

## Artículo original

# Capacidad inmunomoduladora de cepas potencialmente probióticas de *Lactobacillus* aisladas de leche materna y heces de lactante

Roselynn Moreno Baptista<sup>a,\*</sup>, Elaysa Salas Osorio<sup>b</sup>, César Pérez Maldonado<sup>a</sup>, José Manuel Jiménez<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Postgrado de Microbiología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis. <sup>b</sup>Departamento de Biopatología, Cátedra de Microbiología, Facultad de Odontología. <sup>c</sup>Sección de Biotecnología, Instituto de Investigaciones, Facultad de Farmacia y Bioanálisis, Universidad de los Andes. Mérida, Venezuela.

Recibido 18 de enero de 2012; aceptado 6 de septiembre de 2012

**Resumen:** El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad inmunomoduladora de dos cepas de *L. paracasei* (66 y 71) y una de *L. rhamnosus* (75) aisladas de leche materna y heces de lactante, en Mérida, Venezuela, caracterizadas como potencialmente probióticas en estudios previos. Las bacterias fueron administradas a ratones BALB/c en el agua de bebida durante 7 días. Con los fluidos intestinales se realizaron pruebas de ELISA para determinar los valores de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-10. Se realizó la coloración de hematoxilina-eosina a cortes histológicos del intestino delgado para observar posibles reacciones inflamatorias. Para el análisis estadístico, se utilizó la prueba de ANOVA de una vía, seguido del test *post hoc* de Tukey, considerando a  $p < 0,05$  como significativo. Se observaron incrementos significativos, por encima del grupo control, en las concentraciones de IFN- $\gamma$  e IL-10 en el fluido intestinal de los ratones alimentados con las cepas 71 y 75. No se observaron reacciones inflamatorias en el intestino delgado. Al inducir un aumento en la producción de las citoquinas, estas cepas fueron capaces de estimular el sistema inmune manteniendo la homeostasis, por lo que pueden ser utilizadas como adyuvantes del sistema inmune intestinal, sin producir efectos secundarios indeseables.

**Palabras clave:** inmunomodulación, *Lactobacillus*, probióticos, leche materna, heces de lactante.

## Immunomodulating capacity of potentially probiotic *Lactobacillus* strains isolated from human breast milk and lactating children feces

**Abstract:** The objective of this study was to evaluate the immunomodulating capacity of two *L. paracasei* strains (66 and 71), and one *L. rhamnosus* (75) isolated from breast milk and lactating children feces in Mérida, Venezuela, characterized as potentially probiotic in previous studies. The bacteria were administered to BALB/c mice in their drinking water during 7 days. Intestinal fluids were tested by ELISA to determine IFN- $\gamma$  and IL-10 cytokines values. Histological sections of the small intestine were stained with hematoxylin-eosin to detect possible inflammatory reactions. The statistical analysis was done by a one way ANOVA, followed by the Tukey post hoc test, considering  $p < 0.05$  as significant. There were significant increases, as compared with the control group, of INF- $\gamma$  and IL.10 concentrations in the intestinal fluid of mice fed with strains 71 and 75. There were no inflammatory reactions of the small intestine tissue. By inducing an increase in cytokine production, these strains were capable of stimulating the immune system maintaining homeostasis, due to which they can be used as adjuvant of the immune intestinal system, without producing undesirable side effects.

**Keywords:** immunomodulation, *Lactobacillus*, probiotics, human breast milk, lactating children feces.

\* Correspondencia:  
E-mail: roselynn@ula.ve

### Introducción

En la actualidad, las sociedades desarrolladas se enfrentan a un progresivo incremento de problemas de salud relacionados con el sistema inmune y el tracto intestinal, tales como alergias y enfermedades inflamatorias autoinmunes. Evidencia reciente sugiere que las estrategias de nutrición

emergentes pueden contribuir a la disminución de estas patologías, mediante la manipulación de la microbiota a través de la dieta. De allí que, el uso de prebióticos y probióticos, se ha convertido en un área prioritaria dentro del campo de la nutrición y una herramienta prometedora para modular el sistema inmunológico de diferentes poblaciones [1].

Los probióticos han sido definidos como microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades apropiadas, confieren al hospedador efectos saludables. Para que la administración de bacterias probióticas sea exitosa, deben ser resistentes a condiciones específicas del tracto gastrointestinal, como la acidez gástrica y las sales biliares. El espectro de microorganismos probióticos es amplio y los más utilizados pertenecen al grupo de las bacterias ácido lácticas (BAL). Estas forman parte de la microbiota intestinal del hombre y animales, y están presentes en productos fermentados, como los lácteos. Dentro de este grupo destaca, entre otros, el género *Lactobacillus* [2-4].

