

Probióticos

Su impacto en la
nutrición y la salud

Una visión desde
el Cono Sur

Juan Andrés De Paula

Gabriel Vinderola

Ricardo Weill



PROBIÓTICOS

SU IMPACTO EN LA NUTRICIÓN Y LA SALUD
UNA VISIÓN DESDE EL CONO SUR

PROBIÓTICOS

SU IMPACTO EN LA NUTRICIÓN Y LA SALUD
UNA VISIÓN DESDE EL CONO SUR

Juan Andrés De Paula

Gabriel Vinderola

Ricardo Weill

Tapa y contratapa: Blaunt

Diseño de interiores: Blaunt

Edición general: Alejandro Ferrari

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

1ª edición, Asociación Civil Danone para la Nutrición, la Salud y la Calidad de Vida, 2018.

© de todas las ediciones

Asociación Civil Danone para la Nutrición,
la Salud y la Calidad de Vida
Moreno 877 - Piso 13 - C.A.B.A.
secretaria@institutodanoneconosur.org

Queda hecho el depósito que previene la Ley 11.723
Impreso en Argentina – Printed in Argentina

Tirada: 50 ejemplares.

Impreso en Latingráfica
Rocamora 4161
CABA
Argentina

PRÓLOGO

Cuando las primeros organismos animales hicieron su aparición en la tierra –hace más de 600 millones de años– las bacterias ya eran dueñas del mundo. Desde entonces, no solo hemos aprendido a convivir con ellas, sino que hemos experimentado lo que podría denominarse una co-evolución en un diálogo caracterizado por una interacción que ha sido tan constante como diversa.

Es necesario reconocer que solamente en muy pocos casos, estas interacciones revisten de un carácter patógeno. En la mayor parte de los procesos, bacterias y organismos animales nos ayudamos mutuamente. En el cuerpo humano la microbiota estable más importantes se encuentra en boca, tracto gastrointestinal, vagina y piel. Sin lugar a dudas, la microbiota intestinal es la más compleja, tanto por la cantidad de organismos que la componen como por la diversidad de funciones que posee como las interacciones con el sistema inmune. Basta mencionar que un animal axénico (sin bacterias en su intestino) por demás saludable, tienen una sobrevida muy frágil, aparecen enfermedades no solo infecciosas sino degenerativas y además requiere de un 30% más de alimento que un animal naturalmente colonizado por bacterias. Esa es una medida aproximada de la contribución nutricional aportada por el salvataje de nutrientes realizado por la microbiota intestinal. No debería sorprendernos, porque los humanos contamos con apenas 20 genes para codificar las enzimas necesarias para digerir carbohidratos, mientras que solamente los bacteroides cuentan con más de 260.

La microbiota intestinal crece y madura a partir del nacimiento (y existen indicios que algunos procesos comienzan en la vida intrauterina) hasta que alcanza su homeostasis alrededor de los tres años de edad. Los primeros microorganismos colonizadores son claves y de allí el papel de la exposición durante el parto, los prebióticos de la leche de madre que representan hasta el 8% del total de sus nutrientes) están compuestos por más de 200 oligosacáridos diferentes tienen como propósito fundamental el desarrollo de una microbiota estable y saludable. Es altamente probable que en el mismo objetivo opere el papel activo de la ruta entero-mamaria seleccionando cepas del entorno intestinal de la madre para conformar los 3 enterotipos predominantes. Aunque, escasas en variedad (no suelen ser más de 2 a 15 las especies cultivables en leche materna) la evidencia demuestra que son estables y características de cada mujer y que luego pueden ser “rescatadas” de la microbiota intestinal.

Hoy existe evidencia de la asociación entre la microbiota y varios posibles mecanismos fisiopatológicos en numerosas enfermedades crónicas: alérgicas, inflamatorias, obesidad, diabetes y el síndrome metabólico.

En un mundo donde es común uso de antibióticos, la dieta, las condiciones de crianza animal se han modificado tan sustancialmente que hay un impacto en la composición, función e interacción de nuestra microbiota intestinal y la salud. En este sentido, es válido preguntarnos si existe una microbiota saludable? Los alimentos y

compuestos bioactivos de la dieta que hoy consideramos saludables son promotores de una mayor diversidad en la composición de la microbiota intestinal, todos aportan sustratos que favorecen el desarrollo de diversas vías metabólicas hacia el interior de la propia microbiota. Es probable que esta riqueza en el dialogo molecular bacteriano pueda contribuir al mantenimiento de la salud.

Estas son algunas de las consideraciones que han impulsado al vertiginoso crecimiento de la ciencia detrás de los probióticos. Apenas hace menos de 20 años un comité de expertos reunido en Córdoba definió a los probióticos como microorganismos vivos que cuando se administran en cantidades adecuadas ejercen un beneficio para el hospedador. La enorme contribución de esta comisión radicó en que puso un nombre y un territorio común que ayudo que las distintas disciplinas involucradas tuvieran un intercambio más rico y que se ha traducido en el cuerpo de conocimiento científico que hoy está disponible.

Pero, aún mucho antes de la definición surgida en Córdoba, los probióticos han acompañado la historia del hombre desde hace al menos 10.000 años. El viejo testamento atribuía la longevidad de Abraham al consumo de leche agria, gran parte de los alimentos fermentados en su denominación cultural como su diseminación reconocían un componente de salud, Metchnikof atribuía la longevidad de los pueblos balcánicos a la composición de la flora intestinal. No nos debería sorprender, porque los alimentos, en especial los lácteos fermentados son el segundo hábitat natural de las bacterias acidolácticas. Existen numerosas razones tecnológicas y estudios experimentales para pensar que los alimentos fermentados tienen una profunda transformación y las perspectivas del uso de probióticos es amplia.

Desde el Instituto Danone del Cono Sur hemos abordado siempre con una perspectiva regional temas centrales de la alimentación, la nutrición y la salud. Es por ello, que el IDCS ha convocado a más de 15 investigadores referentes de la Región y del mundo para organizar un Taller en las afueras de la ciudad de Buenos Aires, que es la semilla germinal de este libro.

Merece destacarse el papel de Gabriel Vinderola, Juan de Paula y Ricardo Weill quienes más allá de su responsabilidad editorial, han desempeñado un papel central en la armonización de los temas y de sus documentos. Como en otras ocasiones, me es grato agradecer el compromiso de Alejandro Ferrari en la revisión y compilación del libro

Aspiramos a que este documento contribuya a enriquecer el material de consulta, ser una guía en la investigación, mejorar la docencia, ayudar a la toma de decisiones clínicas y constituir una referencia en idioma español de una visión moderna y actualizada del complejo mundo de los probióticos así como un mojón más en el necesario proceso de avanzar hacia un marco regulatorio global en el contexto del CODEX.

Dr. Esteban Carmuega
Director Instituto Danone

ÍNDICE

PRÓLOGO	5
• CAPÍTULO 1	
ESTABLECIMIENTO Y DINÁMICA DEL MICROBIOMA INTESTINAL Y FECAL HUMANO DURANTE LOS PRIMEROS 1000 DÍAS DE VIDA	17
MIGUEL GUEIMONDE - ROCIO MARTIN - JAN KNOL - SEPPO SALMINEN	
I. INTRODUCCIÓN	19
II. EL DESARROLLO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL	21
II.A. COLONIZACIÓN <i>IN UTERO</i>	21
II.B. MODO DE PARTO	22
II.C. TIPO DE ALIMENTACIÓN	23
II.D. EDAD GESTACIONAL	25
II.E. USO DE ANTIBIÓTICOS	25
II.F. IMPACTO DE LA COLONIZACIÓN	26
II.G. CONCLUSIONES	27
III. BIBLIOGRAFÍA CITADA	27
• CAPÍTULO 2	
EL USO DE PROBIÓTICOS DURANTE LOS PRIMEROS 1000 DÍAS DE VIDA	31
MARIA CARMEN COLLADO - KAOUTHER BEN AMOR - SEPPO SALMINEN - JAN KNOL - ROCIO MARTIN	
I. LA LECHE MATERNA HUMANA COMO REFERENCIA PARA EL DESARROLLO DE ESTRATEGIAS	

NUTRICIONALES EN LA VIDA TEMPRANA	33
I.A. LA MICROBIOTA DE LA LECHE HUMANA	34
I.B. OLIGOSACÁRIDOS DE LECHE HUMANA	35
II. LOS PROBIÓTICOS EN LOS PRIMEROS 1000 DÍAS	37
II.A. LOS PROBIÓTICOS DURANTE EL EMBARAZO	38
II.A.I. LOS PROBIÓTICOS Y LAS INFECCIONES GENITOURINARIAS	38
II.A.II. LOS PROBIÓTICOS Y LA COLONIZACIÓN POR <i>STREPTOCOCCUS</i> DEL GRUPO B	38
II.A.III. LOS PROBIÓTICOS Y LA DIABETES MELLITUS GESTACIONAL	39
II.B. LOS PROBIÓTICOS DURANTE LA INFANCIA	41
II.B.I. LOS PROBIÓTICOS Y LA PREVENCIÓN DE LA ALERGIA	41
II.B.II. LOS PROBIÓTICOS EN LA PREVENCIÓN DE LA ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE Y LA SEPSIS DE DEBUT TARDÍO	43
II.B.III. EL USO DE PROBIÓTICOS PARA MANEJAR Y PREVENIR EL CÓLICO INFANTIL	44
II.B.IV. LOS PROBIÓTICOS EN EL MANEJO DE LA DIARREA AGUDA, Y LA DIARREA ASOCIADA A ANTIBIÓTICOS, EN NIÑOS.	45
III. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	46
IV. BIBLIOGRAFÍA CITADA	47

• **CAPÍTULO 3**

YOGURES CON PROBIÓTICOS; UNA VISIÓN TECNOLÓGICA	61
GABRIEL VINDEROLA	
I. ARGENTINA, CUNA DE UNA DEFINICIÓN DE PROBIÓTICOS CON CONSENSO INTERNACIONAL	63
II. ALIMENTOS UTILIZADOS COMO VEHÍCULOS DE PROBIÓTICOS	64
III. LECHE FERMENTADAS Y YOGURES CON PROBIÓTICOS	65
IV. ¿CÓMO SE ELABORA UN YOGUR CON PROBIÓTICOS?	69
V. RECuento DE CÉLULAS VIABLES DE PROBIÓTICOS EN YOGURES	71

VI. CONCLUSIONES	73
VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	74

• CAPÍTULO 4

METODOLOGÍAS EN LA INVESTIGACIÓN DE LOS BENEFICIOS DE LOS PROBIÓTICOS	77
DIEGO HERNÁN GIUNTA	

I. INTRODUCCIÓN	79
II. DISEÑOS	79
II.A. ESTUDIOS OBSERVACIONALES	79
II.B. COHORTE	80
II.C. CASOS Y CONTROLES	80
II.D. CORTE TRANSVERSAL	81
II.E. ESTUDIO ECOLÓGICO	81
II.F. REPORTE DE CASOS/SERIE DE CASOS	82
II.G. ESTUDIOS EXPERIMENTALES	82
II.H. ENSAYO CLÍNICO	82
II.I. ESTUDIO CUASIEXPERIMENTAL	84
III. POBLACIÓN	85
IV. INTERVENCIÓN	87
V. COMPARADOR	89
VI. EVENTOS DE INTERÉS	90
VII. SEGUIMIENTO	92
VIII. SEGURIDAD	92
IX. ASIGNACIÓN AL AZAR DE TRATAMIENTO	94
X. CIEGO	96

XI. ADHERENCIA	97
XII. ESTIMACIÓN DE TAMAÑO MUESTRAL	99
XIII. CONCLUSIÓN	101
XIV. BIBLIOGRAFÍA CITADA	102

• **CAPÍTULO 5**

EVIDENCIAS ACERCA DEL PAPEL DE LOS PROBIÓTICOS EN LA SALUD DIGESTIVA DESDE LA PERSPECTIVA DE LA CLÍNICA GASTROENTEROLÓGICA	109
JUAN ANDRÉS DE PAULA	
I. INTRODUCCIÓN	111
II. LA MICROBIOTA Y EL HUÉSPED	111
III. PROBIÓTICOS Y TRASTORNOS FUNCIONALES:	112
IV. PROBIÓTICOS Y SOBRECRECIMIENTO BACTERIANO DEL INTESTINO DELGADO	113
V. PROBIÓTICOS Y CÁNCER COLORRECTAL	113
VI. PROBIÓTICOS Y DIARREA INFECCIOSA	114
VII. PROBIÓTICOS Y OTRAS AFECCIONES GASTROINTESTINALES	115
VIII. CONCLUSIONES	115
IX. BIBLIOGRAFIA CITADA	116

• **CAPÍTULO 6**

ENFERMEDADES ALÉRGICAS, MICROBIOTA Y EMPLEO DE PROBIÓTICOS PARA SU TRATAMIENTO	119
GUILLERMO H. DOCENA	
I. GENERALIDADES SOBRE ENFERMEDADES ALÉRGICAS Y TRATAMIENTOS	121

I.A. ENFERMEDADES ALÉRGICAS. DEFINICIONES Y CONCEPTOS GENERALES	121
I.B. PREVALENCIA, “HIPÓTESIS DE LA HIGIENE” Y MICROBIOTA	123
I.C. MECANISMOS DE TOLERANCIA	126
II. MICROBIOTA Y ENFERMEDADES ALÉRGICAS	127
III. TRATAMIENTOS BASADOS EN EL EMPLEO DE PROBIÓTICOS, ENSAYOS CLÍNICOS EN PACIENTES ALÉRGICOS	131
V. BIBLIOGRAFÍA CITADA	134

• CAPÍTULO 7

EVIDENCIA DE LA EFECTIVIDAD DE LOS PROBIÓTICOS EN PROGRAMAS SOCIALES	137
JULIO VILLENA - SUSANA ALVAREZ - GRACIELA FONT - SUSANA SALVA - MARÍA PÍA TARANTO	
I. INFECCIONES INTESTINALES Y RESPIRATORIAS EN NIÑOS	139
II. LOS MICROORGANISMOS BENEFICIOSOS COMO ALTERNATIVA PARA COMBATIR INFECCIONES	139
III. <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> CRL1505 Y SUS MECANISMOS DE ACCIÓN	140
IV. EFECTO DEL <i>LACTOBACILLUS RHAMNOSUS</i> CRL1505 EN LA SALUD DE LOS NIÑOS Y EL NACIMIENTO DEL PROGRAMA “YOGURITO”	143
IV. A. ESTUDIO CLÍNICO	143
IV. B. ETAPAS DE IMPLEMENTACIÓN	144
IV. C. RESULTADOS DEL ESTUDIO CLÍNICO	147
IV. D. CONCLUSIONES GENERALES	150
V. EL PROGRAMA SOCIAL “YOGURITO”: DESAFÍOS, APRENDIZAJES E IMPACTOS	150
VI. MODELO DE LA TRIPLE HÉLICE EN BENEFICIO DE LA SOCIEDAD: CONNIVENCIA ESTADO-SECTOR CIENTÍFICO-SECTOR PRODUCTIVO	152
VII. AGRADECIMIENTOS	153
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	153

• CAPÍTULO 8

EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DE LOS MECANISMOS INDUCIDOS POR PROBIÓTICOS EN LA MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE 157

CAROLINA MALDONADO GALDEANO - SILVIA INÉS CAZORLA - GABRIELA PERDIGÓN
JOSÉ MARÍA LEMME DUMIT

I. INTRODUCCIÓN: EL PAPEL DE LA MICROBIOTA EN LA RESPUESTA INMUNE	159
II. BACTERIAS PROBIÓTICAS COMO INMUNOMODULADORES	159
III. EFECTO DE LOS PROBIÓTICOS SOBRE LA BARRERA EPITELIAL	161
IV. EFECTO SOBRE LÁMINA PROPIA DEL INTESTINO DELGADO	165
V. MECANISMOS INDUCIDOS POR PROBIÓTICOS EN ETAPAS TEMPRANAS DE LA VIDA	170
VI. MECANISMOS INMUNES DIFERENCIALES ENTRE BACTERIAS COMENSALES Y PROBIÓTICAS	171
VII. CONCLUSIONES	172
VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA	172

• CAPÍTULO 9

PROBIÓTICOS Y NUTRICIÓN ANIMAL 179

ELOY ARGANARAZ MARTÍNEZ - JAIME BABOT - MARÍA CRISTINA APELLA - ADRIANA PÉREZ CHAIA

I. INTRODUCCIÓN	181
II. PRODUCCIÓN ANIMAL INTENSIVA	181
III. LA MICROBIOTA INTESTINAL DE ANIMALES DE GRANJA	183
III.A. MICROBIOTA DE AVES	184
III.B. MICROBIOTA DE PORCINOS	186
III.B. MICROBIOTA DE RUMIANTES	187
IV. FACTORES QUE AFECTAN A LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA PRODUCCIÓN INTENSIVA	189
V. USO DE ADITIVOS EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL	191

VI. MODO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS PARA ANIMALES	192
VII. USO DE PROBIÓTICOS EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL	194
VIII. PROTECCIÓN DEL MEDIOAMBIENTE	196
X. BIBLIOGRAFÍA CITADA	197

• CAPÍTULO 10

PROBIÓTICOS: BENEFICIOS BÁSICOS Y MECANISMOS COMUNES	203
--	-----

MARY ELLEN SANDERS

I. INTRODUCCIÓN	205
II. BENEFICIOS DE SALUD DE LOS PROBIÓTICOS	205
III. BENEFICIOS DE SALUD DE LOS PROBIÓTICOS EN INDIVIDUOS SANOS	208
IV. MANEJO DEL SESGO EN ESTUDIOS SOBRE PROBIÓTICOS	209
V. MECANISMOS COMPARTIDOS Y BENEFICIOS CENTRALES DE PROBIÓTICOS	210
VI. IMPLICANCIAS CIENTÍFICAS Y REGULATORIAS DE LOS MECANISMOS COMPARTIDOS ENTRE TAXONES PROBIÓTICOS	211
VII. EL FUTURO DE LOS PROBIÓTICOS	212
VIII. CONCLUSIONES	213
IX. AGRADECIMIENTOS	213
X. BIBLIOGRAFIA CITADA	213

• CAPÍTULO 11

ASOCIACIÓN INTERNACIONAL DE PROBIÓTICOS: UNA PERSPECTIVA GLOBAL	219
---	-----

GEORGE PARASKEVAKOS

I. INTRODUCCIÓN	221
I.A. PROBIÓTICOS; UN MERCADO QUE EXPERIMENTA UN CRECIMIENTO SIN PRECEDENTES	221
II. SEGMENTACIÓN DEL MERCADO Y DE LA CATEGORÍA DE PRODUCTO	224
III. SEGMENTACIÓN DEL MERCADO EN ÁREAS ESPECÍFICAS DEL MUNDO	225
IV. OBSERVACIONES Y PREDICCIONES PARA EL 2025	226
V. FACILITADORES DEL CRECIMIENTO	227
VI. ESTADO DEL ARTE CIENTÍFICO EN USOS NO CONVENCIONALES DE LOS PROBIÓTICOS; NUEVAS OPORTUNIDADES	229
VII. REGULACIONES EN EL CAMPO DE LOS PROBIÓTICOS; UN PAISAJE DIVERGENTE	230
VIII. LOS PROBIÓTICOS EN LAS DISTINTAS REGIONES DEL MUNDO	230
VIII.A. CANADÁ; LOS PROBIÓTICOS COMO PRODUCTOS DE SALUD NATURALES (PSN)	230
VIII.B. ESTADOS UNIDOS; LOS PROBIÓTICOS COMO SUPLEMENTOS DIETARIOS	233
VIII.C. EUROPA; SUPLEMENTOS ALIMENTARIOS	234
VIII.D. AUSTRALIA; MEDICINA COMPLEMENTARIA	234
IX. RESUMEN GENERAL	235
X. PERSPECTIVAS Y DESAFÍOS	236
XI. BIBLIOGRAFÍA CITADA	236

• **CAPÍTULO 12**

ACORTANDO LA BRECHA EN LA REGLAMENTACIÓN SOBRE PROBIÓTICOS EN EL CONO SUR: ESCENARIO EN ARGENTINA	239
--	-----

SUSANA FATTORI - ELIANA CORIA - ANDREA MOSER

I. INTRODUCCIÓN	241
II. NORMATIVA ALIMENTARIA EN ARGENTINA	241
III. REGULACIÓN SOBRE PROBIÓTICOS EN PARTICULAR	242
IV. ANTECEDENTES QUE LLENARON EL VACÍO REGULATORIO EN ARGENTINA	243

V. LOGROS DEL TRABAJO EN ARGENTINA	244
VI. ESCENARIO ACTUAL DE LA REGULACIÓN SOBRE PROBIÓTICOS	245
VII. SITUACIÓN REGIONAL	246
VII.A. MERCADO COMÚN DEL SUR (MERCOSUR)	246
VII.B. BRASIL	246
VII.C. CHILE	248
VII.D. COLOMBIA	248
VII.E. ECUADOR	249
VII.F. SECRETARÍA DE INTEGRACIÓN ECONÓMICA CENTROAMERICANA (SIECA)	250
VIII. SITUACIÓN INTERNACIONAL	251
VIII.A. CANADÁ	251
VIII.B. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA	251
VIII.C. EUROPA	252
VIII.D. AUSTRALIA Y NUEVA ZELANDA	252
VIII.E. JAPÓN	253
IX. CONCLUSIONES	254
X. BIBLIOGRAFÍA CITADA	254

ESTABLECIMIENTO Y DINÁMICA DEL MICROBIOMA INTESTINAL Y FECAL HUMANO DURANTE LOS PRIMEROS 1000 DÍAS DE VIDA

Miguel Gueimonde

- *Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos*
- *Instituto de Investigación sobre Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC)*
- *Villaviciosa, Asturias, Spain*

Rocio Martin

rocio.martin@danone.com

- *Danone Nutricia Research, Singapur*

Jan Knol

- *Danone Nutricia Research, Utrecht, Países Bajos*

Seppo Salminen

sepsal@utu.fi

- *Foro de Alimentos Funcionales, Facultad de Medicina, Universidad de Turku, Turku, Finlandia*

RESUMEN

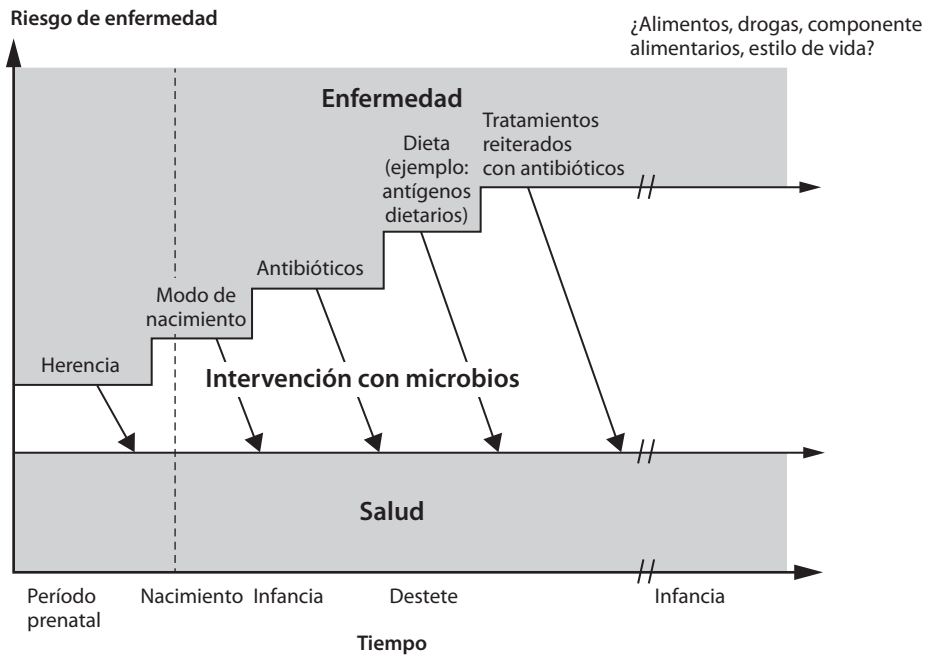
El entorno microbiano temprano tiene un rol crucial, afectando el riesgo de padecer enfermedades crónicas. El trasfondo genético, el entorno, el medio nutricional temprano, el uso de antibióticos y otros medicamentos, afectan tanto la arquitectura intestinal de la microbiota, como su composición individual y su actividad. Evidencias recientes relacionan fuertemente la composición de la microbiota también tanto con el sobrepeso y la obesidad, como con la malnutrición; datos crecientes sugieren que un gran número de otros estados patológicos también estarían vinculados con la composición de la microbiota. En este capítulo se realiza una revisión del establecimiento y desarrollo de la microbiota intestinal humana y se describen ejemplos de desviaciones y el rol de la disbiosis como un factor promotor de aberraciones de la microbiota.

I. INTRODUCCIÓN

El término disbiosis describe un estado de desbalance o mala adaptación microbiana, sobre o dentro del organismo, que puede ser causado por factores tan diversos como exposiciones repetidas y excesivas a antibióticos, o dietas inapropiadas, incluyendo la sobrenutrición o la malnutrición.

La disbiosis puede tener muchas causas y consecuencias. Dependiendo de la estructura de la microbiota puede –por ejemplo– reforzar o debilitar la habilidad del organismo para extraer energía de la dieta, permitiendo un rápido almacenamiento de la energía obtenida para convertirla en grasas corporales, o puede prevenir el uso de energía y nutrientes en niños mal nutridos, e incluso adultos (ver **Figura 1**).

Figura 1. Factores que alteran la microbiota de su normal desarrollo, causando disbiosis.



Lo opuesto a la disbiosis, una microbiota sana, es difícil de definir, en tanto la microbiota saludable es un rasgo individual y difiere entre distintas regiones del globo. En consecuencia, el mismo concepto de desviación varía según la localización geográfica, el trasfondo genético y las condiciones ambientales. De hecho, la microbiota se ha vuelto un "blanco en movimiento" para tomar medidas terapéuticas preventivas, máxime considerando que todavía no se sabe si los cambios en el microbioma subyacen como factores responsables de las enfermedades no-transmisibles, o si tal vez se trata sus consecuencias. La definición de una microbiota saludable como blanco de

intervenciones nutricionales que tengan como finalidad la reducción del riesgo de enfermedad, solo podrá ser alcanzada a partir de laboriosas determinaciones prospectivas sobre niños saludables, que permanezcan además saludables durante períodos de seguimiento razonablemente largos. En qué medida la definición alcanzada se aplique a entornos ambientales de evolución rápida, es otra pregunta abierta.

Además, el estado de disbiosis puede ser modificado por probióticos específicamente dirigidos para influenciar la microbiota en distintas partes del tracto gastrointestinal, o probióticos específicos administrados para prevenir la aparición de tales disbiosis.

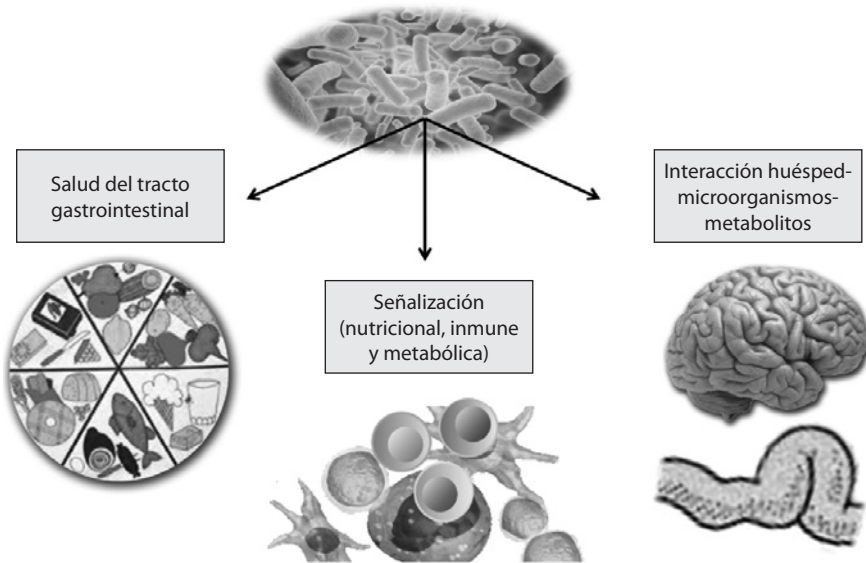
En la actualidad, sabemos que:

- La colonización microbiana temprana es clave en la promoción y mantenimiento de la salud.
- La microbiota materna constituye el primer inóculo para el desarrollo de la microbiota infantil.
- La dieta (prebióticos, probióticos, simbióticos y postbióticos) y la higiene tienen un papel importante en influenciar la composición y diversidad de la microbiota.
- Las aberraciones o desviaciones de la microbiota, o el estado de disbiosis, están vinculados a un mayor riesgo de desarrollo de enfermedades crónicas no-transmisibles.
- La malnutrición se vincula con las deficiencias, excesos o desbalances en la ingesta de energía y/o nutrientes de los individuos (definición de la OMS).
- El término sobrenutrición se usa para referirse al desbalance entre el consumo y el gasto de energía.
- El término subnutrición se usa para referirse a la falta de energía y/o nutrientes, y puede deberse al gasto, atrofia, bajo peso o deficiencias en vitaminas y minerales.

El reconocimiento de la microbiota intestinal como un factor decisivo de la salud humana es generalmente aceptado en la actualidad. También se entiende que la microbiota tiene un rol importante en la programación de la salud y/o enfermedad. Este fenómeno es especialmente relevante en madres embarazadas y recién nacidos, en particular durante los primeros 1000 días de vida. Esta colonización microbiana temprana es de importancia crucial, ya que proporciona estímulos esenciales para la maduración del sistema inmune del hospedador, en etapas en que muchas funciones

metabólicas del recién nacido no han madurado todavía. Estudios en animales han demostrado que la falta de una microbiota adecuada puede alterar muchas funciones del hospedador, y que la restauración de esa microbiota en la vida temprana –pero no luego durante la adultez– es efectiva para normalizar esas funciones [1,2]. En consecuencia, la evidencia actualmente disponible sugiere que los recién nacidos dependen del establecimiento correcto de la microbiota para alcanzar la homeostasis metabólica. Desafortunadamente, el proceso de colonización microbiana es complejo y no del todo comprendido. Mientras que algunos factores han sido identificados, otros todavía debe estudiarse. Los esfuerzos científicos por comprender estos factores han abierto nuevas preguntas, y han desafiado nuestro conocimiento acerca de la relación entre la microbiota y el hospedador. Un buen ejemplo de esto son los estudios recientes que cuestionan la esterilidad microbiana durante la vida fetal, o aquellos que demuestran la presencia de una microbiota normal en la leche materna humana (ver **Figura 2**). El paradigma clásico, hoy desafiado, era que la vida intrauterina y la leche materna, eran estériles.

Figura 32. Algunos roles definidos de la microbiota y sus metabolitos en la salud humana.



II. EL DESARROLLO DE LA MICROBIOTA INTESTINAL

II.A. COLONIZACIÓN *IN UTERO*

La percepción acerca del establecimiento inicial de la microbiota intestinal ha cambiado. Durante mucho tiempo se consideró que el feto era estéril, pero esta idea está siendo desafiada en la actualidad. El embarazo está vinculado a distintos

cambios fisiológicos destinados a respaldar el correcto desarrollo del feto y del recién nacido. Un cambio en la microbiota intestinal de una embarazada hacia un perfil más pro-inflamatorio tiene lugar en el tercer trimestre de embarazo [3]. De manera similar, algunos trabajos [4] reportan que la microbiota intestinal cambia drásticamente desde el primer al tercer trimestre, con una vasta diversidad entre madres, y un incremento generalizado en Proteobacterias y Actinobacterias, y una riqueza reducida.

Durante este proceso, se altera la permeabilidad de la pared intestinal materna hacia los microorganismos, y la microbiota cambia hacia una de perfil más pro-inflamatorio. Se ha sugerido que este fenómeno facilita la traslocación bacteriana en el intestino materno, y –en consecuencia– se favorece la transferencia madre-a-niño de microbios intestinales [4], hecho respaldado por datos de detección de bajos niveles de bacterias en sangre de cordón umbilical [5]. Se cree que la exposición a microbios es iniciada incluso antes de lo que entendemos hoy; de hecho, incluso el propio proceso de fertilización podría estar influenciado por la microbiota vaginal y seminal. Se ha reportado, además, que el líquido amniótico y la placenta tienen cierta composición microbiana. Esta microbiota intrauterina está caracterizada por bajas cantidades de bacterias, y por el predominio de Proteobacterias [6, 7]. Hay diferencias en los resultados relativos al análisis de muestras con bajos recuentos bacterianos: algunos autores detectan microbios en el líquido amniótico provenientes de madres con embarazos saludables, y atribuyen estos hallazgos a artefactos metodológicos o contaminaciones [8]. No obstante, la colonización del feto está también evidenciada por la detección de una microbiota temprana en muestras de meconio, esencialmente Firmicutes, pero también con altas proporciones de Proteobacterias [9]. A pesar de la evidencia creciente, la ocurrencia de una colonización intrauterina y el rol que esta pueda tener en la colonización general temprana, es un proceso que todavía está en debate. Lo que sí está claro es que la colonización microbiana masiva comienza luego del alumbramiento, y que la transmisión vertical madre-a-hijo es crucial para el proceso de colonización temprana [10, 11].

II.B. MODO DE PARTO

Una gran exposición a diferentes especies bacterianas durante el período neonatal es facilitada por el modo de parto. Los niños nacidos por parto vaginal están expuestos a microbios vaginales como *Prevotella* y *Lactobacillus*, y también de los géneros *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Parabacteroides* y *Escherichia*. El intestino materno es una fuente importante de bacterias; el 72% de las bacterias intestinales en los niños nacidos por parto vaginal derivan de las bacterias del intestino materno, comparadas con el 41% en recién nacidos por cesárea. En consecuencia, los niños nacidos por cesárea podrían ser colonizados por bacterias asociadas con la piel y boca materna, o el entorno materno en general.

Numerosos estudios reportaron una abundancia disminuida de *Bacteroides*, o una diversidad reducida de Bacteroidetes en el intestino de niños nacidos por cesárea.

En esos casos, el microbioma fecal podría consistir –entre otros microorganismos– en *Enterobacter*, *Staphylococcus*, incluyendo *S. aureus*, además de *Streptococcus* y *Veillonella*. Las especies de *Bifidocaterium* generalmente tienden a ser menos abundantes en niños nacidos por cesárea, en comparación con los niños nacidos por parto vaginal. Los niños nacidos por cesárea son portadores de mayor proporción de *Clostridium difficile* y esta podría ser una de las especies que introducen desbalances en la microbiota, a causa de un crecimiento desmedido de clostridios e –incluso– hasta producción de toxinas. La OMS declara que el índice de partos por cesárea en 1980 fue del 6%, y que se triplicó a 18,6% en 2016 (OMS 2018) [12]. La influencia del modo de parto en el desarrollo de la microbiota es de gran importancia, especialmente en la medida en que casi el 20% de los niños nacen por cesárea. Aunque existe una gran variabilidad entre países, la OMS (2018) indica que la cesárea podría ser necesaria en un 10% de los partos, lo que implica aproximadamente que hay un 10% de cesáreas innecesarias, o más en ciertas regiones. La alteración de la microbiota intestinal que ocurre como consecuencia del parto por cesárea, en comparación con niños nacidos por parto vaginal [13, 14] podría, al menos en parte, explicar la mayor tendencia de los primeros a padecer enfermedades alérgicas, celiaquía, obesidad, diabetes de tipo 1, entre otras patologías [15].

II.C. TIPO DE ALIMENTACIÓN

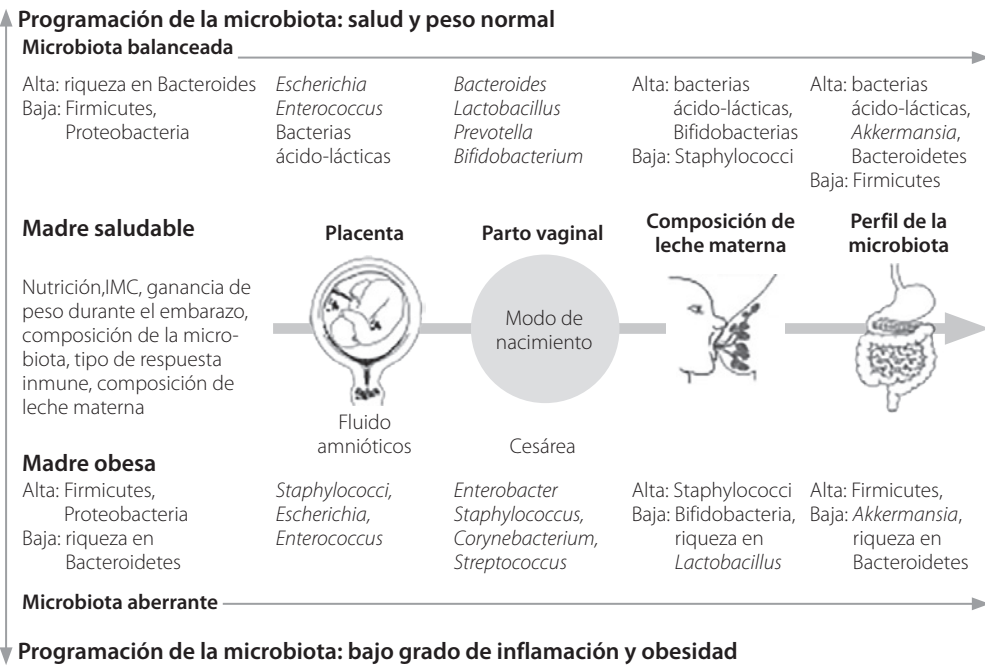
Luego del nacimiento, el tipo de alimentación (amamantamiento, alimentación con fórmulas, introducción de alimentos sólidos) modelan directamente la microbiota, influenciando tanto su diversidad como su riqueza. El lactancia materna generalmente favorece el predominio de las bifidobacterias en el intestino del recién nacido, y la composición y actividad de esas bifidobacterias –junto con las bacterias ácido lácticas– forman la base para el desarrollo de la microbiota. Durante la infancia, el proceso de colonización es facilitado por una rápida sucesión de bacterias anaeróbicas, incluyendo los géneros *Bifidobacterium*, *Eubacterium*, *Clostridium* e incrementos en especies de *Bacteroides*. Las diferentes especies de *Bifidobacterium* pueden alcanzar hasta el 90% de la microbiota fecal total en recién nacidos amamantados, durante el primer año de vida. Con frecuencia, las bifidobacterias de la microbiota incluyen las especies *B. breve*, *B. infantis* y *B. longum*, mientras que los lactobacilos más comunes en las heces de niños amamantados y alimentados con fórmula están relacionados con *Lactobacillus acidophilus* o *Lactobacillus gasseri*.

Las diferencias en la composición de la microbiota en niños amamantados, respecto a los que reciben leche fórmula, se debe a los componentes de la leche materna. La leche humana contiene tanto una microbiota rica como un gran número de oligosacáridos, que condicionan el proceso de colonización, ya sea porque funcionan como promotores del crecimiento de ciertas bacterias, o como moléculas-señuelo para patógenos específicos. La composición de la microbiota y los oligosacáridos varía en las diferentes localizaciones geográficas del globo. Adicionalmente, el contenido

de poliaminas en la leche humana puede tener un impacto en la composición de la microbiota tanto en la leche humana como en el intestino de los niños [16, 17]. Adicionalmente, el amamantamiento también expone al niño a las bacterias de la piel de la madre y algunas bacterias ambientales. Una descripción más detallada de la composición de la leche materna humana y su impacto en la microbiota intestinal, puede ser encontrada en el Capítulo 1 de este mismo libro.

El destete causa cambios rápidos y significativos en el proceso de colonización del intestino, dando lugar al proceso de cambio de composición y actividad de la microbiota hacia una estructura adulta. Un destete paulatino conduce a una disminución de las diferencias entre niños amamantados y alimentados con fórmula. Al mismo tiempo, el número de *Bacteroides*, *Clostridium* y otros cocos anaeróbicos se incrementa, en particular el número de *E. coli* y otros enterococos. Durante esta fase, cambios rápidos y fluctuaciones tienen lugar particularmente en el grupo de especies del género *Bacteroides*, que son capaces de obtener energía a partir de la fibra dietaria. Durante el segundo año de vida, las etapas en el proceso de constitución de la microbiota incluyen el incremento de la diversidad, y el incremento en la proporción de *Bacteroides*, *Veillonella* y *Fusobacterium*. El número de microbios no cultivables y no identificables también se incrementa, haciendo que la caracterización completa de la microbiota sea un objetivo más complejo. No obstante, los niños parecen ser portadores de un mayor número de bifidobacterias y enterobacterias respecto a los adultos durante cierto tiempo, hasta que su microbiota se vuelve similar (ver **Figura 3**).

Figura 3. Diferencias en el establecimiento y desarrollo de la microbiota en niños de madres con peso normal y madres con sobrepeso.



II.D. EDAD GESTACIONAL

Mientras que en niños nacidos a término el modo de nacimiento y el modo de alimentación son considerados como los factores más relevantes y condicionantes del desarrollo de la microbiota, en niños nacidos pre-término la edad gestacional es el factor más fuerte condicionante del proceso de establecimiento de la microbiota intestinal [18]. Los neonatos nacidos pre-término deben sortear importantes desafíos al comienzo de sus vidas, al ser aun inmaduros sus sistemas intestinal, inmune, respiratorio y neurológico. Más aun, los recién nacidos pre-término permanecen en el hospital –con frecuencia– por largos períodos de tiempo, y tienen una gran exposición a antibióticos y otros tratamientos tales como la respiración asistida y la alimentación artificial. Todos estos factores, con frecuencia concomitantes al carácter prematuro del recién nacido, afectarán la adquisición y desarrollo de la microbiota. Estos niños presentan una colonización tardía por parte de los anaerobios comensales como *Bifidobacterium* o *Bacteroides*, al tiempo que muestran niveles incrementados de *Enterobacteriaceae*, y otros microorganismos potencialmente patógenos [19]. De modo similar a lo que ocurre con cualquier otro grupo de niños, definir una microbiota estándar o normal en niños pre-término es todavía una tarea difícil, pero la identificación de diferencias claves en relación con niños sanos nacidos a término es de gran importancia en el desarrollo de estrategias de intervención dirigidas a promover un mejor establecimiento y desarrollo de la microbiota en bebés prematuros. Incluso, estas alteraciones pueden tener un efecto en la salud tanto a corto como a largo plazo. De hecho, las alteraciones de la microbiota han sido relacionadas con el riesgo de enfermedades tales como las infecciones o la enterocolitis necrotizante (EN), en este grupo de niños. Un incremento en la proporción de proteobacterias ha sido vinculado con un aumento en la respuesta inmune inflamatoria, con un aumento concomitante en el riesgo de desarrollo de EN o sepsis [20]. Sin embargo, no se han podido definir cuáles son las alteraciones específicas de la microbiota que se relacionan con la EN, puesto que los estudios disponibles muestran resultados contradictorios [21, 22]. De modo similar, algunos estudios han mostrado alteraciones en la microbiota que se asocian con un posterior desarrollo de sepsis de aparición tardía, en comparación con niños sanos [23, 24]. No obstante, la evidencia disponible hasta el momento no permite sacar conclusiones sobre las alteraciones específicas de la microbiota en relación con el riesgo de EN en neonatos.

II.E. USO DE ANTIBIÓTICOS

Se ha reportado que los antibióticos provocan un desvío significativo en el proceso de colonización temprana del intestino, y que los efectos de este desvío son duraderos, lo que resulta en una diversidad reducida de microorganismos y una abundancia especialmente baja de Actinobacterias, dentro de las cuales se encuentran las bifidobacterias. Como se mencionó antes en este capítulo, durante la

gestación la microbiota materna sufre cambios [25] que pueden impactar sobre la transmisión vertical de microorganismos al niño. En consecuencia, cualquier modificación inducida durante el embarazo, como por ejemplo las complicaciones, las intervenciones médicas y hasta la propia dieta, pueden alterar el establecimiento de la microbiota en el niño [26, 27]. En este contexto, los antibióticos están dentro de los medicamentos más utilizados, y su uso durante el embarazo puede afectar la microbiota materna y la colonización microbiana del recién nacido. De hecho, estudios hechos en animales demuestran el impacto del uso de antibióticos durante el período gestacional, sobre la microbiota intestinal del neonato, y sobre su inmunidad [28, 29]. Aunque diferentes estudios muestran efectos ligeramente distintos –más que nada como consecuencia de los antibióticos estudiados y el tiempo de administración– en general los antibióticos parecen reducir los niveles de *Lactobacillus*, incrementando los niveles de proteobacterias [30]. Los antibióticos también constituyen una de las drogas más empleadas durante el parto, puesto que se estima que son administrados en más del 30% de los partos [31]. Numerosos estudios conducidos durante los últimos años indican que los antibióticos intraparto alteran el establecimiento de la microbiota tanto en niños nacidos pre-término [32] como en niños nacidos a término [33-35], incrementando los niveles de *Enterobacteriaceae* y reduciendo los niveles de bacterias anaeróbicas intestinales, tales como *Bacteroides* o *Bifidobacterium*. En etapas posteriores, durante el período post natal temprano, la administración de antibióticos también puede alterar la microbiota infantil [36]. El uso de antibióticos parece tener su impacto más severo sobre la composición de la microbiota en niños nacidos por cesárea que reciben múltiples tratamientos con antibióticos durante el primer año de vida. Las consecuencias de la exposición neonatal a antibióticos han sido reportadas, e incluyen –entre otras- una mayor abundancia de proteobacterias proinflamatorias y un número significativamente reducido de actinobacterias. Más específicamente, el tratamiento con antibióticos parece conducir a un menor número de bifidobacterias, consideradas “protectivas”. Estas desviaciones son duraderas, y podrían tener un rol significativo en la programación de los niños hacia el sobrepeso y obesidad, así como también podrían incrementar el riesgo de desarrollo de alergias. Esto es de gran relevancia en la medida en que los antibióticos son la medicación más frecuente durante la vida temprana, y a los dos años de edad, más de la mitad de los niños ya los han recibido alguna vez, con consecuencias potenciales a largo plazo sobre la microbiota intestinal, y la salud futura [37, 38].

II.F IMPACTO DE LA COLONIZACIÓN

La colonización intestinal temprana tiene un impacto crucial en la salud de los niños, mediante la programación nutricional, inmunológica y metabólica. El concepto de los primeros 1000 días de vida y el impacto a largo plazo se describen luego, en el Capítulo 1 de este mismo libro. Dicho capítulo sugiere que existe durante la vida temprana una ventana de intervención que constituye una oportunidad para modificar

la microbiota intestinal hacia un consorcio sano, con impacto de largo plazo en la reducción del riesgo de enfermedades crónicas no-transmisibles.

Los cambios en el estilo de vida acontecidos durante el último siglo, tales como el desplazamiento desde áreas rurales hacia áreas urbanizadas, el aumento de la proporción de cesáreas, el estrés, la polución y el uso de medicación, han impactado sobre la composición de la microbiota a lo largo de generaciones. Tal como sabemos ahora, las niñas de hoy serán las madres del futuro, y están evolutivamente programadas para inocular a sus bebés, lo que –en consecuencia– implica que los cambios en la composición de su microbiota serán transmitidos de generación en generación, y pueden explicar el incremento de las tasas de enfermedades no-transmisibles esperadas en la próxima década. Las estrategias dirigidas a proteger el proceso de colonización temprana podrían tener un impacto a largo plazo, no solo en términos individuales, sino del conjunto de la sociedad.

II.G. CONCLUSIONES

La importancia de la microbiota en la salud y la enfermedad se ha vuelto un hecho científicamente aceptado. En consecuencia, el modelado temprano de la microbiota por parte de los primeros microorganismos colonizadores tiene un rol clave en el desarrollo sucesivo de ese ecosistema. Tal proceso impacta, claramente, en la composición y actividad de la microbiota a largo plazo, con consecuencias sobre la salud en etapas tempranas y tardías. La microbiota intestinal se desarrolla y prolifera de modo dependiente de las características genéticas del hospedador, así como de su dieta y de la localización geográfica. Considerando la importancia de la microbiota para los sistemas inmune, metabólico y neurológico, es importante entender los determinantes de la dinámica y manejo de este desarrollo, especialmente durante los primeros 1000 días de vida, pero también en etapas posteriores.

III. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- [1] Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J (2014) The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med* 6:237ra65.
- [2] Arboleya S, Sánchez B, Milani C, et al (2015) Intestinal Microbiota Development in Preterm Neonates and Effect of Perinatal Antibiotics. *J Pediatr* 166:538-544.
- [3] Arboleya S, Suárez M, Fernández N, et al (2018) C-section and the neonatal gut microbiome acquisition: consequences for future health. *Ann Nutr Metabol* (In press)
- [4] Bäckhed F, Roswall J, Peng Y (2015) Dynamics and Stabilization of the Human Gut Microbiome during the First Year of Life. *Cell Host Microbe* 17:690-703.

- [5] Bokulich NA, Chung J, Battaglia T, et al (2016) Antibiotics, birth mode, and diet shape microbiome maturation during early life. *Sci Transl Med* 8:343ra382.
- [6] Chernikova DA, Koestler DC, Hoen AG, et al (2016) Fetal exposures and perinatal influences on the stool microbiota of premature infants. *J Matern-Fetal Neo M* 29:99-105.
- [7] Cho I, Yamanishi S, Cox L, et al (2012) Antibiotics in early life alter the murine colonic microbiome and adiposity. *Nature* 488, 621-626.
- [8] Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S (2016) Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep* 6:23129.
- [9] Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, et al (2014) Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* 158:705-721.
- [10] La Rosa PS, Warner BB, Zhou Y, et al (2014) Patterned progression of bacterial populations in the premature infant gut. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111:12522-12527.
- [11] Cong X, Xu W, Janton S, et al (2016) Gut Microbiome Developmental Patterns in Early Life of Preterm Infants: Impacts of Feeding and Gender. *PLoS One* 11:e0152751.
- [12] Collado MC, Cernada M, Neu J, Perez-Martinez G, Gormaz M, Vento M (2015) Factors influencing gastrointestinal tract and microbiota immune interaction in preterm infants. *Pediatr Res* 77:726-731.
- [13] Torrazza RM, Neu J (2013) The altered gut microbiome and necrotizing enterocolitis. *Clin Perinatol* 40:93-108.
- [14] Berrington JE, Stewart CJ, Embleton ND, Cummings SP (2013) Gut microbiota in preterm infants: assessment and relevance to health and disease. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 98:F286-90.
- [15] Stewart CJ, Embleton ND, Marrs EC, et al (2016) Temporal bacterial and metabolic development of the preterm gut reveals specific signatures in health and disease. *Microbiome* 4:67.
- [16] Madan JC, Salari RC, Saxena D, et al (2012) Gut microbial colonisation in premature neonates predicts neonatal sepsis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 97:F456-62.
- [17] Mai V, Torrazza RM, Ukhanova M, et al (2013) Distortions in development of intestinal microbiota associated with late onset sepsis in preterm infants. *PLoS One* 8:e52876.
- [18] Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, et al (2010) Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:11971-11975.

- [19] Fouhy F, Guinane CM, Hussey S, et al (2012) High-Throughput sequencing reveals the incomplete, short-term recovery of infant gut microbiota following parenteral antibiotic treatment with ampicilin and gentamicin. *Antimicrob Agents Chemother* 56:5811-5820.
- [20] Jimenez E, Fernandez L, Marin ML, et al (2005) Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by cesarean section. *Curr Microbiol* 51:270-274.
- [21] Khan I, Azhar EI, Abbas AT, et al (2016) Metagenomic analysis of antibiotic-induced changes in gut microbiota in a pregnant rat model. *Front Pharmacol* 7:104.
- [22] Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Bäckhed HK, Gonzalez A, Werner JJ, Angenent LT, Knight R, Bäckhed F, Isolauri E, Salminen S, Ley RE. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*. 2012 Aug 3;150(3):470-80.
- [23] Lim ES, Rodriguez C, Holtz LR (2018) Amniotic fluid from healthy term pregnancies does not harbor a detectable microbial community. *Microbiome* 6:87.
- [24] Mazzola G, Murphy K, Ross RP, et al (2016) Early Gut Microbiota Perturbations Following Intrapartum Antibiotic Prophylaxis to Prevent Group B Streptococcal Disease. *PLoS One* 11:e0157527.
- [25] Munyaka PM, Eissa N, Bernstein CN, Khafipour E, Ghaia JE (2015) Antepartum antibiotic treatment increases offspring susceptibility to experimental colitis: a role of the gut microbiota. *PLoS One* 10(11):e0142536.
- [26] Nogacka A, Salazar N, Arbolea S, et al (2018) Early microbiota, antibiotics and health. *Cell Mol Life Sci* 75:83-91.
- [27] Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O (2016) Microbial Changes during pregnancy, birth, and infancy. *Front Microbiol* 7:1031.
- [28] Olszak T, An D, Zeissig S, et al (2012) Microbial exposure during early life has persistent effects on natural killer T cell function. *Science* 336, 489-493.
- [29] Tapiainen T, Paalanen N, Tejesvi MV, et al (2018) Maternal influence on the fetal microbiome in a population-based study of the first pass meconium. *Pediatr Res*. Doi: 10.1038/pr.2018.29.
- [30] Tormo-Badia N, Hakansson A, Vasudevan K, Molin G, Ahrne S, Cilio CM (2014) Antibiotic treatment of pregnant non-obese diabetic mice leads to altered gut microbiota and intestinal immunological changes in the offspring. *Scand J Immunol* 80:250-260.
- [31] Van Dyke MK, Phares CR, Lynfield R, et al (2009) Evaluation of universal antenatal screening for group B streptococcus. *N Engl J Med* 360:2626-2636.

[32] WHO/RHR/15.02. World Health Organization 2018. Statement on Caesarean Section Rates.

[33] Scholtens PA, Oozeer R, Martin R, Amor KB, Knol J. The early settlers: intestinal microbiology in early life. *Annu Rev Food Sci Technol.* 2012;3:425-47.

[34] Neuman H, Forsythe P et al (2018). Antibiotics in early life: dysbiosis and the damage done. *FEMS Microbiology reviews* 42, 489-499.

[35] Ferreti P et al., 2018. Mother-to-infant microbial transmission from different body sites shapes the developing infant gut microbiome. *Cell host & microbe* 24, 133-145.

[36] Yassour et al. 2018. Strain-Level Analysis of Mother-to-Child Bacterial Transmission during the First Few Months of Life *Cell host & microbe* 2018 24, 146-154

[37] Sara N. Lundgren, Juliette C. Madan, Jennifer A. Emond, Hilary G. Morrison, Brock C. Christensen, Margaret R. Karagas and Anne G. Hoen. Maternal diet during pregnancy is related with the infant stool microbiome in a delivery mode-dependent manner. *Microbiome* 2018, Vol 6:109. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0490-8>

EL USO DE PROBIÓTICOS DURANTE LOS PRIMEROS 1000 DÍAS DE VIDA

Maria Carmen Collado

- *Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos - Consejo Nacional de Investigaciones (IATA-CSIC), España.*
- *Foro de Alimentos Funcionales, Facultad de Medicina, Universidad de Turku, Finlandia.*

Kaouther Ben Amor

- *Danone Nutricia Research, Utrecht, Países Bajos.*

Seppo Salminen

sepsal@utu.fi

- *Foro de Alimentos Funcionales, Facultad de Medicina, Universidad de Turku, Finlandia.*

Jan Knol

- *Danone Nutricia Research, Utrecht, Países Bajos.*
- *Laboratorio de Microbiología, Universidad de Wageningen, Países Bajos.*

Rocio Martin

rocio.martin@danone.com

- *Danone Nutricia Research, Singapur.*

RESUMEN

La microbiota intestinal humana está involucrada en múltiples interacciones que afectan la salud del hospedador, durante toda su vida. El establecimiento de la microbiota en las etapas tempranas de la vida es un proceso que ocurre de forma concomitante con el desarrollo y maduración del sistema inmune y metabólico. En un plazo de pocas semanas después del nacimiento, un niño ya es hospedador de una comunidad de billones de bacterias, virus y hongos que pueden modelar múltiples aspectos de su salud.

Si acaso el proceso de establecimiento de la microbiota es alterado o “descarrilado”, las consecuencias pueden ser observadas más tarde durante la vida del niño. De hecho, un número creciente de estudios ha reportado acerca de cómo la composición y desarrollo tempranos de la microbiota intestinal humana, podrían estar relacionados con un riesgo incrementado de padecer ciertas condiciones de salud durante la vida adulta. Dichos análisis han relacionado ciertos aspectos de la microbiota, tales como la diversidad reducida o la composición aberrante, con problemas intestinales en niños, o enfermedades que se manifiestan en etapas posteriores de la vida, como el asma, la enfermedad intestinal inflamatoria o desórdenes metabólicos [1].

Los investigadores buscan modos de recuperar el balance y diversidad de la microbiota y hasta se preguntan en qué medida será posible reformular la composición de la comunidad bacteriana hacia una versión saludable, durante los primeros 1000 días de vida (contabilizados desde la concepción), para ayudar a prevenir enfermedades crónicas durante la niñez y adolescencia. Este concepto ha conducido al desarrollo de estrategias para remodelar la composición de la microbiota infantil, basadas en productos funcionales e inspiradas por la composición de la leche materna humana.

En este capítulo se describe la composición de la leche materna humana y la aplicación de diferentes estrategias nutricionales dirigidas a rebalancear o remodelar la microbiota intestinal infantil, cuya finalidad es impactar sobre la salud a largo plazo.

I. LA LECHE MATERNA HUMANA COMO REFERENCIA PARA EL DESARROLLO DE ESTRATEGIAS NUTRICIONALES EN LA VIDA TEMPRANA

La leche materna humana es el vínculo post natal más importante entre la madre y su hijo, en la medida en que proporciona la nutrición óptima durante los primeros meses de vida [2], y tiene un rol clave en la promoción de un crecimiento y desarrollo saludables [3]. Se ha demostrado que el amamantamiento tiene un efecto protector contra las infecciones, y que reduce el riesgo de diabetes y obesidad a largo plazo [4-6], y –tal como se describe en el Capítulo 2– tiene un rol importante en el modelado de la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal del niño. Se sugiere que la composición de la leche materna humana, y su impacto sobre la microbiota intestinal, sirven para explicar los beneficios a corto y largo plazo del amamantamiento exclusivo [7]. La leche materna humana posee una combinación única y óptima de macro y micronutrientes, y numerosos componentes bioactivos que incluyen compuestos relacionados con la inmunidad, tales como citoquinas regulatorias, quemoquinas, factores de crecimiento, anticuerpos, oligosacáridos y microorganismos, tal como se describe en la Tabla 1 [8-11]. Un balance específico y delicado de esos compuestos bioactivos es transferido directamente a los neonatos por intermedio del amamantamiento. Más aun, es sabido que la composición y concentración de esos compuestos bioactivos varía entre individuos, y están afectadas por el genotipo materno, la edad gestacional, el estado de salud, la etapa lactante y condiciones ambientales tales como la dieta y el estilo de vida [12-17].

Tabla 1. Composición de la leche materna humana

Composición	Compuestos bioactivos
Nutrientes	• Proteínas • Vitaminas y minerales • Carbohidratos • Grasas
Células	• Células inmunes: - Macrófagos - Neutrófilos - Linfocitos y monocitos - Células T, B y NK • Células derivadas de la mama: - Lactocitos - Células mioepiteliales - Células madre y progenitoras • Células bacterianas: microorganismos

Factores inmunes	• Inmunoespecíficos: - Inmunoglobulinas IgAs/ IgG/ IgM/ IgD. • No-específicos - Lactoferrina - Lisozima - Lactoperoxidasa - Mucinas - Lipasa - Ácidos grasos - Factores C3 y C4 del complemento - Hormonas y péptidos bioactivos - Factores de crecimiento (EGF, IGF TGF-β) - Nucleótidos - Defensinas - sCD14 y receptor TLR - Poliaminas - Microbiota - Oligosacáridos
------------------	--

I.A. LA MICROBIOTA DE LA LECHE HUMANA

Históricamente, la leche materna humana era considerada un fluido estéril, aunque en la actualidad –alrededor del año 2000– comenzó a cambiar esta visión, en coincidencia con el aislamiento de cepas bacterianas beneficiosas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* de mujeres sanas, hecho que constituyó un quiebre en el viejo dogma [18]. Desde entonces, la leche materna humana ya no fue considerada estéril y, de hecho, una acumulación creciente de evidencia demostró la presencia de bacterias en dicho fluido mediante el empleo de diferentes metodologías basadas en técnicas de cultivo y biología molecular. Las cepas bacterianas más frecuentemente aisladas pertenecen a los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, seguidos de *Enterococcus*, *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* spp., encontrándose en concentraciones que oscilan entre 10³ y 10⁵ CFU/ml [19-21].

Los métodos de secuenciación de nueva generación (NGS, por las siglas en inglés para *next-generation sequencing*) han permitido expandir el conocimiento acerca de la diversidad microbiana de la leche humana [22-24] y han permitido estudios más comprensivos acerca de la riqueza y diversidad microbiana, proporcionando evidencia de la complejidad del ecosistema microbiano de la leche [25-28]. Estos estudios han confirmado los grupos bacterianos identificados por técnicas de cultivo, principalmente *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* spp, pero también han identificado bacterias anaeróbicas tales como *Blautia*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Faecalibacterium*, *Coprococcus*, *Roseburia* y *Veillonella* [29-31]. Se ha reportado que *Streptococcus* y *Staphylococcus* están universalmente presentes en la leche humana, independientemente de la metodología empleada para estudiarla, de la localización geográfica donde se realice el estudio, de la técnica o el método de toma de muestras [32]. El primer reporte sobre la composición del microbioma de la leche

materna humana utilizando pirosecuenciación, mostró una enorme complejidad y alta variabilidad [33]. Entre todas las bacterias presentes en cada muestra de leche, se identificaron bacterias específicas como *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Serratia*, *Pseudomonas*, *Corynebacterium* y también otras como *Ralstonia*, *Propionibacterium*, *Sphingomonas*, y *Bradyrhizobiaceae*. Las diferencias observadas entre estudios realizados con técnicas moleculares podrían explicarse en parte por diferencias en las técnicas de muestreo, en los kits o protocolos de extracción de ADN, de amplificación de ADN y la región 16S, diferencias en la plataforma de secuenciación, entre otras posibilidades. Además, podría haber diferencias en los sistemas de análisis bioinformáticos, y factores ambientales y perinatales [34]. Se han reportado diferencias en la microbiota de la leche materna humana y en los perfiles microbianos del tejido mamario en diferentes países del globo [35, 36].

Los estudios metagenómicos confirmaron la presencia de diferentes bacterias [37, 38] y otros organismos tales como hongos y organismos relacionados a los protozoos y a los virus. Más aun, el mismo estudio proveyó información acerca de la funcionalidad de las bacterias presentes en la leche, indicando que su actividad estaba relacionada con las funciones básicas celulares (respiración, señalización, ARN, ADN y metabolismo de aminoácidos).

