de estos pacientes diferenciados con GM-CSF y expuestos a LPS mostraron un aumento significativo en el porcentaje de células que expresan CD14 y CD86, así como una disminución significativa en la expresión de HLA-DR y CD206 en comparación con macrófagos no estimulados o en presencia de M-CSF. La exposición de estos macrófagos a *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 indujo la expresión de estos marcadores en un porcentaje de células similar al de macrófagos no estimulados o estimulados con medio M-CSF, y significativamente distintos a los inducidos por el LPS.
Estos cambios inducidos por *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 coincidieron con una reducción significativa de los niveles de citocinas pro-inflamatorias TNF-α, IL-6 e IL-1β comparados con los valores tras estímulo con LPS, alcanzando valores similares a los observados en los sobrenadantes de macrófagos no estimulados o estimulados con M-CSF.
Conclusiones: *Bifidobacterium pseudocatenulatum* CECT7765 induce una repolarización de los macrófagos que puede contribuir a reducir la inflamación sistémica en los pacientes con cirrosis.

Selección de probióticos para contrarestar el efecto de las toxinas de *Clostridium difficile*

L Valdés-Varela, M Gueimonde y P Ruas-Madiedo
Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias, España (lvaldes@ipla.csic.es).

Abstract
Durante los últimos años se ha producido un incremento en la incidencia y mortalidad de las infecciones asociadas a *Clostridium difficile* (CDAI), afectando especialmente a la tercera edad. El tratamiento antibiótico de la CDAI puede ser insatisfactorio ya que además de eliminar miembros de la microbiota intestinal puede no prevenir la recurrencia de la enfermedad. Los probióticos se han propuesto como una alternativa para restaurar la microbiota intestinal alterada por el consumo de antibióticos, sin embargo, es difícil elegir una cepa correcta o un consorcio bacteriano que pueda ser eficiente. Por lo tanto, es necesaria la selección racional de candidatos a probióticos para ser usados en pacientes con CDAI. El objetivo de este estudio fue seleccionar cepas potencialmente probióticas capaces de contrarrestar el efecto de las toxinas producidas por *C. difficile* sobre el epitelio intestinal. Con esta finalidad se usó el equipo Real Time Cell Analyzer (RTCA xCELLigence) que nos permitió monitorizar, en tiempo real, el comportamiento de monocapas confluentes de la línea celular HT29 ante la presencia de sobrenadantes tóxicos de *C. difficile* incubados en presencia o ausencia de distintas cepas de bifidobacterias y lactobacilos. Los resultados obtenidos nos permitieron identificar, entre otras, la cepa *Bifidobacterium longum* IPLA20022 (CECT8699) con gran capacidad para contrarrestar el efecto de las toxinas de *C. difficile* sobre la línea celular HT29. Hasta el momento, sabemos que esta cepa es capaz de disminuir la cantidad de toxinas A y B, cuantificadas mediante ELISAs, de los sobrenadantes tóxicos, reduciendo así de un modo muy significativo la toxicidad de los mismos.

Cardiovascular protective effects of probiotics in spontaneoulsy hypertensive rats

Manuel Gómez-Guzmán[1], Rosario Jiménez[1], Pilar Galindo[1], Oscar Bañuelos[2], Manuel Sánchez[1], María José Zarzuelo[1], Ana Isabel Sañudo[2], Miguel Romero[1], Marta Toral[1], Mónica Olivares[2], Julio Gálvez[1] y Juan Duarte[1]
[1]Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. 18071. Granada. [2]Laboratorio de Descubrimiento y Preclínica. Departamento de Investigación. BIOSEARCH S.A. Granada.