Dada su localización intestinal (ya que la administración por vía oral es la habitual) y la posibilidad de interactuar con el epitelio de la mucosa, los probióticos actúan sobre la inmunidad intestinal, lo cual está íntimamente relacionado con los efectos beneficiosos sobre el hospedador. Sin embargo, se ha demostrado que algunas bacterias probióticas pueden actuar también como adyuvantes de la respuesta inmune sistémica. No todos los probióticos ejercen los mismos efectos, ya que existe una gran variabilidad inmunológica entre especies, e incluso entre cepas pertenecientes a la misma especie. La inmunomodulación, producida por probióticos como las BAL, depende de la interacción de estos microorganismos con el sistema inmune, a nivel intestinal, las bacterias pueden ser internalizadas como células completas o fragmentos antigénicos a través de las células M de la placa de Peyer o a través de las células dendríticas de la lámina propia [5, 6].

La mayoría de las cepas probióticas necesitan permanecer en estado viable para poder ejercer sus efectos en el sistema inmunológico; si bien algunas cepas de lactobacilos no viables han mostrado efecto inmunomodulador, no es tan potente como el observado en células viables. De manera similar, deben permanecer mínimo 48 a 72 horas en el intestino para poder ser efectivas, ya que se ha estimado que ese es el tiempo requerido para que un antígeno particulado ejerza su acción inmunomoduladora a nivel intestinal. Asimismo, los efectos sobre el sistema inmune también dependen de la dosis administrada; se ha establecido que las dosis de probióticos requeridas para que puedan actuar como adyuvantes del sistema inmune oscilan entre  $10^8$  y  $10^9$  unidades formadoras de colonias (UFC) por día [6].

La estimulación ejercida por estas bacterias al interactuar con las células epiteliales e inmunes ocasionan diferentes patrones de secreción de citoquinas en el intestino. En este sentido, el principal perfil de citoquinas inducido por BAL probióticas se caracteriza por incrementos en el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), en el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ), y en la interleuquina reguladora IL 10. Este patrón generalmente no se encuentra asociado a ningún aumento en la respuesta inflamatoria [6, 7].

Los linfocitos T ayudadores (Th) pueden presentar un patrón de liberación de citoquinas como IL-2, IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ , asociadas a la inmunidad mediada por células o respuesta de tipo Th1, caracterizada por fagocitosis y destrucción de los antígenos. También pueden secretar un

patrón contrario, típico de una respuesta tipo Th2 o humoral (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13), que inducen la diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas y la expansión clonal de los linfocitos B específicos del antígeno para su eliminación. Adicionalmente se ha descrito una respuesta reguladora, donde los linfocitos T reguladores (Treg, Tr1 y Th3) secretan IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF- $\beta$ ) que regulan el funcionamiento de las células Th1 y Th2 [8, 9].

En consecuencia, los principales efectos documentados de los probióticos sobre el sistema inmune son, a nivel de la inmunidad innata: promover la producción de mucina, inhibir el crecimiento de patógenos, disminuir la permeabilidad y reforzar el efecto de barrera del epitelio intestinal, aumentar la actividad de células NK y de macrófagos. Con respecto a la inmunidad adaptativa, los efectos más importantes reportados son: el incremento en la producción de células secretoras de IgA, IgG e IgM, incrementos en la IgA secretora total y específica y la modulación de la respuesta inflamatoria intestinal [10, 11].

El objetivo del presente estudio fue evaluar la capacidad inmunomoduladora de cepas potencialmente probióticas de *Lactobacillus* aisladas de muestras de leche materna y heces de lactante.

## Materiales y métodos

**Cepas estudiadas:** Se evaluó la capacidad inmunomoduladora de dos cepas de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (66 y 71) y una cepa de *L. rhamnosus* (75); identificadas bioquímicamente a través del medio API CHL y las galerías API 50 CH (BioMérieux), utilizando el programa API LAB plus versión 3.2 y caracterizadas como potencialmente probióticas de acuerdo a las pruebas *in vitro* de resistencia a la acidez gástrica, sales biliares [12] y actividad antagónica contra patógenos intestinales [13]. Dichas cepas fueron obtenidas a partir de muestras de leche materna de una mujer sana (cepa 71), sin tratamiento con antimicrobianos y muestras de heces de su lactante de un mes de vida (cepas 66 y 75), alimentado exclusivamente con leche materna, sin tratamiento con antimicrobianos; previo consentimiento oral y escrito de los participantes, directiva del Hospital Sor Juana Inés de la Cruz y Comité de Bioética de la Universidad de los Andes.