Más allá de la presencia de bacterias en la leche materna humana, algunos estudios han identificado la existencia de una comunidad bacteriana compleja en el tejido epitelial mamario, por intermedio del estudio de biopsias mamarias, y han sugerido su potencial vínculo con el desarrollo de tumores [39, 40]. Sin embargo, el origen de los microorganismos de la leche materna humana sigue en debate.

Algunas bacterias específicas son compartidas entre el intestino materno, la leche materna y las heces del recién nacido [41-43], demostrando así la transmisión vertical de microbios maternos al intestino infantil. Datos recientes mostraron que los microorganismos de la leche materna contribuyen en un 27,7% a la microbiota intestinal neonatal, mientras que los microbios presentes en la piel de la areola lo hacen en un 10,3% [44]. Estos hallazgos resaltan la relevancia de los microorganismos de la leche materna humana en el proceso de colonización del intestino del recién nacido. En este contexto, la caracterización de la composición microbiana de la leche materna humana es un asunto científico de enorme interés, y existe una necesidad de desentrañar su rol en el proceso de colonización del intestino neonatal, así como su importancia sobre la maduración del sistema inmune del recién nacido. Adicionalmente, la leche materna humana puede ser considerada una fuente de potenciales cepas probióticas, para ser utilizadas luego durante la infancia.

I.B. OLIGOSACÁRIDOS DE LECHE HUMANA

Como se mencionó antes en este capítulo, la leche materna humana contiene diferentes oligosacáridos (abreviados OLH, oligosacáridos de leche humana), que son considerados los componentes más abundantes en la leche humana. Se ha descrito

que la leche materna humana contiene aproximadamente entre 5 y 20 g de OLH, y que estas concentraciones varían a lo largo del período de amamantamiento, siendo el calostro y la leche temprana los momentos en que los OLH se encuentran en mayores concentraciones.

Los OLH son carbohidratos complejos, y al momento se han descrito más de 200 formas, cuya presencia es exclusiva de los humanos. Los OLH tienen numerosas funciones biológicas, incluyendo la protección contra bacterias y virus patógenos, el mejoramiento de la salud intestinal y la contribución al desarrollo cerebral. Más aun, se ha sugerido que los OLH tienen un impacto clave sobre la composición de la microbiota intestinal neonatal [45] y sobre el crecimiento infantil [46, 47].

La mayoría de las bacterias identificadas presentes en la leche materna humana, tales como *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Staphylococcus*, son capaces de utilizar los OLH como sustratos, lo cual les resulta favorable para su propio crecimiento [48-52]. Más aun, se sabe que los perfiles de OLH están influenciados por la etapa de lactancia [53, 54] y también que los perfiles de glicosilación de la leche cambian con el tiempo [55]. El perfil de OLH es determinado por el genotipo de la madre, y codificado por el gen de la fucosiltransferasa 2 (FUT2) [56, 57]. Además, se ha demostrado que la localización geográfica también impacta en el perfil de OLH [58]. Incluso, recientemente se han descrito asociaciones entre microorganismos de la leche y los OLH [59, 60] e incluso con células y macronutrientes de dicho fluido [61, 62].

Es necesario realizar estudios más grandes incluyendo leche materna humana de diferentes etapas de lactancia, a lo largo de distintas localizaciones geográficas, para alcanzar una mejor comprensión acerca del efecto de los factores ambientales y de las bases genéticas, sobre el perfil de compuestos presentes en la leche materna y acerca de su impacto sobre la salud neonatal. Los perfiles de OLH han sido asociados a la composición corporal de los niños, y a un riesgo reducido de problemas vinculados con alergias en etapas más tardías de la vida [64, 64], y en la modulación de la microbiota intestinal infantil [65]. Niños no amamantados por sus madres, con menores niveles de 2FL (abreviatura que designa al azúcar 2-fucosil lactosa) muestran una colonización más tardía y menos profusa por *Bifidobacterium* spp., en relación con niños que reciben leche materna humana con alta proporción de dicho OLH [66]. Se han reportado mayores niveles de *Bifidobacterium* y *Bacteroides* en neonatos alimentados a pecho durante el primer mes de vida, en comparación con niños no amamantados [67, 68].

Tal como se mencionó antes, los OLH son capaces de estimular selectivamente el crecimiento de bacterias pertenecientes a distintos géneros, y se cree que son responsables de conducir hacia una microbiota dominada por bifidobacterias, en el caso de los niños amamantados con leche materna. Sin embargo, no todas las bifidobacterias son capaces de utilizar los OLH de modo eficiente como fuente única de carbono [69-71]. Las bifidobacterias que se asocian a una microbiota adulta, tales como *B. adolescentis* o *B. catenulatum* son incapaces de utilizar los OLH como estructuras principales. El efecto bifidogénico de los OLH es específico y favorece

el crecimiento de las así llamadas “cepas infantiles”, tales como *B. longum*, *B. breve*, *B. bifidum* (ver Figura 1). No todas las bacterias tienen la maquinaria completa como para degradar los OLH, y algunos microorganismos solamente pueden romper y metabolizar elementos específicos de la compleja estructura de los OLH; no obstante, esta capacidad parcial opera de modo concertado con el resto de las bacterias, y tiene influencia en el modelado de la microbiota intestinal infantil [72]. Esto debería ser tenido en cuenta al seleccionar las cepas probióticas para ser utilizadas en nutrición infantil. De hecho, se ha demostrado que las cepas pertenecientes al tipo infantil de bifidobacterias son capaces de colonizar establemente el intestino infantil, puesto que han sido detectadas hasta un mes después del cese de suplementación de la dieta, plazo que resulta mucho más largo que el descripto para otras especies [73, 74].

II. LOS PROBIÓTICOS EN LOS PRIMEROS 1000 DÍAS

Los primeros 1000 días de vida, desde la concepción hasta la niñez temprana, constituyen un período crucial en el cual aparecen los primeros estímulos externos y el organismo se entrena para responder a ellos. Las bacterias pioneras que colonizan el intestino infantil, y la diversificación gradual de ese ecosistema bacteriano, tienen un papel crucial en el establecimiento de las interacciones entre microbios y hospedador, esenciales para una simbiosis óptima. Este proceso de colonización temprana ocurre en forma concomitante con el desarrollo de los sistemas inmune, metabólico y neurológico, lo que hace razonable creer que los procesos de colonización temprana –y los factores que los afecten– son muy importantes para la salud en etapas posteriores de la vida. Numerosos estudios han mostrado que la disbiosis de la microbiota en etapas tempranas de la vida –fenómeno descripto como una reducción de la diversidad microbiana o directamente como una aberración en su composición– está relacionada con enfermedades tales como la enterocolitis necrotizante, los cólicos infantiles, las alergias y la obesidad en niños, o las enfermedades que se manifiestan en etapas posteriores de la vida tales como diabetes, enfermedad intestinal inflamatoria o síndrome intestinal inflamatorio [75, 76].

En la actualidad, se está empezando a entender la relevancia de dichas interacciones tempranas, que podrían empezar ya en la gestación, en relación con la salud en etapas posteriores de la vida. En consecuencia, las estrategias centradas en la dirección del desarrollo de la microbiota están recibiendo cada vez más atención. Varios estudios sugieren que existe un beneficio potencial en el uso de probióticos durante los primeros 1000 días de vida, para influir en el desarrollo posterior de la madre y el niño. En este capítulo, se revisan los efectos de los probióticos sobre la salud de la madre y el niño (resumidos en la Figura 2 y las Tablas 2 y 3).

II.A. LOS PROBIÓTICOS DURANTE EL EMBARAZO

La microbiota materna ha sido descrita como una fuente importante de bacterias para el intestino del recién nacido [77, 78]. A su vez, se sugiere que el microbioma de la vagina y la placenta se alteran a lo largo del embarazo; tanto es así, que se asume que esas alteraciones podrían asociarse a complicaciones del embarazo, y llevar a eventos adversos para la madre y el niño en el corto y largo plazo [79]. Tomadas juntas, estas observaciones explican el interés creciente en el uso de probióticos durante el embarazo, con la finalidad de prevenir un amplio espectro de enfermedades transmisibles y no-transmisibles. Existen en la actualidad evidencia del rol protector de los probióticos, por ejemplo durante el embarazo y/o la lactancia, en la preeclampsia, diabetes gestacional, infecciones bacterianas, mastitis del amamantamiento, en ganancia de peso (materna e infantil) y en enfermedades alérgicas.

II.A.I. LOS PROBIÓTICOS Y LAS INFECCIONES GENITOURINARIAS

Las mujeres embarazadas sufren de infecciones urinarias recurrentes y vaginosis bacterianas, que podrían estar asociadas con eventos adversos tanto para la madre como para el niño, incluyendo un nacimiento premauro o niños con baja talla para la edad gestacional. Se ha reportado que el 30-50% de los partos pretérmino están asociados con infecciones maternas. Una infección del tracto urinario (ITU) es una infección de la vejiga o los riñones, debida a la presencia de bacterias en la orina, mientras que la vaginosis bacteriana es una disbiosis de la microbiota vaginal. Los probióticos se proponen como una alternativa profiláctica atractiva para ambas condiciones [80], sea manteniendo o restaurando la microbiota vaginal, o previniendo que los patógenos colonicen el tracto urinario. Entre los distintos probióticos estudiados con estos fines, *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* RC-14 parecen ser las cepas más promisorias para la colonización y protección del tracto urogenital contra la infección microbiana [81].

En consecuencia, podría hipotetizarse que el uso de los probióticos durante el embarazo podría reducir el riesgo de infecciones urogenitales y, en consecuencia, reducir el riesgo de parto prematuro. Mientras que el uso de probióticos ha sido demostrado como una buena alternativa en el tratamiento de las infecciones vaginales durante el embarazo, sigue siendo insuficiente todavía la información que demuestre un impacto sobre la tasa de nacimientos prematuros [82].

II.A.II. LOS PROBIÓTICOS Y LA COLONIZACIÓN POR *STREPTOCOCCUS* DEL GRUPO B

Los estreptococos del grupo B (SGB) son considerados bacterias comensales que colonizan los tractos genital y gastrointestinal en aproximadamente el 10-30% de las mujeres, aunque todavía resta hacer estimaciones sistemáticas globales [83, 84]. La colonización por SGB habitualmente es asintomática, pero en caso de sobrecrecimiento

–como en etapas tardías del embarazo– puede causar sepsis materna o fetal, conduciendo a la muerte fetal y/o neonatal [85-87]. Se ha demostrado que la colonización materna por SGB puede causar neumonía, meningitis en recién nacidos, y parece incrementar el riesgo de nacimiento prematuro [88, 89]. Como una medida preventiva, se recomienda el uso de antibióticos profilácticos en las madres que posean un cultivo positivo para SGB, según el CDC de EE.UU. De acuerdo con dicha organización en 2010, se recomienda un mínimo de 4 horas de antibiótico como profiláctico, antes del parto, para evitar las infecciones por SGB de aparición temprana. Sin embargo, las enfermedades por SGB no son fácilmente resueltas por el tratamiento con antibióticos y, adicionalmente, la administración perinatal de antibióticos ha sido asociada con un mayor riesgo de alergia y obesidad infantil [90-93]. En consecuencia, esto podría explicar por qué no todos los países adhieren a esta recomendación frente a la infección materna por SGB.

Recientemente, un estudio clínico mostró que la suplementación con dos cepas probióticas (*L. rhamnosus* GR-1 y *L. reuteri* RC-14) fue efectiva para resolver la infección por SGB en mujeres embarazadas [94]. Aunque esto parece promisorio, es necesaria una confirmación de que la reducción de las enfermedades provocadas por SGB se logra con dicho tratamiento. En la actualidad, se están llevando a cabo estudios clínicos más grandes que utilizan la misma combinación de probióticos, y que tienen como finalidad evaluar el impacto sobre la salud de la madre y el niño [95, 96].

II.A.III. LOS PROBIÓTICOS Y LA DIABETES MELLITUS GESTACIONAL

La diabetes gestacional se define como el desarrollo de intolerancia a la glucosa, con su desencadenamiento durante el embarazo. La DG es una de las complicaciones metabólicas más frecuentes durante este período, y su prevalencia alcanza el 12% de los embarazos en países desarrollados, aunque esta cifra varía en función del grupo étnico, del país o las instituciones médicas tratantes, dependiendo del criterio diagnóstico que se esté empleando. Esta condición se asocia con una salud adversa materno-infantil durante el embarazo, el nacimiento y el post parto. Los riesgos de salud para mujeres con DG incluyen pre-eclampsia, mayor riesgo de infección durante el embarazo, inducción del parto, mayor tendencia a la cesárea y un riesgo incrementado para padecer diabetes tipo 2 luego del parto. Los riesgos para el niño incluyen la macrosomía, el síndrome de distrés respiratorio, lesiones en el nacimiento tales como parálisis nerviosa, fractura ósea, distocia de hombros, ictericia e hipoglucemia, que –si es prolongada o severa– puede causar daño cerebral [97]. Adicionalmente, algunos estudios sugieren que los niños nacidos de madres con DG tienen un riesgo incrementado de padecer diabetes mellitus y disfunciones metabólicas más adelante en su vida [98, 99, 100].

Con la finalidad de reducir el riesgo de dichos efectos adversos, actualmente las mejores prácticas para el manejo de la DG requieren la modificación de la dieta materna, con o sin tratamiento farmacológico. Sin embargo, basándose en investigaciones

recientes, pareciera que los probióticos pueden ser una alternativa promisorio para reducir la prevalencia de DG y atenuar algunos de los efectos adversos metabólicos. Se cree que la microbiota intestinal influye sobre la aparición de obesidad y diabetes tipo 2 a través de la modificación de la capacidad para extraer energía de los alimentos, de la inflamación, el hambre, la saciedad y el metabolismo de lípidos y glucosa [101, 102]. Se han observado, en este contexto, diferencias entre la microbiota de mujeres embarazadas con sobrepeso y mujeres de peso normal [103], así como entre mujeres en el tercer trimestre de embarazo y mujeres en el primero, siendo el microbioma de las primeras similar al de aquellas con síndrome metabólico [104]. La suplementación con probióticos (*L. rhamnosus* GG y *B. lactis* BB12) combinada con la consejería dietética, ha demostrado ser capaz de prevenir la DG en un conjunto de mujeres embarazadas, ser capaz de reducir la concentración de glucosa plasmática y de mejorar la sensibilidad a la insulina [105, 106]. Estudios más recientes han demostrado que la suplementación con la cepa *L. rhamnosus* HN001 entre la semana de gestación 14 y la 16 puede reducir la prevalencia de DG, particularmente entre mujeres más grandes y aquellas con historia previa de DG [107]. Un meta-análisis reciente que incluye el análisis de cuatro Ensayos Controlados Aleatorizados que involucraron a 288 participantes, mostró que los probióticos son capaces de reducir el HOMA-IR, mientras que no se observó ningún efecto sobre la reducción de la glucosa en ayunas, ni en el LDL, en mujeres con DG [108]. Adicionalmente, otra revisión sistemática que incluyó más de 30 estudios realizados sobre el embarazo (24-40 semanas de gestación) mostró el efecto de la intervención con probióticos, sobre el mejoramiento del control de la glucemia y la reducción del VDL, los triglicéridos y una reducción de los marcadores de inflamación [109].

Una revisión sistemática de Cochrane, que incluyó el análisis de 11 estudios, remarcó el hecho de que hay pocos estudios como para realizar un meta-análisis cuantitativo, y –en consecuencia– se necesitan más ensayos clínicos [110]. Los resultados de distintos estudios son a veces controvertidos, posiblemente debido a diferencias en las definiciones y/o los criterios diagnósticos para la DG, o hay diferencias geográficas o en las cepas probióticas utilizadas. Adicionalmente, hace falta más investigación para poder decir si los resultados observados en la salud materna (por ejemplo, incidencia de DG reducida, impacto sobre parámetros metabólicos) pueden traducirse en beneficios de salud significativos.

En conjunto, la suplementación con probióticos constituye una alternativa atractiva para influir sobre una serie de riesgos de salud durante el embarazo. La bibliografía actual no indica la existencia de efectos adversos sobre la salud, y –en consecuencia– los probióticos no hay restricciones en el uso de probióticos en embarazadas y madres lactantes [111]. Sin embargo, son necesarios ensayos clínicos de mayor tamaño, controlados y adecuadamente diseñados para reforzar la evidencia disponible y establecer definitivamente el rol de los probióticos cuando se los consume durante el embarazo.

II.B. LOS PROBIÓTICOS DURANTE LA INFANCIA

Inspiradas por la composición de la leche materna humana y los beneficios de salud asociados al amamantamiento, las estrategias que utilizan probióticos para influenciar y dirigir el desarrollo de la microbiota en la vida temprana, son comúnmente utilizadas y parecen ofrecer oportunidades promisorias para mejorar el desarrollo de la salud.

Hay, sin embargo, algunos desafíos considerables para reunir los datos científicos suficientes para poder recomendar el uso de probióticos en niños. Los desafíos incluyen la dificultad para realizar estudios en esta población, pues –por ejemplo– generalmente se trata de estudios basados en síntomas reportados por los padres, y existe dificultad en el reclutamiento y retención de los pacientes, en las comparaciones contra el placebo y la necesidad de reclutar grandes cantidades de sujetos y seguirlos durante largos períodos, con el objetivo de poder valorar el impacto sobre la salud, a largo plazo. Otra dificultad para analizar la información disponible, es la gran diferencia entre las distintas intervenciones que se han realizado, en relación con las cepas de probióticos utilizadas, las dosis, tiempos y duración de las intervenciones.

II.B.I. LOS PROBIÓTICOS Y LA PREVENCIÓN DE LA ALERGIA

Las enfermedades alérgicas en los niños están mostrando un incremento en todo el mundo, y representan una carga para el sistema de salud. Se estima que la prevalencia de dichas enfermedades es alrededor del 10% en niños sin antecedentes familiares de alergia, y entre el 20 y el 30% en aquellos con historia de alergia atópica en parientes de primer grado [112, 113, 114]. Una explicación para la alta prevalencia de alergia es la llamada “hipótesis de la higiene”, que postula que la causa de esta prevalencia es una falta de exposición saludable a los microbios durante la vida temprana [115]. Desde la perspectiva de dicha hipótesis, se ha propuesto la llamada hipótesis de la microbiota intestinal [116], que implica sugerir que las alteraciones de la microbiota intestinal –la fuente más importante de exposición a los microbios y una fuente vital de estímulos inmunes– podrían subyacer a la epidemia de atopía. Un creciente conjunto de evidencia científica reveló que la microbiota intestinal tiene un rol clave en el desarrollo de la sensibilización y el comienzo de las alergias, en tanto puede regular las respuestas inflamatorias y alérgicas. Más aun, numerosos estudios han sugerido la existencia de una asociación entre la composición de la microbiota intestinal y el desarrollo de alergias. En consecuencia, la suplementación con probióticos parece una estrategia nutricional atractiva para prevenir desórdenes alérgicos.

En varios ensayos controlados aleatorizados se ha investigado la eficacia de los probióticos en la prevención de desórdenes alérgicos, principalmente dermatitis atópica y sensibilización alérgica; sin embargo, dichos estudios arrojaron resultados conflictivos. De hecho, los protocolos de trabajo eran diferentes en términos de las cepas y especies probióticas utilizadas, las dosis, la duración del tratamiento y, lo más

importante, el momento en que fue realizada la intervención como suplementación. En particular, en algunos casos se realizó durante el embarazo [117, 118], durante el embarazo y el amamantamiento [119-121], durante el embarazo y a los niños [122-133] o solo en los niños [134, 135].

Para comprender un poco más la eficacia del uso de probióticos durante los primeros 1000 días de vida en el manejo de enfermedades alérgicas, se realizaron algunos meta-análisis y revisiones sistemáticas de la mayor parte de los Ensayos Controlados Aleatorizados publicados. Un meta-análisis reciente demostró que la suplementación con probióticos reduce, en términos generales, el riesgo de incidencia de dermatitis atópica, especialmente si se utiliza una combinación de probióticos, pero mostró a su vez que no hay efecto sobre la incidencia del asma, las sibilancias y de rino-conjuntivitis [136]. La revisión sistemática y meta-análisis más reciente ha sugerido que la suplementación materna con probióticos tiene un efecto positivo sobre el eczema [137]. Dicho estudio ha mostrado que los probióticos empleados durante el embarazo y el amamantamiento se asocian con un riesgo 22% menor de que los niños desarrollen eczema y eczema atópico hasta los 4 años, mientras que no encontró asociación alguna entre los probióticos y otras condiciones alérgicas.

Por otro lado, este estudio sugirió que la suplementación materna durante el período post natal –y no la suplementación de los niños– podría ser importante en esta clase de intervenciones.

Otro meta-análisis se enfocó en el momento de administración de los probióticos; los datos acumulados indicaron que los probióticos pueden reducir el riesgo de atopía e hipersensibilidad alimentaria más efectivamente cuando se los administra pre-natalmente a madres embarazadas, y post-natalmente al niño. El mismo estudio mostró que la suplementación no tiene efecto benéfico cuando se la administra únicamente a los niños [138]. Adicionalmente, los autores mostraron que en los grupos con altas tasas de cesárea, la administración de probióticos reduce más drásticamente el riesgo de atopía, cuando se compara con el grupo de baja tasa de cesárea. Estos hallazgos son consistentes con el estudio realizado por Kuitunen [139], en el que se concluyó que la suplementación con probióticos y prebióticos durante el embarazo y la niñez confieren protección más significativa en los casos de cesárea. Interesantemente, un estudio más reciente reveló resultados promisorios en el efecto de la intervención con probióticos para reducir el riesgo de alergias en niños nacidos por cesárea [140]. En dicho estudio, los niños nacidos por cesárea que recibieron un suplemento simbiótico compuesto por la cepa probiótica *Bifidobacterium breve* M-16V y una mezcla prebiótica específica (scGOS/lcFOS), tuvieron menores síntomas relacionados con la piel y dermatitis atópica luego de 6 semanas de intervención, cuando se compara con los grupos que solamente recibieron suplementación prebiótica o una fórmula estándar. Se ha demostrado en la bibliografía específica, que los niños nacidos por cesárea –de quienes se sabe que su colonización intestinal es más tardía debido a la falta de exposición a la microbiota materna al nacer– tienen un mayor riesgo de desarrollar alergia/asma luego en la vida [141]. Podría especularse que los niños nacidos por cesárea

–quienes son privados de la carga microbiana masiva que tiene lugar durante el parto vaginal– podrían beneficiarse con la administración de probióticos.

A pesar del gran número de estudios clínicos en el campo de los probióticos y la prevención de alergias, no se ha alcanzado un consenso para la recomendación del uso de probióticos en el manejo de alergia en las etapas tempranas de la vida. A la luz de todos los estudios publicados hasta ahora, la Organización Mundial de Alergia (OMA) recomienda el uso de probióticos durante el embarazo y el amamantamiento, cuando los niños padezcan alto riesgo de alergia, así como en aquellos niños con predisposición a la atopía. En contraste con los postulados de la OMA, otras guías no recomiendan el uso de probióticos en la prevención de enfermedades atópicas, como consecuencia de la gran variabilidad de resultados entre los estudios publicados (guías ASCIA, 2018). De hecho, algunos estudios reportan resultados diferentes con la suplementación con probióticos durante la vida más temprana, como modalidad para prevenir el eccema primario [142, 143], y hasta hay estudios que muestran resultados conflictivos aun cuando se utiliza la misma cepa probiótica [144-148]. Como se mencionó antes, estas discrepancias muy probablemente se deban al diseño del estudio, especialmente al tiempo significativamente menor de amamantamiento que el que se reportó en otros estudios, como el de Kopp y colaboradores. Esta alta variabilidad entre diferentes estudios, que se debe al diseño experimental, la población y la cantidad de sujetos reclutados, las cepas probióticas, las dosis, la definición de las condiciones sintomáticas, el tiempo y duración de la intervención y la influencia de otras covariables como la duración del amamantamiento o la introducción de los alimentos sólidos en la dieta del niño, son factores importantes para ser considerados en el futuro, en el diseño de estudios clínicos más armonizados.

II.B.II. LOS PROBIÓTICOS EN LA PREVENCIÓN DE LA ENTEROCOLITIS NECROTIZANTE Y LA SEPSIS DE DEBUT TARDÍO

El nacimiento pretérmino es la mayor causa de muerte de niños hasta 5 años de edad en los países desarrollados, mientras que en los países de bajos recursos el nacimiento pretérmino es la segunda de las causas de muerte en niños pequeños (OMS). Haber nacido prematuramente se asocia con un riesgo incrementado de mortalidad y morbilidad, incluyendo la sepsis de debut tardío (SDT), la enterocolitis necrotizante (EN), dificultades en la alimentación, dificultad en el desarrollo neurológico a largo plazo y discapacidad en la vida posterior, tal como lo indica la revisión realizada por Van den Akker y colaboradores [149]. Los probióticos han sido ampliamente estudiados para mejorar la salud y reducir la morbilidad y mortalidad en niños nacidos pretérmino. Uno de las aplicaciones más estudiadas es el uso de probióticos para reducir el riesgo de EN, un desorden intestinal serio que afecta principalmente a los niños nacidos pretérmino [150]. La EN es una enfermedad multifactorial, aunque el tipo de alimentación (la leche de la madre propia se asocia a un menor riesgo de EN) y una microbiota intestinal anormal son determinantes cruciales [151, 152].

Varios meta-análisis, incluyendo tanto Ensayos Controlados Aleatorizados (ECA) y ensayos no-ECA, sugieren que los probióticos son eficaces para reducir la incidencia de EN, SDT y la tasa de mortalidad, y facilitan la alimentación [153]. En la mayoría de estos meta-análisis, el grupo que recibió probióticos fue conformado reuniendo una gran variedad de cepas probióticas, tal como se indicaba en los estudios originales. Sin embargo, debido a la heterogeneidad de dichas cepas probióticas, los regímenes de dosificación, el tiempo de intervención, el diseño del estudio y el tipo de enfoque meta-analítico, es difícil hacer una recomendación de uso para un tratamiento con una cepa específica, que es lo que en realidad les resulta más relevante a los médicos [154]. En otro estudio reciente, un acercamiento de meta-análisis en red (MAR) fue utilizado para identificar las cepas con mayor eficacia [155]. Utilizar este nuevo acercamiento de MAR específico de cepas, permitió la identificación de cepas potenciales o combinaciones de cepas con un potencial benéfico para reducir la morbilidad y mortalidad en este grupo vulnerable. Los autores identificaron: i) que el tratamiento con combinaciones de probióticos reducen significativamente las tasas de morbilidad; ii) siete cepas o combinaciones de cepas que tuvieron un efecto significativo en la reducción de la EN; iii) dos tratamientos con combinaciones de probióticos que tuvieron efectos significativos en la reducción de SDT; y iv) tres combinaciones de cepas que redujeron el tiempo hasta alcanzar la nutrición enteral completa [156]. Interesantemente, este estudio no mostró una superposición de cepas, las que fueron efectivas en varios aspectos clínicos; más aun, solamente un bajo número de las cepas probióticas estudiadas fueron efectivas para reducir la mortalidad y morbilidad en niños nacidos pretérmino.

Sin embargo, luego de más de 10 años desde el primer ECA que mostró que los probióticos podrían reducir la EN, y a pesar del gran número de ensayos y pacientes estudiados hasta la fecha, todavía no es posible indicar cuál es la cepa óptima, ni tampoco la dosis o la combinación de cepas, motivo por el cual los médicos podrían estar empleando tratamientos inadecuadamente evaluados y potencialmente inefectivos [157]. Serán necesarios ECA más grandes utilizando cepas con la mayor eficacia aparente, para definir con precisión las estrategias óptimas de tratamiento.

II.B.III. EL USO DE PROBIÓTICOS PARA MANEJAR Y PREVENIR EL CÓLICO INFANTIL

Los cólicos infantiles, o llanto excesivo de causa desconocida, es una condición que afecta aproximadamente a 1 de cada 5 niños menores de 3 meses. Es comúnmente definido por el criterio modificado de Wessel, como el llanto y/o la queja durante más de 3 horas por día, por más de 3 días a la semana. Se asocia con cese prematuro del amamantamiento, con el impacto en el bienestar familiar y el traumatismo de cráneo. Aunque se cree que es una condición que se resuelve sola, hay evidencias recientes de sus efectos adversos a largo plazo sobre el comportamiento, sueño y alergia de los niños. La causa permanece desconocida, y a pesar de haber distintas opciones de tratamiento en el mercado, hay muy poca evidencia científica

de que alguno de ellos realmente proporcione alivio. Hay, sin embargo, evidencia de numerosos estudios que sugieren que *Lactobacillus reuteri* DSM17938 podría ser efectivo en los niños amamantados que sufren cólicos [158].

Una revisión reciente de los datos crudos (IPDMA, por sus siglas en inglés), sugiere que la cepa *L. reuteri* DSM17938 es efectiva para reducir cólicos infantiles, en niños que son amamantados [159]. Este tipo de acercamiento, realizado acumulando datos de 345 niños a partir de distintos ECA, tiene un poder suficiente como para alcanzar estimaciones mucho más confiables sobre los efectos de los probióticos, permitiendo el análisis de subgrupos y proveyendo conclusiones más definitivas. Aunque los resultados de este estudio ayudan a clarificar el debate acerca de la utilidad de la cepa *L. reuteri* DSM 17938 para mejorar los síntomas de los cólicos en los niños amamantados, su rol en niños alimentados con fórmula requiere todavía ser clarificada. Adicionalmente, no hay todavía datos acerca de si esta cepa podría ser efectiva en la prevención del establecimiento de dicha condición patológica.

II.B.IV. LOS PROBIÓTICOS EN EL MANEJO DE LA DIARREA AGUDA, Y LA DIARREA ASOCIADA A ANTIBIÓTICOS, EN NIÑOS.

Se ha sugerido que el uso de probióticos y rehidratación oral son los únicos tratamientos recomendados en el manejo de la gastroenteritis aguda. Esta recomendación universal ha sido validada recientemente por el grupo de trabajo de la Federación de Sociedades Internacionales Pediátricas de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición. Otro tratamiento, como el uso de drogas antidiarréicas y antimeméticas alcanzaron menor nivel de acuerdo y necesitan ser adaptadas en cada región [160].

El Grupo de Trabajo para los Probióticos y Prebióticos ESPGHAN publicó en 2014 un trabajo dirigido a recomendar probióticos específicos para el tratamiento de gastroenteritis aguda, además de la terapia de rehidratación, basándose en una revisión sistemática. El grupo de trabajo de la ESPGHAN recomendó el uso de *L. rhamnosus* GG y *Saccharomyces boulardii*. Sin embargo, hay menos evidencia para el uso de *L. reuteri* DSM 17938 y *Lactobacillus acidophilus* LB inactivado por calor. Hay otras cepas o combinaciones de cepas que también han sido evaluadas, pero la evidencia acerca de su eficacia es débil o simplemente muy preliminar [161].

Varias revisiones sistemáticas han concluido que existe evidencia de calidad moderada que sugiere que los probióticos pueden prevenir la diarrea asociada a antibióticos (DAA) [162, 163]. El grupo de trabajo de la ESPGHAN sobre probióticos y prebióticos también revisó la calidad y cantidad de evidencias disponibles para sugerir el uso de probióticos específicos, para prevenir la DAA. En el caso de que el uso de probióticos para la prevención de la DAA sea considerado, el grupo de trabajo recomienda el uso de *L. rhamnosus* GG o *S. boulardii*. Esta última cepa es propuesta para la prevención de diarreas causadas por *C. difficile*.

Uno de los más asombrosos resultados, que muestra el potencial de los probióticos para prevenir infecciones infantiles, son aquellos de Panigrahi y colaboradores

[164]. Este estudio ha mostrado que una gran proporción de los casos de sepsis neonatal en países en desarrollo, podría ser efectivamente prevenida por el uso de una combinación de *L. plantarum* ATCC-202195, junto con fructo-oligosacáridos, que reduce la incidencia entre un 20-50%. Además, la intervención condujo a una menor cantidad de infecciones de la vía respiratoria alta.

III. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Hay un interés creciente en el rol del microbioma humano en el desarrollo de un amplio rango de enfermedades no-transmisibles crónicas.

El establecimiento de la microbiota en las etapas tempranas de la vida es un proceso que ocurre de forma concomitante con el desarrollo y maduración de los sistemas inmune y metabólico.

El amamantamiento tiene un rol clave en la promoción del crecimiento saludable y el desarrollo, y ha sido asociado con un riesgo reducido de problemas de salud en etapas posteriores de la vida.

La leche materna humana contiene un amplio espectro de compuestos bioactivos complejos, incluyendo a los oligosacáridos y los microorganismos, que modelan la colonización de la microbiota temprana y afectan a la salud del niño más allá de los aspectos nutricionales.

Las estrategias de suplementación nutricional inspiradas por la leche materna humana, tales como el uso de probióticos y prebióticos, ofrece soluciones atractivas para influenciar el desarrollo de un número importante de condiciones de salud.

La bibliografía actual no indica ningún incremento en la aparición de efectos adversos, de modo que los probióticos no traen aparejada ninguna preocupación en cuanto a su seguridad, en el uso en mujeres amamantando y/o niños.

Las recomendaciones generales sobre el uso de probióticos específicos para cada condición de salud, siguen siendo un desafío, en parte como consecuencia de la heterogeneidad de estudios, cepas, dosis tiempos y períodos de tiempo en los que se administra el tratamiento.

Hay desafíos en el desarrollo de estudios en esta población (síntomas reportados por los padres, dificultades en el reclutamiento y retención de los sujetos del estudio, dificultades en la definición del placebo, en alcanzar tamaños muestrales satisfactorios y en el seguimiento en el tiempo que se requiere para estudiar los efectos de salud a largo plazo).

Son necesarios estudios clínicos de gran tamaño y bien diseñados, con protocolos, definiciones e intervenciones coordinados, para reforzar la evidencia y respaldar a los profesionales de la salud en su búsqueda de productos efectivos.

Hoy, los principales probióticos disponibles en el mercado generalmente derivan de un estrecho rango de microorganismos, especialmente lactobacilos y bifidobacterias. El conocimiento cada vez más abundante acerca de la microbiota intestinal y

su rol fundamental en la salud del hospedador, está cambiando el paradigma hacia el desarrollo de una nueva generación de productos basados en bacterias comensales de otros géneros y especies. Se han propuesto cepas candidatas no-convencionales, que incluyen a *Akkermansia muciniphila*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bacteroides fragilis*, *Eubacterium hallii*, y miembros de los grupos Clostridia tipo IV, XIVa y XVIII. Sin embargo esta nueva generación de candidatos basados en microorganismos comensales deben cumplir los mismos criterios que los candidatos convencionales. Esto significa que: i) deben estar bien caracterizados; ii) deben cumplir los mismos requisitos de seguridad, tales como resistencia a antibióticos aceptables (no transferible), y no deben tener capacidades líticas ni de adhesión; iii) mostrar efectos benéficos en el hospedador, antes de ser considerados probióticos. El desarrollo de una nueva generación de probióticos promete un futuro de innovación; sin embargo, es vital una colaboración estrecha entre el sector científico, la industria y las agencias regulatorias, para pavimentar el camino hacia el desarrollo de probióticos nuevos que promuevan la salud, y sirvan para la implementación de estrategias profilácticas y terapéuticas.

IV. BIBLIOGRAFÍA CITADA

Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, Belzer C, Delgado Palacio S, Arboleya Montes S, Mancabelli L, Lugli GA, Rodríguez JM, Bode L, de Vos W, Gueimonde M, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. 2017. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 81:e00036-17.

[1] Hennet T, Borsig L. Breastfed at Tiffany's. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(6):508-518.

[2] Mosca F, Gianni ML. Human milk: composition and health benefits. *Pediatr Med Chir.* 2017;39(2):155.

[3] Stuebe A. The Risks of Not Breastfeeding for Mothers and Infants. *Reviews in Obstetrics and Gynecology.* 2009;2(4):222-231.

[4] Yan J, Liu L, Zhu Y, Huang G, Wang PP. The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis. *BMC Public Health* 2014, 14:126

[5] Cardwell CR, Stene LC, Ludvigsson J, et al. Breast-Feeding and Childhood-Onset Type 1 Diabetes: A pooled analysis of individual participant data from 43 observational studies. *Diabetes Care.* 2012;35(11):2215-2225.

[6] Ho NT, Li F, , Kathleen A Lee-Sarwar, Hein M Tun, Bryan Brown, Pia S Pannaraj, Lianna F Wood, Jeffrey M Bender, Joanne E Sordillo, Meghan B Azad, Amanda L Thompson, Scott T Weiss, M. Andrea Azcarate-Peril, Augusto A Litonjua, Anita L Kozyrskyj, Heather B Jaspán,

Grace M Aldrovandi, Louise Kuhn (2018). Effects of exclusive breastfeeding on infant gut microbiota: a meta-analysis across studies and populations. *bioRxiv* 292755;

[7] Petherick A. Development: Mother's milk: A rich opportunity. *Nature*. 2010;468(7327):S5-7.

[8] Walker A. 2010. Breast milk as the gold standard for protective nutrients. *J Pediatr* 2010; 156(2): S3-7

[9] Lawrence RM, Lawrence RA. Breastfeeding: more than just good nutrition. *Pediatr Rev*. 2011;32(7):267-80

[10] Hennet T, Borsig L. Breastfed at Tiffany's. *Trends Biochem Sci*. 2016;41(6):508-518.

[11] 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(3):544-51.

[12] Andreas NJ, Lampmann B, Mehrling Le-Doare K, 2015. Human breast milk: a review on its composition and bioactivity. *Ear Hum Dev*. 91:626-635.

[13] Feng P, Gao M, Burher A, Zhou TH, Pramuk K. 2016. A nine-country study on the protein content and amino acid composition of mature human milk. *Food Nutr Res*. 60:Art. 31042.

[14] Kumar H, du Toit E, Kulkarni A, Aako J, Linderborg KM, Zhang Y, Nicol MP, Isolauri E, Yang B, Collado MC, Salminen S. 2016. Distinct patterns in human milk microbiota and fatty acid profiles across specific geographic locations. *Front Microbiol*. 7:1619.

[15] Gomez-Gallego C, Garcia-Mantrana I, Salminen S, Collado MC. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2016;21(6):400-405.

[16] Ruiz L, Espinosa-Martos I, García-Carral C, Manzano S, McGuire MK, Meehan CL, McGuire MA, Williams JE, Foster J, Sellen DW, Kamau-Mbuthia EW, Kamundia EW, Mbugua S, Moore SE, Kvist LJ, Otoo GE, Lackey KA, Flores K, Pareja RG, Bode L, Rodríguez JM. What's Normal? Immune Profiling of Human Milk from Healthy Women Living in Different Geographical and Socioeconomic Settings. *Front Immunol*. 2017;8:696.

[17] Martín R, Langa S, Reviriego C, Jimenez E, Marin ML, Xaus J, Fernandez L, Rodriguez JM. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr*. 2003; 143:754-758.

[18] Jimenez E, Delgado S, Maldonado A, Arroyo R, Albujar M, Garcia N, Jarrod M, Fernandez L, Gomez A, Rodriguez JM. *Staphylococcus epidermidis*: A differential trait of the fecal microbiota of breast-fed infants. 2008a *BMC Microbiol*. 8:143.

[19] Solis G. de los Reyes-Gavilan CG, Fernández N, Margolles A, Gueimonde M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in

breast-milk and the infant gut. *Anaerobe*. 2010; 16:307-310.

[20] Schanler RJ, Fraley JK, Lau C, Hurst NM, Hovarth L, Rossmann SN. 2011. Breastmilk cultures and infection in extremely premature infants. *J Perinatol*. 31:335-338.

[21] Gueimonde M, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E. 2007. Breast Milk: A source of bifidobacteria for infant gut development and maturation? *Neonatology* 92:64-66.

[22] 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(7):1253-62.

[23] McGuire MK, McGuire MA. Human milk: mother nature's prototypical probiotic food? *Adv Nutr*. 2015;6(1):112-23.

[24] 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): 1–10.

[25] 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(7):1253-62.

[26] 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(1):17-30.

[27] McGuire MK, McGuire MA. Human milk: mother nature's prototypical probiotic food? *Adv Nutr*. 2015;6(1):112-23.

[28] 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(7):1253-62.

[29] 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(3):544-51.

[30] Gomez-Gallego C, Garcia-Mantrana I, Salminen S, Collado MC. The human milk microbiome and factors influencing its composition and activity. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2016;21(6):400-405.

[31] Fitzstevens JL, Smith KC, Hagadorn JI, Caimano MJ, Matson AP, Brownell EA. Systematic Review of the Human Milk Microbiota. *Nutr Clin Pract*. 2017 32(3):354-364.

[32] Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UM, Beck DL, Abdo Z, Fox LK, Williams JE, McGuire

MK, McGuire MA. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One* 2011;6:e21313.

[33] Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UM, Beck DL, Abdo Z, Fox LK, Williams JE, McGuire MK, McGuire MA. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One* 2011;6:e21313.

[34] Kumar H, du Toit E, Kulkarni A, Aako J, Linderborg KM, Zhang Y, Nicol MP, Isolauri E, Yang B, Collado MC, Salminen S. 2016. Distinct patterns in human milk microbiota and fatty acid profiles across specific geographic locations. *Front Microbiol.* 7:1619.

[35] Urbaniak C, Cummins J, Brackstone M, Macklaim JM, Gloor GB, Baban CK, Scott L, O'Hanlon DM, Burton JP, Francis KP, Tangney M, Reid G. Microbiota of human breast tissue. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(10):3007-14

[36] Ward TL, Hosid S, Ioshikhes I, Altosaar I. Human milk metagenome: a functional capacity analysis. *BMC Microbiol* 2013; 13:116.

[37] Jiménez E, de Andrés J, Manrique M, Pareja-Tobes P, Tobes R, Martínez-Blanch JF, Codoñer FM, Ramón D, Fernández L, Rodríguez JM. Metagenomic Analysis of Milk of Healthy and Mastitis-Suffering Women. *J Hum Lact.* 2015 31(3):406-15

[38] Urbaniak C, Cummins J, Brackstone M, Macklaim JM, Gloor GB, Baban CK, Scott L, O'Hanlon DM, Burton JP, Francis KP, Tangney M, Reid G. Microbiota of human breast tissue. *Appl Environ Microbiol.* 2014;80(10):3007-14

[39] Xuan C, Shamonki JM, Chung A, Dinome ML, Chung M, Sieling PA, Lee DJ. Microbial dysbiosis is associated with human breast cancer. *PLoS One* 2014; 9(1): e83744.

[40] Makino et al., 2013. Mother-to-Infant Transmission of Intestinal Bifidobacterial Strains Has an Impact on the Early Development of Vaginally Delivered Infant's Microbiota. *PlosOne*: 8(11): e78331.

[41] Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. *Environ Microbiol.* 2014;16(9):2891-904.

[42] Duranti S, Lugli GA, Mancabelli L, Armanini F, Turroni F, James K, Ferretti P, Gorfer V, Ferrario C, Milani C, Mangifesta M, Anzalone R, Zolfo M, Viappiani A, Pasolli E, Bariletti I, Canto R, Clementi R, Cologna M, Crifò T, Cusumano G, Fedi S, Gottardi S, Innamorati C, Masè C, Postai D, Savoi D, Soffiati M, Tateo S, Pedrotti A, Segata N, van Sinderen D, Ventura M. 2017. Maternal inheritance of bifidobacterial communities and bifidophages in infants through vertical transmission. *Microbiome* 5(1):Art. 66

[43] Pannaraj PS, Li F, Cerini C, Bender JM, Yang S, Rollie A, Adisetiyo H, Zabih S, Lincez PJ, Bittiger K, Bailey A, Bushman FD, Sleasman JW, Aldrovandi GM. 2017. Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut

microbiome. *JAMA Pediatr.* 171(7):647-654.

[44] Wang M, Li M, Wu S, et al. Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015;60(6):825-33.

[45] Sprenger N, Lee LY, De Castro CA, et al. Longitudinal change of selected human milk oligosaccharides and association to infants' growth, an observatory, single center, longitudinal cohort study. *PLoS One* 2017a;1 2(2):e0171814.

[46] Lewis ZT, Totten SM, Smilowitz JT, et al. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome* 2015; 3:13

[47] Davis JC, Lewis ZT, Krishnan S, et al. Growth and Morbidity of Gambian Infants are Influenced by Maternal Milk Oligosaccharides and Infant Gut Microbiota. *Sci Rep* 2017; 7:40466.

[48] Zivkovic AM, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. Human milk glycobiome and its impact on the infant gastrointestinal microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011 Mar 15;108 Suppl 1:4653-8.

[49] Yu ZT, Chen C, Newburg DS. Utilization of major fucosylated and sialylated human milk oligosaccharides by isolated human gut microbes. *Glycobiology* 2013; 23(11):1281-92.

[50] Garrido D, Ruiz-Moyano S, Lemay DG, et al. Comparative transcriptomics reveals key differences in the response to milk oligosaccharides of infant gut-associated bifidobacteria. *Sci Rep* 2015;5:13517.

[51] Marcobal A, Barboza M, Sonnenburg ED, et al. Bacteroides in the infant gut consume milk oligosaccharides via mucus-utilization pathways. *Cell Host Microbe* 2011;10(5):507-14

[52] Hunt KM, Preuss J, Nissan C, et al. Human milk oligosaccharides promote the growth of staphylococci. *Appl Environ Microbiol* 2012;78(14):4763-70.

[53] Sprenger N, Lee LY, De Castro CA, et al. Longitudinal change of selected human milk oligosaccharides and association to infants' growth, an observatory, single center, longitudinal cohort study. *PLoS One* 2017a;1 2(2):e0171814.

[54] Kunz C, Meyer C, Collado MC, et al. Influence of Gestational Age, Secretor, and Lewis Blood Group Status on the Oligosaccharide Content of Human Milk. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2017; 64(5):789-798.

[55] McGuire MK, Meehan CL, McGuire MA, Williams JE, Foster J, Sellen DW, Kamau-Mbuthia EW, Kamundia EW, Mbugua S, Moore SE, Prentice AM, Kvist LJ, Otoo GE, Brooker SL, Price WJ, Shafii B, Placek C, Lackey KA, Robertson B, Manzano S, Ruiz L, Rodríguez JM, Pareja RG, Bode L. What's normal? Oligosaccharide concentrations and profiles in milk produced by healthy

women vary geographically. *Am J Clin Nutr.* 2017;105(5):1086-1100.

[56] Hoashi M, Meche L, Mahal LK, Bakacs E, Nardella D, Naftolin F, Bar-Yam N, Dominguez-Bello MG. Human Milk Bacterial and Glycosylation Patterns Differ by Delivery Mode. *Reprod Sci.* 2016 Jul;23(7):902-7

[57] Thurl S, Henker J, Siegel M, et al. Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. *Glycoconj J* 1997;14(7):795-9.

[58] Kunz C, Rudloff S, Baier W, et al. Oligosaccharides in human milk: structural, functional, and metabolic aspects. *Ann Rev Nutr* 2000; 20:699–722.

[59] Aakko J, Kumar H, Rautava S, Wise A, Autran C, Bode L, Isolauri E, Salminen S. Human milk oligosaccharide categories define the microbiota composition in human colostrum. *Benef Microbes* 2017;8(4):563-567.

[60] Williams JE, Carrothers JM, Lackey KA, Beatty NF, York MA, Brooker SL, Shafii B, Price WJ, Settles ML, McGuire MA, McGuire MK. Human Milk Microbial Community Structure Is Relatively Stable and Related to Variations in Macronutrient and Micronutrient Intakes in Healthy Lactating Women. *J Nutr.* 2017a;147(9):1739-1748.

[61] Boix-Amorós A, Collado MC, Mira A. Relationship between Milk Microbiota, Bacterial Load, Macronutrients, and Human Cells during Lactation. *Front Microbiol.* 2016; ;7:492

[62] Williams JE, Price WJ, Shafii B, Yahvah KM, Bode L, McGuire MA, McGuire MK. Relationships Among Microbial Communities, Maternal Cells, Oligosaccharides, and Macronutrients in Human Milk. *J Hum Lact.* 2017b;33(3):540-551

[63] Alderete TL, Autran C, Brekke BE, et al. Associations between human milk oligosaccharides and infant body composition in the first 6 mo of life. *Am J Clin Nutr* 2015;102(6):1381-8.

[64] Sprenger N, Odenwald H, Kukkonen AK, et al. FUT2-dependent breast milk oligosaccharides and allergy at 2 and 5 years of age in infants with high hereditary allergy risk. *Eur J Nutr* 2017b; 56(3):1293-1301.

[65] Wang M, Li M, Wu S, et al. Fecal microbiota composition of breast-fed infants is correlated with human milk oligosaccharides consumed. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2015;60(6):825-33.

[66] Lewis ZT, Totten SM, Smilowitz JT, et al. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome* 2015; 3:13

[67] Lewis ZT, Totten SM, Smilowitz JT, et al. Maternal fucosyltransferase 2 status affects the gut bifidobacterial communities of breastfed infants. *Microbiome* 2015; 3:13

- [68] Smith-Brown P, Morrison M, Krause L, et al. Mothers Secretor Status Affects Development of Childrens Microbiota Composition and Function: A Pilot Study. *PLoS One* 2016;11(9):e0161211.
- [69] Locascio et al., 2007. Glycoprofiling of bifidobacterial consumption of human milk oligosaccharides demonstrates strain specific, preferential consumption of small chain glycans secreted in early human lactation *J Agric Food Chem.* 2007;55(22):8914-9.
- [70] Locascio et al., 2010. Broad Conservation of Milk Utilization Genes in *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* as Revealed by Comparative Genomic Hybridization *Appl. Environ. Microbiol.* 2010 ;76(22): 7373-7381
- [71] Bode L. 2012. Human milk oligosaccharides: Every baby needs a sugar mama. *Glycobiology*, Volume 22, Issue 9, 1 September 2012, Pages 1147–1162,
- [72] Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, Belzer C, Delgado Palacio S, Arbolea Montes S, Mancabelli L, Lugli GA, Rodriguez JM, Bode L, de Vos W, Gueimonde M, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. 2017. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 81:e00036-17.
- [73] Frese SA, Hutton AA, Contreras LN, et al. Persistence of Supplemented *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* EVC001 in Breastfed Infants. *Krajmalnik-Brown R, ed. mSphere.* 2017;2(6):e00501-17. doi:10.1128/mSphere.00501-17.
- [74] Chua MC et al., 2017. Effect of Synbiotic on the Gut Microbiota of Cesarean Delivered Infants: A Randomized, Double-blind, Multicenter Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017 Jul;65(1):102-106.
- [75] Slattery, MacFabe DF, Frye RE. 2016. The Significance of the Enteric Microbiome on the Development of Childhood Disease: A Review of Prebiotic and Probiotic Therapies in Disorders of Childhood. *Clin Med Insights Pediatr.* 2016; 10: 91–107.
- [76] Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, Belzer C, Delgado Palacio S, Arbolea Montes S, Mancabelli L, Lugli GA, Rodriguez JM, Bode L, de Vos W, Gueimonde M, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. 2017. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 81:e00036-17.
- [77] Makino et al., 2013. Mother-to-Infant Transmission of Intestinal *Bifidobacterial* Strains Has an Impact on the Early Development of Vaginally Delivered Infant's Microbiota. *PlosOne:* 8(11): e78331.
- [78] Ferreti et al., 2018. Mother-to-Infant Microbial Transmission from Different Body Sites Shapes the Developing Infant Gut Microbiome *Cell Host & Microbe* 24, 133–145

- [79] Nuriel-Ohayon M, Neuman H, Koren O. Microbial Changes during Pregnancy, Birth, and Infancy. *Frontiers in Microbiology*. 2016;7:1031.
- [80] Homayouni A et al., 2014. Effects of probiotics on the recurrence of bacterial vaginosis: a review. *J Low Genit Tract Dis*. 2014 Jan;18(1):79-86.
- [81] Stapleton AE, et al., 2011. Randomized, placebo-controlled phase 2 trial of a *Lactobacillus crispatus* probiotic given intravaginally for prevention of recurrent urinary tract infection. *Clin Infect Dis*. 2011;52(10):1212-7.
- [82] Homayouni A et al., 2014. Effects of probiotics on the recurrence of bacterial vaginosis: a review. *J Low Genit Tract Dis*. 2014 Jan;18(1):79-86.
- [83] Othman M. et al., 2007. Probiotics for preventing preterm labour. *The Cochrane Database of Systematic Reviews* 10.1002/14651858.CD005941.pub2
- [84] Seale et al., 2017. Stillbirth With Group B Streptococcus Disease Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis*. 2017 Nov 15; 65(Suppl 2): S125–S132.
- [85] Valkenburg-van der Berg 2009. Association between colonization with Group B Streptococcus and preterm delivery: a systematic review. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2009;88(9):958-67.
- [86] Hall et al., 2017 Maternal Disease With Group B Streptococcus and Serotype Distribution Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis*. 2017 Nov 15; 65(Suppl 2): S112–S124.
- [87] Seale et al., 2017. Stillbirth With Group B Streptococcus Disease Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis*. 2017 Nov 15; 65(Suppl 2): S125–S132.
- [88] Madrid et al., 2017. Infant Group B Streptococcal Disease Incidence and Serotypes Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis*. 2017; 65(Suppl 2): S160–S172.
- [89] Seale et al., 2017. Stillbirth With Group B Streptococcus Disease Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses. *Clin Infect Dis*. 2017 Nov 15; 65(Suppl 2): S125–S132.
- [90] Bianchi-Jassir, F. et al., 2017 Preterm Birth Associated With Group B Streptococcus Maternal Colonization Worldwide: Systematic Review and Meta-analyses *Clinical Infectious Diseases*;65(2):S133–42
- [91] Scott FI, Horton DB, Mamtani R, et al. Administration of Antibiotics to Children Before Age 2 Years Increases Risk for Childhood Obesity. *Gastroenterology*. 2016;151(1):120-129.e5.
- [92] Miller SA1, Wu RKS2, Oremus M (2018). The association between antibiotic use in infancy and childhood overweight or obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*. 2018

Jul 23.

[93] Risnes KR et al., 2011. Antibiotic exposure by 6 months and asthma and allergy at 6 years: findings in a cohort of 1,401 US children. *Am J Epidemiol*: 173(3): 310–318

[94] Mitre et al., 2018. Association Between Use of Acid-Suppressive Medications and Antibiotics During Infancy and Allergic Diseases in Early Childhood. *JAMA Pediatr*. 2018;172(6):e180315.

[95] Ming Ho, et al., . 2016. Oral *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14 to reduce Group B *Streptococcus* colonization in pregnant women: A randomized controlled trial. *Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology* 55 (2016) 515e518

[96] Okesene-Gafa KAM, et al.,. 2018. Probiotics for treating women with gestational diabetes for improving maternal and fetal health and well-being. *Cochrane Database of Systematic Reviews* 2018, Issue 2. Art. No.: CD012970.

[97] Shah BR, Retnakaran R, Booth GL. Increased Risk of Cardiovascular Disease in Young Women Following Gestational Diabetes Mellitus . *Diabetes Care*. 2008;31(8):1668-1669.

[98] Vohr BR, Boney CM. Gestational diabetes: the forerunner for the development of maternal and childhood obesity and metabolic syndrome? *J Matern Fetal Neonatal Med*. 2008 Mar;21(3):149-57.

[99] Boney CM, Verma A, Tucker R, Vohr BR. Metabolic syndrome in childhood: association with birth weight, maternal obesity, and gestational diabetes mellitus. *Pediatrics* 2005;115(3):e290–6.

[100] Nieuwdorp M, Gilijamse PW, Pai N, Kaplan LM. Role of the microbiome in energy regulation and metabolism. *Gastroenterology* 2014;146(6):1525–33.

[101] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JL. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006; 444 (7122):1027–31

[102] Collado MC, Isolauri E, Laitinen K, Salminen S. Distinct composition of gut microbiota during pregnancy in overweight and normal-weight women. *American Journal Clinical Nutrition* 2008;88(4):894–9.

[103] Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Backhed HK, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell* 2012;150 (3):470–80.

[104] Laitinen K, Poussa T, Isolauri E, Allergy Mucosal Immunology Intestinal Microbiota Group. Probiotics and dietary counselling contribute to glucose regulation during and after pregnancy: a randomised controlled trial. *British Journal of Nutrition* 2009; 101(11):1679–87

- [105] Luoto R, Laitinen K, Nermes M, Isolauri E. Impact of maternal probiotic-supplemented dietary counselling on pregnancy outcome and prenatal and postnatal growth: a double-blind, placebo-controlled study. *British Journal of Nutrition* 2010;103(12):1792–9.
- [106] Wickens KL, Barthow CA, Murphy R, et al. Early pregnancy probiotic supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* HN001 may reduce the prevalence of gestational diabetes mellitus: a randomised controlled trial. *The British Journal of Nutrition*. 2017;117(6):804-813.
- [107] Taylor BL, Woodfall GE, Sheedy KE, O’Riley ML, Rainbow KA, Bramwell EL, Kellow NJ. Effect of Probiotics on Metabolic Outcomes in Pregnant Women with Gestational Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials.. *Nutrients*. 2017;9(5). pii: E461.
- [108] Dallanora S, Medeiros de Souza Y, Deon RG, Tracey CA, Freitas-Vilela AA, Wurdig Roesch LF, Hack Mendes R. Do probiotics effectively ameliorate glycemic control during gestational diabetes? A systematic review. *Arch Gynecol Obstet*. 2018 Jun 18. doi: 10.1007/s00404-018-4809-2.
- [109] Barrett HL et al., 2014. Probiotics for preventing gestational diabetes. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014 Feb 27;(2):CD009951..
- [110] Jarde A., et al.,. Pregnancy outcomes in women taking probiotics or prebiotics: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy and Childbirth* 2018, 18:14
- [111] Pawankar R, Walkter Canonica G, Holgate ST, Lockey RF. World Health Organization. White Book on Allergy, 2011–2012. Executive Summary
- [112] Prescott SL, Pawankar R, Allen KJ, Campbell DE, Sinn J, Fiocchi A, et al. A global survey of changing patterns of food allergy burden in children. *World Allergy Organ J* 2013; 6: 21 (Prevalence)
- [113] Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989 Nov 18;299(6710):1259-60.
- [114] Wold AE. The hygiene hypothesis revised: is the rising frequency of allergy due to changes in the intestinal flora? *Allergy*. 1998;53(46 Suppl):20-5.
- [115] Ou CY, Kuo HC, Wang L, Hsu TY, Chuang H, Liu CA, et al. Prenatal and postnatal probiotics reduces maternal but not childhood allergic diseases: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Exp Allergy* 2012; 42: 1386–96
- [116] Boyle RJ, Ismail IH, Kivivuori S, Licciardi PV, Robins-Browne RM, Mah LJ, et al. *Lactobacillus* GG treatment during pregnancy for the prevention of eczema: a randomized controlled trial. *Allergy* 2011; 66: 509–16
- [117] Huurre A, Laitinen K, Rautava S, Korkeamaki M, Isolauri E. Impact of maternal atopy

and probiotic supplementation during pregnancy on infant sensitization: a double-blind placebo-controlled study. *Clin Exp Allergy* 2008; 38: 1342–8

[118] Dotterud CK, Storro O, Johnsen R, Oien T. Probiotics in pregnant women to prevent allergic disease: a randomized, double-blind trial. *Br J Dermatol* 2010; 163: 616–23

[119] Rautava S, Kainonen E, Salminen S, Isolauri E. Maternal probiotic supplementation during pregnancy and breast-feeding reduces the risk of eczema in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2012; 130: 1355–60

[120] Abrahamsson TR, Jakobsson T, Bottcher MF, Fredrikson M, Jenmalm MC, Bjorksten B, et al. Probiotics in prevention of IgE-associated eczema: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119: 1174–80.

[121] Abrahamsson TR, Jakobsson T, Bjorksten B, Oldaeus G, Jenmalm MC. No effect of probiotics on respiratory allergies: a seven-year follow-up of a randomized controlled trial in infancy. *Pediatr Allergy Immunol* 2013; 24: 5

[122] Allen SJ, Jordan S, Storey M, Thornton CA, Gravenor MB, Garaiova I, et al. Probiotics in the prevention of eczema: a randomised controlled trial. *Arch Dis Child* 2014; 99: 1014–9.

[123] Kim JY, Kwon JH, Ahn SH, Lee SI, Han YS, Choi YO, et al. Effect of probiotic mix (*Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus acidophilus*) in the primary prevention of eczema: a double double-blind, randomized, placebo-controlled trial "The Journal of allergy and clin *Pediatr Allergy Immunol* 2010; 21: 386–93

[124] Kalliomaki M., et al., 2001 Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2001 ;357(9262):1076-9.

[125] Kalliomaki M., et al., 2003. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003 ;361(9372):1869-71.

[126] Kalliomaki M., et al., 2007. Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 119(4):1019-21.

[127] Kopp MV et al., 2008. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of *Lactobacillus GG* supplementation. *Pediatrics*. 2008 Apr;121(4):e850-6. doi: 10.1542/peds.2007-1492.

[128] Niers L, Martin R, Rijkers G, Sengers F, Timmerman H, van Uden N, et al. The effects of selected probiotic strains on the development of eczema (the PandA study). *Allergy* 2009; 64: 1349–58.

[129] Wickens K, Black PN, Stanley TV, Mitchell E, Fitzharris P, Tannock GW, et al. A differential effect of 2 probiotics in the prevention of eczema and atopy: a double-blind, randomized,

placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol* 2008; 122: 788–94.

[130] Wickens K, Black P, Stanley TV, Mitchell E, Barthow C, Fitzharris P, et al. A protective effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 against eczema in the first 2 years of life persists to age 4 years. *Clin Exp Allergy* 2012; 42: 1071–9.

[131] Wickens K, Stanley TV, Mitchell EA, Barthow C, Fitzharris P, Purdie G, et al. Early supplementation with *Lactobacillus rhamnosus* HN001 reduces eczema prevalence to 6 years: does it also reduce atopic sensitization? *Clin Exp Allergy* 2013; 43: 1048–57.

[132] Soh et al., 2009. Probiotic supplementation in the first 6 months of life in at risk Asian infants—effects on eczema and atopic sensitization at the age of 1 year. *Clin Exp Allergy*. 2009 39(4):571-8.

[133] West CE, Hammarstrom ML, Hernell O. Probiotics during weaning reduce the incidence of eczema. *Pediatr Allergy Immunol* 2009; 20: 430–7.