Abstract
Hypertension is characterized by elevated blood pressure, endothelial dysfunction, vascular inflammation, and dysregulation of the immune system. In the present study we evaluated the cardiovascular effects of probiotics with inmunomodulatory properties, *Lactobacillus fermentum* CECT5716 (LC40), or *L. coryniformis* CECT5711 (K8) plus *L. gasseri* CECT5714 (LC9) (1:1) in spontaneously hypertensive rats (SHR). Ten Wistar Kyoto rats (WKY) and thirty SHR were randomly assigned to four groups (n=10): a control WKY group and a control SHR groups, a treated SHR-LC40 group, and a treated SHR-K8/LC9 group (the probiotics suspended in drinking water at the final concentration of 109 colony-forming units/ml). The probiotic treatment was given for 5 weeks. Long-term administration of probiotics induced a progressive reduction in systolic blood pressure (SBP) without significant change in heart rate. Only treatment with the probiotics K8/LC9 significantly reduced the cardiac hypertrophy. Both groups of probiotics treatment reversed the reduced aortic endothelium-dependent relaxation by acetylcholine observed in SHR. They also restored the increased vessel superoxide levels observed in SHR, by reducing NADPH oxidase activity. Probiotics treatments induced a significant change in the caecum microbiota of the SHR, with higher counts of the *Lactobacillus* spp. cluster, and lower counts of *Bacteriodes* spp. and *Clostridium* spp. The modifications in the intestinal microbiota were significantly more intense in the group SHR-K8/LC9 than in SHR-LC40. The current study demonstrates a cardiovascular protective effect of probiotics in SHR by increasing nitric oxide bioavailability, suggesting the therapeutic potential of this gut microbiota manipulation to reduce high blood pressure in genetic hypertension.

Lactobacillus salivarius CECT5713 inhibe la adhesión de *Streptococcus mutans* a hidroxiapatita

Ana Isabel Sañudo y Óscar Bañuelos
Biosearch Life, S.A.

Resumen
Objetivo: La adhesión de *Streptococcus mutans* a la superficie dental es uno de los hechos que facilita la persistencia de este microorganismo en la cavidad bucal y facilita su participación en el desarrollo de caries. En este estudio, analizamos la capacidad de *Lactobacillus salivarius* CECT 5713, una cepa originaria de leche materna, de inhibir este proceso de adhesión en un modelo *in vitro*.
Métodos: Se emplearon discos de hidroxiapatita para simular la superficie dental, sobre los cuales se co-incubaron suspensiones de *S. mutans* CECT 479 ($5x10^8$ ufc/mL) y *L. salivarius* CECT 5713 (10^9, 10^8 y 10^7 bacterias/mL) inactivado térmicamente. Tras un periodo de incubación de 3 h y lavados exhaustivos; la población de *S. mutans* adherida a la superficie de los discos de hidroxiapatita se cuantificó mediante qPCR.

Resultados: La adhesión de *S. mutans* a hidroxiapatita se ve reducida en más de un 70 % cuando se co-incuba este microorganismo con *L. salivarius* CECT 5713 en proporción 1:2. Este efecto inhibitorio también es perceptible, en menor magnitud (25 % de inhibición) con concentraciones inferiores de *L. salivarius* CECT 5713 (proporción entre *S. mutans* y *L. salivarius* de 5:1).
Conclusiones: L. salivarius CECT 5713 inactivado térmicamente es capaz de inhibir la adhesión de *S. mutans* CECT 479 a una superficie dental artificial en un modelo *in vitro* de caries.

Effect of phenolic compounds-enriched olive oils on human gut microbial populations and metabolites. Possible influence on lipid profile

Sandra Martín-Peláez[1], Juana Mosele[2], Neus Pizarro[3], Marta Farràs[1], Rafael de la Torre[3], Isaac Subirana[4], Francisco Pérez-Cano[5], Olga Castañer[1], Rosa Solà[6], Sara Fernandez-Castillejo[6], Saray Heredia[1], Magí Farré[3], María José Motilva[2] and Montserrat Fitó[1]
[1]Cardiovascular Risk and Nutrition Research Group, REGICOR Study Group. Hospital del Mar Research Institute (IMIM). Doctor Aiguader 88, Barcelona 08003, Spain. [2]Food Technology Department, UTPV-XaRTA, University of Lleida. Av. Alcalde Rovira Roure 191, Lleida 25198, Spain. [3]Human Pharmacology and Clinical Neurosciences Research Group. IMIM. Doctor Aiguader 88, Barcelona 08003, Spain. [4]Cardiovascular and Genetic Epidemiology Research Group, REGICOR Study Group. IMIM. Doctor Aiguader 88 , Barcelona 08003, Spain. [5]Department of Physiology, Faculty of Pharmacy. B building, Joan XXIII, 27-30, Barcelona 08028, Spain. [6]Unit of Farmacobiology. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira I Virgili, Sant Llorenç 21, Reus 43201, Spain.