**Estandarización y elaboración de los inóculos bacterianos para la alimentación de los ratones:** Para la estandarización del inóculo se realizó un cultivo de 24 horas de cada cepa en caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) a 37 °C, a partir del cual se hicieron diluciones seriadas en agua peptonada, las cuales fueron cultivadas en placas de agar MRS e incubadas durante 24 horas a 37 °C, luego se realizó el conteo y estandarización del inóculo bacteriano, el cual debía tener una concentración final aproximada de  $10^8$  UFC/mL. Después de la estandarización, las cepas se inocularon en caldo MRS y se incubaron durante 24 horas a 37 °C. Los cultivos obtenidos fueron centrifugados a 4000 rpm por

10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 5 mL de leche descremada al 10%. Los inóculos fueron conservados bajo refrigeración hasta su uso [14].

**Animales de experimentación y periodos de administración:** Se emplearon ratones BALB/c machos, sanos, de seis semanas de vida, provistos por el bioterio del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), en San Miguel de Tucumán, Argentina. Los estudios fueron realizados bajo condiciones apropiadas de cuidado y mantenimiento, con libre acceso a una dieta convencional balanceada y agua (alimentación *ad libitum*). Las bacterias fueron administradas en el agua de bebida durante un periodo de 7 días. Se utilizaron tres animales por cada cepa bacteriana y un grupo control al que no se administró bacterias [14].

**Determinación de las concentraciones de citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-10 en fluido intestinal:** El intestino delgado de cada ratón fue extraído y se recuperó el fluido intestinal en tubos Eppendorf haciendo lavados con buffer fosfato salino (PBS) estéril. Con los fluidos intestinales de cada ratón se realizaron pruebas de enzima inmunoensayo (ELISA) para determinar los valores de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-10 tanto del grupo control como de los grupos alimentados con las cepas de lactobacilos. Se emplearon los estuches comerciales de ELISA para la determinación de IFN- $\gamma$  e IL-10 en ratones distribuidos por Biosciences, siguiendo las instrucciones suministradas por los fabricantes. Para determinar las concentraciones de las citoquinas en cada ratón, se realizaron tres mediciones de la densidad óptica y se calcularon los promedios de esas lecturas.

**Estudios histológicos de intestino delgado para detectar reacciones inflamatorias:** Luego de ser lavado con PBS, cada intestino delgado fue cortado en pequeños fragmentos, los cuales fueron colocados cuidadosamente en rejillas y sumergidos en formol al 10%. Posteriormente se procedió a la deshidratación de los tejidos mediante pases sucesivos en alcoholes, baños de xilol y se incluyeron en parafina líquida. Los cortes histológicos se realizaron con un microtomo. Por último, se fijaron los cortes en láminas portaobjetos y se utilizó la técnica de coloración con hematoxilina-eosina [5].

**Análisis estadístico:** Los datos obtenidos fueron procesados con el programa SPSS para Windows (versión 15.0); se utilizó el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía, seguido del test *post hoc* de Tukey, para establecer diferencias significativas entre las medias de los valores obtenidos de las cepas y del grupo control, considerando una  $p < 0,05$  como significativo.

## Resultados

**Determinación de las concentraciones de citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-10 en fluido intestinal:** Se observaron incrementos

significativos por encima del grupo control, en las concentraciones de IFN- $\gamma$  e IL-10 del fluido intestinal de los ratones alimentados con las cepas 71 y 75 (Figuras 1 y 2). El análisis estadístico determinó que las concentraciones inducidas de las citoquinas en fluido intestinal fueron muy similares en ambos grupos. Con la cepa 66 no se observaron diferencias significativas en los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-10.