[134] Zuccotti G, et al., Probiotics for prevention of atopic diseases in infants: systematic review and meta-analysis. *Allergy*. 2015 70(11):1356-71

[135] Garcia-Larsen V, Ierodiakonou D, Jarrold K, Cunha S, Chivinge J, et al. (2018) Diet during pregnancy and infancy and risk of allergic or autoimmune disease: A systematic review and meta-analysis. *PLOS Medicine* 15(2): e1002507

[136] Zhang GQ et al. Probiotics for Prevention of Atopy and Food Hypersensitivity in Early Childhood: A PRISMA-Compliant Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. Shoenfeld. Y, ed. *Medicine*. 2016;95(8):e256

[137] Kuitunen, Mikael et al. Probiotics prevent IgE-associated allergy until age 5 years in cesarean-delivered children but not in the total cohort. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 2009 , 123(2):335 - 341

[138] Chua MC et al., 2017. Effect of Synbiotic on the Gut Microbiota of Cesarean Delivered Infants: A Randomized, Double-blind, Multicenter Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017 Jul;65(1):102-106.

[139] Chua MC et al., 2017. Effect of Synbiotic on the Gut Microbiota of Cesarean Delivered Infants: A Randomized, Double-blind, Multicenter Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017 Jul;65(1):102-106.

[140] Sevelsted A, Stokholm J, Bønnelykke K, Bisgaard H. Cesarean section and chronic immune disorders. *Pediatrics*. 2015 ;135(1):e92-8.

[141] Soh et al., 2009. Probiotic supplementation in the first 6 months of life in at risk Asian infants—effects on eczema and atopic sensitization at the age of 1 year. *Clin Exp Allergy*. 2009 39(4):571-8.

- [142] Kopp MV et al., 2008. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of *Lactobacillus GG* supplementation. *Pediatrics*. 2008 Apr;121(4):e850-6. doi: 10.1542/peds.2007-1492.
- [143] Kalliomaki M., et al., 2001. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2001 ;357(9262):1076-9.
- [144] Kalliomaki M., et al., 2003. Probiotics and prevention of atopic disease: 4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2003 ;361(9372):1869-71.
- [145] Kalliomaki M., et al., 2007. Probiotics during the first 7 years of life: a cumulative risk reduction of eczema in a randomized, placebo-controlled trial. *J Allergy Clin Immunol*. 2007 119(4):1019-21.
- [146] Kopp MV et al., 2008. Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of probiotics for primary prevention: no clinical effects of *Lactobacillus GG* supplementation. *Pediatrics*. 2008 Apr;121(4):e850-6. doi: 10.1542/peds.2007-1492.
- [147] Cabana MD, et al., 2017. Early Probiotic Supplementation for Eczema and Asthma Prevention: A Randomized Controlled Trial. *Pediatrics*. 2017 Sep;140(3). pii: e20163000.
- [148] van den Akker et al., 2018. Probiotics for Preterm Infants: a strain specific systematic review and network meta-analysis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 67(1):103–122
- [149] Frost BL. 2017. New Medical and Surgical Insights Into Neonatal Necrotizing Enterocolitis: A Review. *JAMA Pediatr*. 2017;171(1):83-88.
- [150] Pammi et al., 2017. Intestinal dysbiosis in preterm infants preceding necrotizing enterocolitis: a systematic review and meta-analysis. *Microbiome*/ 2017; 5:31(pages)
- [151] Warner BB et al., 2016. Gut bacteria dysbiosis and necrotising enterocolitis in very low birthweight infants: a prospective case-control study. *Lancet*. 2016 May 7;387(10031):1928-36.
- [152] Dermyshe E., Wang Y., Yan C., Hong W., Qiu G., Gong X., and Zhang T. The “Golden Age” of Probiotics: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized and Observational Studies in Preterm Infants. *Neonatology* 2017;112:9-23
- [153] Patel RM, Underwood MA. 2018. Probiotics and necrotizing enterocolitis. *Seminars in Pediatric Surgery* 27 (2018) 39–46
- [154] van den Akker et al., 2018. Probiotics for Preterm Infants: a strain specific systematic review and network meta-analysis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 67(1):103–122

- [155] van den Akker et al., 2018. Probiotics for Preterm Infants: a strain specific systematic review and network meta-analysis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 67(1):103–122
- [156] van den Akker et al., 2018. Probiotics for Preterm Infants: a strain specific systematic review and network meta-analysis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*. 67(1):103–122
- [157] Sung, V., F. D'Amico, M. D. Cabana, K. Chau, G. Koren, F. Savino, H. Szajewska, G. Deshpande, C. Dupont, F. Indrio, S. Mentula, A. Partty and D. Tancredi (2018). "Lactobacillus reuteri to Treat Infant Colic: A Meta-analysis." *Pediatrics* 141(1)
- [158] Sung, V., F. D'Amico, M. D. Cabana, K. Chau, G. Koren, F. Savino, H. Szajewska, G. Deshpande, C. Dupont, F. Indrio, S. Mentula, A. Partty and D. Tancredi (2018). "Lactobacillus reuteri to Treat Infant Colic: A Meta-analysis." *Pediatrics* 141(1)
- [159] Guarino, A., Vecchio, A.L., Dias J.A., Berkley, J.A., Boey, C.Bruzzese, D.Cohen, M.B., Cruchet, S., Liguoro, I., Salazar-Lindo, E., Sandhu, B., Sherman, P.M., Shimizu, T. Universal recommendations for the management of acute diarrhea in non-malnourished children. *JPGN*, June 12, 2018 - Publish Ahead of Print - Issue - p doi: 10.1097/MPG.0000000000002053\
- [160] Szajewska et al., 2014. 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 Apr;58(4):531-9.
- [161] Johnston BC1, Goldenberg JZ2, Parkin PC3. Probiotics and the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Infants and Children. *JAMA*. 2016;316(14):1484-1485.
- [162] Szajewska, et al., 2016. Probiotics for the Prevention of Antibiotic-Associated Diarrhea in Children *JPGN* _ Volume 62, Number 3, March 2016
- [163] Panigrahi P et al., 2017. A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India. *Nature*. 2017 Aug 24;548(7668):407-412.

YOGURES CON PROBIÓTICOS; UNA VISIÓN TECNOLÓGICA

Gabriel Vinderola

gvinde@fiq.unl.edu.ar

- Investigador Independiente del CONICET, Instituto de Lactología Industrial (CONICET-UNL).
- Profesor Asociado de la Cátedra de Microbiología, Facultad de Ingeniería Química, Universidad Nacional del Litoral, Santa Fe, Argentina.

RESUMEN

Argentina fue la sede en 2001 de una reunión de expertos internacionales por encargo de la Organización Mundial de la Salud y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura con el objetivo de analizar, debatir y consensuar lineamientos sobre los probióticos, los cuales son microorganismos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, producen un efecto benéfico sobre el hospedador. En la Argentina, el Instituto de Nacional de Alimentos (INAL), dependiente del ANMAT, incorporó esta definición en el Código Alimentario Argentino para regular el rotulado de alimentos que incluyen probióticos. De todos modos, mucho antes de esta definición, la industria de alimentos ya incorporaba bacterias probióticas en algunos de sus alimentos, como por ejemplo la leche cultivada o la leche Bio. La presencia de bacterias probióticas en alimentos en el cono sur está fuertemente representada por los productos lácteos, principalmente los yogures. La industria láctea incorpora probióticos a sus yogures desde mediados de los años 90, el haber transitado este camino le permitió conocer y dominar las variables que garantizan la viabilidad de estos microorganismos en yogures. Los yogures con probióticos son una forma de incorporar microorganismos vivos, benéficos y en cantidades abundantes a la dieta.

I. ARGENTINA, CUNA DE UNA DEFINICIÓN DE PROBIÓTICOS CON CONSENSO INTERNACIONAL

Entre el 1 y el 4 de Octubre de 2001, un grupo de cinco expertos internacionales, entre los cuales se encontraba la Dra. Mary Ellen Sanders, autora de uno de los capítulos de este libro, se reunió en el hotel Amerian de la ciudad de Córdoba (Argentina) por encargo de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO, por sus siglas en inglés). El objetivo de esta consulta a expertos fue analizar, debatir y consensuar lineamientos para una temática que venía en paulatino crecimiento a nivel mundial, en el ámbito científico pero también en su aplicación en alimentos y en suplementos alimenticios. Esta temática tenía que ver con la existencia de ciertos microorganismos que, cuando son administrados en cantidades adecuadas, producen un efecto benéfico sobre el hospedador. Literalmente la definición en inglés finalmente adoptada por este grupo de expertos estipula que los probióticos son *"live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host"*. Esta definición, que no fue la primera, pero ha sido la que ha tenido aceptación a nivel científico global y por parte de los entes reguladores de esta temática en numerosos países. En Argentina, el Instituto Nacional de Alimentos (INAL), dependiente del ANMAT, incorporó esta definición en el Código Alimentario Argentino para regular el rotulado de alimentos que incluyen probióticos, tema que será tratado en otro apartado de este libro. De todos modos, mucho antes de esta definición por parte de estos dos organismos de reconocido prestigio internacional, la industria de alimentos ya incorporaba bacterias probióticas en algunos de sus alimentos. Al lector más entrado en años le resultarán familiares palabras como "leche cultivada", "leche Bio" o "Lactobacillus GG". A lo largo de este capítulo daremos una mirada tecnológica a estos productos para clarificar de que se trataban y cuales son los alimentos que hoy en día son fuente de probióticos.

Si bien la definición consensuada por el comité de expertos convocados en la ciudad de Córdoba (2001) por la OMS y la FAO, utiliza el término *"microorganismos"* en un sentido amplio, en la práctica los probióticos son mayoritariamente bacterias, y en mucho menor medida ciertas levaduras, las que se han usado como probióticos en alimentos desde hace más de 20 años. No hay registro del uso de otros microorganismos como virus, hongos o incluso parásitos microscópicos como probióticos, aunque *a priori* a estas palabras no las asociamos con microorganismos que puedan ejercer un efecto benéfico para la salud. Hasta no hace mucho creíamos que las bacterias eran solamente agentes causales de infecciones y enfermedades o responsable de la putrefacción de alimentos. Hoy sabemos que muchas de ellas son esenciales para la vida, otras son útiles para la producción de alimentos, y otras, los probióticos, promueven la salud en diferentes aspectos, si las consumimos vivas y en forma suficiente y frecuente. A lo largo de este capítulo podremos apreciar que las leches fermentadas, llamadas comúnmente yogures, pueden ser una fuente de bacterias

benéficas viables y en gran cantidad (suficiente), y que pueden ser consumidas con frecuencia. Con el término de “probióticos” nos vamos a referir a los grupos microbianos más utilizados para este fin en alimentos, los lactobacilos y las bifidobacterias. En suplementos dietarios podemos encontrar otros grupos como ciertas levaduras (*Saccharomyces boulardii*, por ejemplo) y bacilos esporulados (*Bacillus clausii*, *Bacillus coagulans*, por ejemplo). Dentro de los grupos de los lactobacilos y las bifidobacterias, las especies más comunes dentro de las cuales encontramos cepas probióticas son *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*, etc.

Es importante aclarar en este punto el concepto microbiológico de una cepa, y para serlo más fácil vamos a explicarlo desde un punto de vista macrobiológico. Todos nosotros pertenecemos a la especie *Homo sapiens*; sin embargo no somos todos iguales, algunos tenemos mayor habilidad innata para realizar tareas técnicas, otros para desarrollos filosóficos, otros para programar complicados software, otros para operar a corazón abierto y otros para hacer obras de arte. A las bacterias probióticas les pasa lo mismo, hay cepas con efectos sobre la inmunidad del intestino, otras capaces de inhibir patógenos y otras con actividades antiinflamatorias, y muchas a la vez comparten parcialmente estas propiedades, tema que se abordará en el capítulo de la Dra. Sanders bajo el concepto de “mecanismos compartidos”. En este sentido, en el mercado existen cepas particulares de cepas probióticas como *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* HN001, *L. plantarum* 229v, *L. casei* Shirota, *L. paracasei* CRL 432, *L. acidophilus* LA5, *L. acidophilus* NCFM, *L. casei* Immunitas, *B. animalis* subsp. *lactis* BB12, *B. animalis* subsp. *lactis* DN173010, *B. animalis* subsp. *lactis* HN019, *B. longum* BB536, *L. reuteri* SD2112, *L. reuteri* DSM 17938 [1]. El nombre correcto de una cepa probiótica, el cual debería estar claramente explicitado en un producto que la contenga, es el género, especie e identificación de la cepa, por ejemplo: *Lactobacillus rhamnosus* GG.

II. ALIMENTOS UTILIZADOS COMO VEHÍCULOS DE PROBIÓTICOS

Euromonitor International es una empresa *on line* que provee, de forma paga, investigación de mercado estratégica independiente, capaces de analizar diferentes productos y servicios alrededor del mundo de manera cuantitativa y cualitativa. La información disponible en esta plataforma en el año 2014 indicaba que el valor del mercado de probióticos en el continente americano ascendía a más de 10.000 millones de dólares, siendo el 43,4% representado por América Latina. Mientras en Estados Unidos el 29% del mercado de probióticos está representado por suplementos alimentarios, en América Latina es solo del 4%, siendo el resto vehiculizado en alimentos tipo yogur (www.euromonitor.com). En este contexto podemos decir que en América Latina, a los probióticos los encontramos en los yogures o, en sentido

más amplio y técnicamente correcto, en las leches fermentadas.

Si bien el mercado de alimentos probióticos está fuertemente dominado por los productos lácteos, yogures en particular, como matrices alimentarias vehículos de probióticos, la industria alimentaria internacional ha desarrollado una amplia gama de productos que incluyen estas bacterias benéficas, como forma de dar opciones de alimentos para personas intolerantes a la lactosa, alérgicos a las proteínas lácteas, veganos y vegetarianos o aquellos que quieren diversificar las fuentes de posibles probióticos. Entre los lácteos con probióticos podemos encontrar, además de yogures, quesos, bebidas en base suero de queso, postres lácteos y helados. En relación con las matrices no lácteas, se han reportado la presencia de probióticos en barras de chocolate, productos de panadería, budines, films comestibles, jugos de fruta con o sin pulpa, purés de frutas para bebés, frutas trozadas o jugos de fruta en polvo, embutidos, cereales fermentados o productos en base soja [2]. Sin embargo, el éxito comercial y funcional de los yogures pueden explicarse debido a la conjunción de factores que solo reúnen otros pocos alimentos, como los jugos de fruta por ejemplo, y que se comentan a continuación. Desde un punto de vista tecnológico, un yogur implica un proceso de producción compatible con la presencia y viabilidad de las bacterias probióticas, es un proceso relativamente corto, sencillo y donde no se exponen a los probióticos a condiciones fisicoquímicas que podrían inactivarlos. El producto se conserva en frío y tiene una vida útil tal que permite que los probióticos lleguen en alto número al consumidor, cumpliendo el requerimiento de “cantidades suficientes” de la definición de la OMS/FAO. Desde el punto de vista del alimento, el yogur, y los jugos de fruta por ejemplo, poseen una percepción de alimento saludable por parte del consumidor. No es lo mismo incorporar probióticos en otros alimentos como un helado o un embutido, puesto que estos son alimentos que consumimos por placer y no porque entendemos que la matriz alimentaria es saludable (alto contenido de azúcares, grasas, sal). Finalmente, la persona que consume yogur, o jugos de frutas, lo hace con una cierta regularidad, como parte del desayuno o la colación. Esta regularidad aporta a la necesidad de “frecuencia de consumo” que requieren los probióticos, ya que no colonizan el intestino, ni siquiera en neonatos que poseen una microbiota intestinal aún en establecimiento [3], sino que están de tránsito mientras son consumidos y se eliminan del intestino unos pocos días después de interrumpida la ingesta [4], por lo tanto es necesario una ingesta frecuente.

III. LECHE FERMENTADAS Y YOGURES CON PROBIÓTICOS

Con el nombre de leches fermentadas se conoce a un grupo de alimentos basados en la fermentación microbiana de leches de diferentes mamíferos (vaca, cabra, búfala, oveja, camello, etc.). La fermentación implica una transformación fisicoquímica y microbiológica de la leche por acción de microorganismos especialmente seleccionados y agregados a la leche (leches fermentadas industriales), o que pueden

provenir del medio ambiente y que se han seleccionado de forma artesanal fermentación tras fermentación (leches fermentadas artesanales). Se estima que existen más de 400 tipos de leches fermentadas alrededor del mundo, tanto industriales como artesanales. A pesar de tener nombres muy diversos (yogur, kéfir, koumiss, täfil, fil-mjolk, täetmjolk, långofil viili, dahi, eyran, busa, kissel, naja, urgotnic, leban, zabady, mast, dough, roba, mazun, katyk, etc), según la zona geográfica donde se haya desarrollado, son esencialmente la misma cosa, con variaciones en el tipo de leche, los microorganismos usados y las condiciones de fermentación (tiempo y temperatura) y drenado parcial o no del suero, lo que hace que se obtengan productos con diferentes propiedades sensoriales y consistencia [5](Tamime y Robinson, 2000). El artículo 576 (Resolución Conjunta SPRyRS y SAGPyA N° 33/2006 y N° 563/2006) del Código Alimentario Argentino define a las Leches Fermentadas a los productos, adicionados o no de otras sustancias alimenticias, obtenidos por coagulación y disminución del pH de la leche o leche reconstituida, adicionada o no de otros productos lácteos, por fermentación láctica mediante la acción de cultivos de microorganismos específicos. Estos microorganismos específicos deben ser viables, activos y abundantes en el producto final durante su período de validez. En particular, entiende por yogur o yoghurt o iogurte, en adelante yogur, el producto incluido en la definición anterior cuya fermentación se realiza con cultivos de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* (llamados fermentos) a los que en forma complementaria pueden acompañar otras bacterias acidolácticas (probióticos, por ejemplo) que, por su actividad, contribuyen a la determinación de las características del producto terminado. En síntesis, el yogur es el producto de la fermentación de la leche con bacterias específicas llamadas *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. Si bien estas bacterias tienen características probióticas, como la capacidad de reducir los síntomas de intolerancia a la lactosa, reconocidas por las Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, por sus siglas en inglés) (<https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/1763>, fecha de último acceso 8 de Mayo de 2018) y pueden ser encontradas en heces luego del consumo de yogur [6], estas bacterias, tienen relativamente poca capacidad de tolerar las condiciones ácidas del estómago, perdiendo significativamente viabilidad durante la digestión gastrointestinal [7]. En este sentido, las bacterias probióticas de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, poseen en general una mayor resistencia a las condiciones adversas gastrointestinales (alta acidez, presencia de enzimas hidrolíticas y sales biliares con acción detergente sobre las membranas lipídicas de las bacterias) que las bacterias del fermento del yogur (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*), esto garantiza su llegada al intestino en elevados niveles de células viables [8]. Para una mejor comprensión de este texto, de aquí en adelante denominaremos bacterias del fermento o cultivos iniciadores, a las bacterias empleadas para la fermentación de la leche y la fabricación del yogur (*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*), mientras que con el término probióticos, nos referiremos a las cepas o a las especies estipuladas al final del primer apartado

de este capítulo (pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*). Sin embargo, hay casos particulares que escapan a esta distinción entre bacterias del fermento y bacterias probióticas. Por ejemplo, la leche fermentada japonesa Yakult [9], presente en el mercado japonés desde 1935 y que se puede conseguir en ciertas cadenas internacionales de supermercados o en los populares “supermercados chinos” de la ciudad de Buenos Aires, es producida por el mismo probiótico, *Lactobacillus casei* Shirota. Esta cepa fermenta la leche durante 5 días (a diferencia de la fermentación del yogur que se consigue en 4-5 horas, según el fermento utilizado), siguiendo un perfil de fermentación a diferentes temperaturas sub-óptimas, que otorga a la cepa una mayor resistencia a las condiciones de estrés del producto ácido y a las condiciones de estrés gastrointestinales.

Un rápido recorrido por la historia de las leches fermentadas probióticas en el Cono Sur ubica a la Argentina como pionera en el desarrollo de estos productos. Uno de los primeros productos con probióticos que llegaron al mercado, a mediados de la década del 90, fueron las llamadas “leches cultivadas”, las cuales poseían en su formulación microbiológica a los cultivos del fermento (*S. thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*) y cepas probióticas de las especies *L. acidophilus* y *B. bifidum*. Incluso antes de los años 90, el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA, CONICET, Tucumán), comenzó el desarrollo junto a la empresa SanCor C.U.L., de la leche fermentada probiótica denominada Leche SanCor Bio, la cual poseía la cepa *L. casei* CRL 431. La cepa *L. rhamnosus* GG fue incorporada en yogures en Argentina por La Serenísima en el año 1995. Años más tarde, los productos Actimel (2001) y Activia (2006) que incluyen las cepas probióticas *L. casei* DN114001 y *B. animalis* subsp. *lactis* DN173010, respectivamente, también llegaron al mercado Argentino. Es posible conseguir en Argentina, y en Brasil por ejemplo, la leche fermentada probiótica japonesa Yakult, conteniendo *L. casei* Shirota. Las cepas probióticas de Chr. Hansen, *B. animalis* subsp. *lactis* BB12 y *L. acidophilus* LA5 fueron utilizadas en otras versiones de las llamadas leches cultivadas en los años 90. En relación a los quesos, una colaboración establecida en 1997 entre la empresa Sucesores de A. Williner S.A. (Rafaela, Santa Fe) y el Instituto de Lactología Industrial (UNL-CONICET, Santa Fe) permitió el desarrollo del primer queso probiótico de Latinoamérica, el Bioqueso Ilolay Vita, lanzado al mercado en 1999. A principios de la década del 2010, la empresa La Serenísima lanzó al mercado un queso tipo Port Salut con la cepa *L. rhamnosus* GG.

La historia del desarrollo de la primera leche fermentada probiótica Argentina, la Leche Bio, a partir de una cepa y recursos humanos argentinos, merece ser contada. Según un reporte de la Dra. Adriana Pérez Chaia, la cepa *Lactobacillus casei* CRL 431 fue incorporada a la colección de cultivos del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA, CONICET, Tucumán) en 1983 por el Dr. Guillermo Oliver. En los registros de la colección, se observa una breve nota que indica como origen “heces de niño sano”. Esta anotación simple, escueta, encierra una historia centrada en la palabra “sano”, que permite anticipar el valor de esta cepa.

El Dr. Guillermo Oliver se graduó en la Facultad de Ingeniería Química de la

Universidad Nacional del Litoral (Santa Fe, Argentina) y se inició en el estudio de las bacterias lácticas durante una estadía posdoctoral en el *Institut National de la Recherche Agronomique* (INRA), en Jouy-en-Josas (Francia), bajo la dirección del Prof. Germain Mocquot. Poco tiempo después de volver al país, se radicó en San Miguel de Tucumán, donde inició sus actividades como Profesor de Microbiología General en la Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia de la Universidad Nacional de Tucumán (1965), con esmero en formación de investigadores jóvenes en el metabolismo de bacterias lácticas. En 1976, los conocimientos adquiridos a lo largo de los años, le permitieron fundar, junto a la Dra. Aída Pesce de Ruiz Holgado, el Centro de Referencia para Lactobacilos, un centro de investigaciones dedicado al estudio del metabolismo de las bacterias lácticas y sus aplicaciones industriales.

Las investigaciones en ecología intestinal que realizaban en Jouy-en-Josas los Dres. Pierre Raibaud y Robert Ducluzeau, con quienes el Dr. Oliver mantenía relación profesional, habían despertado tiempo atrás su interés por la interacción de las bacterias lácticas con otros microorganismos en diferentes ecosistemas y, especialmente, en el intestino del hombre y animales. Esto cimentó relaciones con médicos pediatras, como los Dres. Carlos Gianantonio y Alejandro O'Donnell, y una especialista en ecosistemas, la Dra. Caría, con quienes fortaleció sus conocimientos en el sistema gastrointestinal del niño y en la interpretación ecológica de las poblaciones de la microbiota intestinal.

En la década del 80, la Provincia de Tucumán vivía una situación de crisis de salud. Datos del INDEC señalan que, en 1983, la mortalidad infantil constituía la segunda causa de muerte infantil en la provincia alcanzando, en el verano, un 20% de la población infantil. Un equipo de médicos del Hospital del Niño Jesús de Tucumán, visitó a los Directores de CERELA preocupados por el alto índice de mortalidad que se registraba en niños de corta edad y con cuadro de desnutrición, que sufrían diarreas estivales. Los tratamientos terapéuticos que se aplicaban en ese momento no permitían resolver al mismo tiempo la desnutrición, la inmunosupresión y controlar las infecciones. La inquietud que llevaban a CERELA era si las bacterias lácticas podían ser usadas para devolver la salud y prevenir nuevas infecciones. Ante esta situación el Dr. Oliver decidió aplicar los conocimientos adquiridos sobre ecología intestinal, e inició la búsqueda de muestras de heces de niños que hubieran resistido naturalmente la enfermedad, habiendo estado expuestos a ella. Los aislamientos de bacterias lácticas obtenidos a partir de heces de niños sanos de esa época, se depositaron en CERELA entre 1983 y 1984. Con las bacterias aisladas, se realizaron estudios que incluían la habilidad para desarrollar en leche y el potencial para inhibir patógenos responsables de cuadros de diarrea. Entre las bacterias lácticas estudiadas, se destacó *L. casei* CRL 431, la que demostró además su total inocuidad en numerosos estudios en animales de laboratorio y en voluntarios humanos adultos. Origen huésped homólogo, constituyente de microbiota intestinal normal y carácter microbiológico no asociado a patogenicidad (microorganismos seguros) eran atributos muy importantes para su uso en bioterapia. Así, los miembros del Laboratorio de Ecofisiología Tecnológica de

CERELA, dirigidos por el Dr. Oliver, junto a Médicos Pediatras del Hospital de Niños de Tucumán, encararon el desafío de mejorar la microbiota intestinal de niños afectados por diarreas mediante la administración de la cepa *L. casei* CRL 431 en cultivo simbiótico con otra cepa de *L. acidophilus*. En los años siguientes, se añadieron nuevas investigaciones básicas de metabolismo, estudios inmunológicos y ensayos tecnológicos. Dados estos resultados, CONICET decidió llamar a licitación a empresas lácteas para la elaboración de un producto a escala industrial, y en 1988 se firmó un acuerdo de riesgo compartido con la Empresa SanCor C.U.L. Finalmente, en 1995 se completó el desarrollo tecnológico de la primera leche fermentada argentina probiótica (Leche SanCor Bio) que podría tratar la desnutrición y la diarrea al mismo tiempo, y estimular la producción de inmunoglobulina.

IV. ¿CÓMO SE ELABORA UN YOGUR CON PROBIÓTICOS?

Para la elaboración de yogures con probióticos, la industria láctica emplea a las bacterias del fermento y a los probióticos esencialmente en dos formatos tecnológicos comerciales, los denominados cultivos congelados y cultivos liofilizados (o deshidratados) y bajo una modalidad denominada DVI (Direct to Vat Inoculation), lo que significa el agregado directo de los fermentos y los probióticos al tanque de fermentación donde se produce el yogur [10], habiéndose dejado paulatinamente de lado la costumbre de iniciar la fermentación con una fracción del cultivo de una fabricación anterior. La disponibilidad de estos cultivos altamente concentrados y estandarizados implica la producción de biomasa, o de células viables de estas bacterias, en fermentadores hasta una alta concentración (más de 1×10^9 UFC/mL). Para el lector menos familiarizado con la microbiología, la sigla UFC significa Unidades Formadoras de Colonias, lo que remite a la cantidad de células, solas o en pequeñas cadenas, que pueden formar una colonia visible al ojo desnudo cuando son cultivadas en una placa de Petri conteniendo un medio agarizado nutritivo, capaz de soportar el crecimiento de esa bacteria. Luego de la producción de estas células, las mismas deben ser concentradas por centrifugación o mediante filtración por membranas, para luego ser adicionadas de ingredientes denominados crioprotectores (lactosa, glucosa, trehalosa, maltodextrina, sacarosa, leche descremada, proteínas de suero) que tendrán la función de proteger a las células para mantenerlas viables y activas. Seguido al agregado de las sustancias protectoras, las células serán congeladas rápidamente por goteo en una batea de nitrógeno líquido, lo que las convertirá instantáneamente en pequeñas esferas (5-10 mm de diámetro) congeladas que deben mantenerse a la menor temperatura posible (idealmente menos de 40 grados bajo cero). Estos cultivos concentrados congelados presentan concentraciones de células viables generalmente mayores a 1×10^{10} UFC/g. Si el cultivo se comercializará en formato liofilizado, los pellets de células congeladas son sometidos a un proceso tecnológico adicional de remoción de agua a ultrabaja presión, este proceso se

denomina liofilización e implica la sublimación del agua, es decir, el pasaje directo del estado sólido al vapor del agua libre de las células. Los cultivos así deshidratados se denominan cultivos liofilizados y suelen presentar un nivel de células viables cercanos o mayores a 1×10^{11} UFC/g [10]. Los cultivos DVI pueden tener una vida útil de entre 12 y 24 meses si se mantienen las condiciones adecuadas de almacenamiento sugeridas por el fabricante.

Como consumidores, y con un poco de atención, en un supermercado podríamos distinguir tres tipos de yogures: aquellos denominados “firmes”, los cuales se reconocen por estar disponibles en potes y presentar una alta viscosidad, lo que hace que se deban comer con la ayuda de una cuchara, en contraposición con aquellos denominados “bebibles” y “líquidos”, que se pueden beber directamente de la botella, por ser más fluidos, es decir, más o menos líquidos según la formulación y el proceso tecnológico que le sigue a la fermentación. Para la elaboración de un yogur es necesario partir de una leche de buena calidad, esto significa una carga microbiana total moderada (la cual será reducida a niveles inocuos mediante un tratamiento térmico) y la ausencia de antibióticos, que podrían provenir de la producción primaria de la leche. El hecho de que las bacterias del fermento puedan crecer en la leche para transformarla en yogur es la mejor garantía de la ausencia de antibióticos en el producto, ya que la presencia de los mismos impediría la fermentación al inhibir a las bacterias del fermento. La leche de buena calidad es entonces parcial o totalmente descremada, adicionada de sólidos lácteos (leche descremada en polvo, por ejemplo), para elevar el contenido de sólidos totales hasta 10-15% (p/v) y algo de azúcares, edulcorantes y colorantes, seguido de un tratamiento térmico para la inactivación de microorganismos patógenos y deteriorantes. Al proceso térmico le sigue otro de homogeneización, por el cual se logra reducir el tamaño de los glóbulos grasos de la leche y permite obtener un producto con una textura más suave y homogénea [8]. Llegado este punto, la leche será inoculada en condiciones de extrema asepsia con las bacterias del fermento y, si se tratara de un yogur firme, con los probióticos, ya que en este tipo de yogures la fermentación de la leche tendrá lugar dentro del mismo contenedor o pote que llegará al consumidor, y no dentro de un tanque fermentador. En el caso de los yogures batidos o bebibles, la fermentación se lleva a cabo en grandes fermentadores de acero inoxidable, y el producto coagulado resultante sufre un proceso de quiebre de la cuajada y fluidificación mediante el paso por bombas especializadas, que dependiendo de la intensidad de este tratamiento se obtendrá un producto más o menos bebible (agitación suave) o líquido (agitación vigorosa). Los probióticos pueden ser entonces agregados en esta instancia, una vez enfriado parcialmente el producto. Cabe aclarar que la fermentación de la leche, es decir la acidificación desde el pH natural de la misma hasta el pH final del producto, cercano a pH 4,5, es una tarea llevada a cabo por las bacterias del fermento cuando la leche se termostatiza a 42-43°C. *Streptococcus thermophilus* y *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* establecen entre sí un fenómeno de mutua cooperación, denominado específicamente protocoperación. Esta protosimbiosis hace que ambas especies crezcan en

leche a mayor velocidad de que si lo hicieran por separado, debido a que una especie produce metabolitos que son aprovechados por la otra, y viceversa. Esto permite reducir el pH de la leche en un período generalmente menor a las 5-6 h. Si los probióticos están presentes durante el proceso fermentativo, poco pueden aportar al mismo y acidificar y crecer en el producto, por lo que deben ser agregados a la leche en los niveles de células viables que se pretenden estén en el producto final. Durante la fermentación láctica de la leche, las bacterias del fermento pueden llegar a niveles de células viables de $1 \times 10^{8-9}$ UFC/mL, mientras que los probióticos serán adicionados a niveles de 1×10^7 UFC/mL, pudiendo alcanzar concentraciones de un orden logarítmico más (1×10^8 UFC/mL) en el caso de que sean capaces de desarrollar parcialmente durante la fermentación. Son en estos niveles de células viables en los que deben encontrarse tanto las bacterias del fermento como los probióticos, para que un yogur con probióticos ejerza su efecto benéfico sobre la salud. Numerosos metabolitos microbianos, no presentes en la leche antes de la fermentación, aparecen en el yogur como resultado de la acción fermentativa de las bacterias lácticas del fermento. Estos productos son el ácido láctico y otros ácidos orgánicos, los péptidos derivados de la acción hidrolítica de las bacterias lácticas, principalmente sobre la principal proteína de la leche, la caseína [11], los exopolisacáridos o cadenas poliméricas de azúcares con efectos tecnológicos espesantes y funcionales sobre la salud [12], compuestos antimicrobianos de diferente naturaleza (peróxido de hidrógeno, compuestos tipo bacteriocinas) que, junto al ácido láctico, contribuyen a la estabilidad y seguridad microbiológica del yogur, e incluso galactooligosacáridos, con propiedades prebióticas, provenientes de reacciones bioquímicas de la lactosa durante la fermentación [13]. Todos estos componentes no microbianos contribuyen a la acción benéfica de los probióticos en yogures.

V. RECuento DE CÉLULAS VIABLES DE PROBIÓTICOS EN YOGURES

La definición de probióticos indica que estos microorganismos deben estar viables al momento de ser administrados. Para los probióticos en yogures, esto implica que las cepas benéficas deben tolerar el proceso industrial de producción de yogur y mantenerse viables a lo largo del período de vida útil, el cual comprende un tiempo que puede llegar hasta los 30-45 días. Durante este tiempo, el producto debe ser mantenido en refrigeración (5-8°C), lo cual favorece la sobrevivencia del probiótico. Si bien no existe un estándar internacional ni una dosis efectiva de probióticos para todas las cepas disponibles, los estudios de revisión sistemática y meta-análisis indican que un consumo de aproximadamente 1×10^9 células totales de probióticos por día serían suficiente para garantizar un efecto benéfico en la salud [14]. Esta cantidad de bacterias se logra si la porción de 100 mL de yogur presenta un nivel de células viables de como mínimo 1×10^7 UFC/mL.

Si bien existen metodologías de biología molecular [15] o basadas en citometría

de flujo [16] independientes del cultivo para determinar el nivel de células viables de un probiótico en una matriz alimentaria, estas son costosas en términos de reactivos, requieren equipamiento altamente específico y personal muy calificado, por lo que no son de fácil acceso para los organismos públicos de control o las pequeñas y medianas industrias que quieren colocar en el mercado un producto probiótico con niveles satisfactorios de células viables. En este contexto, el recuento de bacterias probióticas sigue siendo dependiente de la disponibilidad de medios de cultivos agarizados que permitan distinguir a los probióticos de las bacterias del fermento (medios de cultivo diferenciales) o que permitan hacer el recuento selectivo de los probióticos presentes en el producto (medios de cultivos selectivos). El recuento de probióticos en un alimento puede resultar un gran desafío, dependiendo de la complejidad microbiológica del producto en cuestión, es decir, de la cantidad de especies/cepas presentes. El caso más simple podría suponer el recuento de *L. casei* Shirota en la leche fermentada Yakult, ya que, al ser el único microorganismo presente, bastará hacer diluciones seriadas de la muestra en un medio líquido apropiado y el plaqueamiento, en superficie, en agar MRS, seguido de una incubación a 37°C por 48 hs. En el caso del BioQueso Ilolay Vita, primer queso probiótico de Latinoamérica y que llegó al mercado argentino en 1999 [17], el mismo presentaba 3 cepas probióticas (un *L. casei*, un *L. acidophilus* y una bifidobacteria) y 2 cepas del fermento (*S. thermophilus* y *Lactococcus lactis*). Para llevar a cabo el control de calidad microbiológica de este queso se tuvieron que diseñar especialmente un grupo de medios de cultivos selectivos y diferenciales [18]. Para tal fin, se adicionó al agar MRS de agentes selectivos como sales biliares, cloruro de litio y propionato de sodio [19, 20], capaces de inhibir a las bacterias del fermento, sin afectar el desarrollo de los probióticos, los cuales aparecían con morfologías de colonia claramente distinguibles según la especie.

Es necesario aclarar que el término probiótico no engloba una categoría homogénea de microorganismos como podrían ser los psicrotróficos, termodúricos o microorganismos totales en leche cruda, para los cuales se han desarrollado metodologías estandarizadas de recuento. El término tampoco representa géneros específicos como *Salmonella*, *Escherichia* o *Clostridium* para los cuales existen metodologías estandarizadas y/o medios de cultivos comerciales específicos para hacer un recuento selectivo seguro. Los lactobacilos y bifidobacterias usados como probióticos pueden tener requerimientos metabólicos muy diferentes entre sí, pero a la vez cercanos a las bacterias lácticas del fermento, por lo cual es difícil intentar favorecer el crecimiento de unos mientras se intenta inhibir el desarrollo de otros cuando se diseñan medios de cultivos selectivos o diferenciales. Por el momento no existen metodologías estandarizadas, ni medios de cultivos específicos, que garanticen un recuento cierto de probióticos, este es siempre una solución a medida del producto y de las cepas presentes. En 2006 fue publicada una norma ISO (<https://www.iso.org/standard/35292.html>) para la enumeración presuntiva de *L. acidophilus* en un medio selectivo mediante recuento en placa, y en 2010 fue propuesta una norma equivalente para bifidobacterias (<https://www.iso.org/standard/45765.html>). Sin embargo, las

limitaciones de ambas normas hace que el recuento sea solo presuntivo y no pueda asegurarse a ciencia cierta que se obtendrá una adecuada respuesta para todas las cepas de bifidobacterias o *L. acidophilus* presentes. Además no se ha abordado con una norma el recuento de cepas de las especies *L. casei* y *L. rhamnosus*, sin dudas las especies más intensivamente usadas en yogures con probióticos. Por lo tanto, el recuento de probióticos es una solución a medida que debe ponerse a punto para cada producto en particular, teniendo en cuenta las cepas utilizadas, donde el objetivo es utilizar medios de cultivos selectivos que permitan una recuperación adecuada del probiótico y a la vez inhibir, o poder diferenciar, a las bacterias del fermento. En este sentido se han propuesto una gran cantidad de medios de cultivo posibles [21, 22], sin embargo la elección del medio de cultivo y de las condiciones para el recuento microbiológico deben ajustarse en cada caso, para lo cual se requiere una adecuada formación microbiológica en el campo de las bacterias lácticas y las bifidobacterias.

Los laboratorios capacitados en el abordaje de la compleja temática del recuento de probióticos en alimentos podrían ser los del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA, Tucumán, Argentina), el Instituto de Lactología Industrial (INLAIN, CONICET-UNL, Santa Fe, Argentina) o el Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA, CONICET-UNLP; La Plata, Argentina), quienes poseen una historia de más de 20 años ininterrumpido en la temática de bacterias lácticas y probióticas.

VI. CONCLUSIONES

La presencia de bacterias probióticas en alimentos en el cono sur está fuertemente representada por los productos lácteos, principalmente los yogures. Una conjunción de factores justifican este hecho: el proceso tecnológico relativamente simple de elaboración de yogur, una matriz fisicoquímica y condiciones de almacenamiento del producto que garanticen la viabilidad del probiótico hasta el momento del consumo, una percepción del yogur como alimento saludable por parte del consumidor, y una alta frecuencia de ingesta del producto yogur, compatible con lo que necesita un probiótico para ejercer su efecto benéfico. La industria láctea incorpora probióticos a sus yogures desde mediados de los años 90, el haber transitado este camino le permitió conocer y dominar las variables que garanticen la viabilidad de estos microorganismos en yogures, no siendo actualmente la viabilidad un tema de preocupación para los tecnólogos y microbiólogos alimentarios, aunque es siempre necesario estar atentos a la respuesta de nuevos cultivos probióticos que van apareciendo en el mercado e incorporándose a yogures, donde el recuento selectivo y diferencial es siempre una solución a medida del producto que le garantice al consumidor la presencia en el producto de la cantidad necesaria de células viables para cumplir el efecto benéfico sobre la salud.

VII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- [1] Tripathi, M.K., Giri, S.K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225-241,
- [2] Vijaya Kumar, B., Vijayendra, S.V., Reddy, O.V. (2015). Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. *J Food Sci Technol*. 52, 10, 6112-24.
- [3] Gueimonde, M., Kalliomäki, M., Isolauri, E., Salminen, S. 2006). Probiotic intervention in neonates--will permanent colonization ensue? *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 42, 5, 604-606.
- [4] Saxelin, M., Lassig, A., Karjalainen, H., Tynkkynen, S., Surakka, A., Vapaatalo, H., Järvenpää, S., Korpela, R., Mutanen, M., Hatakka, K. (2010). Persistence of probiotic strains in the gastrointestinal tract when administered as capsules, yoghurt, or cheese. *Int J Food Microbiol.*, 144, 2, 293-300.
- [5] Tamime and Robinson's Yoghurt. 3rd Edition. Science and Technology. Editorial Elsevier, 2007.
- [6] Elli, M., Callegari, M.L., Ferrari, S., Bessi, E., Cattivelli, D., Soldi, S., Morelli, L., Goupil Feuillerat, N., Antoine, J.M. (2006). Survival of Yogurt Bacteria in the Human Gut. *Appl Environ Microbiol.*, 72, 7, 5113-5117.
- [7] Morelli, L. (2017). Bacteria in yoghurt and strain-dependent effects on gut health. In (Ed. Shah N) *Yoghurt in health and disease prevention*, Academic Press.
- [8] Champagne, C. (2009). Development of Fermented Milk Products Containing Probiotics. In *Dairy Microbiology and Biochemistry. Recent Developments*, CRC Press, Taylor and Francis.
- [9] Nanno, M., Kato, I., Kobayashi, T., Shida, K. (2011). Biological effects of probiotics: what impact does *Lactobacillus casei* Shirota have on us? *Int J Immunopathol Pharmacol.*, 24 (1 Suppl), 45S-50S.
- [10] Farnworth, E.R., Champagne, C.P. (2016). Production of Probiotic Cultures and Their Incorporation into Foods. In (Ed. Ronald Ross Watson and Victor R. Preedy) *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. Bioactive Foods in Health Promotion*, Academic Press.
- [11] Korhonen, H. (2009). Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. *Journal of Functional Foods*, 1, 177-187.
- [12] Harutoshi, T., 2013. Exopolysaccharides of lactic acid bacteria for food and colon health applications. In: Kongo, M. (Ed.), *Biochemistry, Genetics and Molecular Biology: Lactic Acid*

Bacteria – R&D for Food, Health and Livestock Purposes, pp. 515–538 (Chapter 22).

[13] Martinez Villauenga 2008

[14] Ouwehand, A.C. (2017). A review of dose-responses of probiotics in human studies. *Benef Microbes*, 8, 2, 143-151.

[15] Davis, C. (2014). Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 103, 9-17.

[16] Wilkinson, M.G. (2018). Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review. *Trends in Food Science & Technology*, In press.

[17] Vinderola, G., Perdigón, G., Reinheimer, J.A., Médici, M., Prosello, W., Ghiberto, D (2003). Bioqueso Iloy Vita: un nuevo queso probiótico con alta respuesta sobre el sistema inmune. *Industrias Lácteas Españolas (ILE), Dic.*, 34-48.

[18] Vinderola, G., Prosello, W., Ghiberto, D., Reinheimer, J.A. (2000). Viability of probiotic- (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian Fresco Cheese. *Journal of Dairy Science*, 83, 9, 1905 - 1911.

[19] Vinderola, G., Reinheimer, J.A. (1999). Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria (1999). *International Dairy Journal*, 9 8, 497-505.

[20] Vinderola, G., Reinheimer, J.A. (2000). Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *International Dairy Journal*, 10, 4, 271 – 275.

[21] Ashraf, R., Shah, N.P. (2011). Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yoghurt - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 3, 194-208.

[22] Zielińska, D., Ołdak, A., Rzepkowska, A., Zieliński, K. (2018). Enumeration and Identification of Probiotic Bacteria in Food Matrices. In *Advances in Biotechnology for Food Industry*, Chapter 6, 167-196.

METODOLOGÍAS EN LA INVESTIGACIÓN DE LOS BENEFICIOS DE LOS PROBIÓTICOS

Diego Hernán Giunta

diego.giunta@hospitalitaliano.org.ar

- *Coordinador Área de Investigación en Medicina Interna. Servicio de Clínica Médica*
- *Coordinador Investigación No Patrocinada. Departamento de Investigación*
- *Maestría Investigación Clínica - Instituto Universitario Hospital Italiano*
- *Hospital Italiano de Buenos Aires.*

RESUMEN

En este capítulo presentaremos los componentes más importantes de los estudios de investigación sobre probióticos para consumo humano. Una de las principales dificultades es la falta de homogeneidad en los métodos utilizados, por lo cual presentamos una revisión de las características principales, ventajas, desventajas, aplicaciones y ejemplos de cada uno de ellos. Esta introducción a los métodos de investigación en probióticos tiene la intención inicial de brindar los elementos básicos para el diseño, el reporte y la comprensión de la investigación en probióticos en nuestra región.

I. INTRODUCCIÓN

Los efectos benéficos de los probióticos sobre la salud deben ser demostrados en estudios clínicos en humanos. Para evaluar los beneficios es necesario plantear preguntas de investigación. La pregunta de investigación es el eje de un proyecto de investigación. Sobre este eje se toman las decisiones de cada uno de los componentes y métodos de un proyecto de investigación, como el diseño o la población del estudio.

Antes de discutir los métodos que se utilizan para estudiar el efecto de los probióticos sobre la salud, es importante remarcar que el fundamento teórico para el diseño de los estudios de investigación debe ser sólido. Debe estar claro para el grupo investigador el porqué intervenir con un probiótico. Las razones para la elección de un probiótico en particular, la evidencia disponible sobre seguridad y eficacia, y la plausibilidad biológica de un probiótico en particular para un determinado efecto de interés. Todos estos aspectos del marco teórico del estudio deben estar claros. De nada sirve el mejor diseño, ni las mejores decisiones sobre un estudio si el marco teórico no es sólido.

A continuación revisaremos los diseños más frecuentes utilizados para el estudio de probióticos. Posteriormente consideraremos la población del estudio, consideraciones sobre intervenciones, eventos de interés y seguridad, el uso de aleatorización cuando es posible, ciego y adherencia. Por último haremos una mínima referencia a la estimación del tamaño muestral en el contexto del estudio de probióticos. Debido a la variedad de los métodos disponibles, presentamos artículos para cada una de las secciones que ejemplifican los conceptos más importantes.

II. DISEÑOS

La selección del diseño más apropiado depende de la pregunta de investigación. La pregunta de investigación es el eje de un estudio y contiene la esencia del conocimiento que se desea generar.

Con respecto a la naturaleza de la exposición, los diseños de investigación se pueden dividir en observacionales y experimentales. Presentaremos a continuación un breve resumen de cada uno de los diseños potenciales para evaluar los probióticos que pudieran utilizarse en diferentes situaciones. Ningún diseño es perfecto, cada uno tiene fortalezas y debilidades inherentes que son importante conocer.

II.A. ESTUDIOS OBSERVACIONALES

Los estudios observacionales son aquellos en que el investigador para contestar su pregunta de investigación solo observa exposiciones y eventos de interés sin realizar intervenciones. Observar no es una actividad pasiva en este sentido, ya que

implica observar lo que ocurre de manera activa y recuperar la información de manera estandarizada. El investigador no indica procedimientos adicionales sino que se limita a obtener información del cuidado habitual de los pacientes. Pueden existir variaciones en el cuidado, pero típicamente no se le indican procedimientos o exposiciones adicionales.

Un ejemplo de este tipo de estudios es el de Ohashi y col. (2002) realizaron un estudio de casos de cáncer de vejiga y controles "apareados" [1]. Evaluaron el efecto del consumo de un producto lácteo fermentado con *Lactobacillus casei Shirota* sobre el cáncer de vejiga.

En general los estudios puramente observacionales en el estudio de probióticos son muy variables y heterogéneos.

II.B. COHORTE

En los estudios de cohorte el investigador incluye los pacientes de acuerdo a su exposición y los sigue en el tiempo en busca de los participantes que desarrollan eventos. Las cohortes implican un período de seguimiento para los participantes. Pueden ser retrospectivas o prospectivas. Pueden tener una única rama o varias ramas de exposición diferente y permiten estimar riesgos. La medida natural de asociación es el riesgo relativo o la razón de tasas de incidencia.

Las cohortes son eficientes para exposiciones infrecuentes. También permiten estudiar más de un evento simultáneamente. Permiten medir las exposiciones antes que los eventos, asegurando así la preexistencia de las exposiciones a los eventos. La relación temporal es uno de los criterios de causalidad postulados por Bradford Hill para identificar asociaciones causales [2,3], por lo cual aportan mayor información con fortaleza causal que otros diseños observacionales.

Las principales desventajas de las cohortes prospectivas son la dificultad en su implementación, el costo y tiempo que requiere para completarse. La principal desventaja de las cohortes retrospectivas es la validez de la información y la calidad de las mediciones y registros retrospectivos. Por ejemplo, las historias clínicas pueden registrar información muy incompleta. A su vez es imposible estandarizar cómo se tomó la información o como se evaluaron los pacientes de manera retrospectiva.

Por ejemplo el estudio de Nordqvist y col. (2018) fue una cohorte prospectiva de mujeres embarazadas para estudiar el efecto del consumo de probióticos sobre parto y preeclampsia [4]. Como es habitual en este diseño, existe escasa información sobre la exposición a probióticos previa y está restringida a probióticos disponibles comercialmente.

II.C. CASOS Y CONTROLES

En los estudios de casos y controles, los participantes se incluyen por haber tenido un evento (casos) o por no haberlo tenido (controles). En este caso se busca

retrospectivamente recuperar información sobre su exposición previa a la ocurrencia del evento. En los estudios de casos y controles no se puede estimar riesgos, pero sí odds. La natural medida de asociación de los estudios de casos y controles es el odds ratio.

Estos estudios son muy eficientes para el estudio de eventos raros (casos poco frecuentes) y permiten estudiar varias exposiciones al mismo tiempo. La gran restricción es la incapacidad para medir algunas exposiciones por falta de información. A su vez el desafío más grande de los estudios de casos y controles es asegurar que tanto casos como controles provienen de la misma población.

Por ejemplo en este estudio de Rodríguez-Campello y col. (2014) se compararon los hábitos dietarios de casos con un accidente cerebrovascular agudo y controles sanos [5]. Uno de los factores evaluados significativamente diferente entre casos y controles fue el consumo de yogures con probióticos. En este estudio, Lu y col. (2017) utilizaron un diseño de casos y controles también. Identificaron el consumo de probióticos como un factor protector para el desarrollo de enterocolitis necrotizante en neonatos [6].

II.D. CORTE TRANSVERSAL

En los estudios de cohorte transversal, se seleccionaron participantes por pertenecer a una población específica. Son siempre retrospectivos, pueden ser descriptivos o analíticos. La natural medida de frecuencia en este caso es la prevalencia y la medida de asociación la razón de prevalencias. En este tipo de estudio, se realizan las mediciones de eventos y exposiciones en el mismo momento del tiempo. Esto no quiere decir que ocurre exactamente en el mismo día, quiere decir que se trata del mismo momento conceptual para todos los participantes.

Los estudios de corte transversal son susceptibles a la presencia de causalidad reversa, ya que no es posible en la mayoría de las exposiciones, definir con claridad la preexistencia de una exposición en particular con respecto a un determinado evento. La gran ventaja de este tipo de estudio es la simpleza y facilidad de su diseño e implementación. Los estudios de corte transversal generan escasa información causal, pero permiten evaluar múltiples asociaciones a la vez.

En el estudio de Drew y col. (2018) se realizó un estudio de corte transversal 3 meses antes de los juegos olímpicos de 2016 en atletas de élite seleccionados para participar [7]. Se estudió la prevalencia de depresión, ansiedad, estrés percibido, resiliencia, recuperación de stress, energía, sueño, consumo de probióticos.

II.E. ESTUDIO ECOLÓGICO

Los estudios ecológicos son poblacionales por definición. En estos estudios las unidades de observación están medidas en niveles de poblaciones y no de individuos. Es natural presentar la asociación de las tasas como coeficientes de correlación o aplicar modelos de regresión a situaciones más complejas.

Es el diseño más apropiado cuándo una determinada exposición varía naturalmente entre las poblaciones o cuando el efecto de una exposición ocurre a nivel de la población como las campañas de vacunación. Si bien es un diseño extremadamente útil para la evaluación a nivel poblacional de los probióticos, es un área poco explorada que merece atención adicional.

La gran ventaja de los diseños ecológicos es su facilidad de implementación y bajo costo, ya que los datos son en general recolectados por sistemas de datos rutinarios. La desventaja más grande es que son los estudios que aportan menor fortaleza en sentido causal. Tienen un enorme valor en la generación de información para salud pública y gestión de salud.

II.F. REPORTE DE CASOS/SERIE DE CASOS

Los reportes de casos o las series de casos no tienen particularidades específicas del diseño. Simplemente representan el reporte de un caso particular de un determinado evento o presentación clínica de interés. En general representan casos infrecuentes. En el estudio de los probióticos se utilizan mucho los reportes de casos de eventos de seguridad por su baja frecuencia. Por ejemplo en la revisión de seguridad realizada por Didari y col. (2014) gran parte de la información sobre seguridad proviene de reportes de casos o series de casos [8].

II.G. ESTUDIOS EXPERIMENTALES

En los estudios experimentales el investigador administra una exposición o un producto. Los estudios experimentales más comunes son los ensayos clínicos en los cuales el investigador administra la exposición bajo estudio. Esta administración de la exposición, sólo es posible con las exposiciones administrables como los probióticos.

Por ejemplo el estudio de Ryan y col. (2015) realizaron un ensayo clínico de una sola rama para evaluar el efecto del consumo de *Saccharomyces boulardii* sobre los niveles de colesterol de voluntarios sanos [9]. Si bien no es un estudio piloto en sentido estricto de la definición de estudio piloto.

En el estudio experimental de Gil y col. (2001) los investigadores evaluaron el efecto de la suplementación con *Bifidobacterium lactis* HN019 sobre la proporción de los subgrupos de leucocitos y su actividad fagocítica y ataque de células tumorales *in vitro* [10]. En este estudio, voluntarios sanos fueron expuestos a 2 concentraciones del mismo probiótico. No usar aleatorización y cada individuo fue su propio control.

II.H. ENSAYO CLÍNICO

En los estudios experimentales el investigador administra una exposición y evalúa su efecto sobre una variable de resultado. En este caso la exposición podría ser un probiótico. En los ensayos clínicos el investigador evalúa el efecto sobre un evento,

de una exposición administrada por el investigador. En sentido estricto son cohortes experimentales, donde el investigador administra una exposición y sigue a los participantes en el tiempo en busca de los que desarrollan un evento de interés. Son siempre experimentales y prospectivos. A su vez los ensayos clínicos pueden ser aleatorios, controlados, y ciegos entre otros.

Pueden tener una o más ramas de exposición. Se llama ramas de exposición a los diferentes niveles de exposición, como por ejemplo cepa A o comparador B. Los ensayos clínicos con más de una rama son los más comunes y permiten obtener información de eficacia y seguridad de las intervenciones. Se llaman controlados a los ensayos clínicos que tienen más de una rama de exposición. Generalmente en estos casos, una de las ramas actúa como control.

Por ejemplo el estudio de estudio con dos ramas es el de Slykerman y col. (2017) [11]. En este estudio compararon el efecto de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 comparado con placebo sobre la ansiedad y depresión posparto de mujeres embarazadas. Fue un estudio aleatorizado y doble ciego adicionalmente. En el estudio de Morales y col. (2018) se incluyen 3 ramas de evaluación: probiótico (*Lactobacillus rhamnosus* SP1), antibiótico y placebo en voluntarios sanos [12].

Las ventajas principales de los ensayos clínicos son la posibilidad de obtener información causal sobre la asociación entre la exposición bajo estudio y el evento de interés cuando es posible aleatorizar la exposición. Esto es fundamental ya que es necesario información de alta calidad para sostener la evidencia del consumo de probióticos y sus efectos [13]. Componentes adicionales del ensayo clínico como la aleatorización, la presencia de al menos un control, el ciego permiten generar información con el mayor grado de evidencia. Las principales desventajas son el costo y el tiempo de la implementación y la complejidad del diseño, implementación y control de calidad.

Con respecto a las ramas del ensayo clínico, se puede dividir en estudios de ramas paralelas o cruzadas. En los primeros, la asignación a rama de intervención se mantiene constante durante todo el estudio. Por el contrario en los ensayos clínicos con ramas cruzadas, los participantes son asignados a una exposición y luego de un período de lavado (del inglés *wash-out* o periodo sin medicación) reciben la otra exposición del estudio. Este diseño solo puede aplicarse a eventos de interés reversibles.

Por ejemplo el estudio de Pu y col. (2017) fue un ensayo clínico de ramas paralelas [14]. Una de las ramas recibió *Lactobacillus paracasei* N1115 y la otra placebo. El objetivo fue evaluar el efecto sobre las infecciones del tracto respiratorio superior.

Pakdaman y col. (2016) utilizaron un diseño cruzado para evaluar el efecto de la cepa DDS-1 de *Lactobacillus acidophilus* sobre los síntomas de la intolerancia a lactosa en voluntarios sanos adultos [15]. En este estudio, todos los participantes recibieron el probiótico o placebo por 4 semanas de manera secuencial. Se aleatorizan quienes empezaron con probiótico y quienes con placebo. Se utilizó un periodo de lavado (sin probiótico ni placebo) de 2 semanas entre ambos periodos.

Existe un subtipo de ensayo clínico denominado factorial. En este tipo de diseño, se estudia simultáneamente el efecto de 2 intervenciones diferentes y su combinación.

Los diseños factoriales son muy eficientes para estudiar el efecto de dos intervenciones en simultáneo.

Por ejemplo, en el estudio de Okesene-Gafa y col. (2016) evaluaron el efecto de 2 intervenciones simultáneas con un diseño factorial [16]. El objetivo fue estudiar el efecto de 2 intervenciones sobre la ganancia de peso durante la gestación y optimizar los resultados del embarazo en mujeres obesas embarazadas. Las dos intervenciones evaluadas fueron: 1) *Lactobacillus rhamnosus* GG y *Bifidobacterium lactis* BB12, y 2) una intervención dietaria.

En los estudios de superioridad, el investigador cree que una de las dos ramas del ensayo clínico es superior a la otra. Por ejemplo si interesa evaluar la eficacia de un probiótico para el control de la ansiedad versus placebo. Por el contrario es común que no sea ético dejar sin tratamiento a los participantes de un estudio de investigación si existieran tratamientos disponibles de conocida eficacia. En ese contexto, cualquier nuevo tratamiento interesa demostrar que al menos no es inferior que los tratamientos de mejor cuidado recomendado disponible. Estos estudios se llaman estudios de no inferioridad y tienen particularidades en su diseño, tamaño muestral, análisis estadístico y métodos.

Por ejemplo el estudio de Oudhui y col. (2011) fue un estudio de no inferioridad [17]. En este estudio se evaluó si el consumo de *Lactobacillus plantarum* 299/299v más fibra y la descontaminación selectiva del tracto gastrointestinal en la prevención de infecciones en pacientes internados en unidades de cuidados intensivos.

De acuerdo con su diseño específico se los puede clasificar en ensayos clínicos clásicos y pragmáticos. Los ensayos clínicos clásicos, de eficacia o tradicionales son situaciones muy artificiales donde se estudia la eficacia de una intervención sobre un determinado resultado. Los pacientes incluidos en el estudio se seleccionan para ser similares, adherentes y tener baja probabilidad de abandonar el estudio. A su vez se incluye un determinado grupo etario que tenga baja frecuencia de eventos adversos y dentro de lo posible pocas comorbilidades adicionales. Los métodos de seguimiento de los participantes son intensivos, invasivos y muy diferentes de la práctica habitual. Los pacientes incluidos son muy parecidos entre sí. Esta situación maximiza la validez interna y la eficiencia del estudio, pero compromete la validez externa.

Por ejemplo en el estudio de Smith y col. (2016) se evaluó el efecto del consumo de probióticos diario comparado con cuidado habitual [18]. Se incluyeron participantes con asma mayores a 5 años y el evento de interés fue el consumo de antibióticos durante el invierno. Tanto en la asignación de tratamientos como en las mediciones de las variables de respuesta, este estudio se parece a lo que ocurre en el mundo real con los pacientes.

II.1. ESTUDIO CUASIEXPERIMENTAL

Adicionalmente, existen estudios cuasi experimentales que son aquellos donde falta alguno de los componentes de los estudios experimentales como pueden ser

los diseños antes después de una determinada intervención.

Por ejemplo en el estudio de Yamamoto y col. (2017) se utilizó un diseño cuasiexperimental antes - después [19]. El objetivo fue comparar el cambio en la IgA salival de pacientes ancianos institucionalizados antes y después del consumo de un yogurt fermentado con *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* OLL1073R-1. Existen muchos estudios con similares características, con variabilidad en el reporte del diseño del estudio. Por ejemplo, muchos los clasifican erróneamente como estudios observacionales por la falta de aleatorización.

III. POBLACIÓN

La población del estudio debe ser seleccionada apropiadamente para representar la población objetivo a la que se pretende generalizar los resultados del estudio. De esta manera las técnicas de muestreo deben asegurar que la muestra seleccionada en el estudio representa adecuadamente el comportamiento y características de la población objetivo. La validez externa del estudio depende en gran medida de los métodos para obtener la muestra de la población objetivo [13]. Por ejemplo, si interesa estudiar el efecto de un probiótico sobre el ánimo de los adultos mayores sanos, el estudio debe ser realizado con una muestra representativa de adultos mayores sanos. Si bien en ocasiones es razonable pensar que poblaciones de similares características podrían tener comportamientos similares.

La selección de la población debe respetar los principios éticos básicos de autonomía, beneficencia, no maleficencia y justicia. Los protocolos deben ser evaluados y aprobados por un comité de ética idóneo con jurisprudencia en el ámbito donde se implementara el estudio. En todos los casos los participantes deben consentir de manera informada su participación en el estudio de acuerdo con las Buenas Prácticas Clínicas y las normas regulatorias y legales locales e internacionales vigentes.

Con respecto al principio de justicia, los probióticos deberían ser estudiados en la población que se va a beneficiar de sus potenciales beneficios. Participar en un estudio de investigación clínica tiene riesgos, y los participantes se exponen a este riesgo al consentir informadamente su participación. Si deseara estudiar el efecto sobre la salud de un determinado probiótico con un estudio clínico por ejemplo, y decidiera realizar el estudio en una población de bajos recursos, podría violar el principio de justicia. ¿Tendrá la población de donde salieron los participantes del estudio acceso al producto si se demuestra que es eficaz o tiene efectos beneficiosos? ¿o solo podrán acceder quienes puedan comprarlo? Este principio asegura que la población que origina los participantes de un estudio, tenga acceso posteriormente a los potenciales beneficios derivados de los resultados de la investigación.