Abstract
Recent insights indicate that gut microbiota plays an important role on cardiovascular disease risk. The aim of this work was to investigate whether phenolic compounds (PCs) enriched olive oils (OOs) influence gut microbiota, leading to cardio-protective changes in lipid metabolism. A randomized, double-blind, crossover, human trial with 12 hypercholesterolemic volunteers was carried out. They ingested 25 mL/day of (1) low PC raw virgin OO (80 mg/kg; VOO), (2) virgin OO enriched with its own PC (500 mg/kg; FVOO), and (3) virgin OO enriched with its own PC and thyme PC (1:1) (500 mg/kg; FVOOT), for 3 weeks with 2-week washout periods. Fecal microbial populations, PCs, short chain fatty acids, cholesterol microbial metabolites, bile acids, and blood lipid parameters were analyzed. FVOOT increased *Bifidobacterium spp.* (P=0.04) and tended to increase *Roseburia-Eubacterium rectale* groups (P=0.08) compared with VOO and FVOO respectively. FVOO tended to decrease *Clostridium cluster IX* compared to VOO (P=0.07). Fecal hydroxytyrosol increased compared with pre-intervention values (P=0.038 and P=0.064 for FVOO and FVOOT respectively). Dihydroxyphenilacetic acid and protocatechuic acid increased with FVOO (P=0.014) and FVOOT (P=0.003) respectively compared with VOO. FVOO increased the percentage of coprostanone (P=0.031) compared to FVOOT. FVOOT decreased oxidized LDL compared with pre-FVOOT (P=0.05). PCs present in FVOO and FVOOT are able to beneficially modulate the growth of gut microbiota. Gut microbial PC metabolites from FVOOT could exert cardio-protective effects through decreases in oxLDL and should be further investigated.

Lactobacillus salivarius CECT5713 reduce la carga de *Streptococcus mutans* en saliva

María Paz Díaz-Ropero[1], Ana Isabel Sañudo[1], Óscar Bañuelos[1] y Juristo Fonollá[1]
Biosearch S.A., Granada (España).

Abstract
Objetivo: Streptococcus mutans es considerado como uno de los principales patógenos involucrados en el desarrollo de la caries. El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de una cepa originaria de leche materna, *Lactobacillus salivarius* CECT5713, sobre la carga de *Streptococcus mutans* en la cavidad oral.
Métodos: Se reclutaron 11 voluntarios adultos sanos. Durante una semana los voluntarios se hicieron dos enjuagues bucales diarios de 30 segundos con 10 mL de un placebo después del cepillado. Tras una semana el placebo fue sustituido por un enjuague bucal que contenía 10^8 cfu/mL de *L. salivarius* CECT5713 inactivadas por tratamiento térmico. Durante 2 semanas los voluntarios realizaron 2 enjuagues bucales diarios de 30 segundos con 10 mL del producto probiótico. Los días 0, 3, 7 y 14 del tratamiento se tomaron muestras de saliva 3 horas después del enjuague. El análisis de la carga de *Streptococcus mutans* en saliva se llevó a cabo mediante PCR cuantitativa.
Resultados: La carga de *Streptococcus mutans* en saliva se redujo significativamente tras el tratamiento probiótico en una media estimada de 0,33 log (p=0,001). Dicho efecto es ya observado desde los 3 días del tratamiento y se mantuvo a lo largo de las 2 semanas de tratamiento.
Conclusiones: Lactobacilllus salivarius CECT5713 inactivado por tratamiento térmico reduce la carga de *Streptococcus mutans* en saliva pudiendo ser una alternativa natural para la prevención de caries.