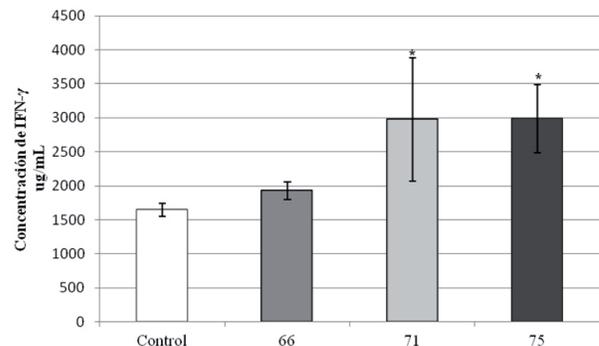


Figura 1. Concentración de IFN- $\gamma$  en fluido intestinal de ratones, después de la administración durante 7 días de las cepas de lactobacilos.  
\*Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

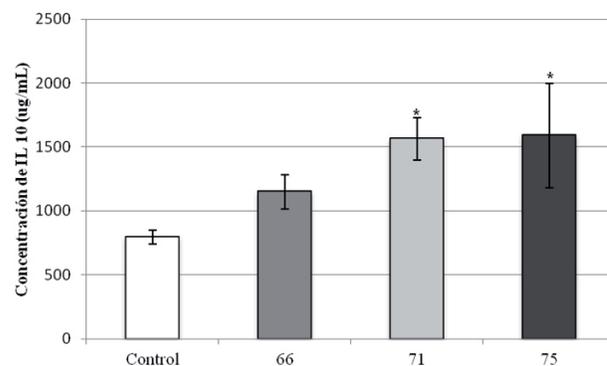


Figura 2. Concentración de IL-10 en fluido intestinal de ratones, después de la administración durante 7 días de las cepas de lactobacilos.  
\*Diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

**Estudios histológicos de intestino delgado:** No se observaron reacciones inflamatorias en los cortes teñidos con hematoxilina-eosina de todos los ratones.

## Discusión

Con respecto a los niveles de IFN- $\gamma$  e IL-10 en intestino, los resultados coincidieron con dos estudios, en los cuales se observaron aumentos con respecto al grupo control, en las células productoras de IFN- $\gamma$  e IL-10 del intestino de ratones alimentados por vía oral con leche fermentada que contenía *L. casei* DN-114001 y cultivos de las cepas probióticas *L. casei* CRL 431, *L. acidophilus* CRL 730, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CRL 423 y *S. thermophilus* CRL 412 resuspendidos en leche descremada [5, 15]. Los resultados de este estudio también coincidieron con lo afirmado por algunos autores, de que el principal perfil de secreción de citoquinas a nivel intestinal, inducido por BAL probióticas, se caracteriza por incrementos en el IFN- $\gamma$  y en

la IL-10 [6, 7].

El IFN- $\gamma$  es necesario para la maduración de células dendríticas, para el control de la proliferación celular intestinal y además tiene carácter pro-inflamatorio (aumenta la actividad fagocítica y citotóxica), ya que se encuentra asociado a la inmunidad mediada por células o respuesta de tipo Th1. Por otra parte, la IL-10 ejerce efectos reguladores en el tubo digestivo, asociados con la tolerancia a la microbiota local, con la inducción de la producción de IgA por parte de los linfocitos B y la regulación de las células Th1 y Th2, por lo cual, aunque también es capaz de inducir una respuesta inmunológica antiinflamatoria (tipo Th2) es una citoquina perteneciente al patrón Treg [5, 7-9]. Al inducir un aumento en la producción de estas dos citoquinas, las cepas estudiadas fueron capaces de estimular el sistema inmune manteniendo el balance Th1/Th2, conservando de esta manera la homeostasis en el intestino.

Por el contrario, en una de las tres cepas de lactobacilos evaluadas en el presente estudio (cepa 66), no se observaron incrementos significativos en la producción de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-10 en el intestino de los ratones, lo cual demuestra que no todos los probióticos ejercen los mismos efectos, ya que existe una gran variabilidad inmunológica entre especies, e incluso entre cepas pertenecientes a la misma especie [5, 6].

Los resultados obtenidos en los estudios histológicos de intestino delgado son similares a los informados en la literatura, la cual refiere que el consumo prolongado de leches fermentadas que contenían las cepas *Lactobacillus casei* DN-114001, *L. casei* CRL431 y *L. acidophilus* CRL 730 no produjeron efectos inflamatorios no deseados [5, 16]. De igual manera, son similares a lo expresado en uno de los estudios anteriores, en el cual, si bien se observaron incrementos en el IFN- $\gamma$  en el fluido intestinal de los ratones, no se observaron reacciones inflamatorias a nivel de la mucosa intestinal, ya que posiblemente sus efectos fueron modulados por la IL-10, cuyos niveles en el fluido intestinal también aumentaron [5].