Desde este punto de vista, la seguridad es fundamental en las poblaciones vulnerables potencialmente en mayor riesgo de eventos adversos bajo tratamiento con probióticos. Estas poblaciones incluyen inmunocomprometidos, poblaciones

vulnerables, cáncer, pacientes adultos y niños críticamente enfermos, postoperatorios e internados, mujeres embarazadas, pacientes con defectos estructurales del corazón o con catéteres o dispositivos permanentes que pudieran potencialmente favorecer la translocación o su colonización [8,20–23]. En todos los casos debe balancearse los potenciales riesgos y beneficios de la selección de la población del estudio.

Es interesante notar que algunas poblaciones vulnerables se excluyen sistemáticamente, como las mujeres embarazadas, mujeres en edad fértil, adultos mayores, pacientes con HIV o cáncer [24]. Se debe considerar con cuidado la seguridad del uso de probióticos en estas poblaciones que potencialmente pudieran beneficiarse con su uso. En los estudios que evalúan probióticos, al igual que con otras exposiciones evaluadas en ensayos clínicos, es comun excluir sistemáticamente estas poblaciones de los estudios. Esto genera una vacancia de conocimiento ya que carecemos de información de seguridad y eficacia por la falta de estudios.

Sin embargo, en el estudio de probióticos existen muchos estudios realizados en estas poblaciones específicamente, como el estudio Arnbjerg y col. (2018) que evaluó el efecto de *Lactobacillus rhamnosus* GG sobre la inflamación intestinal, la composición de la microbiota y la translocación bacteriana en pacientes con HIV [25]. Otro ejemplo es el estudio de Hummelen y col. (2011) que evaluó el efecto del impacto de un yogurt con *L. rhamnosus* GR-1 y micronutrientes sobre la inmunidad de pacientes con HIV [26]. Asimismo hay muchos ejemplos de estudios en mujeres embarazadas [27–29] o pacientes con cáncer [30–32].

Es importante resaltar que podría haber diferencias en el efecto de probióticos relacionados con la población de estudio. Existen amplias diferencias en diferentes poblaciones sociales, culturales, étnicas, ecológicas, económicas. Asimismo las diferencias genética, epigenética, en la dieta, microbiota, cointervenciones, contexto, nivel de instrucción, ejercicio, adherencia, entre otras, podría modificar la respuesta a los probióticos.

En muchos casos interesa saber el efecto de los probióticos en población sana, como la prevención de condiciones clínicas o la optimización de condiciones fisiológicas dentro de rangos normales [33]. El estudio de los probióticos en población sana requiere una mención aparte. El uso de población sana en estudios de investigación implica una exposición que pudiera considerarse innecesaria, por ende se debe considerar la relación riesgo beneficio con cuidado. Debido a que la seguridad de muchos probióticos disponibles en el mercado en alimentos comercializados podría tener suficiente evidencia documentada, esto no es una barrera para el estudio de los potenciales beneficios nutricionales en población sana [23]. A su vez, la medicalización del estudio de los participantes voluntarios sanos puede distorsionar los resultados afectando su validez externa. Por ejemplo, los voluntarios podrían ser diferentes en aspectos relacionados con la salud o la autopercepción que la población general a la cual se pretende extrapolar los resultados del estudio. Cuando se pretende extrapolar los resultados a población general, la variabilidad de la población incluida en el estudio es una característica muy importante.

Por ejemplo, Pu y col. (2017) evaluaron el efecto de un yogurt suplementado con *Lactobacillus paracasei* N1115, sobre las infecciones respiratorias inferiores en adultos mayores [14]. Los participantes fueron voluntarios sanos mayores a 45 años de Chengdu en China. Es difícil comprender si los resultados podrían extrapolarse a población de la misma edad en Chengdu o China. La validez externa de los hallazgos podría ser más difícil de sostener en latinoamérica

IV. INTERVENCIÓN

La intervención o exposición es de vital importancia. Es fundamental basar la decisión de la intervención en el conocimiento profundo de las características del probiótico propuesto. En muchos casos se desconoce el mecanismo de acción exacto de funcionamiento del probiótico. El mecanismo de funcionamiento de los probióticos implica su interacción con la composición o actividad metabólica de la microbiota, la fermentación de fibras y producción de AGCC o por interacción directa con el sistema inmune del huésped. Es probable asimismo que el mecanismo específico sea complejo y difiere entre cepas y condiciones clínicas [33,34].

Conceptualmente las intervenciones con probióticos pueden verse como una indicación dietaria, un suplemento, una droga o comportarse como ninguna de las anteriores. Pero ¿cuál es la intervención en sí? ¿la ingesta del probiótico? ¿la colonización? ¿la interacción? ¿la modificación de la microbiota? ¿la selección de predominio en microbiota? ¿las nuevas vías metabólicas activas en el individuo? Mientras más claro esté el potencial mecanismo de acción, más fácil va a ser plantear el diseño y los mecanismos adecuados al diseño para evaluar el efecto de un probiótico, ya que no existe una única metodología estándar para todos. Asimismo es fundamental tener claro porqué se desea intervenir con un probiótico y no utilizar otras intervenciones como fármacos, modificaciones en la dieta, o los hábitos, entre otros.

Las intervenciones administradas son complejas y contienen un principio activo, excipientes y matriz que varía en sentidos diferentes a los componentes de los preparados farmacéuticos con drogas como principios activos. La identificación de la cepa se basa en el análisis de la secuencia del gen de 16S rRNA. Sin embargo existen diferencias específicas de cepa que son detectables con combinación de técnicas genéticas con fenotipos específicos son el *gold standard* de la identificación de la cepa [13]. La definición de la intervención debe incluir cepa o combinación de cepas/especies identificadas con precisión, cantidad de unidades formadoras de colonias, posología, administración, vía, forma de presentación y duración. La selección de la cepa es fundamental considerando el marco teórico de los mecanismos de acción potenciales propuestos por el grupo investigador. En el error en la selección de la cepa apropiada es uno de los errores más frecuentes que se postula para explicar la falta de efecto de muchos probióticos en estudios publicados [33].

¿Se trata de una cepa o varias? ¿Se administra como granulado o en comprimido o incorporado en un alimento? ¿Cuál es la dosis diaria? Si bien en las intervenciones farmacéuticas se deben considerar los mismos componentes, en el caso de los probióticos esto es de particular importancia ya que el preparado contiene múltiples componentes que pudieran tener actividad. Estas características específicas de la administración del probiótico se relacionan con la validez externa, la adherencia y la aceptabilidad de los individuos a consumirlo en el estudio y una vez finalizado, en el mundo real. Mientras más pragmático sea, mayor validez externa.

Es importante definir los detalles de almacenamiento y el circuito de preparación, almacenamiento, y dispensación. Estos detalles aseguran que todos los participantes del estudio reciban la misma intervención. De esta manera, un estudio diseñado para evaluar el efecto de un probiótico específico, podrá estimar su efecto de manera reproducible. La logística relacionada con el principio activo y el control es un determinante importante de la factibilidad del estudio, por lo cual es fundamental pensar y diseñar estrategias simples desde etapa muy precoces del diseño. Es necesario que el probiótico sea administrado con viabilidad y concentración apropiada al sitio fisiológico de acción [33]. La llegada viable al sitio de acción es un aspecto complejo de estudiar, que se evalúa con baja frecuencia en los estudios clínicos. Deberían incorporarse controles de calidad que aseguren que a lo largo del estudio la viabilidad del probiótico administrado se mantuvo intacta [13].

Con respecto al efecto de la intervención, va a ser de radical importancia definir si se espera efecto de la ingesta de una concentración de probiótico con una periodicidad predefinida, o si se espera efecto por otro mecanismo como podría ser el cambio en la microbiota intestinal o la colonización temporal con el probiótico del tracto gastrointestinal. Estas consideraciones son importantes ya que no es lo mismo evaluar el efecto de la ingesta del probiótico, que de la colonización del tracto gastrointestinal con un probiótico específico. La ingesta podría tener efecto inmediato, mientras que la colonización temporal podría requerir un determinado periodo de exposición a una dosis conocida. A su vez es posible evaluar si la colonización ocurrió o no. No obstante todos los estudios demuestran que una vez interrumpida la administración, los recuentos del probiótico en heces descienden paulatinamente, siendo indetectables poco tiempo después. Ningún estudio hasta el momento logró demostrar la colonización permanente con un probiótico una vez interrumpida su administración.

Una de las dificultades con ciertos productos comerciales de probióticos es la variabilidad en la cantidad y estandarización de los mismos, discrepancias entre las cantidades de unidades formadoras de colonias declaradas en el rotulado y las que realmente contienen, presencia de contaminantes, etc. Es importante considerar este aspecto y verificar la concordancia entre las etiquetas y los contenidos antes de iniciar el estudio si se planea utilizar un producto comercializado. Estas dificultades podrían afectar los resultados y la interpretación de los hallazgos [13,35,36].

V. COMPARADOR

Para estimar el efecto de un probiótico es necesario tener un comparador apropiado. El efecto placebo hace que basalmente los individuos puedan experimentar efectos relacionados con la toma de un producto de investigación que pudieran no tener relación con el principio activo bajo estudio. El efecto placebo se atribuye a la sugestión en la creencia de que el tratamiento recibido es eficaz [37,38]. Usualmente es un efecto positivo y se relaciona con recibir el tratamiento y no con el principio activo o sus componentes.

¿Cómo elegir el comparador apropiado? ¿qué es un control apropiado? el control apropiado debiera tener todos los componentes y características con excepción del principio activo. En este caso el principio activo es el probiótico. Por lo tanto el comparador debiera tener los mismos componentes nutricionales y estructurales que los participantes expuestos. En ocasiones se plantea que el comparador apropiado debiera incluir los mismos microorganismos que el principio activo, pero inactivos. Esta última forma de comparador no es universalmente aceptada.

Si los componentes son diferentes, por ejemplo el valor nutricional o la presencia de micronutrientes o de microorganismos adicionales son diferentes, ¿cómo saber si el efecto observado es causado por el probiótico o por las diferencias adicionales entre los preparados considerados como principio activo y comparador? ¿Cómo saber que no estamos ante un efecto relacionado con las propiedades nutricionales y no con un efecto directo del probiótico? Asimismo si no observamos una diferencia entre ambos grupos, ¿verdaderamente no existe una diferencia o el efecto se debe a algún componente del preparado que es diferente del probiótico en estudio? como la matriz o los fermentos que acompañan al producto.

En muchos casos es necesario comparar con un comparador activo. En muchos estudios puede no ser posible el uso de placebo debido a que exista un tratamiento o recomendación con alto grado de evidencia disponible. En este caso es posible que el comparador apropiado sea la mejor recomendación disponible para el tratamiento de la patología bajo estudio. En este caso se debe evaluar si ambos grupos recibirán la mejor recomendación disponible y uno de ellos recibirá adicionalmente el probiótico, o si se comparará el uso del probiótico versus el mejor tratamiento disponible. Esta última opción requerirá la definición *a priori* de si se trata de un estudio de superioridad o de no inferioridad.

No es posible estimar una medida de efecto sin un control apropiado. Es decir, que para obtener una medida del efecto del probiótico bajo estudio como un riesgo relativo o un *odds ratio* es necesario contar con información de individuos expuestos al probiótico de interés y de individuos no expuestos al probiótico bajo estudio. No hay forma de conocer si el probiótico tiene efecto beneficioso y seguridad sin un comparador. En algunos casos es posible observar los mismos individuos expuestos y no expuestos en momentos diferentes. Este diseño no resuelve el problema de que composición debe tener el control al que voy a exponer a los individuos durante la

fase del estudio que observamos su comportamiento sin la exposición al probiótico.

En algunas situaciones, es posible comparar el propio individuo con respecto a su condición basal. En este caso, se puede simplificar el estudio. Sin embargo podría estar afectado de efecto placebo y Hawthorne. Este último es el cambio en el comportamiento en los participantes que se saben observados [39]. Este efecto está presente en todos los estudios que involucren sujetos de investigación de manera prospectiva. Ambos efectos podrían hacer en apariencia observar un efecto cuando en realidad no existe. Asimismo, el fenómeno de regresión a la media podría afectar los resultados, sin un comparador apropiado para reducir su efecto.

En ocasiones cuando no es posible definir un comparador perfecto, es posible pensar en más de un comparador. Este aumento de complejidad en el estudio afecta la factibilidad y la interpretación de los resultados, por lo tanto es muy importante hacer el intento de mantener el estudio simple con un único comparador. La decisión de incorporar un comparador adicional puede deberse a que el comparador seleccionado comparte elementos con el preparado que contiene el principio activo, y tenemos razones para creer que el comparador podría tener un efecto y ser eficaz aun en ausencia del probiótico bajo estudio.

VI. EVENTOS DE INTERÉS

El evento de interés representa el efecto que se deseaba obtener con la incorporación del probiótico bajo estudio. Incorpora los efectos sobre la eficacia o eficiencia y la seguridad. Las mediciones deberían ser objetivas, factibles, sensibles y representar un beneficio de importancia para la salud [13].

Es importante tener en cuenta que el tiempo de latencia o de exposición que se necesita para producir un efecto en particular. Es decir, es necesario considerar el tiempo que es necesario que transcurra desde el inicio de la exposición hasta la medición del resultado. Los eventos reportados por pacientes podrían responder más rápido. Los eventos de interés que dependen de un cambio en la microbiota intestinal o el sistema inmune asociado al intestino podrían tener periodos de latencia más largos.

Los eventos de interés pueden ser duros o más subjetivos. Se llaman eventos duros a los eventos más objetivos como el fallecimiento o los niveles plasmáticos de lípidos. En general entran dentro de esta categoría los biomarcadores, los parámetros antropométricos, los diagnósticos y eventos objetivos. Los eventos de laboratorio sirven para la comprensión de los fenómenos fisiológicos o para la detección de efectos de seguridad que pudieran pasar inadvertidos [13]. Algunos ejemplos pueden ser los niveles de hemoglobina en pacientes en diálisis [40], microbiota intestinal, síndrome metabólico [41], mediadores inflamatorios [42], infecciones respiratorias agudas [43], mortalidad y morbilidad [44], entre otros.

Los efectos de los probióticos sobre reporte de pacientes como los síntomas, deberían objetivarse con instrumentos de medición validados para la población del

estudio. Estos eventos son más susceptibles de sesgos de información y pueden variar en su complejidad. Toda herramienta a ser utilizada en el estudio debe tener evidencia de validez y reproducibilidad para su uso en la población del estudio [45]. Por ejemplo en el estudio de Östlund-Lagerström (2016) se utilizaron varios eventos reportados por pacientes como la escala de síntomas gastrointestinales (en inglés, *Gastrointestinal symptoms rating scale - GSRS*), la escala de ansiedad y depresión hospitalaria (en inglés, *Hospital anxiety and depression scale - HADS*), escalas para calidad de vida (EQ-5D index y EQ-VAS), escala de estrés percibido (en inglés, *Perceived stress scale - PSS*) y la frecuencia diaria de deposiciones [46].

Es fundamental definir si el efecto deseado es mantener el estado de salud o tratar una condición clínica. Los efectos deseados pueden ser especie, dosis, tiempo o condición específicos. Algunos efectos nutricionales pueden ser inmediatos y otros requerir periodos de latencia mayores. Los efectos preventivos pueden ser cortos o requerir periodos prolongados dependiente de la frecuencia de los eventos que se desea prevenir. La baja frecuencia de los eventos preventivos podría llevar a estimaciones de tamaño muestral más grandes.

Por ejemplo en el metaanálisis realizado por Deshpande y col. (2017) para evaluar el efecto de los probióticos sobre la mortalidad sepsis y enterocolitis necrotizante en neonatos de países de bajo y mediano ingreso [44]. En muchos de los estudios incluidos en este metaanálisis, la exposición al probiótico fue tan corta como 14 días o hasta el alta. Es notable la variabilidad en la descripción incompleta de la exposición entre los diferentes estudios, siendo no identificable la cantidad de días de exposición en gran parte de los artículos. En el estudio de Palma y col. (2018) se evaluó el efecto del tratamiento por hasta 6 meses de *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 vaginal sobre el aclaramiento de la infección por HPV [47]. Como en muchas exposiciones, estudios más prolongados en su exposición son poco comunes.

En muchos casos los eventos de mayor interés o eventos clínicos no pueden ser medidos por su baja frecuencia o por el largo periodo de latencia. En estos casos es útil definir eventos intermedios o subrogados. Estas variables son variables intermedias en el camino causal a los eventos finales de interés o marcadores relacionados con los eventos finales de interés [38]. Las características que deben cumplir las variables surrogadas son: 1. tener un alto valor predictivo sobre el evento clínico de interés, 2. debe comprenderse el mecanismo causal entre la variable subrogada y el evento clínico de interés y 3. deben existir herramientas validadas para su medición [13]. La utilización de variables subrogadas puede acercar la factibilidad de un estudio, ya que puede requerir tamaños muestrales más chicos o periodos de seguimiento más cortos. Asimismo, el uso de variables subrogadas en muchos casos disminuye la relevancia o la validez externa del estudio.

VII. SEGUIMIENTO

El seguimiento debe asegurar la evaluación de los eventos de eficacia/eficiencia de interés y los eventos de seguridad. El esquema de seguimiento planeado puede incluir visitas regladas periódicas o parecerse más al seguimiento habitual de los participantes del estudio con un esquema de seguimiento más laxo. Se debe decidir el esquema apropiado en el contexto de la seguridad del probiótico en estudio, la población incluida y los recursos disponibles.

La determinación del periodo de seguimiento óptimo depende de la pregunta de investigación, del mínimo tiempo de latencia necesario para observar un efecto relacionado con el probiótico, y de los recursos disponibles. El conocimiento del potencial mecanismo de acción y de la fisiopatología de la condición subyacente son fundamentales en la definición del tiempo del seguimiento. Por ejemplo eventos como diarrea pueden requerir periodos de seguimiento cortos. Eventos específicos como cambios en la composición corporal o fallecimiento pueden requerir periodos de seguimiento mucho más prolongados [13].

Ahmadi y col. (2017) estudiaron en un ensayo clínico el efecto de una cápsula con una combinación de probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum*) versus placebo en la pérdida de peso, control de la glucemia en mujeres con ovario poliquístico [48]. En este caso el periodo de seguimiento fue de 12 semanas. En el estudio de Dinleyici y col. (2014) utilizaron sólo 5 días de exposición a *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 para evaluar el efecto de esta cepa sobre la duración de la diarrea y la hospitalización en niños con gastroenteritis aguda [49].

Debido a que el periodo de seguimiento es un componente importante de la factibilidad y de los costos de los estudios, es habitual que sea lo más corto posible. Sin embargo, es razonable pensar en prolongar el estudio lo suficiente como para lograr la persistencia del probiótico *in vivo*, típicamente 4 semanas [13]. En el mundo real, los probióticos pueden ser consumidos por largos periodos de tiempo, por lo cual es necesario realizar mayor cantidad de estudios con seguimientos más prolongados para comprender el efecto del consumo crónico sobre los individuos. El consumo crónico es más parecido al uso potencial en la realidad que los consumos cortos para muchas condiciones.

VIII. SEGURIDAD

En todo estudio de intervención, es fundamental considerar como resultado la seguridad de la intervención propuesta. El probiótico bajo estudio debe tener suficiente evidencia acumulada previa al inicio del estudio de su seguridad para el consumo en humanos en las dosis y posología a utilizarse en el estudio. La seguridad podría variar entre diferentes poblaciones como niños, embarazadas, ancianos o inmunodeprimidos.

Las cepas que caen bajo la definición de probiótico, deben ser seguras por definición. Hay estándares definidos para la seguridad de los probióticos para consumo en humanos que consideran el en líneas generales se considera la unidad taxonómica, el conocimiento previo, la posible patogenicidad y la descripción del potencial uso final. Un ejemplo es la definición GRAS (Generally Recognized As Safe) la agencia Administración de Alimentos y Medicamentos de EEUU (FDA). Se clasifican como GRAS las sustancias generalmente reconocidas como seguras para su uso en alimentos de consumo humano de acuerdo a la presencia de evidencia de su seguridad según estándares de evaluación específicos [50]. Algunos de los conceptos considerados sobre la seguridad de un probiótico incluyen la descripción completa del genoma, metabolómica, la resistencia a antibióticos y la capacidad de transferencia de resistencia, su capacidad de traslocar en animales, producción de toxinas, presencia de marcadores de virulencia o potencial patogenicidad o potencial toxicidad, estabilidad genética y posibilidad de transferencia de material genético, producción de ácido D-láctico, producción de aminos biógenas [20,51,52].

Asimismo todo estudio de eficacia o efectividad debe tener como objetivos adicionales evaluar la seguridad de la intervención comparada con el comparador del estudio. De esta manera todos los estudios son de eficacia/efectividad y seguridad simultáneamente. Si bien antes de utilizar un probiótico para consumo humano es necesario tener suficiente evidencia de su seguridad, durante el desarrollo del estudio podrían detectarse eventos adversos relacionados con su consumo o efectos indeseables relacionados con la exposición al probiótico. Puede incluir variables de eventos clínicos, de laboratorio, reportadas por pacientes o subrogadas. Esta información debe planificarse durante el diseño, debe recolectarse durante la implementación del estudio de manera sistemática, estandarizada y frecuente. El monitoreo de la seguridad durante el estudio es fundamental, como así también los mecanismos preespecificados para eventuales análisis interino y eventual suspensión precoz del protocolo.

Muchas de los eventos de seguridad incluyen reacciones adversas y eventos secundarios [8]. Pueden desarrollarse en cualquier momento del seguimiento del estudio. En cada caso será necesario evaluar la severidad y la relación con la exposición. Algunos de los eventos de seguridad podrían incluir infecciones sistémicas, efectos metabólicos deletéreos, exceso de actividad inmune en individuos susceptibles, transferencia de genes o efectos secundarios gastrointestinales [51]. Algunos de los efectos secundarios más frecuentes de los probióticos son constipación, flatulencias, hipo, náuseas, infección y erupciones en la piel [21].

No se debe olvidar que la seguridad y eficacia de una determinada cepa o combinación de probióticos es específica del preparado en una determinada población. Es decir, puede variar su seguridad de acuerdo a la cepa estudiada, la concentración o el huésped. Las principales eventos de seguridad son la habilidad de translocación, la presencia de elementos de resistencia antibiótica, y la habilidad para causar infección, bacteriemia o fungemia [8,53]. Por ejemplo, diversos estudios muestran

efectos negativos del uso de *L. rhamnosus* en pacientes inmunosuprimidos como fiebre inflamación sistémica y sepsis [53]. En todos los casos se debe verificar el perfil de seguridad de la intervención propuesta, y planear la evaluación de la seguridad y las mediciones adecuadas a realizar durante la conducción del estudio. Por ejemplo la evaluación del perfil de seguridad de *Lactobacillus kefir* se presenta en diversas publicaciones [54].

Si bien en general el perfil de tolerancia y seguridad es bueno, debe ser evaluado siempre, particularmente en individuos severamente comprometidos o inmunosuprimidos. Por ejemplo, en el estudio de Besselink y col. (2008) se estudió el efecto de una preparación de probiótico multiespecie versus placebo en pacientes con pancreatitis aguda severa [55]. El probiótico se asoció a una mortalidad de más del doble comparado con placebo, por lo cual está contraindicado en esta población.

El uso de ensayos clínicos para la evaluación de la seguridad de probióticos son fundamentales debido a que no existe en general modelos animales adecuados. En estos diseños es importante incorporar más de una dosis del probiótico [13]. Muchos estudios diseñados para evaluar la seguridad de los probióticos podrían no tener una estimación de tamaño muestral apropiado considerando este objetivo. Por ejemplo el estudio de Hibberd y col. (2014) es un estudio de fase 1 de evaluación de seguridad del consumo de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 en los ancianos [56]. Se incluyeron 15 ancianos voluntarios sanos. Si bien la descripción de la estimación del tamaño muestral es apropiada, parece más relacionada con los requerimientos regulatorios.

IX. ASIGNACIÓN AL AZAR DE TRATAMIENTO

En los ensayos clínicos la exposición bajo estudio es administrada por el investigador. Esta única posibilidad exclusiva de este tipo de diseños permite usar la aleatorización como herramienta para decidir quien recibe la exposición. Es decir, si mi pregunta fuera ¿es un determinado probiótico A mas eficaz que la dieta habitual B en el tratamiento de la hipertensión crónica en adultos? Al signar al azar los participantes del estudio a recibir la probiótico A o la dieta habitual como control B, se eliminan las diferencias entre ambos grupos.

Solo es posible aleatorizar exposiciones administrables y cuando existe equipoise. Equipoise quiere decir que no se conoce que ninguna de las ramas del estudio sea más eficaz o más segura antes de iniciar el estudio [57]. Es decir, no hay evidencia comprobada y consistente a priori de eficacia y seguridad entre las ramas del estudio.

En el mundo real, múltiples factores intervienen en la decisión de consumir un probiótico y su periodicidad o posología. Se trata de un decisión activa que toma cada individuo, pudiendo participar su entorno, su familia, profesionales de la salud en un contexto específico [58]. Esta decisión está influenciada por múltiples factores tan diversos como la historia previa del individuo, su estado nutricional, sus creencias,

su nivel de instrucción y su nivel socioeconómico, su tolerancia al consumo de ciertos alimentos, su entorno y su contexto, entre otros. Esto hace que en el mundo real, los individuos que consumen probióticos con regularidad, podrían ser diferentes a los que consumen una dieta habitual sin probióticos. Por esta razón probablemente ambos grupos no serían comparables por las diferencias en sus factores de riesgo conocidos y desconocidos. Este problema es una constante de los estudios observacionales. Este fenómeno se llama confusión por indicación. La asignación aleatoria a probiótico A o dieta habitual B elimina el sesgo de confusión por indicación, ya que nadie elige quién consumirá el probiótico A o quien recibirá dieta habitual B, sino que se asigna a un grupo u otro aleatoriamente.

Que ambos grupos sean similares en todas sus características con excepción de la exposición a A o B, podría enunciarse como que son intercambiables. La intercambiabilidad es una propiedad de la causalidad que se asegura máximamente cuando es posible aleatorizar la exposición y da fortaleza a la recomendación con alto grado de evidencia causal [59].

Si la aleatorización funciona, los dos grupos resultantes serán idénticos en todas sus características con excepción de que unos fueron expuestos al probiótico A y otros a la dieta habitual B. La aleatorización es una estrategia para tratar confundidores que tiene el potencial de eliminar el efecto de los confundidores conocidos, los desconocidos e incluso los no medibles al momento de la aleatorización. Solo funciona cuando el tamaño muestral es lo suficientemente grande.

La aleatorización a su vez aumenta mucho la complejidad del estudio. Decidir al azar quién de los participantes de un estudio será asignado a cada rama de exposición requiere una logística más compleja que en los estudios observacionales. Adicionalmente el proceso de consentimiento informado es más complejo cuando existe aleatorización y puede afectar la decisión de participar, dificultando el reclutamiento para el estudio. La aleatorización habitualmente requiere otros componentes como el enmascaramiento para ser máximamente efectiva y evitar sesgos.

Por ejemplo Spaiser y col. (2015) realizaron un ensayo clínico aleatorio cruzado. En este estudio evaluaron si el consumo de una mezcla de probióticos (*Lactobacillus gasseri* KS-13, *Bifidobacterium bifidum* G9-1, *Bifidobacterium longum* MM2) aumenta los linfocitos CD4+ circulantes, altera la producción de citokinas y genera cambios en la microbiota intestinal hacia una microbiota intestinal más saludable en adultos mayores [60]. En este estudio aleatorizaron los participantes a recibir la mezcla de probiótico primero y el placebo después o al revés. La misma mezcla de probióticos se utilizó en el ensayo clínico de ramas paralelas de Dennis-Wall y col. (2017) [61]. En este caso se asignó al azar a los participantes a recibir la mezcla de probióticos o placebo durante 8 semanas.

X. CIEGO

Los participantes que se saben tomando un placebo reportan menos efectos adversos aunque los sientan. Los participantes que se saben tomando un principio activo podría reportar más efectos adversos. Los participantes que se saben tomando un principio activo que creen que es mejor reportan mucha más eficacia y bienestar que los participantes que toman una medicación que creen que es inferior. Esto representa un sesgo de información ya que los participantes reportan sistemáticamente diferente de acuerdo a en qué rama del estudio se encuentran. En ausencia de ciego, es posible que se desarrollen sesgos de información en el reporte de tolerancia, efectos adversos y beneficiosos de los probióticos debido a diferencias en la percepción de los pacientes y de los investigadores [62,63]. Este fenómeno puede afectar en mayor medida las mediciones más subjetivas y en menor medida las más objetivas y validadas. A su vez, los investigadores podrían preguntar diferente o seguir diferente o solicitar diferentes estudios o indicar medicación adicional a sus pacientes si saben la rama del estudio en la cual está un determinado participante.

Los estudios donde se conoce la rama de asignación de cada participante de manera manifiesta se llaman abiertos. En los estudios de probióticos con diferentes ramas de intervención, es fundamental implementar ciego o enmascaramientos de las intervenciones. El enmascaramiento ideal incluye mantener ciego al participante del estudio, al médico o investigador que administra el probiótico y a quien analiza los datos del estudio. Todos los actores podrían potencialmente estar afectados por su subjetividad, por lo cual se recomienda cegar siempre que sea técnica y éticamente posible. Es posible utilizar el ciego incluso en estudios observacionales donde pudieran existir sesgos de información relacionados con la subjetividad.

La falta de ciego puede generar pérdidas al seguimiento de participantes que pueden afectar de manera diferencial las ramas del estudio. A su vez, pueden surgir diferencias relacionadas con los estudios abiertos que impliquen cointervenciones, cambios en la dieta, medicaciones, métodos diagnósticos diferentes entre ramas que pudieran influenciar los resultados de eficacia y seguridad del estudio de manera espuria. La forma más eficiente de prevenir estos potenciales sesgos es mantener el enmascaramiento durante el estudio.

Los estudios no ciegos o abiertos se parecen más a la práctica clínica real, pero son mucho más susceptibles de sesgos de información por reporte diferencial de los pacientes o por recuperación de la información diferencial. A su vez son problemas frecuentes el uso diferencial de estudios de test diagnósticos o las cointervenciones de acuerdo a conocer en qué rama del estudio está un paciente.

Una desventaja del ciego es que aumenta la complejidad del estudio. Requiere el desarrollo de mecanismos para asegurar el ciego y mantenerlo durante todo el estudio. Mantener el ciego implica que tanto el principio activo como el comparador sean indistinguibles en todas sus características como sabor, textura, color, olor, estabilidad, entre otros. Así también requiere mecanismos de ruptura de ciego ante

eventuales necesidades clínicas. Por ejemplo si un paciente en un estudio consulta a la guardia con un dolor precordial, puede ser fundamental tener disponible un mecanismo para que los médicos que lo asistan tengan la posibilidad de conocer en qué rama del estudio está, para tomar acciones en el cuidado de emergencia del paciente. En el estudio de Östlund-Lagerström y col. (2016) se presenta una descripción clara de cómo se hizo para mantener el ciego con la preparación del principio activo (*L. reuteri* DSM 17938) y el placebo [46].

En el estudio de Slykerman y col. (2017) las participantes y sus médicos fueron ciegos a la rama de intervención [11]. Se evaluó el efecto del consumo de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 versus placebo en la depresión y ansiedad en los primeros 6 meses postparto. Debido a la naturaleza del efecto bajo estudio, mantener ciega la rama de exposición es fundamental.

El ciego es muy frecuente en los estudios experimentales de probióticos, pero no siempre es posible. Por ejemplo en el estudio de Vandenplas y col. (2017) la intervención era abierta y no podría enmascarse [64]. En este estudio se asignó aleatoriamente a APT198K (xyloglucano más *Lactobacillus reuteri* SGL01 y *Bifidobacterium brevis* SGB01) o lactasa para el tratamiento de cólicos en lactantes. En este caso la posología y forma de administración diferente imposibilitaba el ciego. La observación del comportamiento de los lactantes por parte de los padres es una medida subjetiva que pudo influenciar los resultados del estudio.

Por ejemplo en el estudio de Lawrence y col. (2017) los autores no utilizaron enmascaramiento de los eventos de interés, asimismo tampoco utilizaron grupo control [65]. Este artículo fue retirado de la prensa por el grupo editor debido a problemas con su diseño, análisis y reporte [66]. Los eventos cognitivos evaluados por los autores son subjetivos y muy sensibles de sesgos de información por lo cual el ciego es fundamental.

En la primera parte del estudio de Dietrich y col. (2014) estudiaron el consumo de *Lactobacillus casei* DN-114001 en pacientes con diarrea por antibióticos [67]. Se ofreció el probiótico a todos los pacientes de un centro y ninguno de los otros dos centros de control. Se estudió el efecto sobre la diarrea a través de la revisión de la historia clínica electrónica. Cegar las ramas de exposición al investigador recolector de datos pudo haber mejorado la calidad de la información subjetiva, aunque no así la objetiva como los días de internación.

XI. ADHERENCIA

Adherencia es un concepto amplio que incluye la toma de los preparados del estudio en tiempo y forma, sin saltar dosis ni modificar los esquemas indicados de manera sustancial [13]. También implica la adherencia a los controles o procedimientos del estudio adicionales. La adherencia es un problema habitual que varía con la complejidad de la intervención, la tolerancia, la motivación y el tiempo de exposición

propuesto. La adherencia de los ensayos clínicos puede variar entre 40 y 80% de acuerdo a las estrategias implementadas para maximizarla.

En el mundo real los pacientes no son totalmente adherentes o totalmente no adherentes, sino que se comporta como un gradiente de adherencia a los procedimientos y tratamientos prescriptos. La falta de adherencia a la rama asignada, hace más homogéneas ambas ramas de intervención. Al ser más homogéneas, disminuye el efecto del principio activo, y es posible que el estudio no sea capaz de detectar un efecto que existe.

La adherencia puede afectar de manera diferencial a las ramas del estudio. Por ejemplo, es posible que los pacientes que se saben tomando el principio activo del estudio tiendan a adherir más a la indicación que los que se saben tomando el comparador. Esta adherencia diferencial entre ramas, potencialmente podría sesgar los resultados del estudio. Durante la conducción del estudio es fundamental medir la adherencia de la misma manera en las diferentes ramas del estudio [13].

Algunas técnicas desarrolladas para evaluar la adherencia son la toma supervisada, el recuento de preparados del estudio, los diarios de toma de preparados del estudio, los monitores electrónicos de toma del preparado del estudio, autoreporte de adherencia por cuestionario directo con herramientas validadas, la detección del principio activo en la materia fecal [13]. Este último implica sobrevida del probiótico como subrogado, pero no implica actividad ni beneficio. Todas las estrategias propuestas tienen sus ventajas y desventajas y deben ser evaluadas en el contexto del diseño del estudio.

La medida más eficiente para intentar minimizar el problema de la adherencia es prevenir la falta de adherencia de los participantes. Por ejemplo, en el estudio de Tamtaji y col. (2017) se evaluó la adherencia contando la devolución de medicación por parte del paciente [42]. Se trata de un ensayo clínico aleatorio donde se administró una combinación de probióticos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum*, y *Lactobacillus fermentum*) versus placebo para evaluar su efecto sobre la inflamación, insulina y perfil lipídico de los pacientes con esclerosis múltiple. Asimismo se utilizó un mecanismo preventivo con un recordatorio diario al celular para que los pacientes tomaran el preparado del estudio. Estas medidas son eficientes, pero suelen disminuir la validez externa, ya que en el mundo real, los pacientes son menos constantes con sus tratamientos.

Una práctica relativamente común en los ensayos clínicos experimentales, es incorporar un periodo previo al estudio donde a través de proveer un placebo a todos los potenciales participantes, se seleccionan los que son adherentes a las recomendaciones del estudio. Es de radical importancia notar que este periodo previo, hace que se seleccionen los participantes adherentes, pero potencialmente podría pasar que los adherentes son diferentes de los no adherentes. Este tipo de medidas van a mejorar la adherencia, incrementando la validez interna del estudio a expensas de la validez externa. Este fenómeno se debe a que en el mundo real, los pacientes no son adherentes complementemente a las indicaciones.

Por ejemplo en el estudio de Pedersen y col. (2014) se presenta de manera muy clara los pacientes perdidos durante el seguimiento del estudio. Sin embargo no incluyen información sobre la adherencia a las intervenciones del estudio [68].

En el estudio de Östlund-Lagerström y col. (2016) se evaluó en un ensayo clínico aleatorio el efecto de *L. reuteri* DSM 17938 versus placebo sobre la autopercepción de la digestión y el bienestar de adultos mayores [46]. En este estudio evaluaron la adherencia auto reportada de los pacientes por medio de un diario. Con esta información, clasificaron los pacientes según su adherencia. Adicionalmente presentaron la información correspondiente en los resultados junto con las pérdidas al seguimiento. Es fundamental contar con información de adherencia a las intervenciones, en particular en los estudios con resultados negativos.

En el estudio de Eggers y col. (2018) se evaluó el efecto de *L. rhamnosus* HN001 sobre la colonización de *S. aureus* en múltiples partes del cuerpo [69]. En este estudio presentan la tasa de pérdida y la comparan entre ramas, la tasa de adherencia y la comparan entre ramas. La confirmación de la exposición en este estudio se realizó por ausencia del probiótico basal en materia fecal de todos los participantes, y la presencia del probiótico en materia fecal del 51,9% de los expuestos a la 4ª semana y 1,6% de los no expuestos. La confirmación de la presencia del probiótico en materia fecal es un método adicional que puede ser útil para asegurar adherencia.

XII. ESTIMACIÓN DE TAMAÑO MUESTRAL

Siempre es necesario realizar una estimación de tamaño muestral en la fase de diseño de cualquier estudio de investigación. Se entiende por estimación de tamaño muestral al cálculo de un número estimado de participantes o unidades de observación que debo incluir en un estudio para contestar de manera eficiente mi pregunta de investigación. El tamaño muestral estimado de un estudio es un factor determinante de la factibilidad, costos y tiempo de implementación del estudio entre otros.

Existen muchas situaciones diferentes con diverso grado de complejidad para la estimación del tamaño muestral que se describen con mayor extensión en la literatura. A los fines de este apartado vamos a considerar la situación más simple. Para realizar una estimación de tamaño muestral se necesitan los siguientes componentes:

1. Conocer con claridad la pregunta de investigación/hipótesis de mi estudio y el diseño
2. Aproximar el parámetro poblacional a estimar de cada una de las poblaciones
3. Medida de variabilidad del parámetro poblacional a estimar de cada una de las poblaciones

4. Magnitud del efecto
5. Nivel de error alfa aceptable
6. Nivel de error beta aceptable
7. ¿1 o 2 colas?

La magnitud del efecto representa la relevancia clínica del efecto. ¿Cuánto espero que mejore un parámetro nutricional con la incorporación del probiótico a la dieta? ¿Cuánto debería mejorar para considerar que el probiótico es eficaz? Para la magnitud del efecto clínica es fundamental la mirada y experiencia de los investigadores vinculados con el ámbito del problema, que ven pacientes y se encuentran familiarizados con los efectos de diferentes tratamientos alternativos.

Es común que el nivel de error alfa y beta aceptables y la cantidad de colas del estudio sean prácticamente fijos y aceptados por convención. El nivel de error alfa aceptable se considera 5% casi de manera universal. El error alfa es la probabilidad de rechazar la hipótesis nula de un estudio cuando en realidad es verdadera. Es decir, encontrar una asociación en un estudio entre la exposición y el evento de interés, cuando en realidad no existe. En este caso estaríamos afirmando que una determinada exposición sirve para un efecto cuando en realidad no sirve. A su vez el error beta habitualmente se considera aceptable 20%. El error beta es la probabilidad de detectar con un estudio una diferencia que existe en la realidad. Es decir, si la diferencia entre los que reciben placebo y los que reciben un probiótico existe, ¿cuál es la probabilidad de detectarla con un estudio de un determinado tamaño muestral?. La cantidad de colas del test de hipótesis depende de lo que el investigador opina a priori sobre la pregunta de investigación. Si el investigador cree que la intervención bajo estudio es mejor o peor que el grupo control, usará test a una cola. De lo contrario usará test a dos colas [70]

La modificación de cada uno de estos valores modifica el tamaño muestral requerido al igual que en la preguntas descriptivas. Debido a que este cálculo se realiza a priori, es fundamental que la información que utilice sea lo más parecida posible a la real. Esto asegura una estimación de tamaño muestral exitosa. A mayor variabilidad, se requerirán tamaños muestrales más grandes. A menor magnitud del efecto, se requieren tamaños muestrales más grandes. A menor error alfa o menor error beta, se requieren tamaños muestrales mayores. Por último, los test a dos colas requieren tamaños muestrales mayores que los tests a una cola.

La magnitud del efecto considerada en la estimación de tamaño muestral se debe definir por la relevancia clínica. Uno de los problemas asociado a la magnitud del efecto, puede ser que la magnitud del efecto esperada sea muy pequeña. Esto podría resultar en tamaños muestrales muy grandes. A mayor magnitud del efecto, menores son los tamaños muestrales requeridos, y por ende, el estudio es más factible y

menos costoso. Asimismo, elegir una magnitud del efecto falsamente grande para la estimación del tamaño muestral, solo generara un estudio que indefectiblemente no tendrá poder para detectar una magnitud del efecto del tamaño real. En esta situación, es importante repensar cuál es el evento de interés más relevante que interesa detectar.

Es muy importante hacer todos los esfuerzos posibles para obtener la información requerida antes de empezar. Sin embargo, es común que falte información previa para la realización de una estimación de tamaño muestral apropiada. Mientras más original es la pregunta, más información puede faltar al respecto. Es común la ausencia del desvío estándar o de los estimadores. En ocasiones por publicaciones incompletas previas. Ante la ausencia de información para la estimación del tamaño muestral, probablemente la mejor idea sea plantear un estudio piloto. Adicionalmente, es posible realizar la estimación del tamaño muestral con la información disponible y plantear recalcular con datos reales incluidos un pequeño número de pacientes.

Si la estimación de tamaño muestral es muy grande, puede ser un impedimento para la realización del estudio ya que es uno de los componentes principales de la factibilidad. Existen diferentes estrategias que pueden ser útiles en esta situación, como por ejemplo ampliar o cambiar la población, seleccionar medidas de resultado diferentes que contengan mayor cantidad de información (como las medidas continuas) o realizar un estudio multicéntrico [71].

Es fundamental considerar en la estimación de tamaño muestral factores de corrección por eventuales pérdidas al seguimiento y falta de adherencia. En ambos casos, el tamaño muestral efectivo final del estudio va a ser menor que el estimado, y existe la posibilidad que el estudio no tenga poder suficiente para detectar la magnitud del efecto de un determinado probiótico finalizado el estudio [13].

Un aspecto interesante del tamaño muestral es que en muchas ocasiones la estimación de tamaño muestral no se aclara con detalle suficiente como para su reproducción en ocasiones en la literatura. Este es un aspecto fundamental para la transparencia y claridad del reporte de cualquier estudio de investigación [72]. Asimismo, con frecuencia el cálculo del tamaño muestral revela una cantidad de participantes accesible, en lugar de tamaños muestrales excesivamente grandes.

XIII. CONCLUSIÓN

En este capítulo presentamos y discutimos algunos de los aspectos fundamentales de los estudios de investigación en probióticos. Es fundamental remarcar que para sostener los beneficios de los probióticos, es fundamental generar información válida robusta que sostenga estos beneficios [23].

Las revisiones sistemáticas y meta-análisis revelan gran heterogeneidad en los métodos para evaluar los potenciales beneficios y seguridad de los probióticos. Las variaciones entre las cepas estudiadas, presentaciones, posología, duración, efectos,

seguridad, métodos y poblaciones hacen que en ocasiones sean dificultoso generar recomendaciones concluyentes. Definir estándares de evaluación sistemática del efecto de los probióticos podría tener impacto en la calidad de los estudios, y de la información generada.

El estudio de los probióticos en latinoamérica es un campo que requiere desarrollo para la generación de información local con validez interna a las poblaciones latinoamericanas. Los métodos específicos del estudio de los probióticos representan pequeñas variaciones de los métodos epidemiológicos tradicionales, sin grandes variaciones. En este capítulo remarcamos las diferencias y proveemos casos específicos que pueden servir como ejemplos válidos para construcción de proyectos de investigación sólidos.

XIV. BIBLIOGRAFÍA CITADA

[1] Ohashi Y, Nakai S, Tsukamoto T, Masumori N, Akaza H, Miyanaga N, et al. Habitual intake of lactic acid bacteria and risk reduction of bladder cancer. *Urol Int*. 2002;68: 273–280.

[2] Bradford Hill criteria - Wikipedia [Internet]. [cited 13 Dec 2017]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Bradford_Hill_criteria

[3] Hill AB. THE ENVIRONMENT AND DISEASE: ASSOCIATION OR CAUSATION? *Proc R Soc Med*. 1965;58: 295–300.

[4] Nordqvist M, Jacobsson B, Brantsæter A-L, Myhre R, Nilsson S, Sengpiel V. Timing of probiotic milk consumption during pregnancy and effects on the incidence of preeclampsia and preterm delivery: a prospective observational cohort study in Norway. *BMJ Open*. 2018;8: e018021.

[5] Rodríguez-Campello A, Jiménez-Conde J, Ois Á, Cuadrado-Godia E, Giralte-Steinhauer E, Schroeder H, et al. Dietary habits in patients with ischemic stroke: a case-control study. *PLoS One*. 2014;9: e114716.

[6] Lu Q, Cheng S, Zhou M, Yu J. Risk Factors for Necrotizing Enterocolitis in Neonates: A Retrospective Case-Control Study. *Pediatrics & Neonatology*. 2017;58: 165–170.

[7] Drew M, Vlahovich N, Hughes D, Appaneal R, Burke LM, Lundy B, et al. Prevalence of illness, poor mental health and sleep quality and low energy availability prior to the 2016 Summer Olympic Games. *Br J Sports Med*. 2018;52: 47–53.

[8] Didari T, Solki S, Mozaffari S, Nikfar S, Abdollahi M. A systematic review of the safety of probiotics. *Expert Opin Drug Saf*. 2014;13: 227–239.

- [9] Ryan JJ, Hanes DA, Schafer MB, Mikolai J, Zwickey H. Effect of the Probiotic *Saccharomyces boulardii* on Cholesterol and Lipoprotein Particles in Hypercholesterolemic Adults: A Single-Arm, Open-Label Pilot Study. *J Altern Complement Med*. 2015;21: 288–293.
- [10] Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr*. 2001;74: 833–839.
- [11] Slykerman RF, Hood F, Wickens K, Thompson JMD, Barthow C, Murphy R, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in Pregnancy on Postpartum Symptoms of Depression and Anxiety: A Randomised Double-blind Placebo-controlled Trial. *EBioMedicine*. 2017;24: 159–165.
- [12] Morales A, Gandolfo A, Bravo J, Carvajal P, Silva N, Godoy C, et al. Microbiological and clinical effects of probiotics and antibiotics on nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo- controlled trial with 9-month follow-up. *J Appl Oral Sci*. 2018;26: e20170075.
- [13] Shane AL, Cabana MD, Vidry S, Merenstein D, Hummelen R, Ellis CL, et al. Guide to designing, conducting, publishing and communicating results of clinical studies involving probiotic applications in human participants. *Gut Microbes*. 2010;1: 243–253.
- [14] Pu F, Guo Y, Li M, Zhu H, Wang S, Shen X, et al. Yogurt supplemented with probiotics can protect the healthy elderly from respiratory infections: A randomized controlled open-label trial. *Clin Interv Aging*. 2017;12: 1223–1231.
- [15] Pakdaman MN, Udani JK, Molina JP, Shahani M. The effects of the DDS-1 strain of *Lactobacillus* on symptomatic relief for lactose intolerance - a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial. *Nutr J*. 2016;15: 56.
- [16] Okesene-Gafa K, Li M, Taylor RS, Thompson JMD, Crowther CA, McKinlay CJD, et al. A randomised controlled demonstration trial of multifaceted nutritional intervention and or probiotics: the healthy mums and babies (HUMBA) trial. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2016;16: 373.
- [17] Oudhuis GJ, Bergmans DC, Dormans T, Zwaveling J-H, Kessels A, Prins MH, et al. Probiotics versus antibiotic decontamination of the digestive tract: infection and mortality. *Intensive Care Med*. 2011;37: 110–117.
- [18] Smith TDH, Watt H, Gunn L, Car J, Boyle RJ. Recommending Oral Probiotics to Reduce Winter Antibiotic Prescriptions in People With Asthma: A Pragmatic Randomized Controlled Trial. *Ann Fam Med*. 2016;14: 422–430.
- [19] Yamamoto Y, Fujino K, Saruta J, Takahashi T, To M, Fuchida S, et al. Effects of yogurt fermented with *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 on the IgA flow rate of saliva in elderly persons residing in a nursing home: A before-after non-randomised intervention study. *Gerodontology*. 2017;34: 479–485.

- [20] Doron S, Snyderman DR. Risk and safety of probiotics. *Clin Infect Dis*. 2015;60 Suppl 2: S129–34.
- [21] Islam SU. Clinical Uses of Probiotics. *Medicine*. 2016;95: e2658.
- [22] Wilkins T, Sequoia J. Probiotics for Gastrointestinal Conditions: A Summary of the Evidence. *Am Fam Physician*. 2017;96: 170–178.
- [23] Fijan S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11: 4745–4767.
- [24] Happel AU, Barnabas SL, Froissart R, Passmore JS. Weighing in on the risks and benefits of probiotic use in HIV-infected and immunocompromised populations. *Benef Microbes*. 2018;9: 239–246.
- [25] Arnbjerg CJ, Vestad B, Hov JR, Pedersen KK, Jespersen S, Johannesen HH, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG Supplementation on Intestinal Inflammation Assessed by PET/MRI Scans and Gut Microbiota Composition in HIV-Infected Individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2018;78: 450–457.
- [26] Hummelen R, Hemsworth J, Chantalucha J, Butamanya NL, Hekmat S, Habbema JDF, et al. Effect of micronutrient and probiotic fortified yogurt on immune-function of anti-retroviral therapy naive HIV patients. *Nutrients*. 2011;3: 897–909.
- [27] Olsen P, Williamson M, Traynor V, Georgiou C. The impact of oral probiotics on vaginal Group B Streptococcal colonisation rates in pregnant women: A pilot randomised control study. *Women Birth*. 2018;31: 31–37.
- [28] Taylor BL, Woodfall GE, Sheedy KE, O’Riley ML, Rainbow KA, Bramwell EL, et al. Effect of Probiotics on Metabolic Outcomes in Pregnant Women with Gestational Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. *Nutrients*. 2017;9. doi:10.3390/nu9050461
- [29] Wibowo N, Bardosono S, Irwinda R. Effects of *Bifidobacterium animalis* lactis HN019 (DR10TM), inulin, and micronutrient fortified milk on faecal DR10TM, immune markers, and maternal micronutrients among Indonesian pregnant women. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2016;25: S102–S110.
- [30] Xie H, Lu Q, Wang H, Zhu X, Guan Z. Effects of probiotics combined with enteral nutrition on immune function and inflammatory response in postoperative patients with gastric cancer. *J BUON*. 2018;23: 678–683.
- [31] Ichim TE, Kesari S, Shafer K. Protection from chemotherapy- and antibiotic-mediated dysbiosis of the gut microbiota by a probiotic with digestive enzymes supplement. *Oncotarget*. 2018;9: 30919–30935.

- [32] Golkhalkhali B, Rajandram R, Paliany AS, Ho GF, Wan Ishak WZ, Johari CS, et al. Strain-specific probiotic (microbial cell preparation) and omega-3 fatty acid in modulating quality of life and inflammatory markers in colorectal cancer patients: a randomized controlled trial. *Asia Pac J Clin Oncol*. 2018;14: 179–191.
- [33] Sanders ME, Guarner F, Guerrant R, Holt PR, Quigley EMM, Sartor RB, et al. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut*. 2013;62: 787–796.
- [34] Faujdar SS, Mehrishi P, Bishnoi S, Sharma A. Role of Probiotics in human health and disease: An update. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 2016;5: 328–344.
- [35] Kolaček S, Hojsak I, Canani RB, Guarino A, Indrio F, Orel R, et al. Commercial Probiotic Products. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;65: 117–124.
- [36] Meléndez-Illanes L, González-Díaz C, Chilet-Rosell E, Álvarez-Dardet C. Does the scientific evidence support the advertising claims made for products containing *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis*? A systematic review. *J Public Health*. 2016;38: e375–e383.
- [37] Website [Internet]. [cited 20 Aug 2018]. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68015990u/mesh/68015990>
- [38] A Dictionary of Epidemiology [Internet]. [cited 20 Aug 2018]. Available: <https://global.oup.com/academic/product/a-dictionary-of-epidemiology-9780199976737>
- [39] Efecto Hawthorne - Wikipedia, la enciclopedia libre [Internet]. [cited 19 Nov 2017]. Available: https://es.wikipedia.org/wiki/Efecto_Hawthorne
- [40] Shariaty Z, Mahmoodi Shan GR, Farajollahi M, Amerian M, Behnam Pour N. The effects of probiotic supplement on hemoglobin in chronic renal failure patients under hemodialysis: A randomized clinical trial. *J Res Med Sci*. 2017;22: 74.
- [41] Nagata S, Chiba Y, Wang C, Yamashiro Y. The effects of the *Lactobacillus casei* strain on obesity in children: a pilot study. *Benef Microbes*. 2017;8: 535–543.
- [42] Tamtaji OR, Kouchaki E, Salami M, Aghadavod E, Akbari E, Tajabadi-Ebrahimi M, et al. The Effects of Probiotic Supplementation on Gene Expression Related to Inflammation, Insulin, and Lipids in Patients With Multiple Sclerosis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *J Am Coll Nutr*. 2017;36: 660–665.
- [43] Hao Q, Lu Z, Dong BR, Huang CQ, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2011.
- [44] Deshpande G, Jape G, Rao S, Patole S. Benefits of probiotics in preterm neonates in low-income and medium-income countries: a systematic review of randomised controlled trials. *BMJ Open*. 2017;7: e017638.

- [45] DeVellis RF. Scale Development: Theory and Applications. Fourth Edition. SAGE Publications; 2016.
- [46] Östlund-Lagerström L, Kihlgren A, Repsilber D, Björkstén B, Brummer RJ, Schoultz I. Probiotic administration among free-living older adults: a double blinded, randomized, placebo-controlled clinical trial. *Nutr J*. 2016;15: 80.
- [47] Palma E, Recine N, Domenici L, Giorgini M, Pierangeli A, Panici PB. Long-term *Lactobacillus rhamnosus* BMX 54 application to restore a balanced vaginal ecosystem: a promising solution against HPV-infection. *BMC Infect Dis*. 2018;18: 13.
- [48] Ahmadi S, Jamilian M, Karamali M, Tajabadi-Ebrahimi M, Jafari P, Taghizadeh M, et al. Probiotic supplementation and the effects on weight loss, glycaemia and lipid profiles in women with polycystic ovary syndrome: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Hum Fertil* . 2017;20: 254–261.
- [49] Dinleyici EC, PROBAGE Study Group, Vandenplas Y. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 effectively reduces the duration of acute diarrhoea in hospitalised children. *Acta Paediatr*. 2014;103: e300–5.
- [50] Center for Food Safety, Nutrition A. Generally Recognized as Safe (GRAS). Center for Food Safety and Applied Nutrition; Available: <https://www.fda.gov/food/ingredientpackaginglabeling/gras/>
- [51] Sanders ME, Akkermans LMA, Haller D, Hammerman C, Heimbach JT, Hörmannspurger G, et al. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*. 2010;1: 164–185.
- [52] Brodmann T, Endo A, Gueimonde M, Vinderola G, Kneifel W, de Vos WM, et al. Safety of Novel Microbes for Human Consumption: Practical Examples of Assessment in the European Union. *Front Microbiol*. 2017;8: 1725.
- [53] Liong M-T. Safety of probiotics: translocation and infection. *Nutr Rev*. 2008;66: 192–202.
- [54] Carasi P, Díaz M, Racedo SM, De Antoni G, Urdaci MC, Serradell M de LA. Safety characterization and antimicrobial properties of kefir-isolated *Lactobacillus kefir*. *Biomed Res Int*. 2014;2014: 208974.
- [55] Besselink MGH, van Santvoort HC, Buskens E, Boermeester MA, van Goor H, Timmerman HM, et al. [Probiotic prophylaxis in patients with predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial]. *Ned Tijdschr Geneeskd*. 2008;152: 685–696.
- [56] Hibberd PL, Kleimola L, Fiorino A-M, Botelho C, Haverkamp M, Andreyeva I, et al. No Evidence of Harms of Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC 53103 in Healthy Elderly—A Phase I Open Label Study to Assess Safety, Tolerability and Cytokine Responses. *PLoS One*. 2014;9: e113456.

- [57] Clinical equipoise - Wikipedia [Internet]. [cited 27 Jan 2018]. Available: https://en.wikipedia.org/wiki/Clinical_equipoise
- [58] Sharp RR, Achkar J-P, Brinich MA, Farrell RM. Helping patients make informed choices about probiotics: a need for research. *Am J Gastroenterol*. 2009;104: 809–813.
- [59] Hernán M, Robins J. Causal Inference. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, Forthcoming; 2018.
- [60] Spaizer SJ, Culpepper T, Nieves C, Ukhanova M, Mai V, Percival SS, et al. Lactobacillus gasseri KS-13, Bifidobacterium bifidum G9-1, and Bifidobacterium longum MM-2 Ingestion Induces a Less Inflammatory Cytokine Profile and a Potentially Beneficial Shift in Gut Microbiota in Older Adults: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Crossover Study. *J Am Coll Nutr*. 2015;34: 459–469.
- [61] Dennis-Wall JC, Culpepper T, Nieves C, Rowe CC, Burns AM, Rusch CT, et al. Probiotics (Lactobacillus gasseri KS-13, Bifidobacterium bifidum G9-1, and Bifidobacterium longum MM-2) improve rhinoconjunctivitis-specific quality of life in individuals with seasonal allergies: a double-blind, placebo-controlled, randomized trial. *Am J Clin Nutr*. 2017;105: 758–767.
- [62] Rijkers GT, Bimmel D, Grevers D, den Haan N, Hristova Y. Consumer perception of beneficial effects of probiotics for human health. *Benef Microbes*. 2013;4: 117–121.
- [63] Melling D. General practitioners roles and experiences with functional foods containing probiotics and plant sterols. *Prim Health Care Res Dev*. 2015;16: 254–262.
- [64] Vandenplas Y, Bacarea A, Marusteri M, Bacarea V, Constantin M, Manolache M. Efficacy and safety of APT198K for the treatment of infantile colic: a pilot study. *J Comp Eff Res*. 2017;6: 137–144.
- [65] Lawrence K, Hyde J. Microbiome restoration diet improves digestion, cognition and physical and emotional wellbeing. *PLoS One*. 2017;12: e0179017.
- [66] The PLOS ONE Editors. Retraction: Microbiome restoration diet improves digestion, cognition and physical and emotional wellbeing. *PLoS One*. 2018;13: e0194851.
- [67] Dietrich CG, Kottmann T, Alavi M. Commercially available probiotic drinks containing Lactobacillus casei DN-114001 reduce antibiotic-associated diarrhea. *World J Gastroenterol*. 2014;20: 15837–15844.
- [68] Pedersen N, Andersen NN, Végh Z, Jensen L, Ankersen DV, Felding M, et al. Ehealth: low FODMAP diet vs Lactobacillus rhamnosus GG in irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol*. 2014;20: 16215–16226.
- [69] Eggers S, Barker AK, Valentine S, Hess T, Duster M, Safdar N. Effect of Lactobacillus rhamnosus HN001 on carriage of Staphylococcus aureus: results of the impact of probiotics

for reducing infections in veterans (IMPROVE) study. BMC Infect Dis. 2018;18: 129.

[70] Hulley SB, Cummings SR, Browner WS, Grady DG, Newman TB. Designing Clinical Research. Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

[71] Hulley MD DS, Cummings SR, Browner WS, Grady MD D, Newman TB. Designing Clinical Research. Fourth edition. Lippincott Williams & Wilkins; 2013.

[72] The EQUATOR Network | Enhancing the QUALity and Transparency Of Health Research [Internet]. [cited 20 Aug 2018]. Available: <http://www.equator-network.org/>

EVIDENCIAS ACERCA DEL PAPEL DE LOS PROBIÓTICOS EN LA SALUD DIGESTIVA DESDE LA PERSPECTIVA DE LA CLÍNICA GASTROENTEROLÓGICA

Juan Andrés De Paula

juan.depaula@hospitalitaliano.org.ar

- Jefe Honorario del Servicio de Gastroenterología del Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina.
- Profesor Asociado de Medicina del Instituto Universitario del Hospital Italiano de Buenos Aires.

RESUMEN

Durante las últimas décadas, se ha comenzado a valorar el impacto de la microbiota sobre la salud digestiva. De hecho, resulta difícil encontrar alguna afección digestiva en la cual no existan reportes acerca de que la microbiota está fuertemente involucrada. En consecuencia, se cree que una manipulación inteligente de estos microorganismos podría facilitar el manejo de las enfermedades gastrointestinales. En este aspecto, la microbiota está fuertemente involucrada no sólo en la susceptibilidad a las infecciones (tanto digestivas como extradigestivas), sino en el riesgo de padecer enfermedades inmunológicas, inflamatorias, metabólicas y degenerativas. En este capítulo desarrollaremos brevemente algunos ejemplos de situaciones gastrointestinales que resultan de interés para comprender la trascendencia de esta novedosa área del conocimiento.

I. INTRODUCCIÓN

Hasta hace unos años el rol de la microbiota en la salud y la enfermedad fue subvalorado, probablemente por la dificultad de explorar su estructura y funcionamiento. Sin embargo, en la últimas décadas, con el desarrollo de nuevas y mejores técnicas para el estudio de su genética, constitución, metabolismo e interacción con la mucosa intestinal, hemos comenzando a valorar el verdadero impacto de la microbiota, asistiendo a una verdadera revolución en el conocimiento [1, 2].

Actualmente resulta difícil encontrar alguna afección digestiva en la cual la microbiota no esté fuertemente involucrada [2]. De esto conceptos se desprende que una manipulación inteligente de la microbiota puede resultar central en el manejo de las enfermedades gastrointestinales. Pero lo que quizás sea aun más importante es que, por sus consecuencias poblacionales, estamos comprendiendo que la calidad de nuestra microbiota tiene un rol trascendental, no solo en la enfermedad, sino también en el mantenimiento y calidad del estado de salud [2, 3]. En este aspecto, la microbiota está fuertemente involucrada no sólo en la susceptibilidad a las infecciones (tanto digestivas como extradigestivas), sino en el riesgo de padecer enfermedades inmunológicas, inflamatorias, metabólicas y degenerativas [2-4]. Esto incluye a patologías enormemente prevalentes como las alteraciones funcionales digestivas y extradigestivas como la obesidad, diabetes y enfermedad vascular. Sin embargo, la disbiosis asociada a las afecciones del aparato digestivo puede ser consecuencia del trastorno o enfermedad, por lo que los datos observacionales deben ser valorados con cautela.