Establecimiento del microbioma intestinal durante los primeros meses de vida e impacto de la vacunación frente a rotavirus

Li Ang[1], Silvia Arboleya[2], Guo Lihua[1], Yuan Chuihui[1], Qin Nan[1], Marta Suárez[3], Gonzalo Solís[3], Clara G de los Reyes-Gavilán[2] y Miguel Gueimonde[2]
[1]State Key Laboratory for Diagnosis and Treatment of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital, Zheijang Univeristy, Hangzhou, China. [2]Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Villaviciosa, Asturias, Spain. [3]Pediatrics Service, Hospital Universitario Central de Asturias, SESPA, Oviedo, Asturias, Spain.

Resumen
La colonización microbiana del intestino del niño resulta esencial para la posterior salud del individuo. Sin embargo, aún se desconoce el efecto que diversos factores, con potencial para afectar este proceso, tienen sobre el establecimiento de la microbiota intestinal. En este sentido, el impacto de prácticas habituales, como la administración de la vacuna oral frente a rotavirus, sobre el desarrollo del microbioma apenas ha sido estudiado. El objetivo de este estudio fue caracterizar el establecimiento del microbioma intestinal durante los primeros meses de vida y evaluar el efecto de la vacunación frente a rotavirus. Para ello se tomaron muestras fecales de tres niños sanos, antes y después de la administración de cada una de las tres dosis de la vacuna Rotateq. Se realizaron análisis, mediante PCR-DGGE y metagenómica, para caracterizar la microbiota fecal y se determinaron los niveles de ácidos grasos de cadena corta. Los resultados mostraron una elevada variabilidad en la composición de los microbiomas de los diferentes niños durante los primeros meses de vida, sin embargo se observó una elevada similitud entre los mismos a nivel funcional. Así mismo, no se observó

ningún efecto significativo de la vacuna sobre el establecimiento del microbioma intestinal. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que el proceso de establecimiento y desarrollo del microbioma intestinal es específico para cada individuo a nivel de composición microbiana pero similar entre individuos a nivel funcional. Además, este proceso no se ve afectado por la administración de la vacuna oral frente a rotavirus.

Creación de una plataforma *online* para la difusión de conocimiento acerca del uso de probióticos y prebióticos en la práctica clínica (el probiótico.com)

Carlos Masdeu[1] y Xavier Tapounet[1]
[1]Dpto. Médico., Profármaco-2 S.L., Barcelona.

Resumen
Introducción: El Probiótico (www.elprobiotico.com) es una web creada con la finalidad de difundir información científica para profesionales sanitarios sobre la evidencia y práctica clínica de probióticos y prebióticos.
Material y métodos: Para la generación de contenidos originales se constituyó un comité científico, coordinado por los Dres. Francisco Guarner y Guillermo Álvarez Calatayud. El portal se actualizaría semanalmente con contenidos que alternarían entre artículos breves, temas de revisión y casos clínicos (estos dos últimos acreditados por la Comisión de Formación Continuada del SNS y el CCFCPS). La formación acreditada se completaría con la adición de un Curso de Probioticoterapia en Gastroenterología de 5 módulos. Todos los contenidos serían de acceso libre, a excepción de aquellos acreditados, que requerirían un registro (libre y gratuito). La difusión de contenidos se vería reforzada mediante diversas redes sociales (principalmente Facebook y Twitter).
Resultados: 40 semanas después del lanzamiento de la web se han publicado 32 artículos breves, 4 temas de revisión y 4 casos clínicos. Se han registrado 3.567 usuarios en la plataforma y unas 890 personas diferentes la visitan cada mes, con una audiencia compuesta principalmente por médicos (51%). Los contenidos más consultados son los del área formativa: 2.051 personas han realizado el examen de evaluación del curso acreditado, con una tasa de aprobados del 89,6% (1.838 aprobados en total).
Conclusiones: La creación de una plataforma *online* permite aumentar la inmediatez y frecuencia con la que se divulga el conocimiento científico sobre probióticos y prebióticos entre los profesionales sanitarios, especialmente de aquellos contenidos con carácter formativo.