## Conclusiones

Las cepas 71 (*L. paracasei* ssp. *paracasei*) y 75 (*L. rhamnosus*) tienen la capacidad de estimular la producción de las citoquinas IFN- $\gamma$  e IL-10, en ausencia de reacciones inflamatorias, manteniendo la homeostasis de la mucosa intestinal. Podrían ser utilizadas como adyuvantes del sistema inmune intestinal, sin producir efectos secundarios indeseables.

## Agradecimientos

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico, Tecnológico y de las Artes de la Universidad de los Andes (CDCHTA-ULA), Mérida Venezuela, por el financiamiento otorgado bajo el código FA-474-10-07-EM.

Al Laboratorio de Inmunología del Centro de Referencia para Lactobacilos CERELA, San Miguel de Tucumán

Argentina, por la colaboración y asesoramiento prestado en la ejecución de los ensayos.

## Referencias

- Romeo J, Nova E, Warnberg J, Gómez-Martínez S, Díaz L, Marcos A. Immunomodulatory effect of fibres, probiotics and symbiotics in different life-stages. *Nutr Hosp.* 2010; 25:341-9.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación) y OMS (Organización Mundial de la Salud). Consulta de Expertos FAO/OMS sobre evaluación de las propiedades saludables y nutricionales de los probióticos en los alimentos, incluida la leche en polvo con bacterias vivas del ácido láctico. Córdoba, Argentina. 2001.
- Mejía J, Chacón Z, Guerrero B, Rojas O, López G. Obtención de cepas de *Lactobacillus*. Caracterización *in vitro* como potenciales probióticas. *Revista Científica FVC-LUZ.* 2007; 17:178-85.
- Vasiljevic T, Shah N. Probiotics, from Metchnikoff to bioactives. *Int Dairy J.* 2008. 18:714-28.
- De Moreno de LeBlanc A, Chaves S, Carmuega E, Weill R, Antóine J, Perdígón G. Effect of long-term continuous consumption of fermented milk containing probiotic bacteria on mucosal immunity and the activity of peritoneal macrophages. *Immunobiology.* 2008; 213:97-108.
- Maldonado Galdeano C, de Moreno de LeBlanc A, Vinderola G, Bibas Bonet M, Perdígón G. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14:485-92.
- Arribas M. Probióticos: una nueva estrategia en la modulación del sistema inmune. [Tesis en línea]. Universidad de Granada, España. 2009. Disponible en: <http://digibug.ugr.es/bitstream/10481/2159/1/17820467.pdf>. Acceso: 20 de noviembre 2010.
- Borchers A, Selmi C, Meyers F, Keen C, Gershwin E. Probiotics and immunity. *J Gastroenterol.* 2009; 44:26-46.
- Ortiz-Andrellucchi, A. Nutrición e inmunidad. *Rev Soc Med Quir Hosp Emerg Pérez de León.* 2007; 38 Suppl 1:S12-8.
- Saavedra J. Use of probiotics in pediatrics: rationale, mechanisms of action, and practical aspects. *Nutr Clin Pract.* 2007; 22:351-65.
- Ardusso L, De Gennaro M, Eiguchi K, Rubeglio E, de Paula J, Perdígón G. Taller de expertos en probióticos: revisión de la evidencia y aplicaciones clínicas. *Arch Alerg Inmunol Clin.* 2010; 41 (2):45-53.
- Moreno R, Salas E, Pérez-Maldonado C, Jiménez JM. Evaluación del potencial probiótico de lactobacilos aislados de heces de lactantes y leche materna. *Rev MedULA.* 2011; 20:135-9.
- Moreno R, Salas E, Pérez-Maldonado C, Jiménez JM. Estudio preliminar de la actividad antagonista sobre microorganismos patógenos de cepas de *Lactobacillus* aisladas a partir de heces de lactantes y leche materna. *Revista CIENCIA.* 2012; 20:105-11.
- Maldonado Galdeano C, Perdígón G. The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through innate immunity. *Clin Vaccine Immunol.* 2006; 13:219-26.
- Perdígón G, Maldonado Galdeano C, Valdez J, Medici M. Interaction of lactic acid bacteria with the gut immune system. *Eur J Clin Nutr.* 2002; 56 Suppl 4:S21-6.
- Costamagna A, Fuentes M, Fabro A, Reus V, Benmelej A, Giugni MC, Ortega H, Minella K, Dezar G, Illesca P, Gallo JE. Expresión de inmunoglobulina A y proliferación celular en intestino de ratones alimentados con leche SanCor Bio. *Revista FABICIB.* 2008; 12:47-55.