En este capítulo desarrollaremos brevemente algunos ejemplos de situaciones gastrointestinales que resultan de interés para comprender la trascendencia de esta novedosa área del conocimiento.

II. LA MICROBIOTA Y EL HUÉSPED

La microbiota puebla las superficies de todo el aparato digestivo en una relación de convivencia signada por la tolerancia, la diversidad y el mutuo beneficio. La calidad y cantidad de bacterias no es igual a lo largo del tubo digestivo. Si bien la microbiota del intestino delgado es menos abundante que la del colon, por su extensión y mayor permeabilidad, es posible que tenga un rol muy importante en la modulación de la inmunidad e inflamación local con consecuencias sistémicas. Por su parte, el colon representa un vasto ecosistema microbiano que alberga varios trillones de microbios que codifican una variedad 100 veces mayor de genes que nuestro propio genoma. La composición y la función de este ecosistema parecen estar modeladas en gran medida por la forma del parto, la lactancia, la colonización inicial, factores ambientales, medicamentos y muy particularmente la dieta y el estilo de vida [3, 4].

La microbiota intestinal desempeña un papel crucial en el procesamiento, síntesis y recuperación de nutrientes, agua y electrolitos no absorbidos en el intestino

delgado, pero sobre todo interviene en la defensa contra la colonización de patógenos y la infección. Finalmente, cada vez contamos con más información indicando que la microbiota intestinal es crucial en la integración de las señales ambientales con la fisiología y metabolismo del huésped, influyendo en procesos biológicos críticos para la salud del aparato digestivo y del resto del organismo tales como inflamación, inmunidad natural y adaptativa, sensibilidad visceral, trofismo y carcinogénesis [3, 4].

Los probióticos –microorganismos que, administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios de salud, cuya definición se abordará a lo largo de este libro– representan una herramienta sumamente interesante para intervenir en todos aquellos procesos en los que la microbiota tenga un rol en su fisiopatología, sobre todo teniendo en cuenta su perfil de seguridad. Tanto los provistos por la industria farmacéutica como los contenidos en alimentos han sido estudiados en diferentes situaciones. Si bien no es fácil delimitar un espectro de situaciones particular para cada categoría, los probióticos contenidos en los alimentos tienen un lugar preferencial, por su precio y disponibilidad, cuando están destinados a la protección de poblaciones en riesgo u optimización del estado de salud.

III. PROBIÓTICOS Y TRASTORNOS FUNCIONALES:

Los trastornos funcionales del aparato digestivo son sumamente prevalentes, afectan personas de todas las edades y condiciones socioeconómicas [6]. Se trata de trastornos que pueden asentar en uno o más sectores del aparato digestivo, en los cuales predominan los síntomas en ausencia de alteración orgánica significativa. Sus representantes más conspicuos son el síndrome de intestino irritable (SII), la dispepsia y el estreñimiento, sin embargo pueden asentar en otros órganos del aparato digestivo incluyendo el esófago, la vía biliar y el páncreas. Estas afecciones aparentemente triviales alteran profundamente la calidad de vida, la actividad laboral y por su prevalencia y cronicidad generan altísimos costos en los sistemas de salud. Su génesis es multifactorial, pero uno de los hallazgos más importantes es la existencia de un enorme tráfico de señales entre el cerebro y el sistema nervioso entérico, lo cual determina un estado de hipersensibilidad visceral. Esta hipersensibilidad, que determina respuestas motoras, secretoras y dolorosas en respuesta mínimos estímulos sensoriales y emocionales, explica la presencia de síntomas floridos en ausencia de daño orgánico. Estudios más profundos han demostrado la existencia un estado de “microinflamación” de la mucosa gastrointestinal asociada a disbiosis de la microbiota [7] que explicaría este estado de hipersensibilidad. La modificación de este estado microinflamatorio parecería ser una de las explicaciones más probables de porqué el uso de prebióticos y probióticos ha demostrado ser de exitoso en muchos estudios controlados y aleatorizados en el SII. En 2016 se publicó un meta-análisis de Zhang y col. que condensa los trabajos realizados en este tema y concluye que los probióticos son efectivos en reducir los síntomas y mejorar la calidad de vida de los pacientes con

SII [8]. Por otra parte, los probióticos también han demostrado ser de utilidad en el tratamiento de los pacientes con dispepsia y con constipación funcional [9-11] por mecanismos que aún no están totalmente claros. Como dato llamativo, un trabajo publicado recientemente muestra que la administración de una cepa de la especie *Bifidobacterium longum* en pacientes con SII reduce los puntajes de depresión, modificando simultáneamente la actividad cerebral en la resonancia magnética funcional, la cual según el análisis de los autores, no es secundaria a la mejoría de los síntomas [12]. Esta observación viene a sumar evidencia a una línea de investigación que surge a partir de comprobar en modelos de experimentación animal la influencia de la microbiota en el estado emocional y la conducta [13].

Es importante destacar que no todos los probióticos se comportan de la misma manera y es necesario corroborar resultados en nuevos trabajos orientados a esclarecer tipos de probióticos, únicos o en combinación, dosis, tiempos de toma y duración del beneficio.

IV. PROBIÓTICOS Y SOBRECRECIMIENTO BACTERIANO DEL INTESTINO DELGADO

El sobrecrecimiento bacteriano del intestino delgado (SCBID) se define como un incremento de la concentración bacteriana del intestino delgado mayor a 10^4 UFC/g en el yeyuno, el cual se suele asociar a cambios no sólo en la cantidad sino en la calidad de la microbiota [14]. Es una afección infrecuente en jóvenes, que sólo se ve asociada a falla en los mecanismos normales de control de la proliferación bacteriana tales como aclorhidria, diverticulosis del intestino delgado, alteraciones del tránsito intestinal. Sin embargo en las personas ancianas el SCBID es frecuente, y puede ser asintomático o producir síntomas tales como meteorismo, diarrea y grados variables de malabsorción secundarios a daño y alteraciones inflamatorias de la mucosa intestinal [15]. Se especula que el SCBID es capaz de inducir además un aumento leve pero sostenido de la respuesta inflamatoria sistémica, con importantes consecuencias para la salud. Un meta-análisis reciente [16] concluye que la administración de suplementos de probióticos podría decontaminar el SCBID de manera efectiva, disminuir la producción de H_2 , sin embargo no alcanzó significación la eficacia para prevenirlo. Es muy probable que la disbiosis y el sobrecrecimiento en el intestino delgado serán tópicos cada vez más importantes por su repercusión en la nutrición y los estados de salud, sobre todo de la población anciana [15].

V. PROBIÓTICOS Y CÁNCER COLORRECTAL

El cáncer colorrectal (CCR) es la tercera causa de muerte por neoplasias en la mayor parte de los países occidentales, y se cree que los factores ambientales incluyendo la

alimentación son cruciales para su génesis [17]. Dentro de este último factor, inciden la calidad de las grasas, la cantidad y calidad de fibra y los productos lácteos. Por otra parte el CCR se asocia con una mayor abundancia de *Fusobacterium nucleatum* en el tejido del CCR, lo cual a su vez se relaciona con una menor densidad de células T CD3 + y una atenuación de la inmunidad antitumoral [18]. En general la dieta occidental promueve una menor producción de ácidos grasos de corta cadena (AGCC), mayor cantidad de sales biliares secundarias, reducción de la capa de mucus, aumento de la permeabilidad y de la inflamación de la mucosa intestinal. Todo esto asociado a una disminución de bacterias productoras de AGCC, tales como *Bifidobacterium* y *Bacteroides* familia S24-7, y aumento de Firmicutes. Contrariamente, en individuos que siguen una dieta alta en frutas, verduras, granos integrales, pescado, soja, aves de corral y productos lácteos bajos en grasa parece haber un menor riesgo de cáncer colorrectal [19, 21, 22]. Por otra parte, existe fuerte evidencia que una mayor ingesta de lácteos, leche y calcio se asocia a un menor riesgo de cáncer colorrectal. Además del calcio y la vitamina D, otros componentes de los productos lácteos tienen actividad antineoplásica, incluido el ácido linoléico conjugado, lactosa, butirato y bacterias productoras de ácido láctico [20]. Un reciente estudio en pacientes con síndrome de colon irritable mostró que el consumo de un producto de leche fermentada que contenía iniciadores lácteos y *Bifidobacterium animalis* potenció la producción colónica de AGCC y disminuyó la abundancia de *Bilophila wadsworthia*, un microorganismo (patobionte) relacionado con inflamación y cáncer colorrectal [20].

VI. PROBIÓTICOS Y DIARREA INFECCIOSA

La diarrea infecciosa representa una de las principales causas de muerte y desnutrición en el mundo. Reducir la susceptibilidad y acelerar la recuperación de los pacientes, sobre todo en las poblaciones más vulnerables como en niños y ancianos, principalmente en áreas carenciadas, tiene un impacto enorme en la salud y la optimización de los recursos sanitarios.

Diversos estudios mostraron que la administración de *S. boulardii*, *Lactobacillus* GG, *L. acidophilus*, *L. bulgaricus* y *Bifidobacterium*, solos o combinados, disminuye la incidencia de diarrea aguda infecciosa, del viajero y asociada a ATBs con un NNT (siglas en inglés para *necessary number to treat*, "número necesario a tratar") de estimado en 4 [23]. Por otra parte numerosos estudios condensados en metaanálisis y revisiones sistemáticas muestran que el uso de probióticos acorta la evolución en aproximadamente un día. La eficacia depende de la cepa y de la dosis, pero entre los diferentes estudios existe una importante heterogeneidad en los resultados que parece estar relacionada con el uso de diferentes tipos de probióticos, dosis y duraciones de tratamiento. Los probióticos que mostraron mayor grado de evidencia fueron *Lactobacillus* GG y *S. boulardii*, y en menor grado *L. reuteri* DSM17938 y *L. acidophilus* LB [23-25]

VII. PROBIÓTICOS Y OTRAS AFECCIONES GASTROINTESTINALES

Existe abundante evidencia de que la microbiota intestinal está fuertemente involucrada en la generación y mantenimiento del daño en muchas otras enfermedades gastrointestinales tales como las enfermedades inflamatorias del intestino, las colitis microscópicas, la enteritis por antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), la enteritis actínica, la enfermedad celíaca y las alergias intestinales.

La pérdida de tolerancia a elementos dependientes de la microbiota intestinal es la base fisiopatológica de las EII (enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa). Pero casi no cabe duda que la urbanización de la dieta en occidente tiene un fuerte impacto en la generación de estas enfermedades [26]. Sin embargo y por el momento, con excepción del uso de determinados probióticos en el manejo de la inflamación del reservorio ileoanal, en la reconstrucción del tránsito luego de la proctocolectomía, los probióticos no gravitan en el tratamiento habitual [27, 28]. Sin embargo desde el momento que el trasplante de materia fecal es exitoso en una proporción considerable de pacientes con colitis ulcerosa, es de suponer que en un futuro no lejano contaremos con suplementos bacterianos estandarizados para este fin específico [29].

En la actualidad los AINEs son una de las clases de drogas de mayor consumo en el mundo y son responsables de daño gastrointestinal altamente prevalente. La microbiota intestinal desempeña un papel clave en el daño del intestino delgado y colon inducido por AINEs, y la modulación de la composición de la microbiota intestinal podría ser una nueva estrategia terapéutica para tratar este daño [30].

En la enfermedad celíaca la microbiota también interviene en la regulación del daño secundario a la exposición al gluten y la administración de probióticos podría convertirse en una herramienta eficaz para reducir dicha sensibilidad y reducir al daño de las transgresiones menores. Se especula que lo haría a través de la reducción de bacterias potencialmente proinflamatorias (grupo *B. fragilis*), linfocitos T activados y sus citoquinas [31].

También hay evidencia de que los probióticos podrían tener un lugar en el manejo de situaciones tales como colitis microscópicas, intolerancias alimentarias alérgicas, enteritis actínica y enfermedades hepáticas, entre muchas otras [32, 33].

VIII. CONCLUSIONES

La interacción entre la microbiota y el huésped determina en gran medida la iniciación y/o persistencia de muchas de las afecciones del aparato digestivo.

La interacción entre la microbiota intestinal y el aparato digestivo es de altísima complejidad, y si bien en estos últimos años se han hecho importantes avances, resulta aún imposible comprender completamente todos los mecanismos involucrados. Sin embargo se han hecho enormes avances y se ha abierto ante nosotros un área del conocimiento que explica muchos de los fenómenos relacionados con el

mantenimiento de la salud, la defensa y la enfermedad, tanto del aparato digestivo como del resto del organismo.

Dentro de este sistema complejo, los alimentos, los prebióticos y los probióticos muy probablemente tendrán un protagonismo creciente en la prevención y tratamiento de muchas condiciones las condiciones descritas, como así también en la optimización del estado de salud.

Tanto el mantenimiento de la eubiosis como la corrección de la disbiosis, por su potencial impacto poblacional, son hoy áreas prioritaria de estudio y experimentación. En la medida que nuestro conocimiento se acreciente, tendremos más y mejores recursos para proteger y mejorar la calidad de la salud y sobre todo en las etapas y poblaciones más vulnerables..

IX. BIBLIOGRAFIA CITADA

[1] Shanahan F, Dinan TG, Ross P y col. Probiotics in Transition. *Clinical Gastroenetrology and Hepatology* 2012;10:1220–1224.

[2] Guarner F, Khan AG, Garisch J, y col. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Probiotics and prebiotics. October 2011. *J Clin Gastroenterol.* 2012;46:468-81.

[3] Stitaya Sirisinha. The potential impact of gut microbiota on your health: Current status and future challenges. *Asian Pac J Allergy Immunol* 2016;34:249-264.

[4] Rasnik K. Singh, Hsin-Wen Chang, Di Yan y col. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human health. *Giovanni Barbara, Gastroenterology* 2016;150:1305.

[5] Mariangela Rondanelli , Milena Anna Faliva, Simone Perna y col. Using probiotics in clinical practice: Where are we now? A review of existing meta-analyses. *Gut Microbes.* 2017; 8(6): 521–543.

[6] Douglas A. Drossman. Functional Gastrointestinal Disorders: History, Pathophysiology, Clinical Features, and Rome IV. *Gastroenterology* 2016;150:1262–1279.

[7] Bruno K. Rodin~o-Janeiro. A Review of Microbiota and Irritable Bowel Syndrome: Future in Therapies. *Adv Ther* 2018;35:289–310.

[8] Zhang et al. Effects of probiotic type, dose and treatment duration on irritable bowel syndrome diagnosed by Rome III criteria: a meta-analysis. *BMC Gastroenterology* 2016;16:62.

[9] Tabbers MM. Effect of the consumption of a fermented dairy product containing *Bifidobacterium lactis* DN-173 010 on constipation in childhood: a multicentre randomised controlled trial (NTRTC: 1571). *BMC Pediatrics* 2009;9:22.

- [10] De Paula JA, Carmuega E, Weill R. Effect of the ingestion of a symbiotic yogurt on the bowel habits of women with functional constipation. *Acta gastroenterologica Latinoamericana* 04/2008; 38:16-25.
- [11] Guyonnet D. 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* 26, 475-486.
- [12] Pinto-Sanchez MI. Probiotic *Bifidobacterium longum* NCC3001 Reduces Depression Scores and Alters Brain Activity: A Pilot Study in Patients With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology* 2017;153:448.
- [13] Bastiaanssen TFS, Cowan CSM, Claesson MJ y col. Making Sense of... the Microbiome in Psychiatry. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2018 Aug 7 [Epub ahead of print].
- [14] Grace E, Shaw C, Whelan K y col. Review article: small intestinal bacterial overgrowth, prevalence, clinical features, current and developing diagnostic tests, and treatment. *Aliment Pharmacol Ther* 2013; 38: 674-688.
- [15] Thevaranjan N, Puchta A, Schulz C y col. Age-Associated Microbial Dysbiosis Promotes Intestinal Permeability, Systemic Inflammation, and Macrophage Dysfunction. *Cell Host & Microbe* 2017;21:455-466.
- [16] Zhong C, Qu C, Wang B y col. Probiotics for Preventing and Treating Small Intestinal Bacterial Overgrowth. A Meta-Analysis and Systematic Review of Current Evidence. *J Clin Gastroenterol* 2017;51:300-311.
- [17] Feng YL, Shu L, Zheng PF, et al. Dietary patterns and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev*. 2017;26:201-11.
- [18] Feng YL, Shu L, Zheng PF, et al. Dietary patterns and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Eur J Cancer Prev*. 2017;26:201-11.
- [19] Song M, Garrett WS, Chan AT. Nutrients, foods, and colorectal cancer prevention. *Gastroenterology*. 2015;148:1244-60.
- [20] Veiga P, Pons N, Agrawal A, et al. Changes of the human gut microbiome induced by a fermented milk product. *Sci Rep*. 2014;4:6328.
- [21] Ohara T, Suzutani T. Intake of *Bifidobacterium longum* and Fructo-oligosaccharides prevents Colorectal Carcinogenesis. *Euroasian J Hepatogastroenterol*. 2018;8:11-17.
- [22] Limeiras SM, Ogo FM, Genez LA, Carreira CM y col. Prevention of DNA damage and anticarcinogenic activity of Activia® in a preclinical model. *Genet Mol Res*. 2017;16:1-12.

- [23] Allen SJ, Martinez EG, Gregorio GV, et al. Probiotics for treating acute infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev*.2010;CD003048.
- [24] Sazawal S, Hiremath G, Dhingra U. Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: A meta-analysis of masked, randomized, placebo-controlled trials. *Lancet Infect Dis*.2006;6:374-82.
- [25] Szajewska H, Guarino A, Hojsak I, 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;58:531-9.
- [26] Zuo T, Kamm MA, Colombel JF y col. Urbanization and the gut microbiota in health and inflammatory bowel disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018;15:440-452.
- [27] Derwa Y, Gracie DJ, Hamlin PJ y col. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2017;1-12.
- [28] Abraham BP y Quigley EMM. Probiotics in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017 Dec;46(4):769-782.
- [29] Browne AS y Kelly CR. Fecal Transplant in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol Clin North Am*. 2017;46:825-837
- [30] Otani K, Tanigawa T, Watanabe T y col. Microbiota Plays a Key Role in Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug-Induced Small Intestinal Damage. *Digestion* 2017;95:22–28.
- [31] Olivares O, Castillejo G, Varea V y col. Double-blind, randomised, placebo-controlled intervention trial to evaluate the effects of *Bifidobacterium longum* CECT 7347 in children with newly diagnosed coeliac disease. *British Journal of Nutrition* 2014;112:30–40
- [32] Markowiak P y Sliżewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *Nutrients* 2017;9:1021
- [33] Sanders ME, Guarner F, Guerrant R y col. An update on the use and investigation of probiotics in health and disease. *Gut* 2013;62:787–796.

ENFERMEDADES ALÉRGICAS, MICROBIOTA Y EMPLEO DE PROBIÓTICOS PARA SU TRATAMIENTO

Guillermo H. Docena

guillermo.docena@gmail.com

- *Instituto de Estudios Inmunológicos y Fisiopatológicos (IIFP), CONICET y Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.*

RESUMEN

A lo largo de la evolución de los seres vivos, los microorganismos han ejercido una presión selectiva que ha modelado el sistema inmune de los distintos organismos, desarrollando la inmunidad innata y la adaptativa, que funcionan a través de una compleja red de células y moléculas dirigidas a detectar y clasificar a los antígenos para controlarlos o eliminarlos. Frente a la enorme variedad y cantidad de partículas y moléculas que ingresan al organismo, de origen ambiental y, microbiano, el sistema inmune tiene la capacidad de montar un delicado equilibrio de mecanismos activos de tolerancia y -al mismo tiempo- mecanismos capaces de eliminar a los microorganismos patógenos.

Para poder establecer este equilibrio y convivir en simbiosis con los microorganismos que conforman la microbiota, es necesario que el sistema inmune asociado a la mucosa gastrointestinal ponga en funcionamiento diversos mecanismos que detectan a los microorganismos no patógenos y los preservan. Por el contrario, frente a un microorganismo patogénico el sistema inmune debe activarse y generar un foco inflamatorio, para eliminarlo. Con los antígenos no procarióticos e ino-cuos -sustancias del medio ambiente, de la dieta o un componente propio- tampoco debe producirse una respuesta inflamatoria. Sin embargo, existen situaciones en las que el sistema inmune se activa en forma inadecuada, produciendo las llamadas reacciones de hipersensibilidad o alergias. En ellas, se produce una ruptura de la tolerancia a sustancias ambientales, alimentarias, etc.

En este capítulo se revisan las bases moleculares de los fenómenos mencionados, y se relatan las evidencias de disponibles en favor del uso de microorganismos probióticos en el tratamiento de distintas clases de alergias.

I. GENERALIDADES SOBRE ENFERMEDADES ALÉRGICAS Y TRATAMIENTOS

I.A. ENFERMEDADES ALÉRGICAS. DEFINICIONES Y CONCEPTOS GENERALES

El hombre vive en un medio ambiente rodeado de sustancias antigénicas –muchas de las cuales son patogénicas– por lo cual le resultaría imposible sobrevivir sin mecanismos de defensa, denominado “sistema inmune”. A lo largo de la evolución de los seres vivos, los microorganismos han ejercido una presión selectiva que ha modelado el sistema inmune de los distintos organismos, desarrollando la inmunidad innata y la adaptativa, que funcionan a través de una compleja red de células y moléculas dirigidas a detectar y clasificar a los antígenos para controlarlos o eliminarlos. El panorama es todavía más complejo, en la medida en que los microorganismos pueden ser patógenos y no patógenos, estos últimos en simbiosis con el propio organismo, tal como ocurre entre la microbiota y el intestino, así como en las otras mucosas. Asimismo, además de los llamados antígenos, también hay que considerar otras moléculas que interactúan con el sistema inmune, y provienen del medio ambiente y la dieta. A pesar de ser –en líneas generales– inocuas, siguen siendo sustancias extrañas para el sistema inmune. Frente a esta variedad de antígenos –microbianos o simplemente ambientales– el sistema inmune tiene la capacidad de montar mecanismos activos de **tolerancia** (frente a aquellos antígenos que requiere preservar), y al mismo tiempo activar mecanismos capaces de **eliminar** a los microorganismos patógenos. Estos mecanismos se inducen y regulan en las mucosas.

La **mucosa gastrointestinal** es la mucosa más compleja y se dice que allí el sistema inmune “aprende” a regular su funcionamiento. El intestino contiene la gran mayoría de las células del sistema inmune del organismo y –por eso– se lo puede considerar un órgano inmune. Aunque la mayor parte de los antígenos que ingresan por las diferentes mucosas del organismo son inocuos, cierto grupo de ellos genera respuestas alérgicas, y por eso se los denomina alergenos. En un individuo normal –no alérgico– la respuesta inmune frente a los alergenos es un fenómeno denominado “tolerancia específica”, que evita que estos provoquen la aparición de procesos inflamatorios. Esta clase de tolerancia es muy importante para preservar la fisiología de las mucosas. En el caso de los alergenos de origen alimentario –que ingresan al organismo por la vía oral– el mecanismo de tolerancia inmunológica se denomina **tolerancia oral**. Esta tolerancia a las sustancias alimentarias y ambientales es necesaria para conservar a los microorganismos vivos presentes en el lumen intestinal, una población a las que habitualmente se la denomina “microbiota”. En conjunto, estas ideas refuerzan la noción de que los mecanismos de tolerancia no han aparecido –en términos evolutivos– para evitar las reacciones alérgicas (que seguramente no existían hace miles o cientos de miles de años), sino que constituyen un aspecto evolutivo de la relación microorganismo-hospedador.

Así como se ha demostrado que muchos patógenos son capaces de evolucionar a partir de microorganismos comensales, actualmente se postula que bacterias

presentes en la microbiota se han desarrollado a partir de bacterias patógenas del tracto gastrointestinal (por ejemplo *Salmonella*), lo que les ha posibilitado adaptarse y sobrevivir en dicho medio sin ser eliminadas. Para poder establecer este equilibrio y convivir en simbiosis, es necesario que el sistema inmune asociado a la mucosa gastrointestinal ponga en funcionamiento diversos mecanismos que detectan a los microorganismos no patógenos y los preservan. Por el contrario, frente a un microorganismo patógeno el sistema inmune debe activarse y generar un foco inflamatorio, para eliminarlo. Con los antígenos no procarióticos e inoos –sustancias del medio ambiente, de la dieta o un componente propio– tampoco debe producirse una respuesta inflamatoria. Sin embargo, existen situaciones en las que el sistema inmune se activa en forma inadecuada, produciendo las llamadas **reacciones de hipersensibilidad o alergias**, descritas ya en la década del 60 por Gell y Coombs.

Las **enfermedades alérgicas** son, por lo tanto, manifestaciones clínicas producto de una falla en los mecanismos de activación o regulación de la respuesta inmune frente a antígenos inoos que se encuentran ampliamente distribuidos en el medio ambiente. Estas reacciones están mediadas por cualquiera de los cuatro mecanismos de hipersensibilidad (clasificados en reacciones de hipersensibilidad de tipo I a IV). Las reacciones más frecuentes y las potencialmente más graves son denominadas reacciones de **anafilaxia**, y son clasificadas como **reacciones de hipersensibilidad de tipo I, o inmediatas o IgE-mediadas, o atópicas**.

Para el caso en particular de las **alergias alimentarias**, éstas son provocadas por alérgenos alimentarios y afectan principalmente la mucosa del tracto gastrointestinal. Es importante definir correctamente qué son las alergias alimentarias, dado que suelen confundirse con una reacción adversa a alimentos. La alergia alimentaria es una reacción adversa originada por la ingesta de alimentos o aditivos alimentarios en la que participa el sistema inmune. Comprenden una amplia variedad de trastornos que pueden ser mediados o no por anticuerpos IgE [1]. Por lo tanto las alergias alimentarias no constituyen una única patología, sino que involucran diferentes enfermedades o patologías, tales como la anafilaxia, el síndrome de alergia oral, la enterocolitis, la esofagitis eosinofílica, la gastroenteropatía eosinofílica, la urticaria, el eccema y otras. En cambio, se define una **reacción adversa a los alimentos** en su concepción más amplia a una reacción anómala desencadenada por alimentos que pueden o no estar mediados por el sistema inmune. Estas se clasifican en **reacciones tóxicas**, a aquellas dependen de la toxicidad del alimento, tal como un pescado en mal estado, chocolate, banana y palta que contienen histamina, alimentos contaminados con microorganismos, etc, y **reacciones no tóxicas**, que son las que dependen de la susceptibilidad individual, tal como la deficiencia de lactasa, etc. Entre estas últimas tenemos las **reacciones no mediadas por el sistema inmune**, comúnmente llamadas “intolerancias”, que son alteraciones anatómicas del tracto gastrointestinal, deficiencias enzimáticas, alteraciones sicosomáticas, etc, y las **reacciones mediadas por el sistema inmune** –denominadas “reacciones alérgicas”– que son las originadas por mecanismos de hipersensibilidad, tal como se describió antes.

Por lo tanto una alergia alimentaria es un tipo de reacción adversa originada por alimentos en la que el sistema inmune se encuentra involucrado. Se estima que sólo el 15-20% de las reacciones adversas alimentarias son realmente alergias alimentarias, por lo cual resulta sumamente importante definir correctamente los diferentes términos y contar con métodos diagnósticos precisos dado que el tratamiento y el pronóstico son muy diferentes.

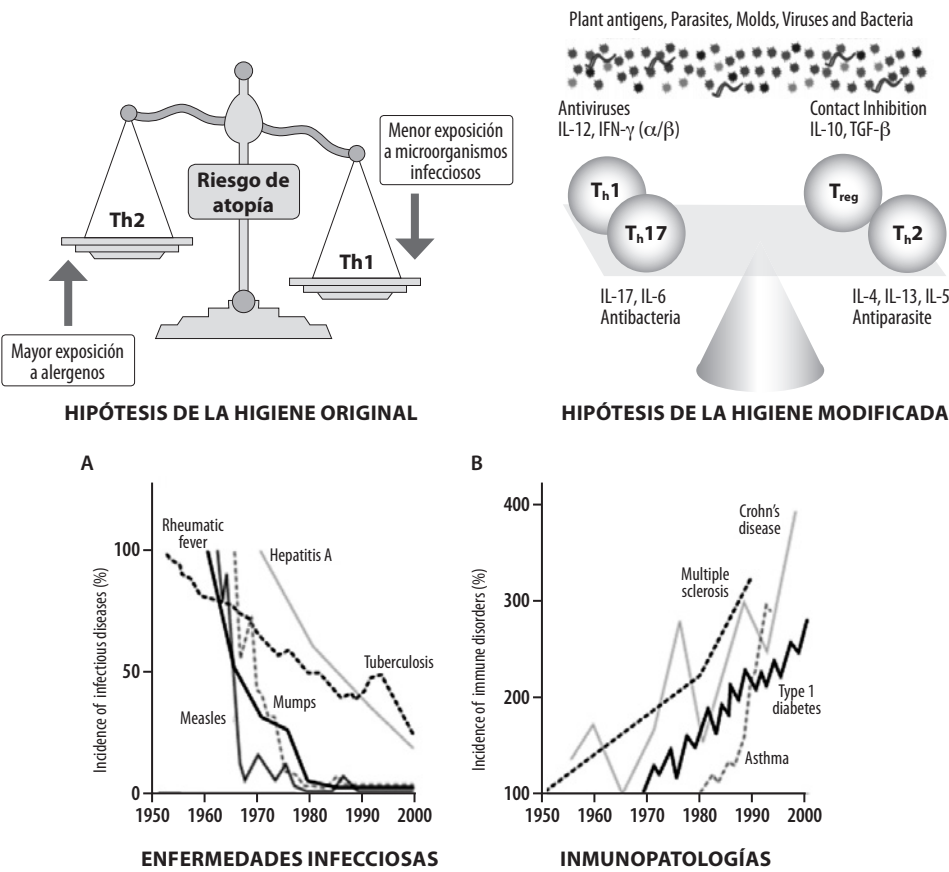
I.B. PREVALENCIA, “HIPÓTESIS DE LA HIGIENE” Y MICROBIOTA

Desde la década del 80 se ha observado un fuerte incremento en la incidencia de las reacciones alérgicas, y de las alergias alimentarias en particular. En ciertas regiones o poblaciones, inclusive, se las considera una epidemia, por el elevado porcentaje de la población afectado (30-40%). Estas cifras implican que hay cientos de millones de individuos afectados [2, 3, 4]. Asimismo, se ha observado que por cada década que transcurre, la incidencia se duplica y –en particular– luego del 2000 se evidenció un creciente aumento de las alergias alimentarias en determinados países. Dado que se trata de patologías multifactoriales, y que la composición genética no se ha modificado en los seres humanos durante este período, la única explicación para comprender y explicar este fenómeno es que ciertos cambios en la expresión de los genes han afectado el funcionamiento del sistema inmune. A través de la epigenética, se puede estudiar cómo los cambios en el medio ambiente o en los hábitos de vida, pueden afectar la expresión de los genes, sin modificar la constitución genética. Esto es, en la práctica, lo que se postula que ha ocurrido, y está ocurriendo con el sistema inmune en determinadas poblaciones.

Aunque estas enfermedades no están directamente relacionadas con la presencia de microorganismos, estos están íntimamente relacionados con la inducción y regulación de los mecanismos inmunológicos en las mucosas. La **hipótesis de la higiene**, permite fundamentar el marcado incremento en la incidencia de las alergias en las últimas décadas en determinadas regiones del mundo [5] (**ver Figura 1**). Esta hipótesis postula que una menor exposición a microorganismos intracelulares patógenos ha sido determinante en la mayor instauración de mecanismos Th2-dependientes frente a la exposición a alérgenos [6]. Los hábitos de vida en ambientes más limpios, mejores planes de vacunación, mejores antibióticos, mayor acceso a fuentes de agua no contaminadas o potabilizadas, alimentos menos contaminados, menor contacto con mascotas, etc., han determinado que el sistema inmune reciba una menor carga de información del medio ambiente relacionada con los microorganismos; a su vez, estos cambios en los hábitos de higiene se acompañan con un mayor contacto con alérgenos, como consecuencia de hábitos de vida más intra-domiciliarios, ambientes más amoblados, con sistemas centralizados de circulación de aire, etc. En conjunto, estos cambios ambientales implican que el sistema inmune recibe menores estímulos antigénicos pro-Th1 (patógenos intracelulares principalmente), y más estímulos pro-Th2 (alérgenos). En consecuencia, el sistema inmune en individuos con cierta

susceptibilidad genética, tiende a reaccionar de forma Th2-dependiente frente a antígenos inocuos que contacta repetidamente, y a desencadenar reacciones inflamatorias o alérgicas. La hipótesis de la higiene postula que los cambios producidos en el medio ambiente y en los hábitos de vida durante los últimos tiempos en países desarrollados, impactan en la regulación del sistema inmune (ver **Figura 1**). De esta manera los mecanismos IgE-dependientes (se inducen exclusivamente cuando existen linfocitos Th2), que en la escala evolutiva se han generado como mecanismo de defensa frente a determinados parásitos (macroparásitos que habitan en órganos huecos), se están activando frente a antígenos inocuos del medio ambiente.

Figura 1. Hipótesis de la higiene original y modificada.



Se observa una representación de las hipótesis de la higiene original y modificada, junto a la disminución de las principales enfermedades infecciosas crónicas e incremento en la incidencia de inmunopatologías Th1 - (esclerosis múltiple, enfermedad de Crohn y diabetes tipo 1) y Th2-mediadas (asma).

Sin embargo, estudios posteriores [7] demostraron que si bien las principales enfermedades infecciosas crónicas (sarampión, paperas, tuberculosis, hepatitis, etc) fueron controladas luego de la década del 80, y que al mismo tiempo las inmunopatologías Th2-dependientes o alergias (asma, rinitis, etc) se incrementaron marcadamente, las inmunopatologías Th1-dependientes o enfermedades autoinmunes también sufrieron un significativo incremento en su incidencia. Dado que estas subpoblaciones Th1 y Th2 están contra-reguladas entre sí, no se esperaba un incremento en las enfermedades autoinmunes. Esta observación llevó a re-considerar, y luego a re-formular, a la hipótesis de la higiene.

Como mencionamos anteriormente, es importante considerar que los microorganismos presentes en la microbiota (comensales y patógenos) cumplen un papel esencial en el desarrollo y correcto funcionamiento del sistema inmune asociado a las mucosas [8]. Se ha demostrado –en modelos animales de individuos criados en espacios libres de gérmenes (carentes de microbiota)– que en ausencia de microbiota no se induce al sistema inmune de mucosas y, por lo tanto, no se generan los mecanismos de tolerancia frente a los antígenos de la microbiota, del medio ambiente y de la dieta [9, 10]. Esto llevó a reformular la hipótesis de la higiene, originalmente descrita por Stracham en 1989 en términos de una menor la exposición a microorganismos patógenos, para considerar que las modificaciones en la composición de la microbiota serían las responsables de las alteraciones de los mecanismos de tolerancia mucosal, principalmente por defectos a nivel de inducción de los linfocitos T regulatorios (abreviados Treg) (ver **Figura 1**). Existen numerosos modelos animales de infección experimental en los que se describe cómo los microorganismos patógenos pueden inducir mecanismos de tolerancia, como estrategia para evadir al sistema inmune. De esta manera, la manipulación del sistema inmune de mucosas les posibilita a los microorganismos patógenos ejercer sus efectos patogénicos.

Es importante resaltar que existe un control mutuo entre los microorganismos individuales de la microbiota y las células del sistema inmune de mucosas. La consecuencia de este delicado –pero altamente controlado– balance, determina que con una microbiota sana y un sistema inmune maduro, la activación de este sistema debería producirse cuando se detecta la presencia de un patógeno, mientras que se deberían inducir los mecanismos de tolerancia ante la exposición a un microorganismo comensal o a un antígeno inocuo.

Se ha observado que la composición de la microbiota en niños con alergia alimentaria difiere de la de un individuo no alérgico [11, 12], lo cual probablemente provoque un funcionamiento anómalo de los mecanismos de tolerancia. Esta hipótesis es muy difícil de probar aunque ha sido estudiada en modelos animales y se ha demostrado que es posible desencadenar cuadros de alergia simplemente alterando la flora intestinal mediante la administración de antibióticos [13].

En conjunto, estos cambios en el medio ambiente, los hábitos de vida y la misma globalización (migración de individuos, incorporación de dietas nuevas, y a veces exóticas, o la modificación de dietas preexistentes por acceso a nuevos alimentos)

han determinado que actualmente las alergias sean las inmunopatologías de mayor prevalencia en el mundo. La misma tendencia se ha observado con las alergias alimentarias, que constituyen un problema sanitario preocupante en muchos países [14], incluyendo el nuestro.

El mejor conocimiento del funcionamiento del sistema inmune de mucosas, junto con los avances en la metodología de caracterización de los mecanismos inmunes involucrados en las reacciones alérgicas, han determinado que en pacientes con alergias alimentarias la causa de las reacciones alérgicas o malfuncionamiento del sistema inmune frente a los alérgenos son las fallas de la tolerancia inmune mucosal. Estos hallazgos han impactado en los tratamientos para esta patología, ponderando las alteraciones en la composición de la microbiota como una posible causa de un mal funcionamiento del sistema inmune de mucosas. Las inmunoterapias más modernas están enfocadas a restaurar los mecanismos de tolerancia específica a través de la administración controlada del alérgeno por una vía mucosal y, más recientemente, a recomponer la microbiota mediante la administración de probióticos o metabolitos de los microorganismos de la microbiota [15]. Dado que no existe todavía ninguna inmunoterapia aprobada para alergias alimentarias, se están realizando denodados esfuerzos para lograr tratamientos con la seguridad y eficacia adecuados. En este sentido, los notables avances producidos en las últimas décadas en cuanto a la metodología desarrollada para caracterizar la composición de la microbiota han impactado notoriamente en este aspecto, y actualmente existen ensayos clínicos en desarrollo que combinan tratamientos convencionales con el empleo de probióticos [16, 18].

I.C. MECANISMOS DE TOLERANCIA

Como ya hemos mencionado, la mucosa del tracto gastrointestinal constituye la “principal puerta de entrada” de los patógenos y de nutrientes, por lo cual es un tejido que se encuentra permanentemente desafiado por estímulos antigénicos. Esto determina que allí se encuentre la mayor concentración de células inmunes del organismo. Para evitar un estado de activación e inflamación continua, los mecanismos que prevalecen son los de tolerancia. Esto ocurre en todas las mucosas, pero principalmente en la intestinal, dado que es la más compleja desde el punto de vista del desafío antigénico constante.

Un aspecto muy importante en el estudio de los factores que influyen en la instauración de los mecanismos de tolerancia, es la presencia y composición de la microbiota. Numerosos estudios, basados en el empleo de diferentes modelos experimentales, han demostrado la importancia de los componentes de la microbiota en la maduración del sistema inmune de mucosas. Animales crecidos en bioterios libres de gérmenes muestran prácticamente una ausencia total del mismo y más recientemente se ha comenzado a comprender cómo la composición de la microbiota afecta la salud del organismo en general, y cómo puede generar distintas inmunopatologías e inclusive patologías no asociadas a priori con el sistema inmune.

Este complejo y altamente regulado control inmunológico de la microbiota es el producto de la co-evolución del sistema inmune y de los microorganismos que forman parte de la microbiota (microorganismos patógenos y comensales). La comprensión de las bases biológicas y fisiológicas de estos procesos permitirá en un futuro una mejor comprensión de los mecanismos inmunopatogénicos que dan origen a patologías asociadas al sistema inmune y otras no relacionadas, como así también al desarrollo de nuevas terapias de inmunointervención, tanto para activar (en procesos infecciosos y tumorales) como para controlar (en situaciones de autoinmunidad, alergias, etc) al sistema inmune.

Se define como **tolerancia oral** al proceso por el cual el sistema inmune responde con menor intensidad frente a un antígeno que ingresa por la vía oral. Si este mismo antígeno ingresara por primera vez por una vía no mucosal al organismo, generaría –por el contrario– una activación inmunológica. Si este antígeno ingresa en primera instancia por la vía oral y luego lo hace por vía sistémica, también se observa una menor respuesta sistémica, y este mecanismo se denomina **tolerancia sistémica**. Si bien la administración del antígeno por otras vías mucosales, diferentes al tracto gastrointestinal, puede generar mecanismos de tolerancia, las condiciones y los mecanismos involucrados no se conocen en forma tan precisa. Estos efectos tolerogénicos han sido demostrados en modelos experimentales y también en seres humanos, confirmando que es posible inducir tolerancia en intestino o pulmón mediante la administración del antígeno por las vías nasal o sublingual.

Los tres mecanismos que permiten mantener la homeostasis intestinal, son: i) **anergia clonal** de linfocitos T; ii) **delección** de linfocitos T y iii) **supresión** por linfocitos T. Por el alcance de este capítulo, no es posible desarrollar estos mecanismos, pero existe bibliografía específica a la que se puede acceder [17-18].

II. MICROBIOTA Y ENFERMEDADES ALÉRGICAS

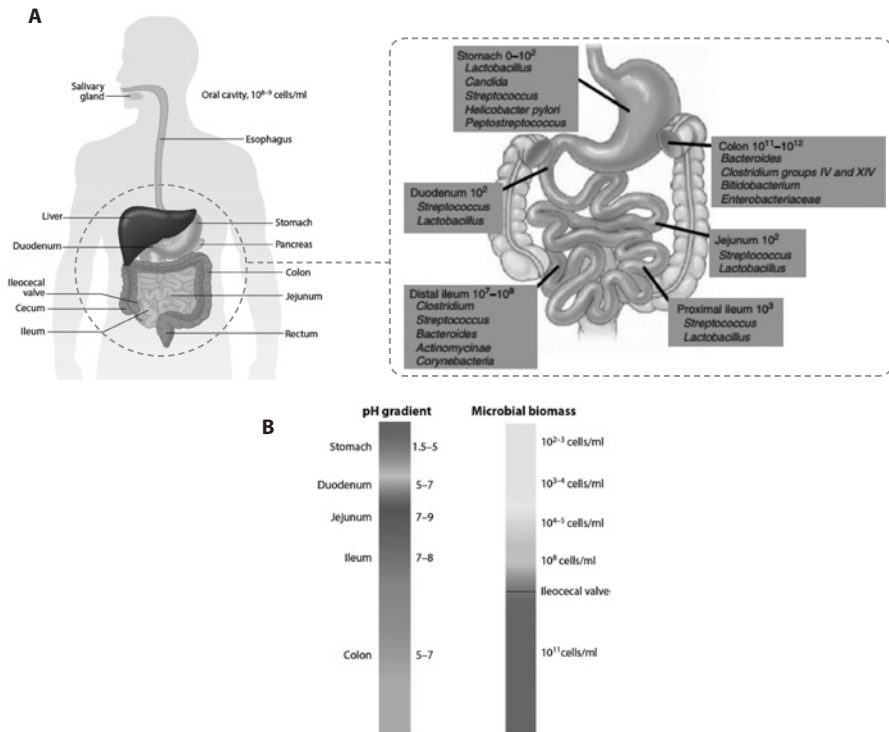
Desde la etapa intrauterina y luego del nacimiento, las distintas mucosas se colonizan con diferentes microorganismos, que son los que constituirán la microbiota. Esta población de microorganismos varía según distintos factores que se están tratando de definir, y van desde el tipo de nacimiento (parto o cesárea), la dieta y la edad, hasta los medicamentos consumidos, entre otros. En conjunto, estos factores hacen que se trate de una comunidad de microorganismos altamente variable entre individuos, e incluso entre las distintas mucosas de un mismo individuo, según el sistema inmune que se encuentra asociado a cada mucosa. Durante los primeros años de vida se producen marcados cambios en la composición de la microbiota, principalmente en términos de la cantidad y variedad de microorganismos que la constituyen; se estima que esta variación se reduce y que la población de microorganismos se estabiliza luego de los 1000 días posteriores al nacimiento, que se mantiene con una mínima variabilidad en la adultez y que luego se modifica en la vejez.

El desarrollo de metodologías adecuadas –en particular, la combinación de cultivos con técnicas de biología molecular– para la caracterización de la composición de la microbiota, ha permitido realizar notables avances en este campo. Esto ha posibilitado comenzar a definir lo que se denomina microbiota saludable o “sana” y microbiota “enferma” –una condición denominada disbiosis– que predispone o genera patologías inflamatorias –alergia, enfermedad de Crohn, celiaquía, autoinmunidad, cáncer, entre otras–, o patologías metabólicas –diabetes, obesidad, aterosclerosis– o psiquiátricas, como la demencia o el autismo.

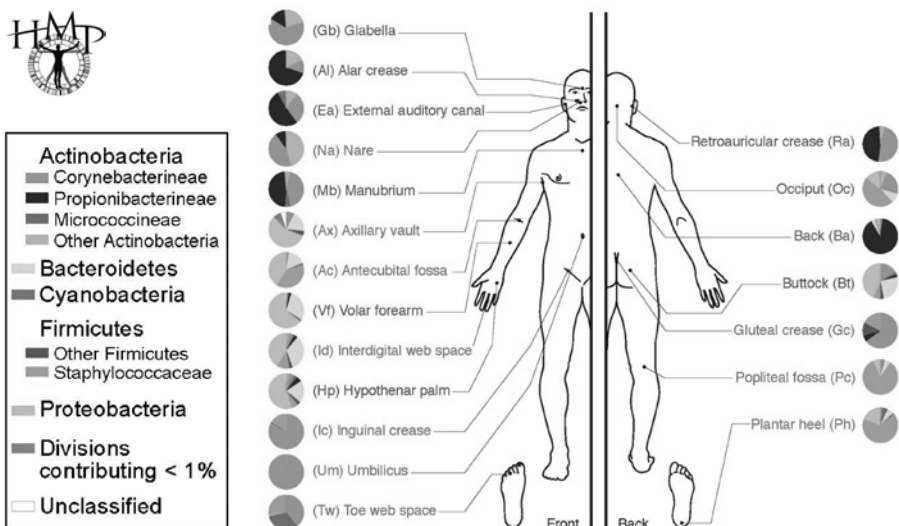
La microbiota tiene distintas funciones en cada mucosa, pero una de las principales es la de aportar funciones metabólicas. Si se considera la carga genética de un organismo, la microbiota tiene aproximadamente 150 veces más genes que el organismo hospedador (3×10^6 genes en la microbiota, contra 2×10^5 en el hospedador, aproximadamente), lo cual significa que aporta numerosas funciones metabólicas que complementan a las del organismo hospedador. Debe considerarse, incluso, que el número de microorganismos en intestino es igual o 10 veces superior al total de células eucarióticas del organismo (10^{14} microorganismos, contra 10^{13} células en el hospedador). El conjunto de células procariotas, con sus respectivos genomas, se denomina **microbioma**. Este microbioma es el reflejo de un proceso evolutivo tanto del organismo hospedador como de los microorganismos, en una simbiosis que permite considerar al contenido luminal del intestino como un órgano adicional de nuestro organismo. Para comprender cómo interacciona el microbioma con el sistema inmune de mucosas y la salud en general, necesitamos conocer cómo se distribuye esa microbiota a lo largo del tracto gastrointestinal, cómo es la composición en homeostasis intestinal en las distintas etapas de la vida (microbiota sana) y definir asociaciones entre disbiosis y patologías.

En los seres humanos, han sido descritas más de 10 divisiones o *filum* de bacterias, junto a numerosos virus, parásitos, archaeas y levaduras. El 90% de las bacterias son anaeróbicas y están principalmente colonizando la cavidad oral y el colon (10^9 – 10^{12} microorganismos/ml) (ver **Figura 2**). En el intestino humano los *filum* más abundantes son *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacterias* (incluyen el orden *Enterobacterias*) y *Actinobacterias*. Los dos primeros *filum* son los más abundantes y *Proteobacterias* constituyen menos del 1% en adultos sanos; en dicho grupo se incluyen bacterias patógenas y oportunistas como: *Salmonella*, *Shigella*, *Helicobacter* y *Escherichia coli*.

Existe un número creciente de trabajos que han demostrado cómo especies individuales de bacterias comensales (17 especies de *Clostridium*, *Bacteroides fragilis*, etc) son indispensables para la inducción de Treg productores de IL-10 o TGF- β ; se conocen inclusive los metabolitos o componentes generados por estas bacterias que son los responsables de esta función, como ocurre con el polisacárido A de *Bacteroides fragilis*.

Figura 2. Distribución de microorganismos en el tracto gastrointestinal.

Se observan las variaciones en función del pH, y la densidad de organismos.

Figura 3. Distribución cualitativa y cuantitativa de microorganismos en las diferentes microbiotas humanas, elucidadas por el Proyecto Microbioma Humano (HMP).

La **hipótesis de la higiene modificada** postula que modificaciones en la composición de la microbiota son responsables de las alteraciones a nivel de los mecanismos de tolerancia mucosal, principalmente por defectos a nivel de los Treg y síntesis de IgA, y que es esto lo que influye en la falta de regulación de los mecanismos Th1-dependientes (enfermedades autoinmunes) o Th2-dependientes (alergias), según la constitución genética del individuo. El desafío actual es definir qué es una microbiota sana, qué es una disbiosis y con qué patologías está asociada. Una vez definidas estas asociaciones, se podrán plantear estrategias terapéuticas no sólo dirigidas a intervenir el tejido mucosal, sino también la composición de la microbiota (o *microbiota-targeted therapies*). Conociendo cómo las mucosas están relacionadas entre sí, es posible intervenir una mucosa y modificar otras mucosas distantes (inmunoterapias mucosales, como la sublingual o intranasal).

En pacientes con alergia alimentaria uno de los principales factores predisponentes para el desarrollo de alergias alimentarias es el nacimiento por cesárea. Se ha reportado que afecta la composición del microbioma del recién nacido y predispone al desarrollo de enfermedades alérgicas durante los primeros años de vida [19]. En pacientes pediátricos con alergia alimentaria, se han caracterizado microbiotas disbióticas en intestino delgado. En pacientes con eccema, se observó una menor diversidad de la microbiota total en el primer mes de vida y una menor diversidad de *Bacteroidetes* y *Proteobacterias*, junto a una mayor abundancia de microorganismos enteropatógenos (*Eschericia coli*, *Clostridium difficile*). En un trabajo reciente de Bunyavanich y colaboradores, se estudió el impacto de la microbiota en la historia natural de la alergia a leche de vaca en pacientes de 3-6 meses de edad (alergia alimentaria más frecuente en población pediátrica). Los autores encontraron que en los primeros años de vida la influencia de la composición de la microbiota en la resolución de la patología es fundamental, y que un enriquecimiento en los géneros *Clostridia* y *Firmicutes* se encontró en aquellos pacientes que desarrollaron tolerancia y resolvieron la alergia a los 8 años de edad, con una mayor diversidad de bacterias [20]. Dado que cada vez se observa con mayor frecuencia la persistencia de esta condición en adultos, estos resultados son importantes y permiten plantear el uso de estas bacterias como probióticos para prevenir la continuidad de la alergia a leche de vaca luego de la niñez.

En general se ha observado en disbiosis asociadas a patologías que las alteraciones no son de componentes individuales, sino de comunidades o conjuntos de microorganismos, siendo muy común la restricción de la diversidad de los mismos. Además, existen diversos trabajos que demuestran que el establecimiento de una microbiota sana a edades tempranas es fundamental para establecer los mecanismos de tolerancia inmunológica que determinan la homeostasis intestinal y un estado saludable general.

III. TRATAMIENTOS BASADOS EN EL EMPLEO DE PROBIÓTICOS, ENSAYOS CLÍNICOS EN PACIENTES ALÉRGICOS

Para definir tratamientos preventivos o terapéuticos es necesario caracterizar:

- la composición del microbioma según sexo, edad, etc.;
- definir microbiomas disbióticos;
- establecer asociaciones entre microbiomas disbióticos y patologías;
- elucidar funciones de comunidades de microorganismos o probióticos individuales, o de los metabolitos producidos por ellos;
- definir en qué tipo de microbiota es posible modificar su composición para prevenir o revertir procesos inflamatorios agudos o crónicos;
- identificar mejoras clínicas dependiendo del tratamiento y la patología;

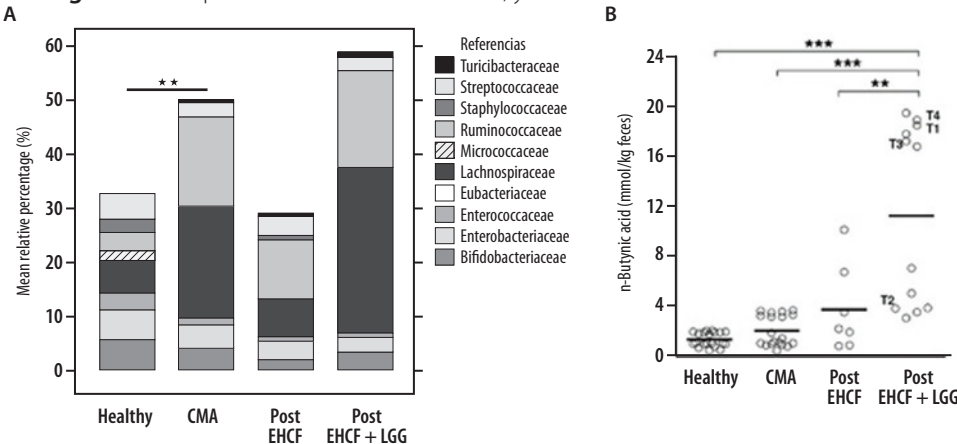
Se han planteado diferentes estrategias de intervención que van desde una dieta adecuada rica en fibras o empleo de prebióticos, restringir el uso de antibióticos y otros fármacos (esteroides, anti-psicóticos), y estimular la lactancia materna, hasta el empleo de comunidades microbianas, empleo de probióticos individuales o mezclas bacterianas, empleo de metabolitos microbianos, reemplazo de la microbiota completa (transplante fecal), combinar inmunoterapias con probióticos, suplementar tratamientos convencionales con probióticos o metabolitos microbianos, etc.

A partir del año 2000, se han incrementado los esfuerzos para dilucidar estos puntos, y la formación de consorcios internacionales ha permitido lograr grandes avances. Entre el 2004 y el 2017 se han publicado casi 2000 trabajos en este campo, y en particular en el trabajo PRACTALL 2017 [21], fruto del esfuerzo conjunto entre miembros del *American Academy of Allergy, Asthma & Immunology* y el *European Academy of Allergy and Clinical Immunology*, se ha llegado a un consenso en la caracterización de los microbiomas de pacientes con asma, dermatitis atópica y alergia alimentaria, así como en las estrategias de intervención terapéutica.

En lo que respecta al empleo de probióticos preventivos en asma y rinitis, existen solo 4 trabajos (con placebo y al azar), y no muestran un efecto clínico benéfico por la administración de probióticos (individuales o mezclas definidas). Sin embargo, reflejan que estos tratamientos inducen cambios en la composición de su microbiota [22-25]. Asimismo, existen numerosos trabajos que estudian el efecto de los probióticos en pacientes con rinitis y prurito, e inclusive el meta-análisis de Zajac y colaboradores, en el cual evaluaron 23 ensayos clínicos que enrolaron 1919 pacientes riniticos, pero no se observan resultados concluyentes [26]. En lo que respecta a la dermatitis atópica, se

han obtenido resultados más alentadores en cuanto al control de la sintomatología al administrar mezcla de probióticos para tratar esta afección [27], e inclusive se ha podido caracterizar la composición de la microbiota en pacientes con dermatitis atópica asociada a alergia alimentaria [28], situación muy habitual en pediatría. Finalmente, y con respecto a la asociación de microbiota disbiótica en pacientes con alergias alimentarias, existen numerosos trabajos que permiten establecer determinadas variaciones en la composición; estos trabajos señalan una menor diversidad de flora, predominio de *Clostridium*, menor diversidad de *Bacteroides* al primer mes de vida y de *Proteobacterias* a los 12 meses, niños no alérgicos con mayor diversidad de *Proteobacterias* al año de edad, etc [29]. Esto ha permitido plantear y realizar importantes ensayos clínicos en los que se busca restablecer tolerancia y además lograr efectos benéficos a tiempos prolongados una vez suspendido el tratamiento. En los estudios multicéntricos de Berni Canani y colaboradores, se administraron hidrolizados extensivos de caseína suplementada con *Lactobacillus* GG en pacientes con alergia a leche de vaca y se observó una adquisición de tolerancia en un mayor número de pacientes y a tiempos menores con respecto a pacientes que solo recibieron el sustituto lácteo; además, estos pacientes presentaron una microbiota con composición diferente y mayor producción de butirato (ver **Figura 4**) [12-15].

Figura 4. Composición de microbiota fecal, y contenido de butirato.



En el panel (a) se observa la composición de microbiota fecal, y en el panel (b) el contenido de butirato.

Uno de los trabajos más importantes en alergia alimentaria es el de Hsiao y colaboradores, en el que tratan pacientes pediátricos alérgicos al maní con inmunoterapia oral con maní y *L. rhamnosus* CGMCC 1.3724 durante 18 meses. Se realizó un seguimiento de los pacientes 4 años luego de finalizado y suspendido el tratamiento, y se observó que el tratamiento combinado fue estadísticamente significativo en la eliminación de síntomas, reducción de los niveles séricos de IgE y negativización de las pruebas cutáneas y de desafío oral [30, 36].

Finalmente, y con respecto al trasplante de microbiota fecal, existen numerosos trabajos, pero los resultados son muy preliminares como para concluir acerca de la eficacia de los mismos. Resta aún mucho camino por recorrer para definir qué consorcio de microorganismos utilizar dependiendo de la condición del receptor, origen de la microbiota (dador), vía de administración, enriquecimiento con microorganismos de otras mucosas, etc. En el trabajo de Sheng-Xuan Liu y colaboradores, pacientes pediátricos con colitis alérgica severa que no respondieron a tratamientos habituales recibieron un trasplante fecal de parientes sanos por la vía rectal, y 15 meses más tarde mostraron una marcada mejoría clínica. Este tratamiento mostró ser seguro y mejoró la diversidad de la composición de la microbiota de los pacientes [31]. Actualmente, se está investigando la seguridad y eficacia del trasplante fecal en adultos. El primer ensayo clínico en fase 1 empleando cápsulas con microbiota fecal de dadores no alérgicos por vía oral, se está realizando en Estados Unidos por el grupo de Chatila y Hohmann en el Boston Children's Hospital (NCT02960074, 2017-2019).

Por lo tanto, es muy prematuro aún establecer conclusiones sobre la efectividad del consumo de probióticos para la prevención de enfermedades alérgicas. Sin embargo, se han demostrado ciertos efectos benéficos en la salud de los pacientes, que por la gran heterogeneidad de los ensayos clínicos es difícil actualmente compararlos y arribar a conclusiones que permitan establecer guías terapéuticas o posiciones internacionales. Inclusive tampoco existe consenso sobre cuáles son los potenciales beneficios clínicos a obtener en los pacientes.

Existen además diversos puntos aún no explorados que podrían mejorar la eficacia de estos procedimientos, pero que al mismo tiempo introducen mayor heterogeneidad en las variables a considerar y son los siguientes.

- **¿Es posible intervenir sobre la composición de la microbiota independientemente de en qué momento se observa o produce la disbiosis?** Es importante considerar que cambios en la composición de la microbiota a edades tempranas determinan el curso de la enfermedad alérgica.
- **¿El origen de la microbiota o los probióticos es importante en la eficacia del tratamiento de una determinada alergia?** El tratamiento de una afección cutánea, como la urticaria, o el eccema, se controla más eficientemente con la administración de microorganismos de la microbiota cutánea? Mejora la eficacia del tratamiento si se administran por vía cutánea para afecciones cutáneas, o por la vía nasal para afecciones del árbol respiratorio o bronquiales?
- **¿Es necesario considerar otro tipo de microorganismos además de los bacterianos cuando se analiza la composición de la microbiota?** Existe también un bioma fúngico y uno viral, y se han identificado en intestino virus comensales con efectos inmunomoduladores.

Todos estos aspectos que se conocen, e interrogantes que se plantean, indican la limitada comprensión que tenemos de la interacción entre el microbioma y el sistema inmune y el desarrollo que está teniendo actualmente el avance del conocimiento de esta asociación entre eucariotes y procariotes. Se trata de una comunidad que a lo largo de la evolución ha aprendido a convivir en simbiosis para provecho mutuo. A pesar de todas estas limitaciones e interrogantes que se originan, estamos en un gran momento de adquisición de conocimientos sobre el rol de la microbiota en la salud humana. Un aspecto que merece ser destacado es que la alimentación y las dietas son factores fundamentales para controlar la composición de la microbiota y probablemente la salud del organismo.

V. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- [1] Wang J, Sampson HA. Food allergy. *J Clin Invest*. 2011 Mar;121(3):827-35.
- [2] Sicherer S.H., Muñoz-Furlong A., Sampson H.A. (2003) Prevalence of peanut and tree nut allergy in the United States determined by means of a random digit dial telephone survey: a 5-year follow-up study. *J Allergy Clin Immunol*. 112, 1203-7.
- [3] Devereux G. (2006) The increase in the prevalence of asthma and allergy: food for thought. *Nat Rev Immunol*. 6, 869-74.
- [4] Sicherer S.H., Muñoz-Furlong A., Godbold J.H, Sampson H.A. (2010) US prevalence of self-reported peanut, tree nut, and sesame allergy: 11-year follow-up. *J Allergy Clin Immunol*. 125, 1322-6.
- [5] Strachan DP. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ*. 1989 Nov 18;299(6710):1259-60.
- [6] Okada H1, Kuhn C, Feillet H, Bach JF. The 'hygiene hypothesis' for autoimmune and allergic diseases: an update. *Clin Exp Immunol*. 2010 Apr;160(1):1-9.
- [7] Bach JF. The effect of infections on susceptibility to autoimmune and allergic diseases. *N Engl J Med*. 2002 Sep 19;347(12):911-20.
- [8] Wills-Karp M., Santeliz J., Karp C.L. (2001) The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat Rev Immunol*. 1, 69-75
- [9] Sudo N., Sawamura S., Tanaka K., Aiba Y., Kubo C., Koga Y. (1997) The requirement of intestinal bacterial flora for the development of an IgE production system fully susceptible to oral tolerance induction. *Journal of Immunology* 159, 1739-45.
- [10] Wannemuehler M.J., Kiyono H., Babb J.L., Michalek S.M., McGhee J.R. (1982)

Lipopolysaccharide (LPS) regulation of the immune response: LPS converts germfree mice to sensitivity to oral tolerance induction. *J Immunol.* 129, 959-65..