Comprimidos matriciales de liberación modificada con microorganismos probióticos

Mª Teresa Sánchez Rodríguez, Mª Adolfina Ruiz Martínez y Mª Encarnación Morales Hernández
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

Abstract
Uno de los mayores problemas asociados al uso clínico de microorganismos probióticos es la falta de control sobre la viabilidad de estas bacterias durante el proceso tecnológico, almacenaje y tránsito del producto a lo largo del aparato digestivo puesto que la principal vía de administración es la oral. Es por ello, que se debe resaltar la importancia de desarrollar nuevas formas farmacéuticas que aseguren la protección de estos microorganismos en todo momento permitiendo su liberación a nivel intestinal, donde ejercerán efectos tanto intestinales como extraintestinales, siendo este nuestro principal objetivo.
Desde hace ya algunos años, la investigación en el diseño de formas farmacéuticas se ha centrado en la búsqueda de sistemas que prolonguen la liberación del principio activo tras su administración. Las razones, entre otras, se derivan del deseo de alcanzar la liberación prolongada de los compuestos altamente solubles en agua, alcanzar velocidades de liberación que responden a un objetivo dado, disminuir el número de administraciones diarias y reducir al mínimo efectos secundarios. De acuerdo con todo lo anterior, consideramos los comprimidos matriciales de liberación prolongada como la alternativa que mejor se ajusta a los objetivos planteados. La gran difusión alcanzada por los comprimidos como forma farmacéutica de administración oral es debida al gran número de ventajas que presenta, entre ellas el permitir alcanzar esta liberación controlada del contenido mediante el empleo de polímeros matriciales como Eudragit®, alginato sódico y Metothel®.

Microencapsulación de microorganismos probióticos

Mª Teresa Sánchez Rodríguez, Mª Adolfina Ruiz Martínez y Mª Encarnación Morales Hernández
Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.

Resumen
Son muchos los estudios que avalan los diferentes efectos beneficiosos sobre la salud que aportan los microorganismos probióticos. Sin embargo, para ejercer dichos efectos es requerida su llegada en cantidad suficiente al lugar de acción. El problema que se presenta a la hora de utilizar los probióticos en el tratamiento o prevención de cualquier patología es la falta de formas farmacéuticas capaces de garantizar su viabilidad durante el almacenamiento y administración. El hecho de incorporar probióticos a cualquier formulación supone un reto en el ámbito de la Tecnología Farmacéutica, dada la escasa resistencia de estos microorganismos a los procesos tecnológicos y a diferentes condiciones ambientales como el pH, humedad o temperatura.
Por todo esto, nos planteamos la necesidad de proteger estos microorganismos probióticos con una barrera física que evite su exposición a las condiciones adversas del entorno. Para ello, recurrimos a técnicas de microencapsulación, considerando que la selección del método de microencapsulación estará en función del tamaño medio de la partícula requerida, de las propiedades físicas del agente encapsulante, del contenido a encapsular, de las aplicaciones del material encapsulado, del mecanismo de liberación deseado y del coste. En concreto, hemos seleccionado un método de emulsificación-gelificación iónica interna con alginato sódico, basándonos igualmente en los datos positivos obtenidos por nuestro grupo de investigación.
Asimismo, esto abriría un amplio abanico de posibilidades en el ámbito farmacéutico ya que permitiría la inclusión de tales micropartículas con microorganismos probióticos en formas farmacéuticas seguras y eficaces para la prevención y tratamiento de diferentes afecciones.

Actividad diamino-oxidasa (DAO) en probióticos

Mariluz Latorre, Oriol Comas, Teresa Veciana, Natalia Toro, Joan Bosch y M Carmen Vidal

Departamento de Nutrición y Bromatología. Campus de la Alimentación de Torribera (Facultad de Farmacia). Universidad de Barcelona, Barcelona. España-INSA-XaRTA.

Resumen

El objetivo de este trabajo fue poner a punto una metodología *in vitro* para la determinación de la capacidad diamino-oxidasa (DAO) o histaminasa en bacterias probióticas. Hasta donde llega nuestro conocimiento, a día de hoy, todavía no se ha descrito esta actividad en ningún microorganismo probiótico. El interés de este estudio radica en la posibilidad de poder utilizar estos probióticos para el tratamiento preventivo de la intolerancia a la histamina.

La actividad DAO se ha descrito en diferentes microorganismos, principalmente en bacterias utilizadas como cultivos iniciadores[1]. Los microorganismos pueden oxidar la histamina como fuente de carbono y nitrógeno, generando aldehído, peróxido de hidrógeno y amonio. El procedimiento por *resting cells,* que mantiene a las células microbianas en un medio fosfatado simple con histamina como único sustrato disponible, parece el más idóneo para detectar y cuantificar esta posible actividad enzimática[2].

Para la determinación de la capacidad DAO *in vitro* por *resting cells* se expuso a los microorganismos, tras su crecimiento en medio de cultivo nutritivo, a un medio fosfatado (0,05M, pH 7) suplementado con histamina (0,5 mM) durante 48 horas a 37ºC y agitación constante a 200 rpm. La determinación de la histamina se realizó mediante UHPLC-FL[3], utilizando enzima DAO puro de origen porcino como control positivo. La actividad DAO se mide en función del porcentaje de reducción de los contenidos de histamina en comparación con el mismo medio sin crecimiento microbiano.

Para comprobar la validez de la metodología propuesta se determinó la actividad histaminasa de cepas de *Lactobacillus sakei*, previamente identificadas como histaminasa positivas[4]. Estas cepas redujeron la histamina del medio, con un porcentaje de eficacia que osciló entre el 8 y el 50%, dependiendo de la cepa (Tabla I). Posteriormente, se realizó un estudio preliminar en el que se determinó la actividad DAO de 4 complementos probióticos comes (Tabla II). De todos ellos sólo el complemento probiótico A mostró actividad histaminasa *in vitro* con un porcentaje de reducción del 15%, atribuible exclusivamente a las cepas de *Lactobacillus*.

Se observó una pérdida de la actividad histaminasa en las cepas de *L. sakei* tras sucesivos cultivos en medio nutritivo, hecho que puede sugerir que el gen que codifica el enzima histamina-oxidasa no se encuentra localizado en el ADN cromosómico sino en un plásmido. Para confirmar esta hipótesis, se ha estudiado la localización e identificación del gen que codifica el enzima responsable de la actividad histaminasa en estas cepas.

El aporte de actividad DAO mediante probióticos puede ayudar a metabolizar a nivel intestinal la histamina exógena, y podría ampliar el espectro de efectos beneficiosos asociados a los probióticos.

Tabla I

Capacidad de reducción de la histamina de diferentes cepas de Lactobacillus sakei

Cepas bacterianas	*Capacidad DAO (% reducción de histamina)**
Lactobacillus sakei LU 1010	Positivo (50% ± 9,1)
Lactobacillus sakei LU 1011	Positivo (23 % ± 12,7)
Lactobacillus sakei LU 1015	Positivo (40% ± 10,7)
Lactobacillus sakei LU 1016	Positivo (8 % ± 1,1)

*Reducción de histamina determinada por UHPLC-FL en relación a los 0,5mM de histamina presentes en el medio de ensayo después de 48 horas de incubación a 37ºC y 200 rpm.

Tabla II

Capacidad de reducción de la histamina de diferentes complementos probióticos comerciales

Complementos probióticos	*Capacidad DAO (% reducción de histamina)**
MARCA A *(Streptococcus thermophilus DSM24731, Bifidobacteria breve DSM24732, B. longum DSM24736, B. Infantis DSM24737, Lactobacillus acidophilus DSM24735, L. plantarum DSM 24730, L. paracasei DSM24733, L. delbrueckii subsp. Bulgaricus DSM24734)*	Positivo (15 % ± 3,1)
MARCA B *(Bifidobacterium lactis BL-04, Lactobacillus acidophilus NCFM)*	Negativo
MARCA C *(Sacharomices boulardii)*	Negativo
MARCA D *(Lactobaciluus gasseri, Bifidobacterium bifidum, B. longum)*	Negativo