[11] Ouwehand A.C., Isolauri E., He F., Hashimoto H., Benno Y., Salminen S. Differences in *Bifidobacterium* flora composition in allergic and healthy infants. *J Allergy Clin Immunol.* 108, 144-5.

[12] Berni Canani R, Sangwan N, Stefka AT, Nocerino R, Paparo L, Aitoro R, Calignano A, Khan AA, Gilbert JA, Nagler CR. (2016). *Lactobacillus rhamnosus* GG-supplemented formula expands butyrate-producing bacterial strains in food allergic infants. *ISME J.* 10(3):742-50.

[13] Bashir ME, Louie S, Shi HN, Nagler-Anderson C. (2004) Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. *J Immunol* 1, 6978-87.

[14] Gupta R., Sheikh A., Strachan D.P., Anderson H.R. (2007) Time trends in allergic disorders in the UK. *Thorax* 62, 91-6.

[15] Berni Canani R, Nocerino R, Terrin G, Frediani T, Lucarelli S, Cosenza L, Passariello A, Leone L, Granata V, Di Costanzo M, Pezzella V, Troncone R. (2013). Formula selection for management of children with cow's milk allergy influences the rate of acquisition of tolerance: a prospective multicenter study. *J Pediatr.* 163(3):771-7.e

[16] Kuang-Chih Hsiao, Anne-Louise Ponsonby, Christine Axelrad, Sigrid Pitkin, Mimi L K Tang, on behalf of the PPOIT Study Team (2017). Long-term clinical and immunological effects of probiotic and peanut oral immunotherapy after treatment cessation: 4-year follow-up of a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *The Lancet Child & Adolescent Health* 1 (2): 97-105.

[17] Strobel S, Mowat AM. Oral tolerance and allergic responses to food proteins. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.*6(3):207-13.

[18] Pabst O, Mowat AM. (2012). Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol.*5(3):232-9.

[19] Papathoma E, Triga M, Fouzas S, Dimitriou G. (2016). Cesarean section delivery and development of food allergy and atopic dermatitis in early childhood. *Pediatr Allergy Immunol.* 2016 Jun;27(4):419-24.

[20] Bunyavanich S, Shen N, Grishin A, Wood R, Burks W, Dawson P, Jones SM, Leung DYM, Sampson H, Sicherer S, Clemente JC. Early-life gut microbiome composition and milk allergy resolution. *J Allergy Clin Immunol.* 138(4):1122-1130.

[21] Huang YJ, Marsland BJ, Bunyavanich S, O'Mahony L, Leung DY, Muraro A, Fleisher TA. (2017). The microbiome in allergic disease: Current understanding and future opportunities-2017 PRACTALL document of the American Academy of Allergy, Asthma & Immunology and the European Academy of Allergy and Clinical Immunology. *J Allergy Clin*

Immunol. 139(4):1099-1110.

[22] Giovannini M1, Agostoni C, Riva E, Salvini F, Ruscitto A, Zuccotti GV, Radaelli G; Felicita Study Group. (2007). A randomized prospective double blind controlled trial on effects of long-term consumption of fermented milk containing *Lactobacillus casei* in pre-school children with allergic asthma and/or rhinitis. *Pediatr Res.* 62(2):215-20.

[23] West CE, Hammarström ML, Hernell O. (2013). Probiotics in primary prevention of allergic disease--follow-up at 8-9 years of age. *Allergy.* 68(8):1015-20.

[24] Abrahamsson TR, Jakobsson T, Björkstén B, Oldaeus G, Jenmalm MC (2013). No effect of probiotics on respiratory allergies: a seven-year follow-up of a randomized controlled trial in infancy. *Pediatr Allergy Immunol.* 24(6):556-61.

[25] Zuccotti G, Meneghin F, Aceti A, Barone G, Callegari ML, Di Mauro A, Fantini MP, Gori D, Indrio F, Maggio L, Morelli L, Corvaglia L; Italian Society of Neonatology. (2015). Probiotics for prevention of atopic diseases in infants: systematic review and meta-analysis. *Allergy.* 70(11):1356-71.

[26] Zajac AE, Adams AS, Turner JH. (2015). A systematic review and meta-analysis of probiotics for the treatment of allergic rhinitis. *Int Forum Allergy Rhinol.* ;5(6):524-32.

[27] Navarro-López V, Ramírez-Boscá A, Ramón-Vidal D, Ruzafa-Costas B, Genovés-Martínez S, Chenoll-Cuadros E, Carrión-Gutiérrez M, Horga de la Parte J, Prieto-Merino D, Codoñer-Cortés FM. (2018). Effect of Oral Administration of a Mixture of Probiotic Strains on SCORAD Index and Use of Topical Steroids in Young Patients With Moderate Atopic Dermatitis: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Dermatol.* 1;154(1):37-43.

[28] Fieten KB, Totté JEE, Levin E, Reyman M, Meijer Y, Knulst A, Schuren F, Pasmans SGMA. (2018). Fecal Microbiome and Food Allergy in Pediatric Atopic Dermatitis: A Cross-Sectional Pilot Study. *Int Arch Allergy Immunol.* 175(1-2):77-84.

[29] Ling Z, Li Z, Liu X, Cheng Y, Luo Y, Tong X, Yuan L, Wang Y, Sun J, Li L, Xiang C. (2014). Altered fecal microbiota composition associated with food allergy in infants. *Appl Environ Microbiol.* 80(8):2546-54.

[30] Dunn Galvin A, McMahon S, Ponsonby AL, Hsiao KC, Tang MLK; PPOIT study team. (2018). The longitudinal impact of probiotic and peanut oral immunotherapy on health-related quality of life. *Allergy.* 73(3):560-568.

[31] Liu SX, Li YH, Dai WK, Li XS, Qiu CZ, Ruan ML, Zou B, Dong C, Liu YH, He JY, Huang ZH, Shu SN. (2017). Fecal microbiota transplantation induces remission of infantile allergic colitis through gut microbiota re-establishment. *World J Gastroenterol.* 23(48):8570-8581.

EVIDENCIA DE LA EFECTIVIDAD DE LOS PROBIÓTICOS EN PROGRAMAS SOCIALES

Julio Villena

- *Laboratorio de Inmunobiotecnología. Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-Conicet). Chacabuco 145 - T4000ILC. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.*

Susana Alvarez

- *Laboratorio de Inmunobiotecnología. Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-Conicet). Chacabuco 145 - T4000ILC. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.*

Graciela Font

- *Laboratorio de Tecnología y Desarrollo. Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-Conicet).*

Susana Salva

- *Laboratorio de Inmunobiotecnología. Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-Conicet). Chacabuco 145 - T4000ILC. San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.*

María Pía Taranto

- *Laboratorio de Tecnología y Desarrollo. Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-Conicet).*

RESUMEN

El proyecto "Yogurito" se inició con el desarrollo de un alimento probiótico, en forma de yogur adicionado con la cepa probiótica *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 (PB1505), cuya caracterización funcional y tecnológica está ampliamente documentada por investigadores de CERELA-Conicet. Mediante estudios clínicos se demostró que el consumo de este producto probiótico aumenta las defensas naturales y previene infecciones respiratorias e intestinales, los eventos infecciosos de mayor relevancia en la niñez. Actualmente el proyecto incluye otros alimentos funcionales solidarios (Chocolet, Queso Probiótico) y un suplemento nutricional con el cultivo PB1505 deshidratado, de fácil transporte y uso, que se consume agregado a bebidas, postres, etc.,

denominado Biosec. El programa "Yogurito" tuvo otros impactos: contribuyó al fortalecimiento de la cuenca y la innovación en PYMES al introducir alimentos funcionales, así como la generación de conocimiento tecnológico en el ámbito de Ciencia y Tecnología, entre otros. La cartera de "leches sociales probióticas" beneficia a unos 280.000 escolares en la provincia de Tucumán y unos 100.000 en otras provincias y Municipios como Santiago del Estero, Entre Ríos, Misiones, Luján, entre otros. Este proyecto de transferencia social, vigente desde 2008 en la Provincia de Tucumán (convenio Conicet-Gobierno de Tucumán-empresa), constituye un paradigma de interacción entre el sector de Ciencia y Tecnología, el sector productivo y el Estado, para mejorar la calidad de vida de poblaciones de alta vulnerabilidad.

I. INFECCIONES INTESITNALES Y RESPIRATORIAS EN NIÑOS

En la actualidad, el mundo se enfrenta a dos problemas fundamentales relacionados a la nutrición: la desnutrición y la alimentación excesiva. Estas dos formas de malnutrición presentan riesgos considerables para la salud humana. Las crecientes tasas de sobrepeso y obesidad en todo el mundo están asociadas a un aumento en las enfermedades crónicas como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Por otro lado, la desnutrición es uno de los factores que más contribuyen a la carga mundial de morbilidad afectando con cifras crecientes a las personas más vulnerables de los países en vías de desarrollo. Más de una tercera parte de las defunciones infantiles en todo el mundo se atribuyen a la desnutrición y a su profundo impacto sobre el sistema inmunológico y la resistencia del huésped a las infecciones. En este sentido, la neumonía y la diarrea siguen siendo las principales causas de muerte de niños. En conjunto, estas dos enfermedades infecciosas representan el 29% de las causas de muerte de niños menores de 5 años de edad y dan como resultado la pérdida de 2 millones de vidas jóvenes cada año [1].

La prevención de infecciones en niños desnutridos se ha realizado tradicionalmente mediante el tratamiento con antibióticos de amplio espectro, incluso en ausencia de signos visibles de infección [2]. La razón de ello se basa en tres observaciones: a) los niños desnutridos tienen con frecuencia infecciones bacterianas (incluyendo bacteriemia); b) el diagnóstico de infecciones en los niños desnutridos es difícil debido a que las manifestaciones clínicas de infección (por ejemplo fiebre) pueden no ser evidentes; y c) los niños desnutridos tienen alteraciones de la microbiota y sobrecrecimiento bacteriano en el intestino, con incrementos de translocación bacteriana a sangre. De este modo, se considera que este enfoque tiene una base sólida y racional, y recientemente se han publicado estudios demostrando pruebas de su eficacia [2]. La reducción sustancial de la mortalidad en niños desnutridos mediante los tratamientos con antibióticos sugiere que esta práctica puede ser empleada de rutina. Sin embargo, se han detectado dos problemas importantes asociados a esta estrategia: a) la reducción de la eficacia debido al incremento de la resistencia a antibióticos, y b) el incremento de infecciones que no pueden ser prevenidas por antibióticos tales como las producidas por virus. Por esta razón, se han propuesto estrategias independientes del uso de antibióticos que brinden un espectro de protección más amplio. En ese sentido, la modulación del sistema inmunológico para incrementar la resistencia a infecciones en niños en general, y en aquellos inmunocomprometidos por desnutrición en particular, parece ser una buena alternativa.

II. LOS MICROORGANISMOS BENEFICIOSOS COMO ALTERNATIVA PARA COMBATIR INFECCIONES

En el año 2013, la OMS junto a UNICEF publicaron un plan de acción global integrado

para la prevención y control de la neumonía y la diarrea [1], el cual propone intervenciones para crear ambientes saludables, promueve prácticas para proteger a los niños de las enfermedades infecciosas y se asegura de que todos los niños tengan acceso a medidas preventivas y de tratamiento apropiadas. El documento enfatiza la importancia de la alimentación saludable de los niños y la recuperación rápida y eficiente de los pacientes desnutridos para reducir la incidencia y la severidad de neumonías y diarreas.

Con un objetivo ambicioso pero viable, la OMS se propone terminar con la mortalidad infantil asociada a neumonía y diarrea para el año 2025, empleando tres estrategias principales: a) **protección**: fundamentalmente a través del cuidado de una alimentación saludable; b) **prevención**: mediante el empleo de vacunas eficaces y creación de ambientes saludables; y c) **tratamiento**: promoviendo que todos los niños tengan acceso a medidas apropiadas para manejar las diarreas y neumonías una vez producidas.

En cuanto al primer punto, se considera que la lucha contra la neumonía y la diarrea requeriría de una combinación de acciones simples como promover la lactancia materna exclusiva durante seis meses y su continuación con alimentación complementaria apropiada, sumadas a avances en biotecnología tales como desarrollo de alimentos funcionales altamente eficientes para potenciar la inmunidad en niños. De este modo, los alimentos funcionales capaces de incrementar la inmunidad en niños, incluso en aquellos con compromiso del sistema inmunológico asociados a la desnutrición, podrían tener un papel clave en la disminución de la mortalidad infantil asociada a neumonías y diarreas.

Diversos estudios clínicos y en modelos animales han demostrado la capacidad de las bacterias lácticas probióticas para mejorar la resistencia a infecciones a través de su habilidad para inhibir el crecimiento de patógenos por competencia de nutrientes o la producción de sustancias microbidas, de inhibir la adhesión a las superficies mucosas o de modular favorablemente las respuestas inmunológicas [3-5].

En este sentido, en el marco de proyectos de investigación científica del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-Conicet, Argentina) se seleccionaron cepas de bacterias lácticas probióticas inmunomoduladoras (inmunobióticas), con capacidad de estimular la inmunidad de mucosas e incrementar la resistencia a infecciones. Entre las bacterias con mejores efectos protectores frente a infecciones en los modelos animales se encuentra *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. Se ha reportado que la administración oral de esta cepa inmunobiótica puede modular beneficiosamente la inmunidad local (intestinal) y en sitios mucosos distantes (respiratoria), mejorando la respuesta inmune frente a infecciones bacterianas y virales [6-9].

III. *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* CRL1505 Y SUS MECANISMOS DE ACCIÓN

Se han realizado diversos estudios para dilucidar los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el efecto inmunomodulador de *L. rhamnosus* CRL1505 tales como en estudios *in vitro*, evaluaciones en modelos experimentales *in vivo* y

mediante el empleo de herramientas genómicas.

Para evaluar el efecto local de la cepa CRL1505 se emplearon células epiteliales intestinales (células PIE) y células presentadoras de antígenos (CPAs) de Placas de Peyer porcinas como modelos humanos, dadas las similitudes anatómicas, fisiológicas e inmunológicas del tracto gastrointestinal de ambos huéspedes. Se demostró que *L. rhamnosus* CRL1505 fue efectivo para estimular a las células CD172a⁺CD11R1⁻ (macrófagos) y CD172a⁺CD11R1^{high} y CD172a⁺CD11R1^{low} (células dendríticas) de placas de Peyer de cerdo e inducir la expresión de IL-10 e IFN- γ [10]. Estos cambios se correlacionaron con una mayor resistencia a la infección con *Salmonella* y a un menor daño intestinal asociado a la respuesta inflamatoria tanto en ratones adultos inmunocompetentes [6] como en desnutridos [11].

Se evaluó también el efecto de *L. rhamnosus* CRL1505 en la respuesta transcriptómica de células PIE inducida por la activación de TLR3 [12]. Los resultados mostraron que los cambios más notables inducidos por el desafío con poly(I:C) en las células PIE se registraron en la expresión de interferones de tipo I, factores antivirales y citoquinas seguido de moléculas de adhesión, y factores de los sistemas del complemento y de la cascada de coagulación [12]. Observamos además, que la estimulación con la cepa CRL1505 moduló de manera diferente la expresión génica de las células PIE luego de la activación de TLR3. El tratamiento aumentó la expresión de interferones de tipo I y factores antivirales, y redujo significativamente la expresión de citoquinas y quimioquinas como IL-15. Empleando un modelo murino y desafíos intraperitoneales con el agonista de TLR3 poly(I:C) para inducir una respuesta inflamatoria intestinal, demostramos que la administración oral de *L. rhamnosus* CRL1505 modula beneficiosamente la respuesta inmune antiviral intestinal mediada por linfocitos intraepiteliales [13]. El efecto de la cepa inmunobiótica estuvo asociado a su capacidad para disminuir la producción de citoquinas inflamatorias incluyendo IL-15, incrementar los niveles de IL-10 y reducir el número de células CD3⁺NK1.1⁺ y CD8 α ⁺NKG2D⁺ en intestino, en respuesta a la activación de TLR3. Nuestros resultados indicaron, por primera vez, que una bacteria inmunobiótica es capaz de reducir el daño de células epiteliales intestinales mediadas por el eje TLR3-IL-15-células CD8 α ⁺NKG2D⁺ [13], lo cual es de gran importancia para preservar la integridad de la mucosa intestinal en infecciones como las producidas por rotavirus.

Demostramos además que *L. rhamnosus* CRL1505 puede modular favorablemente la inmunidad en sitios mucosos distantes como el tracto respiratorio y mejorar la resistencia a infecciones pulmonares. Para ello se empleó un modelo de infección por *Streptococcus pneumoniae* en ratones inmunocompetentes. Se observó que la administración oral de la bacteria inmunobiótica, en las dosis apropiadas, incrementa la resistencia a la infección con el patógeno respiratorio. Este efecto se asoció con una mayor activación de la respuesta inmune innata (mayor activación de macrófagos alveolares y reclutamiento de neutrófilos al tejido pulmonar) y adaptativa (mayores niveles de IgA respiratoria e IgG sistémica), acompañada de una modulación de la respuesta inflamatoria [6, 14]. Considerando que la infección neumocócica es más

frecuente y severa en huéspedes inmunocomprometidos, se estudió posteriormente el efecto de *L. rhamnosus* CRL1505 en la resistencia a la infección neumocócica en ratones desnutridos. Se demostró que estos animales tienen una mayor susceptibilidad a la infección que los normales y que el agregado de la cepa inmunobiótica a la dieta de renutrición disminuye significativamente el tiempo necesario para normalizar la respuesta inmune frente al neumococo [6, 15, 16]. La capacidad de la cepa CRL1505 de mejorar la inmunidad respiratoria en los huéspedes desnutridos se asoció en parte a su efecto en médula ósea. Se ha establecido que la malnutrición afecta a los tejidos que tienen una alta velocidad de recambio y proliferación celular como el tejido hematopoyético, lo que conduce a la disminución del número y función de las células inmunes. Al estudiar la influencia de *L. rhamnosus* CRL1505 sobre las poblaciones celulares de médula ósea involucradas en la defensa contra infecciones, se encontró que la bacteria inmunobiótica es capaz de promover la recuperación de los progenitores mieloides (células CD34+ y CD34+Gr-1+) y linfoides (B220^{interm}IgM- y B220^{interm}IgM+) en médula ósea [15, 16]. Reportamos por primera vez que la suplementación dietética con inmunobióticos puede modular la producción de GM-CSF en pulmones infectados y su expresión en médula ósea. *L. rhamnosus* CRL1505 fue capaz de modular el eje de señalización CXCR4/CXCL12, que se asocia con la recuperación de la hematopoyesis [16, 17].

Entre los virus respiratorios, el Virus Influenza (*Influenza Virus*, IFV) y el Virus Sincicial Respiratorio (*Respiratory Syncytial Virus*, RSV) son las causas más importantes de infecciones del tracto respiratorio en niños pequeños, causando una significativa morbilidad y mortalidad, especialmente en los países en desarrollo. Por lo tanto, nuestro siguiente objetivo fue evaluar de su influencia de la cepa CRL1505 en la respuesta inmune respiratoria luego del desafío con IFV o RSV. Demostramos, en ratones adultos e infantes inmunocompetentes, que *L. rhamnosus* CRL1505 es capaz de activar la respuesta inmune Th1 en intestino e inducir la movilización de linfocitos T CD3+CD4+IFN- γ + desde placas de Peyer hacia la mucosa respiratoria, incrementando los niveles de IFN- γ en pulmón e induciendo una activación de células presentadoras de antígenos MHC-II+CD11c+CD11b^{low}CD103+ y MHC-II+CD11c+CD11b^{high}CD103- del tracto respiratorio [18]. Demostramos también que los cambios inducidos por *L. rhamnosus* CRL1505 en el tracto respiratorio, incrementan la resistencia a la infección con RSV [19] y con IFV [20]. Se observó que el tratamiento preventivo con la cepa CRL1505 fue capaz de disminuir el daño pulmonar inducido por la respuesta inflamatoria contra los virus respiratorios, a través de su capacidad para incrementar los niveles de IL-10 en pulmón. Evaluamos también la capacidad de la cepa CRL1505 administrada oralmente para modular la interacción inflamación-coagulación luego del desafío respiratorio con RSV o IFV en ratones adultos. Nuestros resultados revelaron por primera vez, que una bacteria inmunobiótica es capaz de influir beneficiosamente en la respuesta inmuno-coagulativa de pulmón desencadenada por las infecciones virales, mediante la modulación de la producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, así como de la expresión de factor tisular y trombomodulina en el

pulmón [9, 20]. Nuestros datos también indicaron un papel crucial para la IL-10 en la protección inmuno-coagulativa inducida por la cepa CRL1505 durante las infecciones respiratorias virales [9, 20].

Estos estudios en modelos experimentales indican claramente que la cepa inmunobiótica *L. rhamnosus* CRL1505 es una excelente candidata para ser incluida en el desarrollo de alimentos funcionales capaces de incrementar la inmunidad en niños desnutridos y bien nutridos, que ayuden a disminuir de la mortalidad infantil asociada a neumonías y diarreas.

IV. EFECTO DEL *LACTOBACILLUS RHAMNOSUS* CRL1505 EN LA SALUD DE LOS NIÑOS Y EL NACIMIENTO DEL PROGRAMA "YOGURITO"

En el año 2003, la provincia de Tucumán fue tristemente conocida por casos severos de desnutrición infantil. A partir de esta situación, un grupo de investigadores de CERELA sentimos la necesidad de acercar la ciencia y tecnología a poblaciones carenciales y contribuir con nuestro conocimiento y experiencia en un tema de vanguardia: la nutrición funcional. Desarrollamos así un Yogur Probiótico ("Yogurito"), alimento lácteo fermentado conteniendo la cepa inmunobiótica *L. rhamnosus* CRL1505 con capacidad de estimular las defensas naturales (sistema inmunológico) y efecto preventivo de infecciones bronquiales e intestinales. El Yogur Probiótico fue consumido por niños y niñas de 2 a 5 años de edad que concurrían a comedores comunitarios de zonas con necesidades básicas insatisfechas (NBI) de la Provincia de Tucumán, en el marco de una evaluación clínica a doble ciego.

IV. A. ESTUDIO CLÍNICO

Se realizó un estudio clínico a doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo, destinado a evaluar el efecto de un yogur probiótico sobre la salud de niños con NBI. En el proyecto participaron un total de 298 niños de ambos sexo que asistían regularmente a los cuatro comedores comunitarios considerados en el proyecto (Las Talitas, Los Vázquez, Autopista Sur e Inmaculada Concepción de San Cayetano).

- **Yogur Probiótico.** Yogur preparado con un fermento diseñado en CERELA que contiene *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, como fermento iniciador, y *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 como cultivo adjunto.
- **Placebo.** Yogur elaborado con el mismo fermento e iguales condiciones, sin el agregado de la cepa probiótica.
- **Aleatorización.** Se confeccionaron listas con la asignación al azar de los

niños en los grupos placebo y yogur, para cada sitio de estudio. Este procedimiento estuvo a cargo de la división de Estadística de CERELA. Para garantizar la reserva de la asignación, una persona independiente (no perteneciente al Grupo Técnico) supervisó el embalaje y etiquetado de los tratamientos de prueba.

- **Ensayo doble ciego.** El personal interviniente en el estudio, los profesionales de la salud encargados de las evaluaciones, niños, padres y tutores no tenían conocimiento de los códigos de aleatorización. El secreto de los códigos fue garantizado hasta que se completó la entrada de los datos para su análisis.
- **Participantes.** Se seleccionaron para el estudio los niños de edades comprendidas entre los 2 y 5 años, que concurrían a los siguientes comedores comunitarios: Las Talitas, Los Vázquez, Autopista Sur e Inmaculada Concepción (San Cayetano), incluidos en el “Programa Copa de Leche” del Gobierno de la provincia de Tucumán. Los niños seleccionados para el estudio debían cumplir con los siguientes criterios de inclusión y exclusión:
 - a) Criterios de inclusión
 - Niños de 2 a 5 años de edad de ambos sexos.
 - De cualquier estado nutricional.
 - Que asisten regularmente al Comedor Infantil
 - Que acepten participar en forma voluntaria del estudio previo consentimiento de padres o tutores.
 - b) Criterios de exclusión
 - Con enfermedad congénita que afecten al Sistema Digestivo (fibrosis quística, enfermedad celíaca, alergia a la leche de vaca)
 - Con enfermedades Crónicas (displasia pulmonar, EPOC, insuficiencia renal crónica)
 - Que no acepte participar del estudio
- **Duración.** El estudio se desarrolló durante 6 meses. El producto se administró en 5 tomas semanales de lunes a viernes (100 ml por día).

Los aspectos éticos fueron validados por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UNT.

IV. B. ETAPAS DE IMPLEMENTACIÓN

La administración del Yogur Probiótico y el Placebo estuvo a cargo del personal del centro comunitario previamente entrenado, supervisado por estudiantes de la Carrera de Nutrición de la UNSTA e Instituto JIM de San Miguel de Tucumán.

Grupo Probiótico: Recibe 100 g/día de Yogur Probiótico

Grupo placebo: Recibe 100 g/día de placebo que no contiene la bacteria probiótica.

El probiótico y el placebo se administraron diariamente a partir del inicio del estudio durante 6 meses, alternando 5 días de administración y 2 días de descanso semanales.

Control y Seguimiento Clínico y Nutricional:

- a)** Control médico a todos los niños una vez al mes con registro en la historia clínica.
- b)** Encuesta alimentaria.
- c)** Control visual de las porciones que reciben los niños.
- d)** Valoración nutricional (peso/edad, talla/edad y relación peso/talla), según normas del SIPROSA (Lejarraga y Morasso; Lejarraga y Orfila).
- e)** Valoración de la aceptabilidad del producto utilizando escala hedónica.
- f)** Evaluación de eventos infecciosos.
- g)** Ensayos inmunológicos: determinación de IgA en saliva.
- h)** Análisis parasitológicos.

Los datos se registraron por escrito, previo entrenamiento del personal que concurrió diariamente al comedor. Para ello se confeccionó un cuestionario clínico-nutricional donde se hizo constar: datos personales, antecedentes clínicos, heredo-familiares, psicomotrices, ambientales y socioculturales; estado nutricional mediante antropometría (peso, talla), encuesta alimentaria y resultados del examen físico. Se complementó con visitas periódicas de los profesionales responsables al Comedor para reforzar el compromiso y la adhesión del personal al proyecto. Durante los meses de seguimiento se evaluó la aparición de eventos infecciosos relacionados con el aparato gastrointestinal y respiratorio. En esta etapa, los médicos del equipo técnico actuaron en forma coordinada con los responsables de los niños y el personal del centro comunitario utilizando registros por escrito y comunicaciones telefónicas. El seguimiento clínico y nutricional de los grupos probiótico y placebo estuvo a cargo de médicos del Hospital del Niño Jesús y nutricionistas de la División Nutrición del SIPROSA (Sistema Provincial de Salud).

Tanto las evaluaciones realizadas como la metodología empleada se detallan a continuación:

- **Medición basal de la población en estudio: Valoración nutricional de los niños.**

La valoración del estado nutricional se realizó a partir de mediciones e indicadores antropométricos por tratarse de una metodología práctica, confiable y por su sencillez en la interpretación de los datos. Se determinó el tamaño y el estado nutricional de cada uno de los niños y niñas, para lo cual se evaluó peso y talla, utilizándose curvas de distancia.

Se calcularon los siguientes indicadores (*Physical status: the use and interpretation of antropometry. OMS 1995*):

Peso/Edad: refleja la masa corporal alcanzada en relación con la edad cronológica.

Talla/Edad: muestra el crecimiento infantil

Peso/Talla: refleja el peso relativo alcanzado para una talla determinada.

Los indicadores citados se expresaron en forma estandarizada como percentilos (puntos estimativos de una distribución de frecuencias que ubican un porcentaje dado de individuos por debajo o por encima de ellos).

- **Valoración de la aceptabilidad del producto utilizando escala hedónica.**

Se evaluó la calidad del producto desde el punto de vista subjetivo, considerando que el éxito o fracaso de un alimento no depende, solamente, de su composición o de su valor nutricional, sino también de las reacciones totalmente subjetivas vinculadas a una sensación placentera. Se utilizaron pruebas hedónicas momentáneas por el tipo y número de destinatarios, sin entrenamiento y tomando en cuenta que se administraría Yogur Probiótico y Placebo. La escala utilizada fue la hedónica de caritas, con distintas expresiones faciales que van desde el enfado (desagrado total) hasta la felicidad (agrado completo).

- **Ensayos inmunológicos (determinación de IgA en saliva).**

Las muestras de saliva se colectaron con pipetas pasteur estériles, se colocaron en tubos eppendorf rotulados y se refrigeraron inmediatamente para su transporte al laboratorio. Se tomaron muestras antes de comenzar con la administración de probiótico y placebo (nivel basal) y al finalizar el proyecto (post tratamiento). Las determinaciones se realizaron empleando la técnica de ELISA usando anti-IgA humana (cadena alfa específica, SIGMA #I0884). Los niveles totales de anticuerpo fueron cuantificados por el análisis de regresión lineal de los valores de densidad óptica de las muestras contra una curva estándar compuesta de 10 diluciones seriadas de IgA humana (SIGMA #S5018).

- **Control y seguimiento clínico de eventos infecciosos.**

Se investigaron los efectos de la administración del Yogur Probiótico en la prevención de eventos infecciosos, los cuales se definen como sucesos o enfermedad de aparición aguda de origen infeccioso. La recolección de datos se realizó mediante un relevamiento efectuado por médicos pediatras que concurrieron a los comedores. Los datos fueron volcados en planillas individuales para cada niño en donde se anotó la fecha, el tipo de evento infeccioso y las características del mismo.

Se analizaron los siguientes eventos infecciosos:

- Otitis Media Aguda
- Anginas (Faringitis, Amigdalitis, Faringoamigdalitis)
- Catarro de vías aéreas superiores (CVAS)
- Neumonía. Se denomina así a la inflamación aguda del pulmón por causa infecciosa
- Bronquitis aguda (traqueo-bronquitis)
- Diarrea Aguda (Gastroenteritis aguda)
- Infecciones de la piel (impétigo, piodermitis)

- **Análisis parasitológicos.**

Se realizaron a al inicio y al final del estudio, tomándose muestras en frascos estériles en la totalidad de los niños participantes.

- **Procesamiento de los datos y análisis estadístico.**

Se usó un software StatsDirect. El test de Student se usó para comparar las medias de variables continuas de distribución normal. Para las variables de distribución no normal, se usó el test de Mann-Whitney U. El test χ^2 o el test exacto de Fisher se usó para comparar porcentajes. El intervalo de confianza del 95% fue calculado usando el mismo software. La diferencia entre los grupos se consideró significativa para un $p < 0.05$.

IV. C. RESULTADOS DEL ESTUDIO CLÍNICO

- **Valoración de la aceptabilidad del producto utilizando escala hedónica.**

Todos los niños y niñas participantes del estudio consumen habitualmente leche entera en el comedor infantil. Ninguno/a presentó intolerancia a la leche de vaca o derivados. A partir de la administración del Yogur Probiótico, todos los niños manifestaron su preferencia por éste sobre la leche y postre con leche. La consistencia fluida, "bebible", fue muy bien aceptada. La valoración de la satisfacción global fue mayor al 90 % en los productos con sabor a frutilla y vainilla.

• **Ensayos inmunológicos (determinación de IgA en saliva).**

En la **Tabla 1** se consignan los valores promedio de inmunoglobulina A determinados en la totalidad de niños y agrupados de acuerdo al comedor de concurrencia.

Tabla 1. Valores promedios de Inmunoglobulina A en saliva (mg/ml).

	Las Talitas	Autopista Sur	Los Vázquez	San Cayetano	Promedio
Basal					
Placebo	288,32 ± 32,40	214,77 ± 10,51	232,77 ± 10,51	273,52 ± 43,50	256,75 ± 39,80
Yogur	285,01 ± 22,70	211,68 ± 21,35	268,55 ± 34,50	267,31 ± 23,70	267,65 ± 28,90
Post tratamiento					
Placebo	230,21 ± 45,26	235,58 ± 58,65	231,66 ± 46,72	248,63 ± 48,98	261,13 ± 53,02
Yogur	359,81 ± 31,26	391,91 ± 36,70 *	396,99 ± 42,51 *	386,77 ± 32,36 *	383,25 ± 31,53 *

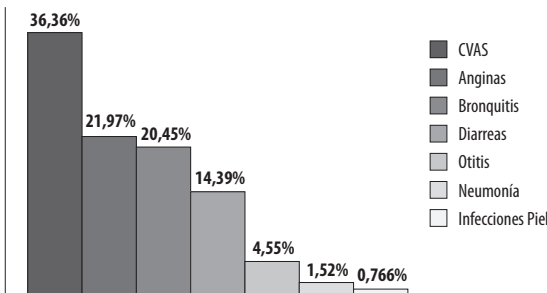
* Estadísticamente diferente con respecto al grupo placebo ($p < 0,001$)

Como se puede observar, el consumo del Yogur Probiótico produjo un aumento significativo de la IgA ($\approx 43\%$) en todos los niños independientemente del Comedor al que pertenecían. Por el contrario, no se observaron modificaciones en los valores de IgA en los niños que recibieron el Placebo. El aumento en los niveles de IgA indica un aumento de la inmunidad de mucosas.

• **Control y seguimiento clínico de eventos infecciosos.**

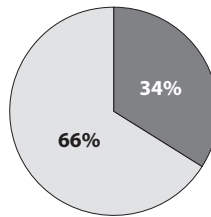
Cuando se abordó el tipo de eventos infecciosos de acuerdo a su localización y/o sintomatología, la frecuencia de los mismos resultó acorde con la prevalencia registrada en nuestra provincia (ver **Figura 1**). Los más frecuentes son los catarros de vías aéreas superiores (CVAS), seguidos de las anginas en general y luego las infecciones respiratorias bajas (bronquitis agudas) junto a las diarreas agudas.

Figura 1. Distribución de los eventos infecciosos registrados



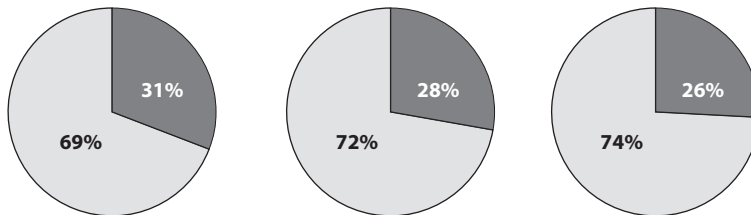
Como se observa en la **Figura 2**, sólo el 34 % de los niños del grupo registraron eventos infecciosos en general luego del consumo de Yogur Probiótico, mientras que, en el grupo Placebo el 66% de los niños presentó algún evento infeccioso. Estos resultados demuestran una disminución significativa ($p<0,001$) de aparición de eventos infecciosos asociados al consumo del Yogur Probiótico.

Figura 2. Eventos infecciosos: Grupo Yogur Probiótico (gris oscuro); Grupo Placebo (gris claro)



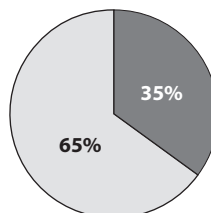
Al discriminar el tipo de evento infeccioso detectado, en el grupo Probiótico se observó una importante disminución con respecto al grupo Placebo en los siguientes eventos: catarro de vías aéreas superiores (CVAS) (31% vs 69%), anginas (AN) (28% vs 72%) y diarreas agudas (DA) (26% vs 74%).

Figura 3. Eventos infecciosos. Grupo Yogur Probiótico (gris oscuro); Grupo Placebo (gris claro)



La aparición de o no de fiebre durante los eventos infecciosos, se tomó como indicador de gravedad del mismo. Se observó una disminución significativa de este síntoma en los niños que consumieron el Yogur Probiótico (35%) respecto a los que consumieron Placebo (65%) (**Figura 4**).

Figura 4. Cuadro febril. Grupo Yogur Probiótico (gris oscuro); Grupo Placebo (gris claro)



- **Análisis parasitológicos**

Los datos basales mostraron que el 81 ± 11 % de los niños evaluados se encontraban parasitados, de los cuales el 47 ± 22 % presentaba más de una especie parasitaria. Se realizaron tratamientos con antiparasitarios, provistos por el Sistema Provincial de Salud (SI.PRO.SA.) del Gobierno de Tucumán. Se utilizó Mebendazol 100 mg, 2 comprimidos por día (ciclo: toma 3 días, descanso 7 días, repetir 3 días). No se dieron medicamentos para giardias.

Después del tratamiento con antiparasitarios más el consumo del Yogur Probiótico, se detectó una significativa reducción de los porcentajes de parasitosis ya que se encontraron un 57 ± 15 % de casos positivos dentro de los cuales sólo el 5 ± 6 % presentaba 2 especies parasitarias. La efectividad del antiparasitario fue considerablemente menor ($p < 0,05$) en el grupo Placebo.

De acuerdo a estos resultados, consideramos que podría haber alguna asociación entre el consumo del probiótico y la efectividad de la terapia antiparasitaria. Aunque este análisis no estaba incluido dentro de los objetivos principales del proyecto, creemos importante considerarlo en futuras investigaciones.

IV. D. CONCLUSIONES GENERALES

Los resultados evidencian que el consumo del Yogur Probiótico: 1) Aumentó las defensas naturales (impacto en el sistema inmunológico) 2) Disminuyó la frecuencia y gravedad de infecciones gastrointestinales y respiratorias. Redujo así, la morbilidad infantil por las enfermedades de mayor prevalencia en la infancia, situación agravada en poblaciones con necesidades básicas insatisfechas y 3) Aumentó la efectividad de antiparasitarios.

V. EL PROGRAMA SOCIAL “YOGURITO”: DESAFÍOS, APRENDIZAJES E IMPACTOS

En el marco de un Convenio firmado entre el Conicet y el Gobierno de la Provincia de Tucumán, el Programa “Yogurito” se implementa con éxito, desde 2008, en escuelas de zonas vulnerables del Gran San Miguel de Tucumán en el marco del Plan Alimentario Provincial beneficiando a unos 280.000 escolares. Esta decisión dio origen a un nuevo modelo de gestión que propicia la creación de espacios multisectoriales donde se retroalimenta el programa social y el proceso de co-creación. Participan del programa los Ministerios de Desarrollo Social, Salud y Educación; centros de gestión de la salud pública (SIPROSA) y centros de control (Instituto de Bromatología) de la provincia; institutos de investigación e I+D (CERELA-Conicet) y PYMES locales. Un ejemplo de la complementariedad y sinergia alcanzados se refleja en la generación

de nuevas ideas y desafíos concretos de I+D+i, como es el caso de BIOSEC (probiótico deshidratado) y la leche chocolatada probiótica (Chocolet*) y el Queso con Probiótico, que se sumaron al Programa Social en los años 2010, 2014 y 2016, respectivamente. BIOSEC es la cepa probiótica (PB 1505) de "Yogurito", deshidratada mediante un proceso estandarizado y optimizado en CERELA. De esta manera se pudo extender los beneficios del probiótico a escolares de zonas de difícil acceso por no requerir cadena de frío, quienes lo consumen agregado a leche chocolatada (fría o tibia).

En el marco de la nueva Gestión del Conocimiento y de los modernos Sistemas de Innovación, el programa social "Yogurito" gestado en CERELA-Conicet es un paradigma de interacción entre los sectores académico, gubernamentales, productivo y la comunidad, que dio lugar a un "sistema local de desarrollo" o "sistema regional de innovación", punto de partida de la transformación social trabajando desde el propio territorio. Los objetivos específicos del programa incluyen:

- 1.** Evaluar el efecto del alimento probiótico sobre infecciones gastrointestinales y respiratorias, en cuanto a número de episodios y gravedad para contribuir a disminuir la morbilidad por las enfermedades de mayor prevalencia en la infancia. Estudiar el efecto del probiótico sobre la inmunidad de mucosas.
- 2.** Promover hábitos higiénicos y concientizar a las familias de la importancia de una alimentación saludable favorecida por el consumo de alimentos probióticos.
- 3.** Favorecer la articulación intersectorial fortaleciendo la comunicación, espacios participativos de trabajo e intercambio entre las distintas áreas y niveles de gobiernos, organizaciones comunitarias, familia y comunidad científica.
- 4.** Estimular la intervención de Organizaciones civiles no gubernamentales (OCNG) en investigación, para el desarrollo de nuevos productos como un paso en la reconstrucción de la arquitectura social. En este sentido es muy valiosa la colaboración y participación del Gobierno provincial.
- 5.** Fortalecer la capacitación de recursos humanos.

Si bien el desafío primario del programa fue mejorar la calidad de vida de los niños de poblaciones vulnerables, reforzando su estado general de salud y la inclusión social, su aplicación también tiene impacto en:

- Salud y Educación: se mejora el estado de salud de los niños, hay menor ausentismo y mayor rendimiento escolar.

- Sistemas productivos y cadenas regionales de valor: se produce mayor crecimiento, rentabilidad y activo productivo de la cuenca lechera y de las plantas de elaboración, fortalecimiento de PyMES, generación de empleo genuino y reactivación de mercados. 2. Sistemas productivos y cadenas regionales de valor: Mayor crecimiento, rentabilidad y activo productivo de la cuenca lechera y de las plantas de elaboración; fortalecimiento de PyMES con generación de empleo genuino y reactivación de mercados. La leche producida en la cuenca de Trancas destinada a la producción de los alimentos probióticos que desarrollamos aumentó 4 veces desde 2008 (de 84.393 L de Leche/mes a 321.348 L de Leche/mes) hasta la actualidad. Este crecimiento ha motivado a productores de la región a invertir en la industria lechera logrando la producción de la cuenca un crecimiento mayor al 100% en los últimos años desde la implementación del proyecto
- Formación de RRHH: Se fomenta la reconversión de la mano de obra a través de la capacitación técnica.
- Sociedad en su conjunto: como parte activa de este moderno concepto de innovación, al tomar conciencia de la necesidad de hábitos saludables de higiene y alimentación en las familias participantes a través de talleres.
- Los sistemas de Ciencia, Tecnología e Innovación: factores claves en la transformación del conocimiento tácito en conocimiento explícito y la producción de bienes y servicios de mayor valor agregado.

VI. MODELO DE LA TRIPLE HÉLICE EN BENEFICIO DE LA SOCIEDAD: CONNIVENCIA ESTADO-SECTOR CIENTÍFICO-SECTOR PRODUCTIVO

El programa “Yogurito”, implementado por el Gobierno de Tucumán, es un paradigma de interacción entre los sectores de Ciencia y Técnica, Empresas, Estado y la Sociedad, donde la innovación basada en el conocimiento se traduce en la producción de bienes y servicios al transformar el conocimiento tácito en conocimiento explícito y documentando el proceso global para su re-utilización.

En este marco se generaron contextos más ricos de desafíos concretos a partir de las necesidades del usuario, trasladando la Investigación/Desarrollo/Innovación a una perspectiva de empresa como co-creadora de conocimiento a partir de un amplio conjunto de capacidades que incluye innovación de productos, innovación de modelos de negocios, e innovación social.

A través de este Programa, que representa un nuevo modelo de gestión, unos 280.000 escolares reciben el yogur probiótico (“Yogurito”) o los otros alimentos (Chocolet Y QUESO PROBIOTICO) y bioingrediente (BIOSEC) funcionales en la provincia

de Tucumán, y unos 100.000 en otras provincias y Municipios como Santiago del Estero, Entre Ríos, Misiones, Lujan, entre otros

VII. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración profesional de las Dras. Martha Nuñez y Verónica Molina y de los Lics. Maria Jose Fornaguera, Lourdes Cruz Pintos y Mariano Obregocho como parte del equipo técnico del programa "Yogurito".

VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- [1] World Health Organization (WHO) / The United Nations Children's Fund (UNICEF). 2013. Ending Preventable Child Deaths from Pneumonia and Diarrhoea by 2025. The integrated Global Action Plan for Pneumonia and Diarrhoea (GAPPD).
- [2] Jones KD, Berkley JA. 2014. Severe acute malnutrition and infection. *Paediatrics and International Child Health* 34:sup1, S1-S29.
- [3] Villena J, H. Zelaya, S. Rojas-Caro, S. Alvarez, A. Garcia, and H. Kitazawa. (2015). Fighting intestinal infections with immunobiotic lactic acid bacteria. En: *Recent Trends in Immunology*. SM Group Austin Publications, USA. ISBN: 978-0-9962745-4-8, Pp. 1-25.
- [4] Wan ML, Forsythe SJ, El-Nezami H. Probiotics interaction with foodborne pathogens: a potential alternative to antibiotics and future challenges. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2018 11:1-29.
- [5] Valdés-Varela L, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. Probiotics for Prevention and Treatment of *Clostridium difficile* Infection. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1050:161-176.
- [6] Salva S., Villena J., and Alvarez S. (2010). Differential immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: impact on intestinal and respiratory infections. *Int. J. Food Microbiol*. 141: 82-89.
- [7] Kitazawa H., and Villena J. (2014). Modulation of respiratory TLR3-antiviral response by probiotic microorganisms: lessons learned from *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. Special issue: Toll-Like Receptor Activation in Immunity vs. Tolerance. *Frontiers in Immunology (Frontiers in Immunological Tolerance)*. 5(201):1-15.
- [8] Villena J, Vizoso Pinto M.G., and Kitazawa H. (2016). Intestinal innate antiviral immunity and immunobiotics: beneficial effects against rotavirus infection. Special issue: Immunobiotics: Interactions of Beneficial Microbes with the Immune System. *Frontiers in Immunology (Microbial Immunology)* 7:563.

- [9] Zelaya H., Alvarez S., Kitazawa H., and Villena J. (2016). Respiratory antiviral immunity and immunobiotics: beneficial effects on inflammation-coagulation interaction during influenza virus infection. Special issue: Immunobiotics: Interactions of Beneficial Microbes with the Immune System. *Frontiers in Immunology (Microbial Immunology)*, 7:633.
- [10] Villena J., Chiba E., Vizoso-Pinto M.G., Tomosada Y., Takahashi T., Ishizuka T., Aso H., Salva S., Alvarez S., and Kitazawa H. (2014). Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* strains differentially modulate antiviral immune response in intestinal epithelial and antigen presenting cells. *BMC Microbiol.*, 14:126.
- [11] Salva S., Nuñez M., Villena J., Ramón A., Font G., Alvarez S. (2011). Development of a fermented goats' milk containing *Lactobacillus rhamnosus*: in vivo study of health benefits. *J. Sci. Food Agric.* 91:2355-2362.
- [12] Albarracin L., Kobayashi H., Iida H., Sato N., Nochi T., Aso H., Salva S., Alvarez S., Kitazawa H., Villena J. (2017). Transcriptomic analysis of the innate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial cells: influence of immunobiotic lactobacilli. *Frontiers in Immunology (Microbial Immunology)*, 8:57.
- [13] Tada A., Zelaya H., Clua P., Salva S., Alvarez S., Kitazawa H., and Villena J. (2016). Immunobiotic *Lactobacillus* strains reduce small intestinal injury induced by intraepithelial lymphocytes after Toll-like receptor 3 activation. *Inflamm Res*, 65: 771.
- [14] Marranzino G., Villena J, Salva S. and Alvarez S. (2012). Stimulation of macrophages by immunobiotic *Lactobacillus* strains: influence beyond the intestinal tract. *Microbiol. Immunol.* 56: 771-781.
- [15] Salva S, Merino MC, Agüero G, Gruppi A, Alvarez S. Dietary supplementation with probiotics improves hematopoiesis in malnourished mice. *PLoS One.* 2012; 7(2):e31171.
- [16] Herrera M., Salva S., Villena H, Barbieri N. and Alvarez S. (2013). *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 enhances systemic and respiratory innate immune response in immunocompromised malnourished mice. *J. Functional Foods*, 5:1693–1704.
- [17] Salva S, Alvarez S. The Role of Microbiota and Immunobiotics in Granulopoiesis of Immunocompromised Hosts. *Front Immunol.* 2017; 8:507
- [18] Villena J, Chiba E., Tomosada Y., Salva S., Marranzino G., Kitazawa H. and Alvarez S. (2012). Orally administered *Lactobacillus rhamnosus* modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C). *BMC Immunol.* 13:53
- [19] Chiba E., Tomosada Y., Vizoso-Pinto M.G., Takahashi T., Tsukida K., Kitazawa H., Alvarez S. and Villena J. (2013). Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* improves resistance of infant mice against respiratory syncytial virus infection. *Int Immunopharmacol.* 17:373-382.
- [20] Zelaya H., Tsukida K., Chiba E., Marranzino G., Alvarez S., Kitazawa H., Agüero G., and

Villena J. (2014). Immunobiotic lactobacilli reduce viral-associated pulmonary damage through the modulation of inflammation-coagulation interactions. *Int. Immunopharmacol.* 19(1):161-173.

EVIDENCIAS CIENTÍFICAS DE LOS MECANISMOS INDUCIDOS POR PROBIÓTICOS EN LA MODULACIÓN DEL SISTEMA INMUNE

Carolina Maldonado Galdeano

- *Laboratorio de Inmunología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA- CONICET), Tucumán, Argentina.*
- *Cátedra de Inmunología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán.*

Silvia Inés Cazorla

- *Laboratorio de Inmunología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA- CONICET), Tucumán, Argentina.*
- *Cátedra de Inmunología, Facultad de Bioquímica, Química y Farmacia, Universidad Nacional de Tucumán.*

Gabriela Perdigón

perdigon@cerela.org.ar

- *Laboratorio de Inmunología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CONICET).*

José María Lemme Dumit

- *Laboratorio de Inmunología, Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA- CONICET), Tucumán, Argentina.*

RESUMEN

El tracto gastrointestinal es uno de los ecosistemas microbiológicamente más activos, pues contiene una gran masa de bacterias, levaduras y otros microorganismos. Esta comunidad diversa y dinámica tiene funciones específicas, que son claves en el mantenimiento de una buena salud. El papel primordial de esta microbiota, es mantener la homeostasis de la mucosa intestinal y promover la maduración del sistema inmune.

Algunas de las bacterias que constituyen la microbiota y otras que forman parte de los alimentos (yogur, leches cultivadas, quesos, y muchos otros alimentos no lácteos), tienen la capacidad de actuar de manera beneficiosa sobre la salud. Estos microorganismos reciben el

nombre de probióticos y ha llevado a numerosos científicos a analizar el efecto de éstos tanto en huésped sano como en grupos de riesgo.

Al presente existe una vasta evidencia científica experimental que demuestra el efecto benéfico de probióticos, y se describen los posibles mecanismos que intervienen en dichos efectos. Todos estos estudios dan sustento científico para el empleo de probióticos en humano. Si bien resulta crucial complementar estas evidencias con la experimentación clínica dirigida a demostrar mecanismos, beneficios y seguridad en el humano, todo parece indicar que el consumo de alimentos adicionales con probióticos podrían ser altamente beneficiosos en el hombre. Sin embargo, es necesario continuar con la validación clínica en diferentes patologías concretas, que aseguren la inocuidad de los mismos.

I. INTRODUCCIÓN: EL PAPEL DE LA MICROBIOTA EN LA RESPUESTA INMUNE

El tracto gastrointestinal es uno de los ecosistemas más activos microbiológicamente, conteniendo una gran masa de bacterias, levaduras y otros microorganismos. La actividad biológica que desarrolla es muy grande, siendo responsable de la biosíntesis de enzimas (sucrasa, lactasa, glicosil-transferasas específicas), factores de proliferación y diferenciación celular y es, además, crucial para la maduración del sistema inmune asociado a mucosa intestinal.

La microbiota intestinal está en un continuo diálogo con las células del sistema inmune, lo cual es esencial para iniciar y prevenir una respuesta inmune y/o una inflamación intestinal. El papel primordial de la microbiota, es mantener la homeostasis de la mucosa intestinal contra los antígenos de la luz intestinal. A través del llamado “efecto barrera”, permite que las bacterias comensales penetren a la lámina propia del intestino, constituyendo al mismo tiempo una barrera para los microorganismos patógenos. La microbiota intestinal es fundamental para la maduración y actividad del sistema inmune [1] y para los mecanismos de tolerancia oral, a través células reguladoras de la inmunidad (Treg) [2-8].

El sistema inmune asociado a mucosas está altamente capacitado para responder a diversos estímulos y auto-regularse, evitando así efectos adversos que modifiquen la homeostasis intestinal. Entender como los microorganismos comensales pueden dirigir al sistema inmune hacia la activación o tolerancia es uno de los grandes desafíos de la Inmunología y la Biología.

La microbiota intestinal cumple numerosas funciones. Para mencionar algunas de ellas: a) funciones intestinales (digestión y adsorción de alimentos, síntesis de vitaminas, motilidad intestinal, mantenimiento de la permeabilidad intestinal); b) formación de vasos sanguíneos y vascularización; c) participación activa en el metabolismo energético; d) homeostasis ósea, osteoclastogénesis y masa ósea; e) interviene en aspectos del comportamiento tales como ansiedad, percepción del dolor, es decir contribuye altamente a la fisiología del huésped, f) maduración del sistema inmune [1, 9-15]. Por otra parte, la colonización bacteriana estimula la producción de sustancias antimicrobianas que regulan la población de las bacterias comensales [16] y favorece la expansión de los centros germinales favoreciendo de esta manera la maduración de todas las células inmunes asociadas [17].

II. BACTERIAS PROBIÓTICAS COMO INMUNOMODULADORES

En el ecosistema intestinal, además de las bacterias que constituyen la microbiota, hay numerosos antígenos microbianos que se encuentran en el lumen y que están presentes en numerosos alimentos (yogur, leches cultivadas, quesos, y muchos otros alimentos no lácteos). Fue el Premio Nobel de Medicina en 1908, Metchnikoff, quien, a principios del siglo pasado, en su libro “la prolongación de la vida” [18] indicó que los

microbios presentes en los alimentos podrían contribuir a una buena salud. Sin embargo, no fue sino hasta las tres últimas décadas, en que se comenzó a considerar el papel biológico de estas bacterias no patógenas, llamadas probióticas, dentro de las cuales se destacan las bacterias y, en menor medida, levaduras. Los microorganismos probióticos han sido definidos por Fuller [19] como “suplemento microbiano vivo que afecta benéficamente al consumidor mejorando el balance intestinal”. Actualmente la FAO/WHO (singlas en inglés para la *Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization*) (2001) los definen como “microorganismos vivos que cuando son administrados en cantidades adecuadas confieren un efecto benéfico sobre el huésped”.

Dentro de estos microorganismos probióticos, las bacterias lácticas son el grupo microbiano más utilizado para el desarrollo de cultivos probióticos. Sin embargo, solo algunas bacterias lácticas cumplen con las características necesarias para considerarse probióticos y formar parte de los llamados alimentos funcionales. Éstos se consumen como parte de una dieta normal y más allá de la nutrición básica, ofrecen beneficios para la salud y reducen el riesgo de sufrir enfermedades. Los alimentos funcionales contienen determinados minerales, vitaminas, ácidos grasos, fibra y/o cultivos vivos de microorganismos probióticos [20]

Las bacterias probióticas administrados oralmente influyen el comportamiento del Sistema Inmune Mucoso (SIM), enviando señales a las células inmunes, lo que les permite modular la actividad inmune. Puesto que estas bacterias pueden ingresar viables, surge la pregunta ¿cómo influyen estos microorganismos que ingresan al tracto intestinal en forma transitoria a este complejo ecosistema? Para que un microorganismo sea considerado probiótico debe cumplir con determinados requerimientos: i) permanecer viables en el tracto intestinal resistiendo el medio ácido del estómago y las enzimas intestinales; ii) adherirse a la célula epitelial intestinal; iii) no presentar resistencia a antibióticos, y en caso de que la presente, que no sea transferible; iv) no inducir hemólisis; v) no producir toxinas y vi) no inducir translocación de bacterias comensales más allá del nódulo mesentérico [21]. Es decir revisten el carácter de ser bacterias GRAS, siglas en inglés para “*Generally Regarded As Safe*”) de acuerdo a FDA (<http://www.cerela.org.ar/ciencia/probioticos.htm>), y/o el carácter QPS (siglas en inglés para *Qualified Presumption of Safety*), de acuerdo a la autoridades europea sobre seguridad alimentaria (EFSA)

Numerosa evidencia científica demuestra que los probióticos pueden activar el sistema inmune [22-24] o actuar como antiinflamatorio [25-28]. Es decir, los probióticos tienen actividad inmunoreguladora. Estos microorganismos viables ingeridos, podrían permanecer intactos e interactuar con la microbiota residente enviando señales a las células inmunes asociadas a la lámina propia del intestino. Sin embargo, muchas veces la falta de conocimiento sobre cómo estas bacterias estimulan el sistema inmune, limita su empleo en la prevención de enfermedades y sólo se consideran las propiedades nutricionales de los alimentos que las contienen.

Para explicar cómo los probióticos inducen la activación del SIM es necesario

comprender el funcionamiento de este sistema inmune, el cual, a su vez, estará influenciado por las bacterias comensales. Los conocimientos inmunológicos básicos nos orientarán sobre el fenotipo celular que debería estimularse, qué marcadores o receptores deben expresarse, o qué mediadores biológicos (citoquinas) deberían inducirse para evitar efectos adversos (respuesta inflamatoria), para inducir activación y regulación de la respuesta inducida, todo ello sin alterar el proceso de tolerancia oral.

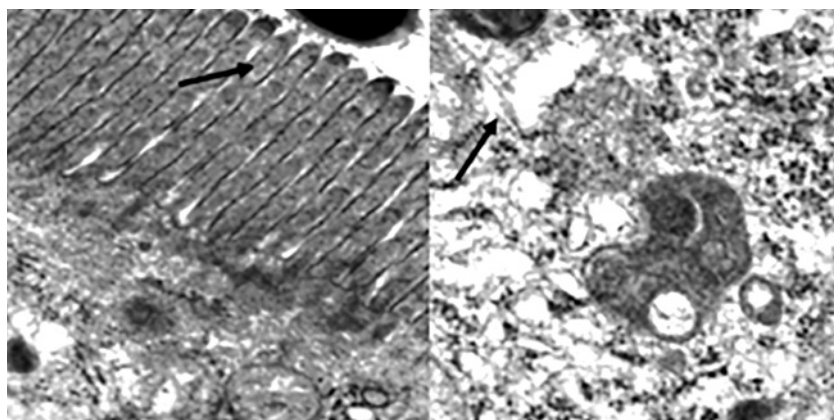
III. EFECTO DE LOS PROBIÓTICOS SOBRE LA BARRERA EPITELIAL

Una bacteria probiótica, ya desde su ingreso por vía oral, va a sufrir una serie de modificaciones de acuerdo al medio con el que interactúa: acidez gástrica, actividad de enzimas, peristaltismo intestinal, el mucus que recubre el epitelio, la IgA presente en el lumen y las sustancias antimicrobianas producidas por las células de Paneth.

Cabe entonces preguntarse: ¿cómo este antígeno (bacteria probiótica) carente de factores de virulencia puede sortear todas estas barreras inespecíficas de la defensa del huésped y activar/regular al SIM?. Más aun, ¿su efecto puede llegar a inducir una respuesta adaptativa, o solo está circunscripto a la respuesta innata? Esto equivale a decir ¿cuál es el alcance del estímulo inducido por estos probióticos?

Por definición, los probióticos deben ser capaces de interactuar con la célula epitelial intestinal (CEI) y mantenerse viables, los que les da la posibilidad de permanecer en el tracto intestinal y multiplicarse. En el laboratorio demostramos por microscopía electrónica de transmisión, que ciertos lactobacilos probióticos pueden interactuar con la célula epitelial intestinal [29] (ver **Figura 1**).

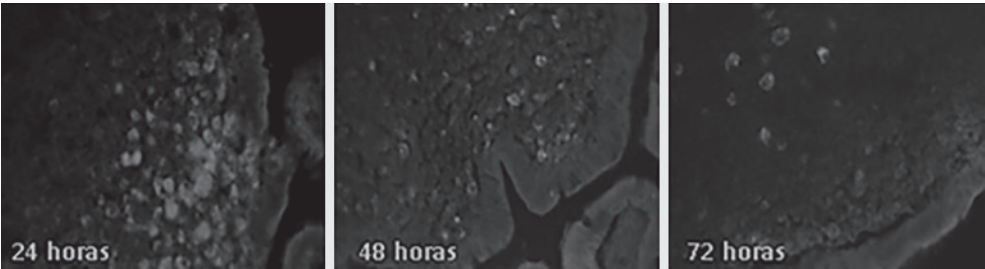
Figura 1. Interacción de probióticos con las células epiteliales de intestino.



Microfotografías de microscopía electrónica de transmisión. Se observa la interacción de un probiótico (flechas negras) con la CEI (A y B), y la consiguiente activación de esta, evidenciada por el aumento de mitocondrias y cuerpos multivesciculares (flechas blancas en B) 33300x.

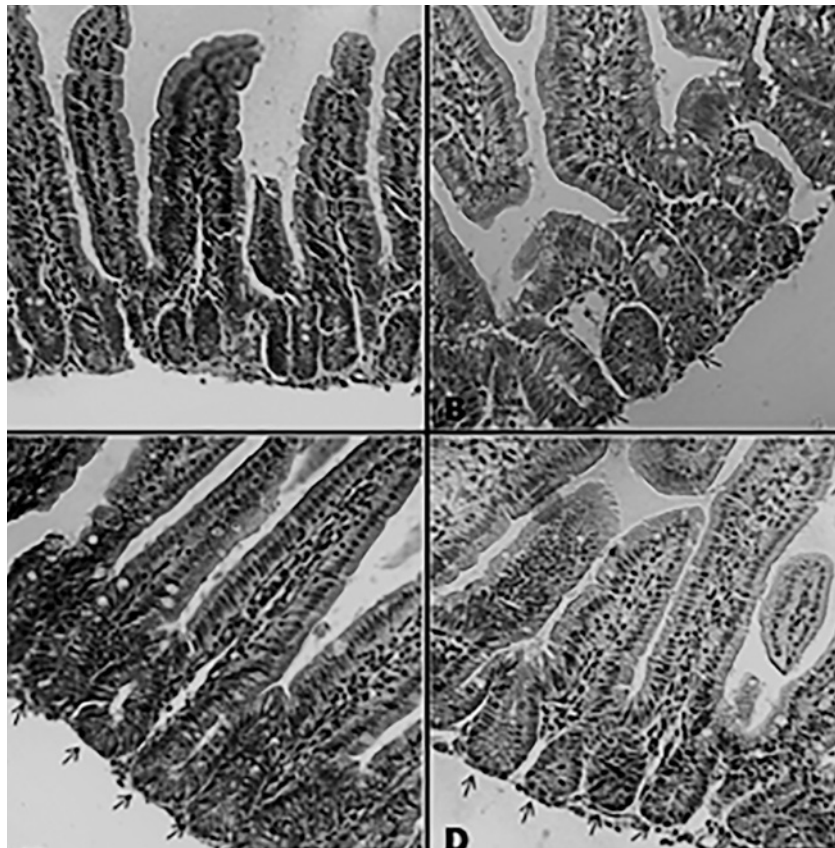
Como consecuencia de la interacción con el probiótico, la CEI se activa y produce IL -6, IL-10 y TGF- β en niveles superiores a los inducidos por a la microbiota comensal. Ahora bien, ¿cuánto tiempo pueden las bacterias probióticas permanecer en el intestino? Demostramos que el tránsito a lo largo del intestino para cualquier bacteria o antígeno particulado no es mayor de 72 horas, por lo que es posible que la administración continua garantice una masa probiótica activa (ver **Figura 2**). También demostramos que las bacterias probióticas o sus leches fermentadas con dichos microorganismos inducen un aumento de las células caliciformes y sobre las células de Paneth incrementando la producción de sustancias antimicrobianas [30] (ver **Figura 3**).

Figura 2. Tiempo de permanencia de probióticos en intestino.



Microscopia de fluorescencia. Los fragmentos bacterianos en placa de Peyer persisten hasta las 72 hs como cualquier antígeno particulado.

Figura 3. Efecto de los probióticos sobre las células de Paneth.

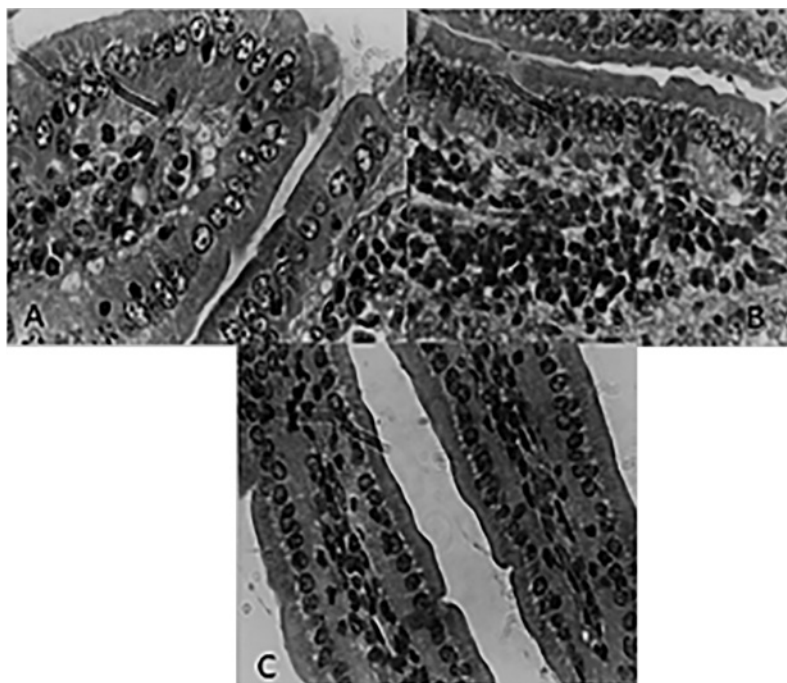


Tinción con hematoxilina eosina, sobre cortes histológico de intestino delgado de ratones que recibieron una dieta convencional (A); la suplementación con: *L. fermentum* (B); *L. casei* CRL 431 (C); *L. paracasei* CNCM I-1518 (D). Las flechas muestran las células de Paneth en la base de las criptas de Lieberkuhn.

El aumento de las sustancias antimicrobianas (SAM) en los fluidos intestinales de ratones alimentados con los lactobacilos probióticos *L. casei* CRL 431 y *L. paracasei* CNCM I-1518 puso en evidencia que la producción de péptidos antimicrobianos (PAM) por las células de Paneth constituiría otro mecanismo de la activación de la respuesta inmune innata ejercida por los probióticos frente a microorganismos patógenos y el mantenimiento de la microbiota intestinal [30]. Acorde a estos resultados, observamos que frente a una infección experimental con el patógeno *Salmonella thyphimurium*, el número de bacterias patógenas internalizadas era significativamente menor en los animales que habían recibido el probiótico. Más aún ratones infectados que recibieron el probiótico, presentaban una arquitectura del órgano similar a la observada en ratones controles no infectados. Por el contrario, en ratones infectados con *Salmonella* observamos una alteración de la histología de las vellosidades

intestinales, con una infiltración de polimorfonucleares a los 7 días post-desafío con el patógeno (ver **Figura 4**).

Figura 4. Protección frente a la infección por *Salmonella Typhimurium*.



Tinción con hematoxilina-eosina sobre cortes de intestino delgado de ratones (A) controles sin infectar; (B) infectado con Salmonella Typhimurium y (C) alimentado con el probiótico durante 7 días y desafiado con Salmonella.

Otro punto importante que debe ser considerado es la de especificidad de especie. Al respecto, hemos observado que el uso de bacterias homólogas no garantizaría un mayor efecto [31]. Aún cuando algunos autores indican que para el uso de microorganismos probióticos debe tenerse en cuenta la especificidad de especie (microorganismo/huésped).

Cualquiera sea la forma en que una bacteria probiótica como tal o sus fragmentos (pared celular, citoplasma o metabolitos) lleguen al intestino, tendrá que sobrepasar las barreras inespecíficas, para luego interactuar con la CEI. Su activación induce la producción de IL-6, y diversos factores que incrementan la respuesta de las células inmunes asociadas a lámina propia de intestino. Está descripto que en la estimulación inmune por antígenos bacterianos (patógenos y no patógenos), la red de señales que se desencadenan pueden ser: a) por la activación directa de la CEI ejercida por la bacteria probiótica o por sus estructuras de pared, que se adhieren a la CEI a través de los receptores Tipo Toll [32]. La activación de la CEI induce la producción de diferentes

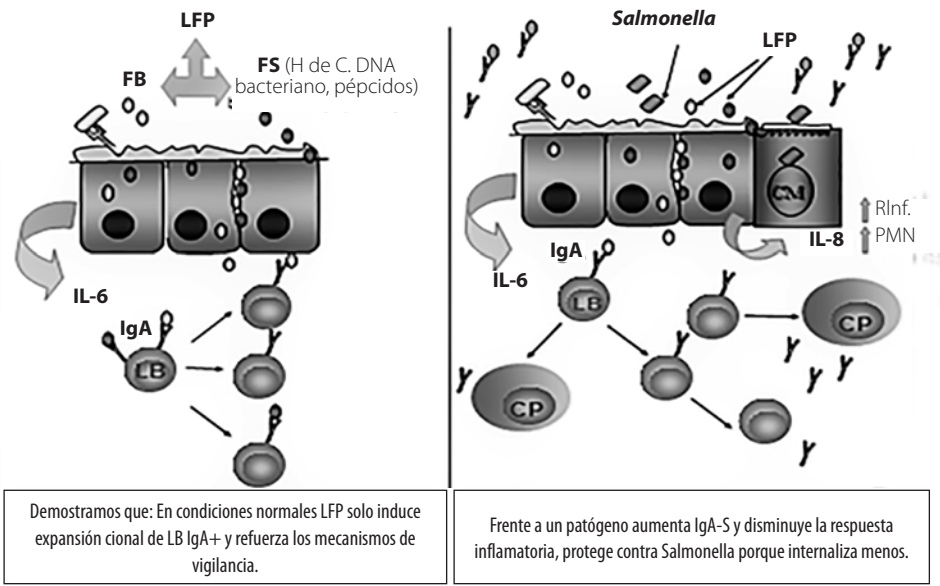
citoquinas: IL-6, IL-1, IL10 y otros factores que serán la señal que recibirán las células inmunes asociadas a la lámina propia del intestino.

IV. EFECTO SOBRE LÁMINA PROPIA DEL INTESTINO DELGADO

Las señales inducidas por probióticos sobre las CEIs activan a las células inmunes de la mucosa intestinal, estimulando la producción de citoquinas que coadyuvarán en la activación del SIM. La posibilidad de que las bacterias probióticas puedan activar directamente a las células inmunes de la lámina propia es factible debido a la presencia de células M en las vellosidades intestinales [33], las cuales constituyen una vía importante de transporte transcelular desde la luz del intestino hasta la célula presentadora de antígenos subyacente. Adicionalmente, la célula dendrítica (CD) expresa proteínas que le permiten interactuar con las uniones estrechas presentes entre las células epiteliales (en inglés, denominadas *tight junctions*), permitiendo tomar antígenos del lumen intestinal [34, 35]. La interacción de la bacteria completa, o de sus fragmentos celulares (principalmente la pared celular) con las células de la respuesta inmune innata (macrófagos y CD) hacen que éstas se activen, aumentando la expresión de receptores tipo Toll (TLRs), CD206 (receptor para manosa) y la producción de citoquinas IL-6, IFN- γ , TNF- α , entre otras. Es precisamente el TNF- α la citoquina que estaría más involucrada en la iniciación del diálogo entre la CEI y las células inmunes, por lo que la CEI juega un papel clave en la inducción de señales. El tipo de respuesta inducida (innata, inflamatoria o adaptativa) dependerá del estímulo, intensidad y duración del mismo, como así también de la expresión de marcadores inmunes en macrófagos y CD que posibiliten la presentación antigénica para dar una posterior respuesta inmune adaptativa. Esta etapa no invalida la interacción directa del antígeno con las células inmunes, posibilitando los dos tipos de señales en forma simultánea.

La pregunta que surge ahora es cómo debería ser el estímulo para evitar una respuesta inflamatoria exagerada y favorecer la activación y la regulación por citoquinas supresoras (IL-10), o del factor transformante de crecimiento beta (TGF β). Sabemos que los patógenos inducen mecanismos de agresión al huésped, por lo que la respuesta que provocan es la inflamatoria. Con la administración de bacterias probióticas se busca activar al SIM para mantener un mejor estado de vigilancia inmunológica, sin alterar la homeostasis intestinal, preservando la tolerancia oral por mecanismos de regulación inmune. ¿Para lograr ese delicado equilibrio, es la respuesta inmune innata la que debería ser favorecida, con activación de la CEI, macrófagos, CD e IgA-secretoria (IgA-S) para reforzar la barrera intestinal? se ha demostrado que precisamente es la respuesta inmune innata la que se encuentra favorecida con la administración de los probióticos [23, 30, 36-38] (ver **Figura 5**).

Figura 5. Modelo propuesto como mecanismo de vigilancia inmune inducida por probióticos.



Efecto de una Leche Fermentada Probiótica (LFP) en la producción de IgA secretoria en animales adultos de 4 semanas.

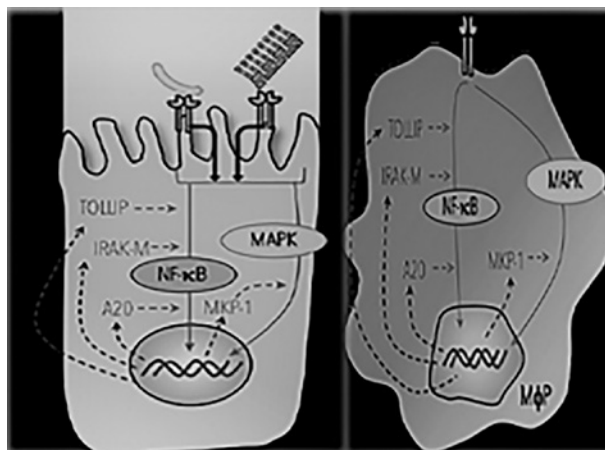
El fortalecimiento de la barrera epitelial intestinal está bien documentado mostrando una mayor expresión de las moléculas que forman las uniones estrechas [39-41]. Por otra parte, la estimulación de las CELs y las células de la respuesta inmune innata, facilitan la producción de IL-6 que induce la expansión clonal de los linfocitos B, favoreciendo así el aumento de células IgA+ en lámina propia y la producción de IgA-S total. El papel biológico de la IgA-S en la protección de mucosas es indiscutido [42, 43].

Se conoce que las células activadas de la respuesta inmune innata pueden adquirir marcadores de superficie (moléculas de adhesión) involucradas en el tráfico leucocitario que les permita migrar para llegar a los sitios mucosos distantes. En el laboratorio demostramos que los probióticos incrementan las células productoras de IgA en intestino y favorecen el ciclo de la IgA a sitios distantes del mismo, aumentando las células IgA+ en bronquios y glándulas mamarias [22, 23] (Maldonado Galdeano et al., 2015, de Moreno de Le Blanc et al., 2005). La población de linfocitos Th (T helper), especialmente CD4+ de lámina propia del intestino delgado también mostraron incrementos luego de la administración de probióticos [44]. Si bien los componentes principales de la pared celular de lactobacilos, ácido lipoteicoico (LTA) y el Muramil Dipéptido (MDP), son antigénicos y estimulan activamente la población Th1 y Th2, no necesariamente inducen siempre una respuesta Th2 [45-47]. Está descrito que altas dosis de peptidoglicano son tóxicas a nivel hepático y renal [48]. Estos

hechos darían otra razón para un análisis más profundo de las estructuras de los probióticos que están involucrados en la estimulación inmune deseada y además podría clarificar porque el efecto probiótico es siempre cepa y dosis dependiente.

A nivel de la mucosa respiratoria debe promoverse el balance hacia una respuesta Th1, para justificar la efectividad de los probióticos en algunas alergias [49]. Nosotros demostramos en un modelo experimental de alergia respiratoria en ratones que es posible estimular la población Th1 por el consumo de una leche fermentada probiótica [50, 51]. En procesos alérgicos la respuesta Th2 no sería aconsejable, sin embargo, sabemos que los probióticos favorecen ambas respuestas, Th1 y Th2, con buena producción de anticuerpos contra antígenos vacunales [52, 53]. Resultados similares se observaron en grupos subnutridos [54].

¿Cómo mantener la homeostasis intestinal inmune después de la activación probiótica?. Esta pregunta surge porque los macrófagos y las CD podrían generar una respuesta Th2 con producción de anticuerpos contra sus propios epitopes o contra antígenos alimentarios. Una respuesta a esa pregunta es que la bacteria o sus fragmentos, al tomar contacto con las células inmunes mediante receptores Toll o CD206 producen la activación de estas células y de los factores transcripcionales, que llevan a la síntesis y producción de citoquinas. Parte de sus fragmentos se unen al HLA-II de la CEI y de ese modo quedan expuestos para posteriormente ser reconocidos por el receptor del linfocito T (TCR) y generar una respuesta adaptativa. Sin embargo, aun cuando esto ocurra, no debemos olvidar que el proceso de presentación antigénica sólo es posible en sitios inductores de la respuesta inmune, placa de Peyer o nódulos linfáticos, por lo que la presentación antigénica a nivel de lámina propia no es probable, y de hecho es donde ocurre el mayor efecto probiótico ya que las partículas probióticas que ingresan a placa de Peyer y son captadas por los macrófagos, son depuradas como cualquier antígeno particulado inocuo. Este aspecto lo hemos demostrado en el laboratorio [32, 55]. Por otra parte, también demostramos que las CEIs y de la respuesta inmune innata activan proteínas reguladoras de los factores transcripcionales evitando así la producción exacerbada de citoquinas proinflamatoria y la respuesta inflamatoria [56] (ver **Figura 6**).

Figura 6. Mecanismos moleculares inducidos por probióticos en CEI y MQ.

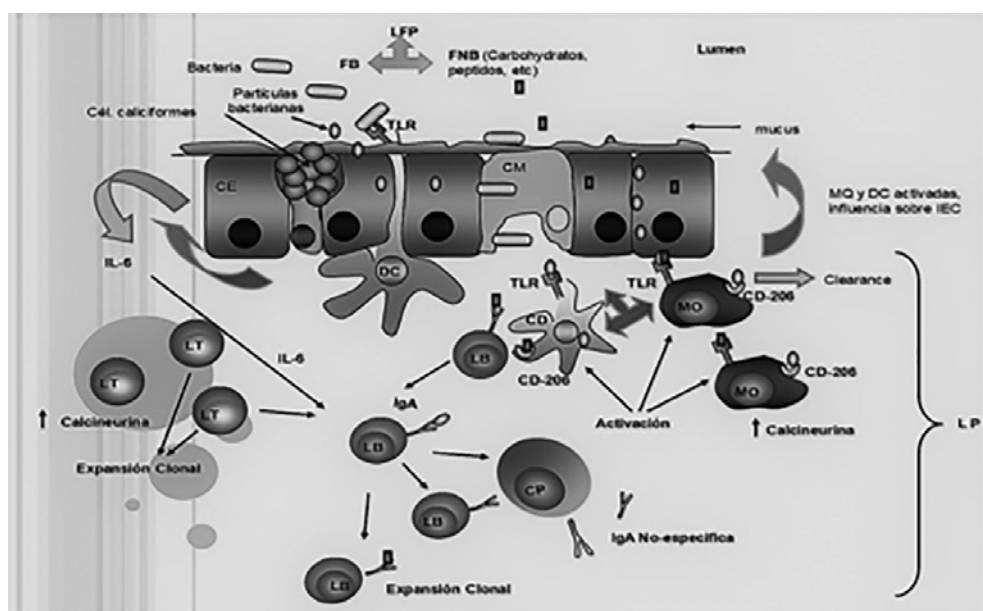
Los probióticos interactúan con la CEI y con MQ activando diferentes vías de señalización como NF-κB y MAPK, induciendo la liberación de citoquinas. Al mismo tiempo inducen la expresión de proteínas reguladoras (TOLLIP, IRAK-M, A20, MKP-1) que permiten mantener la homeostasis regulando la activación inmune.

Las evidencias experimentales de nuestro grupo y de otros investigadores, sobre un número importante de bacterias lácticas de diferentes géneros, principalmente *Lactobacillus*, demuestran que: a) la respuesta innata (RI) es la principal respuesta inducida por los microorganismos probióticos, b) que estos microorganismos estimulan el sistema inmune tanto a nivel intestinal con incremento en el número de células IgA+, como también en bronquios y glándula mamaria, c) la activación de la respuesta inmune innata induce la liberación de citoquinas activadoras y supresoras (efecto inmunomodulador), d) demostramos la importancia de la viabilidad para el mantenimiento de la respuesta inmune inducida [29], e) la administración prolongada no afecta el ecosistema intestinal [57]. Diversas referencias bibliográficas indican que el consumo prolongado de probióticos puede modificar la microbiota intestinal, sin embargo los probióticos no colonizan intestino, además son degradados por sustancias antimicrobianas producidas por las células de Paneth [30]. La microbiota intestinal es estable; solo en determinadas situaciones como el tratamiento prolongado con antibióticos, o en procesos de malnutrición (obesidad, desnutrición), o por algunas drogas antiinflamatorias, puede producirse una alteración de su composición [58]. Los probióticos al ser consumidos regularmente podrían inducir tolerancia oral con aumento de Treg, sin embargo, está demostrado que el consumo prolongado no induce tolerancia oral ya que actúan como inmunomoduladores manteniendo la vigilancia inmunológica como lo demostramos frente a la infección experimental con *Salmonella* [59].

Considerando que los lactobacilos probióticos promueven la RI innata y además la activación de la misma puede llevar a un aumento de la respuesta inflamatoria

intestinal ¿cuál es el efecto positivo que tienen los probióticos a nivel de intestino? Demostramos que la respuesta inmune inducida por los probióticos no conlleva a daño tisular, sino que solo produce un ligero aumento de celularidad en lámina propia [59] y que la interacción de estos con los TLRs induce un aumento en la expresión de proteínas reguladoras de los factores transcripcionales que llevan a la producción de citoquinas inflamatorias con incrementos de la población Treg [56, 60]. Todos los datos obtenidos al presente en modelos animales nos permiten concluir que el consumo de probióticos no afecta la homeostasis del sistema inmune intestinal y son inocuos, aportando así, las bases científicas necesarias para su ensayo en humanos (ver **Figura 7**).

Figura 7. Mecanismos inmunológicos inducidos por los probióticos en la mucosa intestinal.



Si bien contamos con las bases científicas (realizada en modelos experimentales) para el consumo de probióticos en algunas patologías, es importante considerar el sitio mucoso donde estos van a impactar (vagina, piel, cavidad oral, tracto respiratorio) y la microbiota que allí se encuentra [61-63]. Existen además, referencias bibliográficas que promueven el empleo de probióticos o leches probióticas en obesidad debido a su efecto positivo sobre el síndrome metabólico observado en esa patología [26, 64, 65].

La evidencia científica experimental mostrada debe ser validada en humanos. La validación clínica es de fundamental importancia por diferentes razones: a) porque son productos naturales que ingresan con la dieta (no son productos farmacológicos),

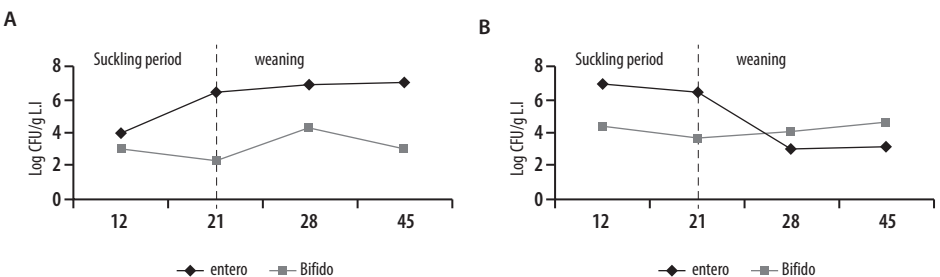
por lo que es necesario demostrar su efecto en la patología deseada, b) aún cuando fueran efectivos la condición del huésped es muy importante como así también la complejidad de la etiología y el estadio en que se encuentra la patología, como en cáncer por ejemplo [27, 66].

V. MECANISMOS INDUCIDOS POR PROBIÓTICOS EN ETAPAS TEMPRANAS DE LA VIDA

Los resultados precedentes avalan el empleo de la administración de probióticos en adultos jóvenes para el fortalecimiento de la respuesta inmune. Sin embargo, existen dudas al momento de ser administrados en etapas tempranas de la vida.

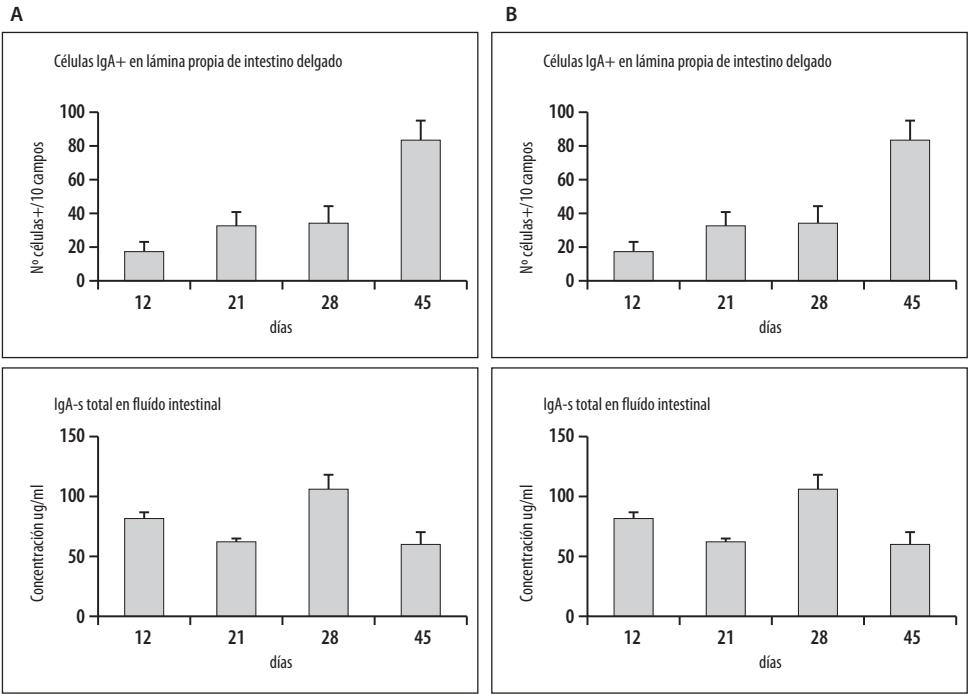
Se ha discutido, y sigue siendo tema de discusión, si es conveniente la administración temprana de probióticos en lactantes menores de 3 meses. Nuestra opinión, fundamentada en ensayos realizados en modelos animales [57] muestran que el efecto de una leche fermentada que contiene una bacteria probiótica es evidente sobre la población de enterobacterias y bifidobacteria. Esta última población, se ve favorecida con la administración de probióticos. Se sabe que las bifidobacterias favorecen la expresión de las células Treg, población de importancia en los primeros meses de vida para permitir la colonización completa del intestino (ver **Figura 8**). En cuanto a la maduración inmune la administración temprana de probióticos no acelera la misma. Su efecto es evidente cuando la colonización bacteriana se completa (ver **Figura 9**).

Figura 8. Efecto de LFP en etapas temprana de la vida sobre enterobacteria y bifidobacteria.



La figura muestra el cambio en la cantidad de bacterias intestinales en función del tiempo. A) Animales que no reciben LFP durante lactancia y al destete; B) Animales con LFP durante lactancia y al destete.

Figura 9. Efecto de la administración temprana de LFP sobre células IgA+ e IgA- S total.



En la figura se muestra el efecto sobre: A) Animales controle que no reciben LFP; B) Animales que reciben LFP durante lactancia y destete (21d) Las diferencias observadas a los 45 días no son significativas. El incremento en IgA e IgA-S inducido por la administración probiótica se manifiesta en este modelo de ratón posterior a los 45d.

VI. MECANISMOS INMUNES DIFERENCIALES ENTRE BACTERIAS COMENSALES Y PROBIÓTICAS

De acuerdo con lo expuesto, algunas de las principales diferencias entre comen-sales y bacterias probióticas están resumidas en la **Tabla 1**.

Comensales	Probióticos
No interactúan con CEI, solo lo hacen por metabolitos.	Interactúan con CEI.
No internalizan a CEI.	No internalizan a CEI. Sí lo hacen sus fragmentos.
Activan la CEI para producir ↑IL10, ↑TGF-β ↓IL-6	Activan CEI para producir ↑IL10, ↑IL-6
Mantienen la barrera epitelial.	Refuerzan la barrera epitelial por ↑de Cel. Caliciformes con producción de mucus.

No produce translocación de la microbiota.	No produce translocación de la microbiota.
Mantiene homeostasis intestinal por producción de sustancias antimicrobianas (PAM).	Mantiene homeostasis intestinal por ↑ producción de PAM que degradan pprobióticos y patógenos para evitas su internalización.
Activa MQ, CD, LB y LT de lámina propia, induciendo su maduración. La CD queda como plasmocitoide.	Activa MQ, CD, LB y LT de lámina propia. ↑ maduración. Expresión de marcadores específicos F4-80, CD-103*. LB → IgA* LT → TH1
Producen proteínas reguladoras de la via NFK-B y MAP kinasas.	Producen proteínas reguladoras de la via NFK-B y MAP kinasas (TOLLIP, IRAK-M, A20, MKP-1).

VII. CONCLUSIONES

En función de la evidencia científica presentada, podemos concluir que el empleo de probióticos en humanos seria inocuo ofreciendo un beneficio adicional sobre la modulación del sistema inmune. El consumo de leches fermentadas probióticas puede ser muy efectivo en grupos de riesgo como pacientes subnutridos no solo por sus propiedades nutricionales sino por su capacidad adyuvante sobre la inmunidad del huésped.

VIII. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- [1] Bäckhed F., Roswall J., Peng Y., Feng Q., Jia H., Kovatcheva-Datchary P, et al. (2015). Dynamics and stabilization of the human gut microbiome during the first year of life . Cell Host and Microbe, 17(5), pp. 690-703. doi: 10.1016/j.chom.2015.04.004.
- [2] Rimoldi M, Chieppa M, Salucci V, Avogadri F, Sonzogni A, Sampietro GM, et al. (2005). Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. Nat Immunol. May;6(5):507-14. Epub 2005 Apr 10. Erratum in: Nat Immunol. 2015 Mar;16(3):326.
- [3] Ivanov II, Frutos R de L, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin B, Sartor RB, et al (2008). Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. Cell Host Microbe. 2008 Oct 16;4(4):337-49. doi: 10.1016/j.chom.2008.09.009.
- [4] Okada Y, Tsuzuki Y, Hokari R, Komoto S, Kurihara C, Kawaguchi A, et al. (2009). Anti-inflammatory effects of the genus Bifidobacterium on macrophages by modification of phospho-I kappaB and SOCS gene expression. Int J Exp Pathol. Apr;90(2):131 -40. doi: 10.1111/j.1365-2613.2008.00632.x.

- [5] Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*. Jun 8;336(6086):1268-73. doi: 10.1126/science.1223490. Epub 2012 Jun 6. Review.
- [6] Hooper LV, Macpherson AJ. (2010). Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*. Mar;10(3):159-69. doi: 10.1038/nri2710.
- [7] Oliveira RP, Santiago AF, Ficker SM, Gomes-Santos AC, Faria AMC. (2015). Antigen administration by continuous feeding enhances oral tolerance and leads to long -lasting effects. *J Immunol Methods*. Jun;421:36-43. doi: 10.1016/j.jim.2015.02.005. Epub 2015 Feb 20.
- [8] Macpherson AJ, de Agüero MG, Ganai-Vonarburg SC. (2017). How nutrition and the maternal microbiota shape the neonatal immune system. *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 17(8), pp. 508-517. doi: 10.1038/nri.2017.58.
- [9] Gaboriau-Routhiau V, Lécuyer E, Cerf-Bensussan N. (2011). Role of microbiota in postnatal maturation of intestinal T-cell responses. *Curr Opin Gastroenterol*. Oct;27(6):502-8. doi:10.1097/MOG.0b013e32834bb82b. Review.
- [10] Chinen T, Rudensky AY. (2012). The effects of commensal microbiota on immune cell subsets and inflammatory responses. *Immunol Rev*. 2012 Jan;245(1):45-55. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01083. Review.
- [11] Shulzhenko N, Morgun A, Hsiao W, Battle M, Yao M, Gavriloova O, et al. (2014). Crosstalk between B lymphocytes, microbiota and the intestinal epithelium governs immunity versus metabolism in the gut. *Nature Medicine*, 17(12), pp. 1585-1593. doi: 10.1038/nm.2505.
- [12] Kelly JR, Minuto C, Cryan JF, Clarke G, Dinan TG. (2017). Cross Talk: The Microbiota and Neurodevelopmental Disorders. *Frontiers in Neuroscience*, 11, p. 490. doi: 10.3389/fnins.2017.00490.
- [13] Sommer F, Bäckhed F. (2016). Know your neighbor: Microbiota and host epithelial cells interact locally to control intestinal function and physiology. *BioEssays*, 38(5), pp. 455- 464.
- [14] Andriessen EM, Wilson AM, Mawambo G, Dejda A, Miloudi K, Sennlaub F, et al. (2016). Gut microbiota influences pathological angiogenesis in obesity-driven choroidal neovascularization. *EMBO Mol Med*. 1;8(12):1366-1379. doi: 10.15252/emmm.201606531.
- [15] Khandagale A, Reinhardt C. (2018). Gut microbiota - architects of small intestinal capillaries. *Front Biosci (Landmark Ed)*. Jan 1;23:752-766.
- [16] Salzman NH. (2010). Paneth cell defensins and the regulation of the microbiome: détente at mucosal surfaces. *Gut Microbes*. 1(6):401-6. doi: 10.4161/gmic.1.6.14076. Review.
- [17] Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*, 489(7415), pp. 231-41. doi: 10.1038/nature11551.

- [18] Argüelles JC. (2008). Los microbios y el premio Nobel de medicina en 1908. *Anales de Biología* 30: 65-71. RESEÑA HISTÓRICA.
- [19] Fuller R. (1989). Probiotics in man and animals. *J Appl Bacteriol.* May;66(5):365-78.
- [20] Ashwell M. (2001). Functional foods: a simple scheme for establishing the scientific validity for all claims. *Public Health Nutr.* Jun;4(3):859-62.
- [21] Arioli S, Elli M, Ricci G, Mora D. (2013). Assessment of the susceptibility of lactic acid bacteria to biocides. *Int J Food Microbiol* 163:1-5. 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.002.
- [22] de Moreno de LeBlanc A, Galdeano CM, Chaves S, Perdígón G. (2005). Oral administration of *L. casei* CRL 431 increases immunity in bronchus and mammary glands. *European Journal of Inflammation*. Vol 3, n1, 25-30. SAGE Public.
- [23] Maldonado Galdeano C, Lemme-Dumit J, Thieblemont N, Carmuega E, Weill R, Perdígón G. (2015). Stimulation of Innate Immune Cells Induced by Probiotics: Participation of Toll-Like Receptors. *Journal of Clinical & Cellular Immunology*, 6(1), pp. 1- 9. doi: 10.4172/2155-9899.1000283.
- [24] Castillo NA, de Moreno de Leblanc A., Galdeano CM, Perdígón G. (2013). Comparative study of the protective capacity against *Salmonella* infection between probiotic and nonprobiotic lactobacilli. *Journal of Applied Microbiology*, 114(3), pp. 861 - 876. doi: 10.1111/jam.12074.
- [25] Ekmekci I, von Klitzing E, Fiebiger U, Neumann C, Bacher P, Scheffold A, et al. (2017). The Probiotic Compound VSL#3 Modulates Mucosal, Peripheral, and Systemic Immunity Following Murine Broad-Spectrum Antibiotic Treatment, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7, p. 167. doi: 10.3389/fcimb.2017.00167.
- [26] Novotny Núñez I, Maldonado Galdeano C, de Moreno de LeBlanc A, Perdígón G. (2015). *Lactobacillus casei* CRL 431 administration decreases inflammatory cytokines in a diet- induced obese mouse model. *Nutrition*. Jul-Aug;31(7-8):1000-7. doi: 10.1016/j.nut.2015.02.006. Epub 2015 Feb 24.
- [27] Aragón F, Carino S, Perdígón G, de Moreno de LeBlanc A. (2015). Inhibition of Growth and Metastasis of Breast Cancer in Mice by Milk Fermented with *Lactobacillus casei* CRL 431. *J Immunother.* 38(5):185-96. doi: 10.1097/CJI.0000000000000079.
- [28] Celiberto LS, Graef FA, Healey GR, Bosman ES, Jacobson K, Sly LM, et al. (2018). Inflammatory bowel disease and immunonutrition: novel therapeutic approaches through modulation of diet and the gut microbiome. *Immunology*. Apr 25. doi: 10.1111/imm.12939. [Epub ahead of print] Review.
- [29] Maldonado Galdeano C and Perdígón G. (2004). Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *The society for Applied Microbiology* Ed. ISSN: 1365-2672. *Journal of Applied Microbiology*, 97: 673–681

- [30] Cazorla SI, Maldonado-Galdeano C, Weill R, De Paula J, Perdigón G. (2018). Oral administration of probiotics increases Paneth Cells and intestinal antimicrobial activity. *Front. Microbiol.* 9:736. doi: 10.3389/fmicb.2018.00736
- [31] Dogi CA, Perdigón G. (2006). Importance of the host specificity in the selection of probiotic bacteria. *J Dairy Res.* 73(3):357-66.
- [32] Lemme-Dumit JM, Polti MA, Perdigón G, Galdeano CM. (2018). Probiotic bacteria cell walls stimulate the activity of the intestinal epithelial cells and macrophage functionality. *Benef Microbes.* Jan 29;9(1):153-164. doi: 10.3920/BM2016.0220.
- [33] Jang MH, Kweon MN, Iwatani K, Yamamoto M, Terahara K, Sasakawa C, et al. (2004). Intestinal villous M cells: an antigen entry site in the mucosal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 20;101(16):6110-5.
- [34] Rescigno MJ. (2008). Intestinal epithelial cells control dendritic cell function. *Pediatr Gastroenterol Nutr.* Apr;46 Suppl 1:E17-9. doi: 10.1097/01.mpg.0000313831.09089.36. Review.
- [35] Kunisawa J, Kiyono H. (2013). Immune regulation and monitoring at the epithelial surface of the intestine. *Drug Discov Today.* Jan;18(1-2):87-92. doi: 10.1016/j.drudis.2012.08.001. Epub 2012 Aug 9. Review.
- [36] Maldonado Galdeano C, Dogi C, Perdigón G. (2013). Difference in the Signals Induced by Commensal or Probiotic Bacteria to the Gut Epithelial and Immune Cells. *Capítulo de libro en: Probiotics: Immunobiotics and Immunogenics.* Ed.: Haruki Kitazawa, Julio Villena and Susana Alvarez. Editorial: CRC Press. New York. Pp 36-53.
- [37] Asgari F, Falak R, Teimourian S, Pourakbari B, Ebrahimnezhad S, Shekarabi M. (2018). Effects of Oral Probiotic Feeding on Toll-Like Receptor Gene Expression of the Chicken's Cecal Tonsil. *Rep Biochem Mol Biol.* 6(2):151-157.
- [38] Habil N, Abate W, Beal J, Foey AD. (2014). Heat-killed probiotic bacteria differentially regulate colonic epithelial cell production of human b-defensin- 2: dependence on inflammatory cytokines. *Benef. Microbes* 5, 483–495. doi: 10.3920/BM2013.0061.
- [39] Liu Z, Tian Y, Jiang Y, Chen S, Liu T, Moyer MP, Qin H, et al. (2018). Protective Effects of Let-7b on the expression of occludin by Targeting P38 MAPK in preventing intestinal barrier dysfunction. *Cell Physiol Biochem.* 45(1):343-355. doi: 10.1159/000486815
- [40] Du W, Xu H, Mei X, Cao X, Gong L, Wu Y, et al. (2018). Probiotic *Bacillus* enhance the intestinal epithelial cell barrier and immune function of piglets. *Benef Microbes.* 13:1-12. doi: 10.3920/BM2017.0142.
- [41] Karimi S, Jonsson H, Lundh T, Roos S. (2018). *Lactobacillus reuteri* strains protect epithelial barrier integrity of IPEC-J2 monolayers from the detrimental effect of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Physiol Rep.* 6(2). doi: 10.14814/phy2.13514.

- [42] Gutzeit C, Magri G, Cerutti A. (2014). Intestinal IgA production and its role in host-microbe interaction. *Immunol Rev.* 260(1):76-85. doi: 10.1111/imr.12189.
- [43] Cerutti A, Rescigno M. (2008). The biology of intestinal immunoglobulin A responses. *Immunity.* 28(6):740-50. doi: 10.1016/j.immuni.2008.05.001.
- [44] Perdigón G, Vintiñi E, Alvarez S, Medina M, Medici M. (1999). Study of the possible mechanisms involved in the mucosal immune system activation by lactic acid bacteria. *J Dairy Sci.* 82(6):1108-14.
- [45] Ahn KB, Jeon JH, Baik JE, Park OJ, Kang SS, Yun CH, Park JH, Han SH. (2014). Muramyl dipeptide potentiates staphylococcal lipoteichoic acid induction of cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *Microbes Infect.* 16(2):153-60. doi: 10.1016/j.micinf.2013.10.018. *Infect Immun.* 55(3):674-9.
- [46] Bougarn S, Cunha P, Harmache A, Fromageau A, Gilbert FB, Rainard P. (2010). Muramyl dipeptide synergizes with *Staphylococcus aureus* lipoteichoic acid to recruit neutrophils in the mammary gland and to stimulate mammary epithelial cells. *Clin Vaccine Immunol.* 17(11):1797-809. doi: 10.1128/CI.00268-10.
- [47] Kim HJ, Yang JS, Woo SS, Kim SK, Yun CH, Kim KK et al. (2007). Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of proinflammatory cytokines. *J Leukoc Biol.* 81(4):983-9.
- [48] Allen JB, Wilder RL. (1987). Variable severity and Ia antigen expression in streptococcal-cell-wall-induced hepatic granulomas in rats.
- [49] Fong FL, Shah NP, Kirjavainen P, El-Nezami H. (2016). Mechanism of action of probiotic bacteria on intestinal and systemic immunities and antigen-presenting cells. *Int Rev Immunol.* 3;35(3):179-88. doi: 10.3109/08830185.2015.1096937.
- [50] Maldonado Galdeano C, Vélez EM, Lemme Dumit JM, Perdigón G. (2016). Sistema Inmune de las Mucosas. Influencia bacteriana en la activación y homeostasis intestinal. Capítulo de libro en: "Probióticos, prebióticos y salud: Evidencia científica." Ed. Guillermo Álvarez Calatayud, Ascensión Marcos, Abelardo Margolles. Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos. Ergon Creación, S.A. páginas: 133-138.
- [51] Velez EM, Maldonado Galdeano C, Carmuega E, Weill R, Bibas Bonet ME, Perdigón G. (2015). Probiotic fermented milk consumption modulates the allergic process induced by ovalbumin in mice. *Br J Nutr.* 114(4):566-76. doi: 10.1017/S0007114515001981.
- [52] Díaz AM, Almozni B, Molina MA, Sparo MD, Manghi MA, Canellada AM, Castro MS. (2018). Potentiation of the humoral immune response elicited by a commercial vaccine against bovine respiratory disease by *Enterococcus faecalis* CECT7121. *Benef Microbes.* 10:1-10. doi: 10.3920/BM2017.0081.

- [53] Beirão BCB, Ingberman M, Fávaro C Jr, Mesa D, Bittencourt LC, Fascina VB, Caron LF. (2018). Effect of an *Enterococcus faecium* probiotic on specific IgA following live *Salmonella* Enteritidis vaccination of layer chickens. *Avian Pathol.* 47(3):325-333. doi: 10.1080/03079457.2018.1450487.
- [54] Maldonado Galdeano C, Novotny Núñez I, de Moreno de LeBlanc A, Carmuega E, Weill R, Perdigón G. 2011. Impact of a probiotic fermented milk in the gut ecosystem and in the systemic immunity using a non-severe protein-energy-malnutrition model in mice. *BMC Gastroenterol.* 26;11:64. doi: 10.1186/1471-230X-11-64
- [55] Maldonado Galdeano C and Perdigón G. (2006). The probiotic bacterium *Lactobacillus casei* induces activation of the gut mucosal immune system through the innate immunity. *American Society for Microbiology Ed.* ISSN: 1556-6811. *Clinical and Vaccine Immunology*, 13 (2): 219-226.
- [56] Lemme Dumit José María, Saavedra Lucila, Hebert, Elvira, Perdigón G, Maldonado Galdeano C. Modulation of signaling pathways by probiotics in the gut mucosa. *International Congress of Mucosal Immunity. (ICMI).* Washington. Estados Unidos. 19-22 de Julio 2017.
- [57] de Moreno de LeBlanc A, Dogi C, Maldonado Galdeano C, Carmuega E, Weill R, Perdigón G. (2008). Effect of the administration of fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114001 on intestinal microflora and immune cells associated to the gut of neonate mice. *BMC Immunology*: 27(9)
- [58] Lopetuso LR, Napoli M, Rizzatti G, Gasbarrini A. (2018). The intriguing role of Rifaximin in gut barrier chronic inflammation and in the treatment of Crohn's disease. *Expert Opin Investig Drugs.* doi: 10.1080/13543784.2018.1483333.
- [59] Castillo NA, Perdigón G, de Moreno de Leblanc A. (2011). Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol.* 3;11:177. doi: 10.1186/1471-2180-11-177.
- [60] Lorea Baroja M, Kirjavainen PV, Hekmat S, Reid G. (2007). Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clin Exp Immunol.* 149(3):470-9.
- [61] Barbieri N, Herrera M, Salva S, Villena J, Alvarez S. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 nasal administration improves recovery of T-cell mediated immunity against pneumococcal infection in malnourished mice. *Benef Microbes.* 30;8(3):393-405. doi: 10.3920/BM2016.0152.
- [62] Parma M, Stella Vanni V, Bertini M, Candiani M. (2014). Probiotics in the prevention of recurrences of bacterial vaginosis. *Altern Ther Health Med.* 20 Suppl 1:52-7.
- [63] Leccese Terraf MC, Juárez Tomás MS, Rault L, Le Loir Y, Even S, Nader-Macías MEF. (2017). In vitro effect of vaginal lactobacilli on the growth and adhesion abilities of uropathogenic *Escherichia coli*. *Arch Microbiol.* 199(5):767-774. doi: 10.1007/s00203-016-1336-z.

- [64] Kang Y, Cai Y. (2018). The development of probiotics therapy to obesity: a therapy that has gained considerable momentum. *Hormones (Athens)*. doi: 10.1007/s42000-018-0003-y.
- Karimi S, Jonsson H, Lundh T, Roos S. (2018). *Lactobacillus reuteri* strains protect epithelial barrier integrity of IPEC-J2 monolayers from the detrimental effect of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Physiol Rep*. 6(2). doi: 10.14814/phy2.13514.
- [65] Ji Y, Park S, Park H, Hwang E, Shin H, Pot B, Holzapfel WH. (2018). Modulation of Active Gut Microbiota by *Lactobacillus rhamnosus* GG in a Diet Induced Obesity Murine Model. *Front Microbiol*. 10;9:710. doi: 10.3389/fmicb.2018.00710.
- [66] Aragón F, Carino S, Perdigón G, de Moreno de LeBlanc A. (2014). The administration of milk fermented by the probiotic *Lactobacillus casei* CRL 431 exerts an immunomodulatory effect against a breast tumour in a mouse model. *Immunobiology*. 219(6):457-64.

PROBIÓTICOS Y NUTRICIÓN ANIMAL

Eloy Argañaraz Martínez

- CCT Tucumán-CONICET,
- Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 471, T4000ILC San Miguel de Tucumán, Argentina.

Jaime Babot

- Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CCT Tucumán-CONICET), Chacabuco 145, T4000ILC San Miguel de Tucumán, Argentina,

María Cristina Apella

- Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CCT Tucumán-CONICET), Chacabuco 145, T4000ILC San Miguel de Tucumán, Argentina,
- Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 471, T4000ILC San Miguel de Tucumán, Argentina.

Adriana Pérez Chaia

apchaia@cerela.org.ar

- Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CCT Tucumán-CONICET), Chacabuco 145, T4000ILC San Miguel de Tucumán, Argentina,
- Universidad Nacional de Tucumán, Ayacucho 471, T4000ILC San Miguel de Tucumán, Argentina.

RESUMEN

Desde hace miles de años, el aporte de proteínas, vitaminas y micronutrientes proviene fundamentalmente de la carne, cuando se la consume con suficiente frecuencia. La carne, a su vez, aporta los aminoácidos necesarios para el metabolismo humano, en tanto la composición proteica animal y humana son –en líneas generales– similares. En la actualidad, dicha carne proviene de terneros, cerdos y pollos de engorde y, en menor extensión, pavos, ovejas, cabras y peces. El mejoramiento en la producción de estas especies de animales se centra alrededor del diseño de nuevas estrategias para lograr productos de alto valor nutricional, sea para conseguir mejores carnes como para mejorar la calidad de la producción de huevos y leche.

No obstante, la calidad de los animales producidos no es la única

preocupación, sino que el diseño de nuevas estrategias de producción debe atender también al respeto por el bienestar animal, debe garantizar la sanidad durante la producción y la seguridad alimentaria de los productos, preservando –ambas– la salud animal y la salud humana.

En este marco, a lo largo de este capítulo se revisa la composición de la microbiota de los distintos grupos de animales de cría, junto con los factores que pueden afectarla. Dicha revisión sirve, en este capítulo, como base para el análisis del uso de probióticos en la alimentación de animal. Se realiza aquí, una revisión de los principales efectos y ventajas de dicha práctica.

I. INTRODUCCIÓN

Junto con el desarrollo de la agricultura, hace más de 10.000 años, el hombre aprendió a domesticar y utilizar a los animales para el aprovechamiento de la carne, leche, huevos, y productos derivados que fue incorporando progresivamente a su dieta. La carne de diferentes animales, bajo la forma de cortes del tejido muscular y órganos internos, embutidos y productos fermentados, contribuye significativamente a la ingesta de proteínas, vitaminas y micronutrientes, cuando se consume con frecuencia [1]. Debido a que el perfil de aminoácidos en las células de animales y humanos es similar, la proteína animal puede aportar la mayoría de los aminoácidos requeridos por el hombre.

Actualmente, la producción mundial de animales para consumo humano de carnes, se concentra principalmente en la cría de terneros, cerdos y pollos de engorde y, en menor extensión, pavos, ovejas, cabras y peces, aplicando diversas estrategias dietarias para lograr productos de alto valor nutricional [2]. La producción de leche y de huevos da base a industrias independientes que, junto a la industria cárnica, proveen una gran parte de los alimentos que consume el hombre.

De acuerdo con la proyección del crecimiento poblacional, se espera que en el año 2050 la población mundial supere los 9 mil millones de habitantes, causando una fuerte demanda de alimentos [3]. Ante este panorama, la agricultura mundial está forzada a generar estrategias para producir mayor cantidad y calidad de alimentos, preservando los recursos naturales, como el agua, la atmósfera, los suelos, y la biodiversidad amenazada por el uso intensivo de la tierra. La producción animal enfrenta, además, la responsabilidad de respetar el bienestar animal, garantizar la sanidad durante la producción y la seguridad alimentaria de los productos, preservando la salud humana [4, 5], sumado al esfuerzo de proteger el medio ambiente de la contaminación por desechos y emisiones de gases que derivan de la actividad pecuaria.

II. PRODUCCIÓN ANIMAL INTENSIVA

Los sistemas de producción intensiva desempeñan un papel cada vez más importante en la actividad pecuaria en todo el mundo. Se caracterizan por ser una forma de explotación animal altamente “tecnificada”, que coloca al ganado en condiciones tales que permitan al productor lograr altos rendimientos productivos en el menor tiempo posible. En el modelo de producción intensiva se utilizan instalaciones y maquinarias de mayor complejidad y mano de obra calificada; la raza del animal se selecciona por la velocidad de conversión del alimento en músculo, leche o huevos, y el animal dispone de menor espacio para moverse. Aunque el sistema intensivo permite obtener productos uniformes con alto rendimiento, aumenta la necesidad de controlar algunos aspectos relacionados con el bienestar y la sanidad animal.

Tradicionalmente, se han utilizado dosis subterapéuticas de algunos antibióticos para prevenir enfermedades infecciosas y lograr el rápido crecimiento de los animales bajo cría intensiva. El mecanismo por el cual los Antibióticos Promotores de Crecimiento (APC) ejercen efectos positivos en la producción animal, se relaciona con la disminución de poblaciones microbianas intestinales por antibiosis, lo que permite que una mayor cantidad de los nutrientes que alcanzan el intestino queden disponibles para ser digeridos y utilizados por el hospedador animal. A pesar de los beneficios que esta práctica aportaba a la producción, la Unión Europea prohibió el uso de antibióticos como promotores del crecimiento animal hace poco más de 10 años, debido a que la exposición de las bacterias intestinales a concentraciones sub-letales de agentes antimicrobianos puede producir adaptación y selección de microorganismos resistentes a antibióticos. Cuando la resistencia obedece a cambios a nivel del genoma, las bacterias alcanzan alta resistencia a un determinado antibiótico, y muchas veces a múltiples agentes [6].

Debido a la alta densidad de la comunidad microbiana intestinal, existe un alto riesgo de transferencia de genes de resistencia a otros microorganismos del mismo ecosistema, lo que puede ocurrir por incorporación de fragmentos de ADN libre proveniente de bacterias muertas y lisadas, o por transferencia de plásmidos conteniendo un gen de resistencia. Los microorganismos resistentes a antibióticos, tanto comensales como patógenos, alcanzan el medio externo con la evacuación de las heces del animal portador. En el exterior, las bacterias intestinales utilizan mecanismos de supervivencia como la aerotolerancia, latencia, y esporulación hasta llegar a un nuevo hospedador [7]. La transmisión de resistencias puede ocurrir por el contacto directo con las heces de animales portadores en las granjas y en establecimientos de faena. De manera indirecta, la transmisión se produce a través de efluentes o alimentos de origen animal contaminados, y por contacto entre seres humanos, cuando uno de ellos es portador de una población microbiana con genes de resistencia [8].

Una vez ingeridas por un nuevo hospedador, las bacterias alcanzan el intestino, donde deben competir con la microbiota residente para su establecimiento. Los patógenos utilizan los mismos mecanismos de la microbiota comensal, pero pueden lograr la colonización del hospedador induciendo la expresión de factores de virulencia, como toxinas, mucinasas, adhesinas, invasinas, que interfieren con el metabolismo intestinal, pueden provocar inflamación y perturbar la microbiota residente del receptor. El metabolismo de los nutrientes y la replicación promueven la persistencia del patógeno e inciden sobre su potencial transmisión convirtiendo al individuo receptor en un donante [7].

La prohibición del uso de APC, ha aumentado la incidencia de infecciones propias del animal y, actualmente, se estima que las enfermedades causan el 20% de las pérdidas económicas de la producción pecuaria en el mundo. El 60% de las enfermedades infecciosas en humanos son zoonóticas, lo que evidencia el impacto que tiene el aumento de las enfermedades durante la producción animal. Aunque la prohibición del uso de APC en la Unión Europea y Estados Unidos se encuentra vigente desde

hace varios años, un gran número de países no ha adoptado todavía esta restricción y tampoco cuentan con organismos de control en la etapa de producción primaria, lo que podría llevar al aumento del uso de APC en paralelo a la demanda de productos alimenticios de origen animal, especialmente en países que comienzan a reemplazar la producción animal extensiva por intensiva [9].

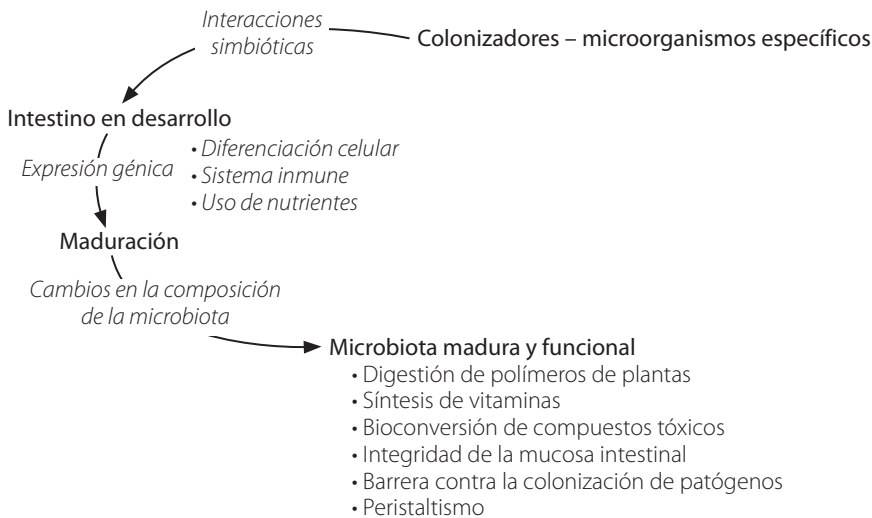
Algunos patógenos intestinales, como *Campylobacter*, *Salmonella*, algunas cepas de *E. coli* y *Clostridium*, pueden alcanzar la cadena alimentaria, ser causa de enfermedades en el hombre y un problema para la salud pública. Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son una causa importante de morbilidad y mortalidad en humanos en todo el mundo, por lo que es necesario extremar las medidas de control, tanto en la fase de producción animal primaria como en las etapas subsiguientes de la cadena alimentaria, para minimizar el riesgo de transmisión de patógenos. Sin embargo, resulta claro que la principal forma de control consiste en evitar su proliferación a nivel intestinal.

Los conocimientos disponibles sobre la ecología intestinal, factores que predisponen a la infección y proliferación de patógenos intestinales, y los mecanismos de defensa del hospedador animal, son fundamentales para desarrollar estrategias de control de las enfermedades y de su transmisión al hombre, que permitan el reemplazo de APC en la producción animal.

III. LA MICROBIOTA INTESTINAL DE ANIMALES DE GRANJA

Al momento del nacimiento, el intestino de los vertebrados es aún inmaduro. Los animales parecen tener un programa conservado de interacciones con los microorganismos con los que han co-evolucionado, lo que incide sobre la selección de las bacterias que colonizan el intestino, en una etapa previa o a partir del nacimiento [10]. En la luz intestinal, éstas encuentran los nutrientes necesarios para su proliferación y establecen relaciones simbióticas con su hospedador (ver **Figura 1**). La colonización microbiana, a su vez, induce cambios en la homeostasis del epitelio intestinal, debido al aumento de la expresión de genes relacionados con la proliferación y diferenciación celular, la función inmune y la utilización de nutrientes. Así, el establecimiento de los microorganismos es fundamental para el desarrollo y maduración del intestino.

Figura 1. Eventos de la colonización y sucesión microbiana intestinal en animales.



Los cambios que se producen durante la maduración se acompañan a su vez de cambios progresivos en la composición de la comunidad microbiana intestinal hasta que ésta alcanza la complejidad de una microbiota comensal madura y funcional. Entre sus efectos beneficiosos, la microbiota intestinal está involucrada en la degradación de nutrientes complejos como las proteínas, y en la hidrólisis y fermentación de polímeros de plantas, siendo esto último de particular importancia en animales herbívoros. También es responsable de la síntesis de vitaminas, bioconversión de compuestos tóxicos a residuos no tóxicos, mantenimiento de la peristalsis y de la integridad de la mucosa intestinal, además de actuar como una barrera frente a la colonización por patógenos (ver **Figura 1**).

La caracterización de las comunidades microbianas en los distintos animales y de los procesos metabólicos que llevan a cabo los microorganismos, aporta información de gran valor para el desarrollo de estrategias de nutrición adecuadas, y de programas de prevención de salud que permitan limitar el uso de antibióticos con fines tanto profilácticos como terapéuticos.

III.A. MICROBIOTA DE AVES

La avicultura es, actualmente, el sistema productivo animal más eficiente gracias a un proceso de selección genética que se desarrolló durante varias décadas. En animales adultos genéticamente seleccionados, las funciones bioquímicas del ave, coordinadas con la actividad de su microbiota intestinal, permiten el máximo aprovechamiento de los alimentos y la producción de proteínas de alta calidad.

Estudios recientes de Wei y col. [11], utilizando todos los datos disponibles sobre microbioma de aves de corral, mostraron la existencia de aproximadamente

900 especies, clasificadas en 13 filos, de los cuales Firmicutes representa el 70%, Bacteroidetes el 12.3% y Proteobacteria el 9.3%, abarcando entre estos tres filum más del 90% de las secuencias analizadas. Entre los géneros predominantes se ubican *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Clostridium* y *Ruminococcus*. Entre las Actinobacterias, *Bifidobacterium* representa sólo el 1% de las secuencias encontradas, mientras que las Archeas están representadas sólo por algunas secuencias de *Euryarcheota*, confirmando la escasez de metanógenos en las aves.

La colonización microbiana del tracto intestinal en estos animales puede iniciarse en la etapa de formación del huevo en el oviducto de la madre, o en el periodo previo a la eclosión con el ingreso de microorganismos a través de poros de la cáscara del huevo [12, 13]. Después del nacimiento, la colonización continúa con microorganismos provenientes del ambiente externo, en la granja de cría o durante el transporte a ellas [14]. La complejidad de la microbiota intestinal aumenta durante las primeras semanas de vida, mientras la variación individual disminuye con el aumento de la edad del animal [15]. Los principales grupos bacterianos encontrados en el buche y estómago, incluyen a *Lactobacillus*, *Clostridiaceae*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium* y *Enterobacteriaceae*.

La microbiota del intestino delgado completa su conformación en aproximadamente dos semanas después del nacimiento, por lo cual, tanto las funciones digestivas como las de defensas del animal frente a infecciones no se desarrollan completamente hasta después de los primeros 15 días de vida. Durante este período, la salud del animal depende, casi completamente, de los anticuerpos transmitidos por la madre a través del huevo [16]. El intestino delgado aún en las aves adultas tiene baja diversidad bacteriana, lo que se relaciona con el rápido tránsito de los alimentos y menor tiempo de retención comparado al de otros animales y el hombre. Los principales microorganismos alojados en el intestino delgado son *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Clostridiaceae*, y *Enterobacteriaceae*. La microbiota del intestino grueso y de los ciegos alcanza estabilidad después de las tres o cuatro semanas de vida del animal debido a su mayor complejidad [17] y, coincidiendo con un mayor tiempo de retención de los alimentos, los ciegos alcanzan mayor recuento de microorganismos. Predominan *Clostridiaceae*, *Bacteroidetes*, *Bifidobacterium*, y otros anaerobios obligados como *Faecalibacterium*, *Butyrivibrio*, *Megamonas*, *Roseburia*, *Ethanoligenes*, *Hespellia*, *Veillonella*, y *Anaerostipes* [11]. El análisis metagenómico muestra la presencia de gran cantidad de secuencias que corresponden a glicosil hidrolasas. Se encuentran genes que codifican enzimas de la degradación de celulosa y xilanos, sugiriendo la capacidad de degradar polisacáridos no amiláceos [18]. El metagenoma cecal muestra, además, la presencia de varias vías metabólicas que conducen a la producción de ácidos grasos de cadena corta [19]. Las heces de aves están colonizadas por *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, *Bacillus*, *Eubacterium*, y *Fusobacterium*. El análisis metaproteómico de las heces muestra presencia de proteasas y enzimas relacionadas a glucólisis [20].

La rentabilidad de la producción pecuaria depende, entre otros factores, de la

calidad del alimento que se usa y de la capacidad del animal para transformarlo en masa corporal, o en otros productos objeto de la actividad. La relación entre el alimento consumido y el peso ganado por el animal en un periodo de prueba se puede expresar como Índice de Conversión Alimenticia (ICA), mientras la Eficiencia Alimenticia (EA), representa el peso ganado por el animal en relación a la cantidad de alimento ingerido para obtenerlo. Los animales con menores requisitos de energía de mantenimiento, pueden obtener mayor peso corporal cuando los alimentos se digieren de manera adecuada. Esto se interpreta como un mejor aprovechamiento de nutrientes, y puede relacionarse con la actividad de la microbiota intestinal. La pirosecuenciación de la región V3 del gen del ARN 16S, ha demostrado que bacterias que degradan celulosa y almidón y bacterias que producen butirato en el ciego, incluyendo a *Clostridium*, *Ruminococcus* y *Bacteroides*, se asocian con un valor más bajo de ICA [21]. En otro estudio, amplificando la región V4 del gen del ARNs 16S, se determinó la relación entre la composición de la microbiota del tracto gastrointestinal y la ganancia de peso corporal de aves alojadas y alimentadas de la misma manera. Se estableció que la presencia de *Streptococcus*, en el íleon, y *Akkermansia*, tanto en íleon como en ciego, se relaciona negativamente con la ganancia de peso corporal; por el contrario, *Bifidobacterium*, en íleon, y *Lactococcus*, en el ciego, favorecen la ganancia de peso del animal [22].