*Reducción de histamina determinada por UHPLC-FL en relación a los 0,5mM de histamina presentes en el medio de ensayo después de 48 horas de incubación a 37ºC y 200rpm

Referencias:

1. Alvárez MA, Moreno-Arribas MV. The problem of biogenic amines in fermented foods and the use of potential biogenic amine-degrading microorganisms as a solution. *Trends Food Sci Tech* 2014; 39: 146-155.
2. Leuschner R.G.K. Heidel M. and Hammes W.P. (1998). Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *Int J Food Microbiol* 39: 1-10.
3. Latorre-Moratalla ML, Bosch-Fusté J, Lavizzari T, Bover-Cid S, Veciana-Nogués MT, Vidal-Carou MC. Validation of an ultra high pressure liquid chromatographic method for the determination of biologically active amines in food. *J Chromatogr A* 2009; 1216: 7715–7720.
4. Dapkevicius MLNE, Nout MJR, Rombouts FM, Houben JH, Wymenga W. Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *Int J Food Microbiol* 2000; 57: 107-114.

The Human Milk Strain *Bifidobacterium* breve CECT7263 is safe in infants from 1 to 12 months and might improve symptoms of infant colic

JA Maldonado-Lobón[1], M Gil-Campos[2], J Maldonado[3], K Flores[2], MR Benavides[4], R Jaldo[5], I Jiménez del Barco[6], V Bolívar[5], E Prados[5], I Pe-

ñalver[5], M Molina[5], JM Fernández[5], JL García-Salmerón[5], FJ Garrido[5], AD Valero[3], F Lara-Villoslada[7], J Fonollá[3] and M Olivares[3]
Biosearch Life SA, Granada (Spain). Hospital Reina Sofía, Córdoba (Spain). Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada Spain. Clínica Pediátrica Roquetas, Almería (Spain). Servicio Andaluz de Salud, Servicios de Atención Primaria, Granada (Spain). Policlínica Cristo de la Salud, Granada (Spain). Research and Development. Lactalis Puleva, Granada (Spain).

Abstract
Objective: To evaluate the safety and tolerance of the consumption of an infant formula supplemented with the probiotic strain *B. breve CECT7263* in neonates from 1 to 12 months of life.
Methods: A randomized double blinded controlled study including 154 infants at the age of 1 month was conducted. Infants were assigned randomly to either infant formula supplemented with *B. breve* (Probiotic group), or the same formula without the probiotic strain (Control group). The primary outcome of the study was the growth of infants. Secondary outcomes were flatulence, regurgitation and bouts of crying. This study was carried out according to the Helsinki declaration, and the protocol was approved by the Regional Ethics Committee of the Sistema Andaluz de Salud based in Seville (Spain).
Results: No significant differences were observed in weight, length or head circumference between groups. The z-scores of weight, length and head circumference for age were calculated based on the WHO Child Growth Standards. The population of the study did not differ from the standard and no significant differences were detected between the groups of the study. No significant differences were observed in the odds to suffering flatulence or regurgitation however infants receiving the probiotic strain had lower risk of bouts of crying (infant colic) ($p<0.001$).
Conclusion: The consumption from 1 to 12 months of life of an infant formula enriched with the human milk probiotic strain *Bifidobacterium breve* CECT7263 is safe. Furthermore, the consumption of this probiotic strain might improve symptoms of infant colic.

Probióticos como nuevos adyuvantes en el tratamiento de la dermatitis atópica

Giuseppina Manzotti[1], Enrico Heffler[2] y Filippo Fassio[3]
[1]Allergy Outpatients Service, General Hospital, Treviglio, Italy. [2]Ambulatorio di Allergologia - ASL TO3 Ospedale Civile "Edoardo Agnelli", Pinerolo, Turin, Italy. [3]UO Medicina, ASL3 Ospedale San Jacopo, Pistoia, Italy.

Resumen
Objetivo: El objetivo de este estudio observacional es analizar el efecto de *Lactobacillus rhamnosus* y *Bifidobacterium lactis* en la dermatitis atópica (DA) en el contexto de la práctica clínica habitual.
Materiales y métodos: Se documentaron 107 pacientes adultos, con DA clínicamente diagnosticada y que consumieron una combinación simbiótica de *Lactobacillus rhamnosus LR05*, *Bifidobacterium lactis BS01* y fructo-oligosacáridos (FOS). Se evaluó la gravedad de la DA utilizando el método SCORAD y una Escala de Visualización analógica (EVA), relativa a la expresión clínica de la enfermedad (DA), en la situación basal y después de 2 y 4 meses de tratamiento. Las evaluaciones secundarias han comportado variaciones en el uso concomitante de corticosteroides, antihistamínicos e inhibidores de calcineurina.
Resultados: El tratamiento con *Lactobacillus rhamnosus LR05 y Bifidobacterium lactis BS01* reduce de forma significativa la gravedad de la dermatitis atópica después de 2 y 4 meses de tratamiento. La puntuación EVA no registró ningún efecto. Se registró también una reducción en el uso de corticosteroides, antihistamínicos e inhibidores de calcineurina.
Conclusiones: La integración de *Lactobacillus rhamnosus LR05*, *Bifidobacterium lactis BS01* y FOS tuvo un efecto positivo con una disminución significativa del índice SCORAD y una reducción concomitante en el uso de corticosteroides, anthistamínicos (después de 2 y 4 meses de tratamiento) e inhibidores de calcineurina (después de 4 meses de tratamiento). Estos datos apoyan la exigencia de ulteriores estudios con el fin de analizar de forma más detallada el efecto positivo de esta combinación simbiótica en la DA, en particular con los efectos de la cepa específica.
Palabras clave: *Lactobacillus rhamnosus, Bifidobacterium lactis, Dermatitis Atópica, Práctica Clínica, Probióticos, Simbióticos, Multicepas.*

Simbióticos multicepas como nuevos adyuvantes en el tratamiento de la rinitis alérgica

Giuseppina Manzotti[1], Enrico Heffler[2] y Filippo Fassio[3]
[1]Allergy Outpatients Service, General Hospital, Treviglio, Italy. [2]Ambulatorio di Allergologia - ASL TO3 Ospedale Civile "Edoardo Agnelli", Pinerolo, Turin, Italy. [3]UO Medicina, ASL3 Ospedale San Jacopo, Pistoia, Italy.

Resumen
Objetivo: Analizar los efectos de 2 simbióticos multi-cepas en la gestión clínica habitual de la rinitis alérgica (RA) estacional y RA perenne.
Materiales y métodos: Se documentaron 76 y 51 pacientes ambulatorios con RA clínicamente documentada en 36 clínicas en Italia. Se trataron con una combinación de simbióticos *Lactobacillus acidophilus NCFM* / *Bifidobacterium lactis BL-04*/ FOS y *Lactobacillus plantarum* LP01/ *Lactobacillus paracasei* LPC00 / FOS durante un periodo de 4 meses.
Después de 2 y 4 meses de tratamiento (respectivamente T1 y T2) se recogieron datos sobre clasificación de la RA e impacto sobre Asma (ARIA), sobre la intensidad de los síntomas nasales a través de la Escala Visual Analógica (EVA) y sobre el uso concomitante de corticosteroides y antihistamínicos.
Resultados: Después del tratamiento con 2 simbióticos multi-cepas se han observado reducciones significativas de los síntomas totales y de la clasificación ARIA en T1 y T2 respecto a la situación inicial (T0).
Respecto al índice EVA, se detectó una disminución significativa en todos los intervalos de tratamiento con respecto al pre-tratamiento a través de la combinación simbiótica *L. plantarum* / *L. paracasei;* se observó una disminución significativa con la combinación simbiótica *L. acidophilus* / *B. lactis* entre T0 y T1, mientras la ulterior reducción en T2 no alcanzó un resultado estadísticamente significativo. Además se encontró una disminución del uso de corticosteroides y antihistamínicos.
Conclusiones:
Estos datos sobre el efecto de los 2 simbióticos multi-cepas apoyan el efecto positivo en la gestión clínica habitual de sujetos afectados por RA estacional y RA perenne. Estudios futuros permitirán confirmar este potencial efecto beneficioso.