Un bajo aprovechamiento de nutrientes consumidos, con exceso de alimentos no digeridos en el intestino, pueden ser factores predisponentes a la infección por diferentes patógenos. Ente los patógenos encontrados en el intestino de aves, *Campylobacter* puede alcanzar un recuento elevado, del orden de 107 UFC/g, aunque se acepta que en general no produce enfermedad en el animal. Las especies de *Salmonella*, en cambio, se encuentran en bajo nivel y esporádicamente, pero causan enfermedad en el animal dependiendo de la edad, estado inmunológico y serovariedad. En aves, *E. coli* alcanza un recuento moderado en el intestino y tiene importancia principalmente en la transmisión de genes de resistencia a antibióticos a la microbiota intestinal; la variedad patógena para aves de corral, *E. coli* APEC, produce enfermedad respiratoria pero no se relaciona con el patógeno aislado de la cadena alimentaria. *Clostridium perfringens* se encuentra como bacteria comensal en las aves y en bajo número, pero puede ser causa de enteritis necrotizante especialmente en animales con dietas excesivamente ricas en polisacáridos solubles resistentes a digestión, y transmitirse al hombre a través de productos alimenticios de origen aviar.

III.B. MICROBIOTA DE PORCINOS

Los cerdos se parecen al ser humano en términos de anatomía del tracto gastrointestinal, fisiología, régimen dietario y digestibilidad de nutrientes [23]. Deusch y col. [18] analizaron la microbiota de cerdos por amplificación de las regiones V1-V3 del gen del ARNr 16S y posterior pirosecuenciación de los amplicones. Se determinó la presencia casi exclusiva de los filos *Firmicutes* y *Proteobacteria* en el lumen del íleon,

mientras que el ciego y la primera porción del colon mostraron mayor diversidad, con *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes* y *Spirochetes* como los filos mayoritarios. *Bacteroidetes* representó casi la mitad del microbioma en el intestino grueso, con presencia de genes relacionados a la degradación de polisacáridos. Por el contrario, *Firmicutes* mostró abundancia de genes asociados a la utilización de moléculas de menor tamaño, aminoácidos y monosacáridos, sugiriendo la cooperación de las poblaciones de la microbiota en el metabolismo de los nutrientes.

El análisis metagenómico de las heces, reveló abundancia de *Firmicutes* no clasificados, *Bacteroidales*, *Clostridiales*, *Spirochetales*, *Gammaproteobacteria* no clasificadas y *Lactobacillales*, como los principales órdenes. Las Arqueas representaron menos del 1% del total de secuencias analizadas en el intestino de cerdos, con presencia de *Methanomicrobia* y *Thermococci*.

McCormack y col. [24] mostraron la relación entre la composición de la microbiota de cerdos y la eficiencia en el consumo de alimentos (EA). Los animales se agruparon de acuerdo a la eficiencia para analizar la composición microbiana en diferentes regiones del intestino, los metabolitos y la morfología intestinal durante la vida del animal. A diferencia del estudio de Deusch y col. [18], McCormack y col. encontraron mayor abundancia de *Firmicutes* y *Actinobacterias* en el íleon, y *Firmicutes* y *Bacteroidetes* en las restantes regiones del intestino. *Proteobacteria* fue más abundante en íleon y ciego que en heces, mientras *Spirochetes* sólo estuvo presente en el ciego. A nivel de género, observaron correlación positiva entre la presencia de *Butyrivibrio* y la fermentación de carbohidratos complejos en animales de mayor eficiencia alimentaria a la edad del destete, coincidiendo con la incorporación de cereales en la dieta. En estos animales observaron, además, abundancia de *Prevotella* y miembros de *Bacteroidetes*, coincidiendo con la mayor capacidad de estos microorganismos para fermentar carbohidratos. Con respecto a la morfología intestinal, observaron mayor longitud de vellosidades, menor profundidad de criptas, menor número de células caliciformes y menor producción de mucinas en animales de mayor eficiencia en la conversión del alimento, sugiriendo una relación entre la eficiencia alimentaria y la mayor superficie de absorción intestinal, con menor interferencia en la captación de nutrientes por la capa de mucus superficial. Por otra parte, demostraron la existencia de bacterias con actividad proteolítica, por la presencia de ácido isobutírico, derivado de la fermentación de valina. Un hallazgo importante en el íleon de animales de mejor eficiencia alimentaria, fue la menor abundancia de *Rhodococcus*, un género que incluye especies que causan enfermedades en cerdos, lo que podría interpretarse como indicativo de un estado más saludable en animales de mejor EA [24].

III.B. MICROBIOTA DE RUMIANTES

El rumen alberga un complejo microbioma constituido mayoritariamente por bacterias (1010/mL), y en menor proporción arqueas, protozoarios y esporas de hongos [25]. De acuerdo a estudios realizados por Rey y col. (2013), la colonización del

rumen se inicia después del nacimiento del animal, es secuencial, y se produce en tres etapas coincidiendo con cambios en la alimentación. Hasta los 3 días de vida, se establecen bacterias que provienen de la vagina de la madre, la piel, el calostro y el ambiente, particularmente de los filos *Proteobacteria* (70% del total), *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Fusobacteria*. A nivel de género, estos microorganismos están representados mayormente por *Bacteroides*, *Prevotella*, *Ruminococcus*, entre los anaerobios obligados, y *Pasteurella* y *Streptococcus*, entre los facultativos. En un segundo estadio, entre los 3 y los 12 días, los animales consumen leche en reemplazo del calostro inicial. En este periodo, predomina *Bacteroides*, aunque son importantes también *Prevotella*, *Actinobacillus*, *Fusobacterium* y *Streptococcus*, que aportan al rumen su actividad fermentativa. Al final de este periodo, cuando el animal comienza a consumir concentrado, la comunidad microbiana comienza a modificarse; se observa disminución de *Bacteroides*, y se detecta *Succinivibrio* y producción de ácidos grasos volátiles. El tercer estadio, se caracteriza por el aumento de consumo de concentrado hasta representar el mayor porcentaje de la dieta, lo que conduce a cambios en la composición de la microbiota ruminal, con descenso de *Actinomyces*, *Bacteroides*, *Streptococcus*, *Fusobacterium*, y aumento de *Proteobacteria*, entre estas, *Prevotella* y *Coriobacterineae* [26].

Un estudio metagenómico reciente del rumen de animales adultos [27], permitió resolver los genomas ruminales a nivel de filo, mostrando predominio de *Firmicutes* (50%), *Bacteroidetes* (36%), *Actinobacteria* (3,5%), *Proteobacteria* (3,1%), *Euryarchaeota* (3,1%) y *Spirochaetes* (1%). A nivel de especies detectaron la presencia de *Bacillus licheniformis* que codifica enzimas que degradan celulosa y hemicelulosa; *Kandleria vitulina*, positivamente relacionada con el rendimiento de leche y negativamente relacionada con las emisiones de metano; *Acidaminococcus fermentans*, un productor de hidrógeno que se asocia a la producción de metano por reacción con dióxido de carbono; *Megasphaera* spp., que produce una variedad de ácidos grasos volátiles; *Bifidobacterium merycicum*, fermentador de almidón con producción de ácido acético y láctico; y *S. bovis*, considerada una bacteria clave en la producción de ácido láctico, y responsable de la acidosis ruminal. También detectaron la presencia de especies de *Methanobrevibacter*, *Methanomethylophilus* y *Methanosphaera*, productoras de metano a partir de CO₂, metanol y acetato, respectivamente. Los genomas analizados permitieron predecir la presencia de glicosido hidrolasas (GHs), glicosil transferasas (GTs), polisacárido liasas (PLs), carbohidrato esterasas (CEs) y otras enzimas accesorias. GHs y GTs abundan en *Prevotellaceae* y otros *Bacteroidales*, *Fibrobacteres* y algunos *Clostridiales*, y, en cambio, están ausentes en las *Archaea* y en *Proteobacteria* del rumen.

La microbiota intestinal participa en diferentes aspectos de la vida del animal, incluyendo el desarrollo del sistema inmunológico y el balance energético. Un crecimiento eficiente y baja incidencia de enfermedades, son condiciones indispensables para una producción animal rentable. Oikonomou y col. [28] determinaron el perfil microbiano de terneros durante las primeras siete semanas de vida, diferenciando grupos

de animales de alto o bajo peso corporal, y grupos afectados o no con diarrea en las primeras semanas. En este estudio concluyeron que la presencia de *Faecalibacterium* sp. en la primera semana de vida del animal, estaba asociado con mayor ganancia de peso y baja incidencia de diarrea en las semanas previas al destete, lo que parece estar relacionado con su capacidad para producir ácido butírico a partir de acetato, dado que el primero es intensamente utilizado como fuente de energía por el epitelio del rumen y el epitelio colónico. La menor incidencia de diarreas se atribuyó principalmente a la actividad antiinflamatoria de *Faecalibacterium*.

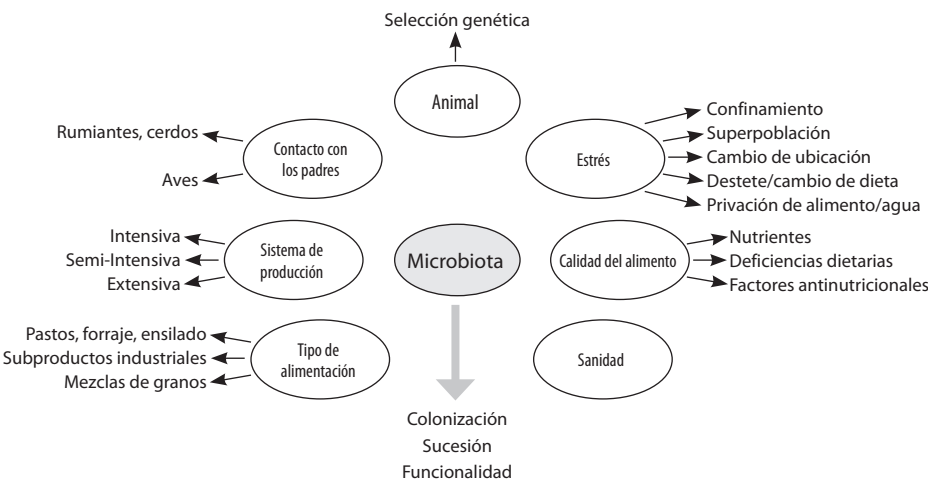
La producción de leche es también un objetivo de la ganadería que depende de varios factores, como la genética del animal, factores ambientales, alimentación, estado inmunológico, entre otros. Jewell y col. [29] evaluaron la eficiencia en la producción de leche en diferentes periodos de dos ciclos de lactación de vacas Holstein, con el objetivo de determinar si la comunidad microbiana del rumen tenía influencia en la productividad. De los resultados de este estudio, concluyeron que la diferencia entre animales con alta y baja eficiencia de lactación tenía mayor relación con la presencia de determinados miembros en la comunidad del rumen que con la diversidad total de la microbiota ruminal. Una baja eficiencia en la lactación se asoció con alta prevalencia de *Anaerovibrio* y *Butyrivibrio*, mientras la alta eficiencia de lactación se relacionó con comunidades ruminales de mayor abundancia de *Coprococcus*.

IV. FACTORES QUE AFECTAN A LA MICROBIOTA INTESTINAL EN LA PRODUCCIÓN INTENSIVA

Diferentes factores externos influyen sobre la sucesión microbiana intestinal durante el desarrollo del animal de cría intensiva, y sobre la composición de la microbiota del adulto. Entre éstos, los más significativos son la relación con los progenitores y otros adultos (crecimiento aislado o en contacto con adultos), tipo y forma de alimentación (fórmulas a base de granos, pasturas o ensilados), cambios en la composición o tipo de alimentos (el cambio de pastura a granos más fácilmente fermentables, y el destete, con una microbiota aún inmadura), cambios fisiológicos durante el desarrollo y madurez sexual, interacción con el ambiente (confinamiento en jaulas, galpones, o cría en corrales a cielo abierto), traslado de animales (a diferentes alojamientos o lugares geográficos), y medidas higiénicas de los establecimientos (limpieza, calidad microbiológica del agua y almacenamiento de los alimentos) (ver **Figura 2**). Estos factores influyen sobre el balance microbiano en el tracto gastrointestinal y, consecuentemente, afectan la función digestiva, eficiencia alimentaria, el bienestar y la salud de los animales.

Una producción segura supone una combinación de estrategias que promuevan la correcta colonización microbiana intestinal en los primeros días de vida y la sucesión microbiana posterior hasta el establecimiento de una microbiota funcional.

Figura 2. Factores que influyen en la colonización y en la composición microbiana final en el intestino del animal adulto



En general, el bienestar animal en los sistemas de producción intensiva depende de causas comunes de estrés, que están principalmente relacionadas con los sistemas de alojamiento y prácticas de manejo; el estrés es una respuesta biológica a factores que alteran el equilibrio fisiológico normal [30]. En los sistemas modernos de producción, los animales se alojan en grupos grandes y homogéneos, en ambientes cerrados (establos y corrales), que ejercen presión sobre su capacidad de adaptación. La sobrepoblación y la manipulación humana de los animales, pueden ser causas de estrés en estos sistemas. Otros factores comunes de estrés incluyen la nutrición inadecuada, la privación de agua y/o alimentos, los cambios climáticos y el transporte a lugares donde los ingredientes de los piensos están más disponibles o para la matanza, causando cambios en la estructura social a través de la separación y mezcla de animales durante el transporte. Estos desafíos perturban la homeostasis de los animales y conducen a una respuesta adaptativa que se activa en un intento de restablecer el equilibrio. Esta respuesta reduce la aptitud de un animal, lo que puede manifestarse como imposibilidad de lograr estándares de producción o, de manera extrema, la enfermedad y muerte.

El estrés puede conducir a importantes cambios en la respuesta inmune y, en consecuencia, en la susceptibilidad a la infección. Por otra parte, produce liberación de catecolaminas, lo que lleva a una producción disminuida de ácido y retraso en el vaciamiento gástrico, con motilidad intestinal y tránsito colónico acelerados. Como consecuencia, el aumento del pH en el estómago conduce a una mayor probabilidad de que los patógenos de origen alimentario como *Escherichia coli*, *Salmonella* y *Campylobacter*, sobrevivan al paso gástrico y alcancen viables el tracto gastrointestinal. Adicionalmente, se ha observado un aumento en la permeabilidad de la mucosa

intestinal en respuesta a estrés psicológico y físico, que conduce a la translocación de microorganismos desde el lumen intestinal a los tejidos. En consecuencia, los animales bajo estrés se vuelven más susceptibles a infecciones nuevas, y con mayor probabilidad de transportar patógenos en el tracto gastrointestinal y tejido linfático asociado.

Con respecto a la dieta de los animales, es fundamental que aporte los nutrientes adecuados y en cantidad suficiente según la edad y el animal del que se trate. Los cambios en la composición de la dieta durante el crecimiento animal influyen sobre la estabilidad de la microbiota intestinal y la susceptibilidad a infecciones. Debido a esto, son estadios críticos el inicio de la lactancia y el destete en cerdos y rumiantes, y el cambio de una dieta con alto contenido de fibras a otra con alto contenido de carbohidratos fácilmente fermentables en la etapa de engorde de terneros en *feedlot*, lo que lleva a la necesidad de formular las dietas para un cambio progresivo en la alimentación.

V. USO DE ADITIVOS EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL

La industria de los alimentos hace esfuerzos para lograr alimentos con mayor digestibilidad, que promuevan una correcta nutrición animal, eviten la acumulación de alimentos mal digeridos en el intestino y la proliferación de patógenos intestinales. Dependiendo del animal, el esfuerzo se ha centrado en la obtención de aditivos dietarios que contienen una o más enzimas, entre estas, proteasas, glicosidasas, glucanasas, feruloyl esterasas, y en el desarrollo de inoculantes bacterianos. Estos tienen la función de controlar microorganismos potencialmente patógenos en el alimento, favorecer la pre-digestión de fibras y reducir factores antinutricionales presentes en los granos de algunos cereales y leguminosas, como los α -galactósidos, xilanos, mananos, taninos, fitatos, inhibidores de proteasas, y lectinas vegetales, que interfieren en una correcta digestión de los alimentos. Otros aditivos actúan directamente inhibiendo o destruyendo microorganismos patógenos, como los ácidos orgánicos y algunos extractos vegetales por su contenido de alcaloides, flavonoides, polifenoles, o aceites esenciales, que tienen actividad antimicrobiana [31].

La tendencia a la erradicación de APC se ha extendido progresivamente en el mundo, aunque todavía no se ha logrado sustituirlos de manera realmente satisfactoria. Los ácidos orgánicos y extractos vegetales con acción antimicrobiana, son sólo parcialmente efectivos en el control de patógenos y pueden limitar el desarrollo de algunas bacterias comensales. Las enzimas utilizadas para mejorar la digestión de alimentos, evitan la acumulación de nutrientes no utilizados en el tracto digestivo y contribuyen a la nutrición, pero no garantizan una correcta colonización y balance microbiano intestinal necesario para la protección frente a infecciones. Las paredes celulares de levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, ricas en α -D-mananos y β -D-glucanos, promueven un estado saludable estimulando el sistema inmunológico y bloqueando la

adhesión de patógenos al epitelio intestinal. Sin embargo, su administración no necesariamente conduce a una mejora en el estado nutricional del animal. Igualmente, los oligosacáridos no digeridos por las enzimas digestivas del animal, conocidos como oligosacáridos prebióticos, pueden estimular selectivamente el desarrollo de determinadas bacterias intestinales mejorando el balance intestinal y las defensas del hospedador; sin embargo, los resultados obtenidos al estudiar la promoción del crecimiento animal con el uso de prebióticos son contradictorios [32]. Finalmente, los microorganismos utilizados como probióticos, resultan una alternativa con gran potencial para el reemplazo de APC en la producción animal. Dado que se incorporan al ecosistema intestinal como organismos vivos, los probióticos son capaces de desarrollar en el animal, y establecer interacciones con la microbiota residente y con el hospedador que resultan en beneficios para el animal. Este concepto se resume en la definición de probióticos del Grupo de Trabajo conjunto de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, y la Organización Mundial de la Salud [33]. La Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA), distingue a los microorganismos que se utilizan en la alimentación animal, no con el término probióticos sino como productos microbianos para alimentación directa (DMF, por sus siglas en inglés).

El Código de Prácticas sobre Buena Alimentación Animal CAC / RCP 54-2004 de la Comisión del Codex Alimentarius (CAC), agrupa a enzimas, reguladores de la acidez, oligoelementos, vitaminas, microorganismos, con el nombre de aditivos para piensos, por lo cual los probióticos para animales quedan incluidos con esta denominación.

En la UE, los aditivos para piensos se agrupan como aditivos tecnológicos; sensoriales; nutricionales; zootécnicos; y coccidiostáticos e histomonastatos [34]. Los probióticos quedan incorporados entre los estabilizadores de la flora intestinal, que constituyen un grupo funcional entre los aditivos zootécnicos.

VI. MODO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS PARA ANIMALES

Actualmente, es posible encontrar diferentes clases de probióticos para animales. Pueden ser bacterianos o no bacterianos, formadores o no de esporas, de mono o multiespecies/cepas, autóctonos o autóctonos. Sus efectos en producción animal se determinan a través de diferentes indicadores. El número de animales infectados por un determinado patógeno, número de animales enfermos, y la mortandad, son indicadores de salud. La cantidad de alimento consumido, ganancia de peso, producción de leche o huevos, y la eficiencia alimentaria, son indicadores de producción. La calidad de la producción se mide por indicadores de calidad de los alimentos producidos, como la terneza de la carne y la cantidad de grasa depositada [35]. En el intestino, el efecto de los probióticos se puede determinar mediante parámetros fisiológicos, como la actividad de enzimas digestivas; parámetros histológicos, como la morfología del epitelio intestinal; y parámetros microbiológicos, como la composición de las

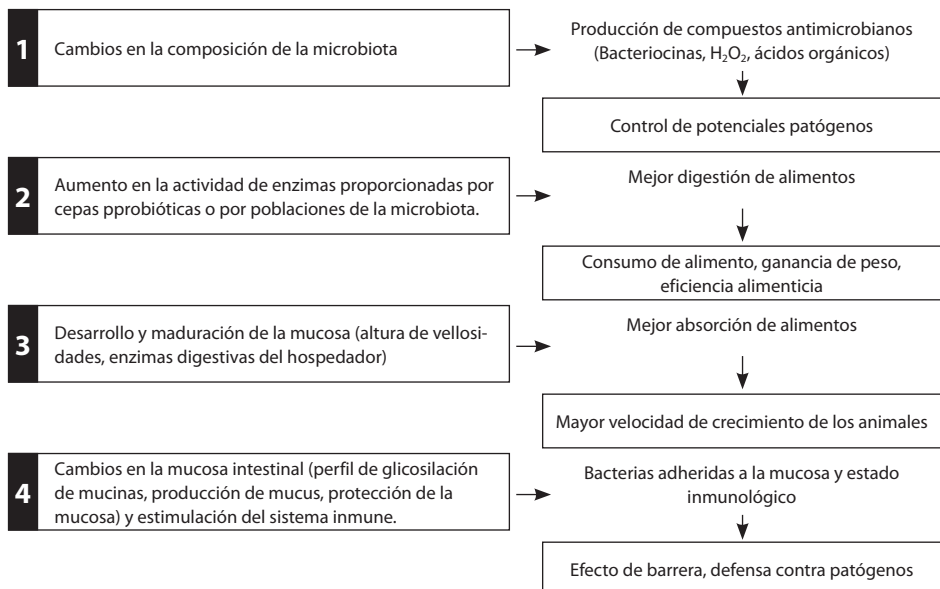
poblaciones y la cantidad de metabolitos microbianos producidos

Dependiendo del microorganismo administrado, es posible observar cambios en el balance microbiano intestinal, con aumento del tamaño de algunas poblaciones específicas capaces de producir ácidos orgánicos, bacteriocinas, HidrógenoO₂, con actividad antimicrobiana y llevar a la disminución de otras poblaciones sensibles a estos compuestos, como ocurre con muchos patógenos intestinales.

La presencia de algunos probióticos en el intestino, se pone en evidencia al detectar la presencia de actividades enzimáticas del microorganismo usado o el aumento en la actividad de enzimas propias de las poblaciones estimuladas por el probiótico. Es el caso del aporte de actividad fitasa de algunas bacterias lácticas y bifidobacterias, feruloyl esterasas de lactobacilos, α-amilasa, proteasas y celulasas de *Bacillus amyloliquefaciens*. El aumento de actividades de enzimas que participan en la digestión de nutrientes puede manifestarse, en el animal, como una mejor conversión del alimento en masa muscular, lo que conduce al aumento de peso en menor tiempo, indicando una alimentación más eficiente.

Muchos probióticos estimulan el desarrollo y maduración de la mucosa intestinal. El estudio morfométrico de distintas regiones del intestino permite poner en evidencia el aumento de altura de las vellosidades intestinales, indicando una mayor superficie de absorción de nutrientes, lo que promueve el crecimiento del animal. En muchos casos se detecta aumento de la actividad de enzimas del hospedador localizadas en el ribete en cepillo, como sacarasa y maltasa, que facilitan la hidrólisis de disacáridos y absorción de azúcares simples (ver Figura 3).

Figura 3. Modo de acción de los probióticos y efectos en el animal.



Algunos cambios en la estructura de la mucosa intestinal refuerzan la función de barrera frente a microorganismos patógenos. En este sentido, es posible observar aumento del número y tamaño de las células caliciformes, productoras del mucus intestinal, y mayor espesor en la capa de mucus que bordea al epitelio. Algunos probióticos inducen cambios en el patrón de glicosilación de las mucinas constituyentes del mucus, modificando el perfil de bacterias adheridas a él. Tanto la producción y secreción de mucus como los cambios producidos en la glicosilación de mucinas, pueden facilitar la eliminación de patógenos intestinales protegiendo al animal de infecciones. Por otra parte, la administración de probióticos puede determinar cambios en el estatus inmunológico de los animales, modulando parámetros de inflamación, inmunidad celular y humoral.

VII. USO DE PROBIÓTICOS EN LA PRODUCCIÓN ANIMAL

La eficiencia de los probióticos depende de varios factores, como la raza del animal, sistema productivo, edad del animal, probiótico administrado, dosis usada, y forma de transpote del probiotico.

En la producción de pollos parrilleros, los probióticos pueden contribuir a la prevención de enfermedades entéricas como salmonelosis [36, 37] y campilobacteriosis [38], de gran interés por ser causadas por patógenos zoonóticos. Diferentes géneros de bacterias probioticas como *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, y *Bifidobacterium*, se incluyen en productos probióticos comerciales principalmente por el efecto inhibitorio de los ácidos láctico y acético que producen. De manera reciente, se ha demostrado la capacidad de bacterias del grupo lácteo de *Propionibacterium*, aisladas de ciego de gallinas, para inhibir *Salmonella* [39] por producción de ácidos propiónico y acético, y competir con el patógeno en la adhesión al epitelio de aves en ensayos ex vivo. Recientemente, se ha demostrado que la administración de estas propionibacterias produce cambios en la morfología de la mucosa y patrón de glicosilación de mucinas que podrían participar en la protección frente a infecciones [40]. Otras enfermedades infecciosas que causan pérdidas significativas a la producción son la enteritis necrotizante, producida por *Clostridium perfringens* y las coccidiocis producidas por parásitos. *Bacillus subtilis* ha mostrado ser eficiente en el control de clostridios [41] y en combinación con bacterias lácticas y bifidobacterias, en el control de coccidios [42].

Los probióticos también se han utilizado en aves para lograr mejoras en el crecimiento del animal. En estudios realizados con *Bacillus amyloliquefaciens* [43], *B. subtilis* [44], *E. faecium* [45], y *S. cereviciae* [46], se obtuvieron mejoras en el crecimiento de los animales y un mayor desarrollo de la mucosa intestinal, con aumento del área de absorción de nutrientes. Se ha informado también que combinaciones de ciertas cepas probióticas de especies como *L. salivarius* y *L. parvulus* [37], o especies de *Lactobacillus*, *Enterococci* y *Bifidobacterium* [47], lograron aumentar la actividad de enzimas digestivas del animal. Algunos probióticos, con capacidad para eliminar

factores antinutricionales, como las lectinas vegetales citotóxicas presentes en pequeñas cantidades en los alimentos, aumentan indirectamente la actividad de enzimas digestivas [47, 48, 49].

Con respecto a la producción y calidad de huevos, en términos de peso, espesor de la cáscara, contenido de colesterol, y viscosidad de la albúmina, el uso de probióticos en las granjas ha mostrado efectos variables. Sin embargo, el balance de la microbiota intestinal hacia una mayor producción de ácidos grasos de cadena corta en gallinas ponedoras, podría incrementar el contenido de hierro y calcio en huevos. Gultemirian y col. [50] han mostrado que el transporte ex vivo de estos minerales a través del epitelio de gallinas ponedoras, dirigido por ácidos acético, propiónico y butírico, ocurre a las concentraciones alcanzadas durante la fermentación microbiana cecal. Luo y col. [51], mostraron un efecto positivo en la producción de huevos, cuando administran *Propionibacterium jensenii* a gallinas ponedoras.

En la producción de cerdos, el efecto de probióticos sobre la ganancia de peso corporal, no siempre ha dado resultados concluyentes. Sin embargo, el uso de diferentes especies de *Bacillus* ha mostrado en general disminución de la tasa de conversión alimenticia, como en los estudios de Alexopoulos y col. [52] con BioPlus 2B, un producto comercial que contiene *B. licheniformis* y *B. subtilis*.

Se han obtenido mejores resultados en el uso de probióticos como promotores de salud en cerdos. Desde el nacimiento y hasta después del destete, los cerdos son muy sensibles a infecciones por bacterias patógenas como *E. coli*, *Clostridium difficile*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella* y *Listeria*, además de sufrir infecciones por parásitos y virus. *B. licheniformis* y *B. subtilis* incorporados a la dieta de cerdos, reducen la morbilidad y mortalidad en diferentes estadios de crecimiento [53]. Se ha mostrado que *B. licheniformis* y *B. toyonensis* reducen la incidencia y severidad de diarreas post-destete [54]. *S. boulardii* y *P. acidilactici* son efectivos en la reducción de *E. coli* en animales destetados [55], mientras *Lactobacillus sobrius* reduce la incidencia de *E. coli* enterotoxigénica en el íleon de cerdos infectados [56].

Los probióticos más usados en la producción de rumiantes, incluyen a levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, bacterias lácticas y propionibacterias. El efecto de las levaduras no ha sido totalmente dilucidado, pero probablemente producen cambios en la velocidad y perfil de fermentación del rumen. Algunas levaduras estabilizan el pH ruminal, favoreciendo el crecimiento de protozoarios que degradan celulosa; la proliferación microbiana permite a los rumiantes obtener una fuente de proteínas y energía adicional al digerir a los microorganismos en el estómago. Las levaduras estimulan también el desarrollo de especies como *Megasphaera elsdenii* o *Selenomonas ruminantium*, que consumen lactato disminuyendo el riesgo de acidosis ruminal [57]. Otros probióticos, como *Propionibacterium* sp., producen ácidos grasos de cadena corta a partir de lactato, con un efecto similar sobre el pH del rumen. Las levaduras administradas durante la preñez mejoran la ganancia de peso y luego la producción de leche. Propionibacterias mejoran la ganancia de peso en el ternero en la etapa del destete.

En relación a la salud del animal, Wisener y col. [58], demostraron que los probióticos previenen la proliferación y diseminación de *E. coli* O157:H57, y que la combinación probiótica más efectiva fue la de *L. acidophilus* y *P. freudenreichii*. La administración de probióticos protege también de diarreas y pérdida de peso causadas por estrés, y tiene el efecto adicional de reducir la contaminación ambiental por el metano generado por los rumiantes.

VIII. PROTECCIÓN DEL MEDIOAMBIENTE

La demanda creciente de alimentos ha impulsado el crecimiento de la producción pecuaria en el mundo, generando fuertes repercusiones ambientales debido a la contaminación por desechos y emisiones de gases que derivan de la actividad y que contribuyen al efecto invernadero. Alrededor del 44% de las emisiones de gases corresponden al metano, y el resto se distribuye en proporciones similares entre el CO₂ y N₂O. En total, representan el 14,5% de todas las emisiones generadas por el hombre [59].

Las principales contribuciones al CO₂ relacionadas a la producción pecuaria, derivan de la expansión de tierras destinadas al cultivo de alimentos para animales; producción, procesamiento y transporte de los alimentos utilizados; el uso de energía para ventilación o calefacción en las unidades de producción animal; y el procesamiento y transporte de los productos pecuarios entre la granja y puntos de venta. Las emisiones de N₂O se generan principalmente del estiércol y otros fertilizantes aplicados a los cultivos forrajeros, mientras que el metano se origina en la fermentación entérica de animales, principalmente los rumiantes, y durante el almacenamiento y manejo del estiércol usado como fertilizante.

El ganado vacuno es el principal productor de emisiones de gases. Representa el 65% del total del sector pecuario, y se atribuye en su mayor parte a la producción de carne vacuna. La producción de cerdos, con un 9%, y de pollos, 8%, tiene un aporte minoritario a la liberación de gases de efecto invernadero. Para los productores ganaderos, las emisiones de gases representan una pérdida de energía, nutrientes y materia orgánica del suelo, ya que sugieren la falta de eficacia en el uso de los insumos de producción. El metano liberado por la fermentación representa energía del forraje no aprovechada por el animal. La práctica demuestra que, en la producción animal, una mayor productividad se asocia a una menor emisión de gases. Esto se debe a que el uso de forrajes de alta calidad, tecnologías de producción mejoradas y líneas genéticas de alto rendimiento, permiten un mayor aprovechamiento de los nutrientes.

El control de la composición o actividad de las poblaciones microbianas del rumen, que limite la proliferación o actividad de metanógenos, ha sido muy estudiado. El uso de aditivos de distinta naturaleza, como bacteriocinas, ácidos orgánicos como málico, fumárico, acrílico, extractos de plantas conteniendo taninos o aceites esenciales, y aditivos probióticos, son algunas de las estrategias que se han utilizado. Entre

los probióticos, los más estudiados para controlar metanógenos son las levaduras y los acetógenos [60]. Las levaduras parecen actuar incrementando la síntesis microbiana o estimulando la acetogénesis reductiva, por la cual el hidrógeno necesario para la producción de metano sería consumido para la formación de ácido acético, con beneficio adicional para la producción animal. Sin embargo, en el rumen los acetógenos son menos numerosos que los metanógenos y requieren mayor cantidad de hidrógeno que estos para reducir el CO₂ a ácido acético.

Otra estrategia posible consiste en la disminución de protozoarios productores de hidrógeno, a los que se asocian los metanógenos. A pesar de ser una estrategia exitosa y que puede producir cambios estables, la eliminación de protozoarios del rumen tiene un efecto negativo en la nutrición del animal por lo que, hasta el presente, esta metodología no está en uso.

X. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- [1] Allman-Farinelli, M. Food Groups, in: Essentials of human nutrition. Mann, J., & Truswell, S. (Eds.). (2006). Oxford University Press. p. 383-413.
- [2] De Smet, S., & Vossen, E. (2016). Meat: The balance between nutrition and health. A review. *Meat Science*, 120, 145-156.
- [3] Billen, G., Lassaletta, L., & Garnier, J. (2015). A vast range of opportunities for feeding the world in 2050: trade-off between diet, N contamination and international trade. *Environmental Research Letters*, 10 (2), 025001. doi:10.1088/1748-9326/10/2/025001.
- [4] Van Helden, P. D., Van Helden, L. S., & Hoal, E. G. (2013). One world, one health: humans, animals and the environment are inextricably linked—a fact that needs to be remembered and exploited in our modern approach to health. *EMBO reports*, 14 (6), 497-501.
- [5] Sleeman, J. M., DeLiberto, T., & Nguyen, N. (2017). Optimization of human, animal, and environmental health by using the One Health approach. *Journal of veterinary science*, 18 (S1), 263-268.
- [6] Silbergeld, E. K., Graham, J., & Price, L. B. (2008). Industrial food animal production, antimicrobial resistance, and human health. *Annu. Rev. Public Health*, 29, 151-169.
- [7] Browne, H. P., Neville, B. A., Forster, S. C., & Lawley, T. D. (2017). Transmission of the gut microbiota: spreading of health. *Nature Reviews Microbiology*, 15 (9), 531.
- [8] Cantas, L., Shah, S. Q. A., Cavaco, L. M., Manaia, C., Walsh, F., Popowska, M., Garelick, H., Bürgmann, H. & Sørum, H. (2013). A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota. *Frontiers in Microbiology*, 4, 96.

- [9] Van Boeckel T. P., Brower C., Gilbert M., Grenfell B. T., Levin S. A., Robinson T. P., Teillant A. & Laxminarayan R. (2015). Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112 (18), 5649-5654.
- [10] Fraune, S., & Bosch, T. C. (2010). Why bacteria matter in animal development and evolution. *Bioessays*, 32 (7), 571-580.
- [11] Wei, S., Morrison, M., & Yu, Z. (2013). Bacterial census of poultry intestinal microbiome. *Poultry Science*, 92 (3), 671-683.
- [12] Gantois, I., Ducatelle, R., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Gast, R., Humphrey, T. J., & Van Immerseel, F. (2009). Mechanisms of egg contamination by *Salmonella Enteritidis*. *FEMS Microbiology Reviews*, 33 (4), 718-738.
- [13] Roto, S. M., Kwon, Y. M., & Ricke, S. C. (2016). Applications of in ovo technique for the optimal development of the gastrointestinal tract and the potential influence on the establishment of its microbiome in poultry. *Frontiers in Veterinary Science*, 3, 63.
- [14] Pedroso, A. A., Menten, J. F. M., & Lambais, M. R. (2005). The structure of bacterial community in the intestines of newly hatched chicks. *Journal of Applied Poultry Research*, 14 (2), 232-237.
- [15] Ballou, A. L., Ali, R. A., Mendoza, M. A., Ellis, J. C., Hassan, H. M., Croom, W. J., & Koci, M. D. (2016). Development of the chick microbiome: how early exposure influences future microbial diversity. *Frontiers in Veterinary Science*, 3, 2.
- [16] Hamal, K. R., Burgess, S. C., Pevzner, I. Y., & Erf, G. F. (2006). Maternal antibody transfers from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens. *Poultry Science*, 85 (8), 1364-1372.
- [17] Clavijo, V., & Flórez, M. J. V. (2017). The gastrointestinal microbiome and its association with the control of pathogens in broiler chicken production: A review. *Poultry Science*, 97 (3), 1006-1021.
- [18] Deusch, S., Tilocca, B., Camarinha-Silva, A., & Seifert, J. (2015). News in livestock research—use of Omics-technologies to study the microbiota in the gastrointestinal tract of farm animals. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 13, 55-63.
- [19] Sergeant, M. J., Constantinidou, C., Cogan, T. A., Bedford, M. R., Penn, C. W., & Pallen, M. J. (2014). Extensive microbial and functional diversity within the chicken cecal microbiome. *PloS One*, 9 (3), e91941.
- [20] Tang, Y., Underwood, A., Gielbert, A., Woodward, M. J., & Petrovska, L. (2013). Metaproteomics analysis reveals the adaptation process for the chicken gut microbiota. *Applied and Environmental Microbiology*, 80, 478-85.

- [21] Stanley, D., Geier, M. S., Denman, S. E., Haring, V. R., Crowley, T. M., Hughes, R. J., & Moore, R. J. (2013). Identification of chicken intestinal microbiota correlated with the efficiency of energy extraction from feed. *Veterinary Microbiology*, 164 (1-2), 85-92.
- [22] Han, G. G., Kim, E. B., Lee, J., Lee, J. Y., Jin, G., Park, J., Huh, C.-S., Kwon, I.-K., Kil, D. Y., Choi, Y.-J. & Kong, C. (2016). Relationship between the microbiota in different sections of the gastrointestinal tract, and the body weight of broiler chickens. *Springerplus*, 5 (1), 911.
- [23] Wang, M., & Donovan, S. M. (2015). Human microbiota-associated swine: current progress and future opportunities. *ILAR Journal*, 56 (1), 63-73.
- [24] McCormack, U. M., Curião, T., Buzoianu, S. G., Prieto, M. L., Ryan, T., Varley, P., Crispie, F., Magowan, E., Metzler-Zebeli, B. U., Berry, D., O'Sullivan, O., Cotter, P. D., Gardiner, G. E., & Lawlor, P. G. (2017). Exploring a possible link between the intestinal microbiota and feed efficiency in pigs. *Applied and Environmental Microbiology*, 83 (15), e00380-17.
- [25] Mackie, R. I., Aminov, R. I., White, B. A., & McSweeney, C. S. (2000). Molecular ecology and diversity in gut microbial ecosystems. *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*, 2, 61-77.
- [26] Rey, M., Enjalbert, F., Combes, S., Cauquil, L., Bouchez, O., & Monteils, V. (2014). Establishment of ruminal bacterial community in dairy calves from birth to weaning is sequential. *Journal of Applied Microbiology*, 116 (2), 245-257.
- [27] Stewart, R. D., Auffret, M. D., Warr, A., Wiser, A. H., Press, M. O., Langford, K. W., Liachko, I., Snelling, T. J., Dewhurst, R. J., Walker, A. W., Roehe, R. & Watson, M. (2018). Assembly of 913 microbial genomes from metagenomic sequencing of the cow rumen. *Nature Communications*, 9 (1), 870.
- [28] Oikonomou, G., Teixeira, A. G. V., Foditsch, C., Bicalho, M. L., Machado, V. S., & Bicalho, R. C. (2013). Fecal microbial diversity in pre-weaned dairy calves as described by pyrosequencing of metagenomic 16S rDNA. Associations of *Faecalibacterium* species with health and growth. *PLoS One*, 8 (4), e63157.
- [29] Jewell, K. A., McCormick, C., Odt, C. L., Weimer, P. J., & Suen, G. (2015). Ruminal bacterial community composition in dairy cows is dynamic over the course of two lactations and correlates with feed efficiency. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 4697-4710.
- [30] Rostagno, M. H. (2009). Can stress in farm animals increase food safety risk?. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6 (7), 767-776.
- [31] Castillo-López, R. I., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Leyva-López, N., López-Martínez, L. X., & Heredia, J. B. (2017). Natural Alternatives to Growth-Promoting Antibiotics (GPA) in Animal Production. *JAPS, Journal of Animal and Plant Sciences*, 27(2), 349-359.
- [32] Gaggia, F., Mattarelli, P., & Biavati, B. (2010). Probiotics and prebiotics in animal feeding for

safe food production. *International Journal of Food Microbiology*, 141, S15-S28.

[33] FAO/WHO working group. (2001). 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. Córdoba, Argentina (October 1–4, 2001).

[34] European Commission. (2003). Regulation (EC) No 1831/2003 of the European parliament and of the council of 22 September 2003 on additives for use in animal nutrition. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:32003R1831&from=EN> Accessed 15 December 2014.

[35] Lee K., Lillehoj H.S. & Siragusa G.R. (2010) Direct-fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. *The Journal of Poultry Science*, 47:106-114.

[36] Biloni, A., Quintana, C. F., Menconi, A., Kallapura, G., Latorre, J., Pixley, C., Layton, S., Dalmagro, M., Hernandez-Velasco, X., Wolfenden, A., Hargis, B. M., & Tellez, G. (2013). Evaluation of effects of EarlyBird associated with FloraMax-B11 on *Salmonella* Enteritidis, intestinal morphology, and performance of broiler chickens. *Poultry Science*, 92 (9), 2337-2346.

[37] Hidalgo, M. (2014). Alimentos funcionales para la industria avícola: acción sobre salmonelosis. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.

[38] Willis, W. L., & Reid, L. (2008). Investigating the effects of dietary probiotic feeding regimens on broiler chicken production and *Campylobacter jejuni* presence. *Poultry Science*, 87 (4), 606-611.

[39] Argañaraz Martínez E, Babot JD, Apella MC & Perez Chaia A. (2013). Physiological and functional characteristics of *Propionibacterium* strains of the poultry microbiota and relevance for the development of probiotic products. *Anaerobe* 23, 27-37.

[40] Argañaraz Martínez E., Babot J.D., Lorenzo-Pisarello M.J., Apella M.C. & Perez Chaia A. (2016). Feed supplementation with avian origin strains of *Propionibacterium acidipropionici* contributes to mucosa development in early stages of rearing of chickens. *Beneficial Microbes* 7, 687-698.

[41] Jayaraman, S., Thangavel, G., Kurian, H., Mani, R., Mukkalil, R., & Chirakkal, H. (2013). *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Poultry Science*, 92 (2), 370-374.

[42] Giannenas, I., Papadopoulos, E., Tsalié, E., Triantafyllou, E. L., Henikl, S., Teichmann, K., & Tontis, D. (2012). Assessment of dietary supplementation with probiotics on performance, intestinal morphology and microflora of chickens infected with *Eimeria tenella*. *Veterinary Parasitology*, 188 (1-2), 31-40.

- [43] Lei, X., Piao, X., Ru, Y., Zhang, H., Péron, A., & Zhang, H. (2015). Effect of *Bacillus amyloliquefaciens*-based direct-fed microbial on performance, nutrient utilization, intestinal morphology and cecal microflora in broiler chickens. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 28 (2), 239–246.
- [44] Afsharmanesh, M., & Sadaghi, B. (2014). Effects of dietary alternatives (probiotic, green tea powder, and Kombucha tea) as antimicrobial growth promoters on growth, ileal nutrient digestibility, blood parameters, and immune response of broiler chickens. *Comparative Clinical Pathology*, 23 (3), 717-724.
- [45] Cao, G. T., Zeng, X. F., Chen, A. G., Zhou, L., Zhang, L., Xiao, Y. P., & Yang, C. M. (2013). Effects of a probiotic, *Enterococcus faecium*, on growth performance, intestinal morphology, immune response, and cecal microflora in broiler chickens challenged with *Escherichia coli* K88. *Poultry Science*, 92 (11), 2949-2955.
- [46] Abdel-Raheem, S. M., Abd-Allah, S. M., & Hassanein, K. M. (2012). The effects of prebiotic, probiotic and synbiotic supplementation on intestinal microbial ecology and histomorphology of broiler chickens. *Int J Agro Vet Med Sci*, 6 (4), 277-289.
- [47] Babot, J. D. (2014). Bacterias lácticas y microorganismos relacionados como protectores de la función digestiva intestinal de aves de criadero. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina.
- [48] Babot, J. D., Argañaraz-Martínez, E., Lorenzo-Pisarello, M. J., Apella, M. C., & Perez Chaia, A. (2016). Cytotoxic damage of soybean agglutinin on intestinal epithelial cells of broiler chicks: in vitro protection by *Bifidobacterium infantis* CRL1395. *FEMS Microbiology Letters*, 363 (12).
- [49] Babot, J. D., Argañaraz Martínez, E., Lorenzo-Pisarello, M. J., Apella, M. C., & Perez Chaia, A. (2017). Lactic acid bacteria isolated from poultry protect the intestinal epithelial cells of chickens from in vitro wheat germ agglutinin-induced cytotoxicity. *British Poultry Science*, 58 (1), 76-82.
- [50] Gultemirian, M. L. (2011). Fermentación intestinal de carbohidratos y su efecto sobre el metabolismo mineral en gallinas ponedoras. Impacto sobre el valor nutricional del huevo. PhD Thesis. Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentine.
- [51] Luo J., King S. & Adams M.C. (2010). Effect of probiotic *Propionibacterium jensenii* 702 supplementation on layer chicken performance. *Beneficial Microbes*, 1(1): 53-60
- [52] Alexopoulos, C., Georgoulakis, I. E., Tzivara, A., Kyriakis, C. S., Govaris, A., & Kyriakis, S. C. (2004b). Field evaluation of the effect of a probiotic- containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores on the health status, performance, and carcass quality of grower and finisher pigs. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 51 (6), 306-312.
- [53] Alexopoulos, C., Georgoulakis, I., Tzivara, A., Kritas, S., Siochu, A. & Kyriakis, S. (2004a). Field

evaluation of the efficacy of a probiotic containing *Bacillus licheniformis* and *Bacillus subtilis* spores, on the health status and performance of sows and their litters. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 88 (11-12): 381–392.

[54] Kantas, D., Papatsiros, V. G., Tassis, P. D., Giavasis, I., Bouki, P., & Tzika, E. D. (2015). A feed additive containing *Bacillus toyonensis* (Toyocerin®) protects against enteric pathogens in postweaning piglets. *Journal of Applied Microbiology*, 118 (3), 727-738.

[55] Le Bon, M., Davies, H. E., Glynn, C., Thompson, C., Madden, M., Wiseman, J., Dodd, C. E. R., Hurdidge, L., Payne, G., Le Treut, Y., Craigon, J., Totemeyer, S., & Mellits, K. H. (2010). Influence of probiotics on gut health in the weaned pig. *Livestock Science*, 133 (1-3), 179-181.

[56] Konstantinov, S. R., Smidt, H., Akkermans, A. D., Casini, L., Trevisi, P., Mazzoni, M., De Filippi, S., Bosi, P., & De Vos, W. M. (2008). Feeding of *Lactobacillus sobrius* reduces *Escherichia coli* F4 levels in the gut and promotes growth of infected piglets. *FEMS Microbiology Ecology*, 66(3), 599-607.

[57] Uyeno Y., Shigemori S., & Shimosato T. (2015). Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environ.* 30 (2,) 126-132.

[58] Wisener, L., Sargeant, J., O'Connor, A., Faires, M. & Glass-Kaasta, S. (2014). The use of direct-fed microbials to reduce shedding of *Escherichia coli* O157 in beef cattle: a systematic review and meta-analysis. *Zoonoses and Public Health*, 62: 7589

[59] Gerber, P.J., Steinfeld, H., Henderson, B., Mottet, A., Opio, C., Dijkman, J., Falcucci, A. & Tempio, G. (2013). Enfrentando el cambio climático a través de la ganadería – Una evaluación global de las emisiones y oportunidades de mitigación. Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura (FAO), Roma.

[60] Martin C., Morgavi D. P. & Doreau M. (2010). Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *Animal* 4(3), 351–365

PROBIÓTICOS: BENEFICIOS BÁSICOS Y MECANISMOS COMUNES

Mary Ellen Sanders

maryellen@ISAPPscience.org

• *Ph.D., Executive Science Officer, International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics, Centennial CO.*

RESUMEN

Los microorganismos probióticos han sido descritos en estudios que se caracterizan por estar centrados en distintas poblaciones y diseños. Se trata de un conjunto sólido de evidencias acerca de los usos que reciben los probióticos. A su vez, estos estudios respaldan la idea de que algunos beneficios pueden ser atribuidos a las especies, más allá de las cepas. Los probióticos

han sido objeto de más de 1800 estudios clínicos en humanos publicados en las

últimas décadas, siendo la mayor parte de las revisiones llevadas a cabo sobre los probióticos

como una categoría, aunque algunas de ellas están realizados sobre cepas específicas.

En este capítulo se revisan los principales hallazgos de estos estudios, y se analizan las diferencias, similitudes, fortalezas y debilidades entre ellos.

I. INTRODUCCIÓN

Los probióticos han sido estudiados en una variedad de acontecimientos clínicos. Este cuerpo de evidencia incluye muchas cepas probióticas diferentes, así como dosis y matrices. Estos estudios se caracterizan por estar centrados en distintas poblaciones, y por presentar diferentes diseños y calidad de resultados. Tomados en conjunto, puede decirse que existe un nivel de evidencia convincente para algunos de los usos que reciben los probióticos. Existe la necesidad para aquellos que se desempeñan en organizaciones médicas, de políticas públicas y de nutrición, de generar declaraciones de salud elaboradas a partir de la totalidad de la evidencia de los efectos de los probióticos, para hacer luego recomendaciones que estén debidamente justificadas. Más aún, a medida que la evidencia se acumula, se abona el concepto de que algunos beneficios pueden ser atribuidos a grupos de mayor orden taxonómico (a nivel de especies), más allá del nivel de “cepas”. Esto respalda la idea de que no todos los efectos clínicos observados para los probióticos deben ser considerados específicos de una cepa, probablemente como consecuencia de la presencia de mecanismos compartidos entre cepas probióticas taxonómicamente relacionadas. Futuras investigaciones sobre los mecanismos básicos de los efectos probióticos, aclararán hasta qué punto los mecanismos comunes son los que sostienen los beneficios clínicos generales.

II. BENEFICIOS DE SALUD DE LOS PROBIÓTICOS

La evidencia sobre los efectos benéficos sobre la salud de los probióticos continua creciendo. La Tabla 1 muestra algunos de los beneficios reconocidos. Los probióticos han sido objeto de más de 1800 estudios clínicos en humanos publicados en las últimas décadas. El número de ensayos realizados con humanos para los mismos acontecimientos clínicos o puntos finales ha crecido hasta el punto de haberse publicado numerosas revisiones sistemáticas (con o sin meta-análisis), en un intento por abordar, de una forma no sesgada, la totalidad de la evidencia. Desde la publicación del primer meta-análisis en probióticos en el año 2000 [1], más de 200 trabajos de este tipo han sido publicados, 32 de ellos por Cochrane Database of Systematic Reviews, institución que es considerada autora de las revisiones de mayor calidad. La mayor parte de las revisiones publicadas están llevadas a cabo sobre los probióticos como una categoría, aunque algunas de ellas están realizados sobre cepas específicas (por ejemplo, *L. reuteri* DSM17938, *L. rhamnosus* GG y *Sacchromyces boulardii*). Considerando que algunos beneficios probióticos podrían ser específicos de una cepa, la combinación de resultados de cepas probióticas diferentes en un único meta-análisis es un proceso que debe ser realizado con la debida justificación científica [2]. En la medida en que mecanismos similares sean los responsables de la eficacia clínica de distintas cepas, entonces es razonable considerarlas (a las cepas) similares

en relación con ese efecto clínico; combinar la información sobre esos mecanismos da una imagen útil acerca de los efectos generales de las cepas.

Tabla 1. Panorama acerca de algunos beneficios de los probióticos sobre las personas, tal como se estableció en estudios clínicos aleatorizados.

Beneficio	Población	Cepas probióticas efectivas	Efectos reportados en la referencia indicada	Referencia
Tratamiento de cólicos en niños amamantados	Lactantes	<i>L. reuteri</i> DSM17938	Tiempo de llanto diario reducido 25,4 minutos por día	(Sung, D'Amico et al. 2018)
Prevención de dermatitis atópica e hipersensibilidad alimentaria	Bebés	Diferentes cepas	Los probióticos durante el embarazo tardío (luego de la semana 36) y lactancia (primeros meses) podrían reducir el riesgo relativo de eczema en un 22%. Los probióticos administrados prenatalmente y postnatalmente podrían reducir el riesgo relativo de hipersensibilidad alimentaria en un 23%	(Zhang, Hu et al. 2016)
Prevenir la enterocolitis necrotizante	Bebés prematuros	Diferentes cepas	Los probióticos podrían reducir el riesgo relativo de enterocolitis necrotizante en un 57% y el riesgo de mortalidad en un 35%	(AlFaleh and Anabrees 2014)
Tratamiento de diarrea aguda	Bebés, niños	<i>L. rhamnosus</i> GG	Los probióticos podrían reducir la duración de la diarrea aguda en bebés y niños en ~1 día	(Szajewska, Skorka et al. 2013)
Manejo de síntomas ocasionales de constipación	Adultos	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	NNT = 9.6	(Eskenes, Jespersen et al. 2015)
Manejo de síntomas de intolerancia a la lactosa	Niños, adultos	<i>Streptococcus thermophilus</i> y <i>L. bulgaricus</i> strains	El consumo de cultivos vivos en el yogur mejora la digestión de la lactosa presente en el propio yogur, en individuos con intolerancia a la lactosa. El yogur debe contener al menos 10 ⁸ CFU vivas <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> y <i>Streptococcus thermophilus</i> por gramo.	(EFSA Panel EFSA sobre Productos Dietéticos, 2010)
Reducción de la incidencia y duración de enfermedades infecciosas comunes (tracto respiratorio superior y gastrointestinal)	Niños, adultos	Diferentes cepas	Los probióticos podrían reducir la duración media de los episodios de infección de tracto respiratorio en 1,9 días, así como el tiempo de uso de antibióticos y la duración de las ausencias en la escuela, producto de los resfriados	(King, Glanville et al. 2014) (Hao, Dong et al. 2015)
Prevenir la diarrea asociada al uso de antibióticos	Niños, adultos	<i>Saccharomyces boulardii</i> <i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. casei</i> DN114001 <i>L. acidophilus</i> CL 1285+ <i>L. casei</i> LBC80R+ <i>L. rhamnosus</i> CLR2	NNT=10 para niños	(Goldenberg, Lytvyn et al. 2015) (Cai, Zhao et al. 2018)

Beneficio	Población	Cepas probióticas efectivas	Efectos reportados en la referencia indicada	Referencia
Extender la remisión de la colitis ulcerosa	Adultos	<i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i> y <i>S. thermophilus</i> strain mixture	NNT=8	(Naidoo, Gordon et al. 2011)
Mejorar la eficacia terapéutica de los antibióticos en la vaginosis bacteriana	Mujeres adultas	<i>L. rhamnosus</i> GR-1+ <i>L. reuteri</i> RC-14	NNT=3.7	(Anukam, Osazuwa et al. 2006) (Martinez, Franceschini et al. 2009)
Reducir el LDL	Adultos	<i>L. reuteri</i> NCIMB 30242	Reducción del LDL en un 11.64% y del colesterol total en 9.14% en adultos hipercolesterolémicos	(Jones, Martoni et al. 2012)
Prevenir la diarrea por <i>Clostridium difficile</i>	Niños, adultos	<i>Saccharomyces boulardii</i> <i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. casei</i> DN114001 <i>L. acidophilus</i> CL 1285+ <i>L. casei</i> LBC80R+ <i>L. rhamnosus</i> CLR2	NNT=41 para niños y adultos hospitalizados	(Goldenberg, Yap et al. 2017)
Prevalencia reducida de caries y gingivitis. Manejo de los síntomas de enfermedad periodontal.	Bebés, niños	<i>L. reuteri</i>		(Martin-Cabezas, Davideau et al. 2016) (Stensson, Koch et al. 2014)

Las filas sombreadas indican beneficios para individuos sanos. Adaptado de Sanders, Merenstein, Merrifield and Hutkins, *Nutrition Bulletin*, to be published online Aug 9, 2018.

Un trabajo sobre *L. reuteri* DSM17938 en el tratamiento de cólicos infantiles, fue un estudio del tipo meta-análisis con datos crudos (IPDMA, por las siglas en inglés para *Individual Participant Data Meta-Analysis*). Los IDPMA son métodos especialmente confiables para revisar evidencia de ensayos clínicos, porque son realizados por equipos de colaboradores que típicamente incluyen a los investigadores principales que llevaron a cabo los estudios individuales, y porque los protocolos de análisis pueden ser realizados sobre el conjunto de datos a nivel individual de cada ensayo, y no sobre resúmenes acumulados. Estas ventajas ayudan a asegurar datos comprensivos y precisos, y permiten realizar análisis que brindan estimaciones más precisas de los efectos de los tratamientos dentro de distintos subgrupos [4, 5]. Por ejemplo, un IPDMA realizado con *L. reuteri* DSM17938 reveló que los efectos del tratamiento eran muy beneficiosos entre lactantes, pero estadísticamente insignificantes entre niños que toman leche de fórmula [3].

La mayoría de los meta-análisis sobre probióticos concluyen que se necesita más evidencia. Esto puede ser porque: los estudios incluidos tenían alto riesgo de sesgo; inhabilidad para concluir cuál es la cepa o dosis óptima para el efecto estudiado; o porque el número total de individuos estudiados debería mayor para agregar confianza a las conclusiones. Otra limitación de los estudios sobre probióticos puede ser

la imposibilidad para predecir cuáles son las características que deben tener los individuos para responder al tratamiento. Ajustar los criterios de inclusión de individuos en los estudios, de modo de incorporar solamente aquellos que probablemente respondan, reduciría el número total de individuos necesarios para obtener resultados confiables, y permitiría tener una mejor idea de la magnitud del efecto, para el grupo de individuos respondedores.

Cualquier intervención, incluyendo la administración de probióticos, puede beneficiar a algunas personas pero no a otras. Esto se refleja en el parámetro “número necesario a tratar” (NNT, por las siglas en inglés de *necessary number to treat*). El NNT se refiere al número de personas que deberían someterse a la intervención, de modo que una de esas personas se beneficie de la misma. Cuanto más bajo sea el NNT, más factible es que cualquier persona que se someta a la intervención, se beneficie. La Tabla 1 enumera algunos de los NNT calculados a partir de ensayos clínicos. Es útil considerar el valor del NNT en comparación con el número de individuos necesario para producir un eventual daño. Los probióticos tradicionales que derivan de los géneros microbianos habituales *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Saccharomyces* tienen potenciales e ínfimos efectos adversos. En líneas generales, son seguros para la población en general, y han sido asociados con muy pocos incidentes adversos. En consecuencia, el campo de los probióticos, al menos con las cepas probióticas tradicionales, se caracteriza por algunos beneficios respaldados por mucha evidencia –en algunos casos todavía con evidencia en desarrollo–, pero muy poca evidencia de efectos adversos.

III. BENEFICIOS DE SALUD DE LOS PROBIÓTICOS EN INDIVIDUOS SANOS

Los probióticos han sido estudiados en una amplia variedad de sujetos, tanto sanos como aquellos presentando alguna patología. Ejemplos del uso de probióticos para tratar individuos enfermos, incluyen el tratamiento de candidiasis vulvovaginal [4], el tratamiento de encefalopatía hepática crónica o aguda [5], el tratamiento de la pouchitis [6], de la diarrea aguda o persistente en niños [7, 8], del eczema [9] y de la diarrea infecciosa [10]. Los probióticos también han sido estudiado en prevención, como en el caso de la enterocolitis necrotizante en recién nacidos prematuros [11] y la prevención de la diarrea inducida por radiación en el tratamiento con radioterapia de pacientes con cáncer abdominal o pélvico [12].

También se han llevado a cabo estudios en población sana, enfocados en la prevención de enfermedades en individuos sanos o en poblaciones de riesgo, o en el manejo de condiciones subclínicas. Este tipo de estudios se han vuelto más comunes, en parte porque la investigación en esas poblaciones es requerida por las agencias regulatorias de muchos países para respaldar las reivindicaciones o alegatos de salud que se hacen sobre los probióticos. A pesar de este cuerpo de evidencias, existe una percepción equivocada de que los probióticos no poseen efectos benéficos en personas sanas. Un artículo recientemente publicado en la revista *Scientific American*,

afirmó que “aunque ciertas bacterias ayudan en el tratamiento de desórdenes intestinales, no tienen beneficios conocidos en individuos sanos” [13]. Esta conclusión es una valoración incorrecta de la evidencia disponible.

Varias líneas de evidencia documentan efectos probióticos en la prevención de enfermedades en individuos razonablemente sanos. Por ejemplo, se ha demostrado que los probióticos pueden prevenir infecciones del tracto respiratorio superior (abreviadas URTI, por sus siglas en inglés) [14]. Esta revisión Cochrane afirma que “los probióticos son mejores que el placebo para reducir el número de participantes que experimentan episodios de URTI, en un 47%, y reducen la duración de cada episodio de URTI en aproximadamente 1,89 días”. Las columnas en gris de la Tabla 1 muestran los beneficios aplicables a las personas sanas.

Aunque se hayan establecido beneficios para individuos sanos, los estudios al día de hoy sugieren que los mismos no están mediados por la habilidad de los probióticos para cambiar la estructura general de la comunidad microbiana del intestino. Un estudio realizado en 2016 por Kristensen y colaboradores [15] concluyó que no hay impacto de los probióticos en la composición de la microbiota fecal en individuos sanos. Es importante notar, sin embargo, que esto no significa que no haya beneficios hacia la salud en individuos sanos [16]. Más aun, estos estudios solamente hicieron foco sobre la microbiota fecal, así que no se sabe a ciencia cierta si ocurre algún cambio en la composición de la microbiota en el intestino delgado, o en el intestino grueso proximal. Adicionalmente, los probióticos pueden tener impacto positivo en la salud por mecanismos independientes de la estructura de las comunidades microbianas fecales. Por ejemplo, la habilidad para modificar la función de la microbiota, podría ser más importante que la habilidad para cambiar la composición de la misma [17, 18]. Se sabe que los probióticos interaccionan directamente con las células inmunes del hospedador, una acción que tiene el potencial para fortalecer la resistencia a patógenos y para reducir la inflamación y alergia. Los probióticos podrían producir moléculas antimicrobianas específicas que directamente inhiben a los patógenos, que no necesariamente son miembros predominantes de la microbiota. Los probióticos pueden promover una barrera intestinal más efectiva, podrían regular la homeostasis intestinal, mejorar la regularidad de las deposiciones [19, 20] y producir mediadores neuroquímicos, por ejemplo, y todo ello sin cambiar la estructura general de la comunidad microbiana fecal.

IV. MANEJO DEL SESGO EN ESTUDIOS SOBRE PROBIÓTICOS

Muchos de los estudios sobre probióticos realizados durante todas estas décadas han sido financiados por compañías con un interés en el resultado. Una búsqueda en la base de datos de ensayos clínicos, clinicaltrials.gov, sugiere que aproximadamente un tercio de todos los ensayos actuales sobre probióticos están financiados por la industria. No es poco habitual que algunos científicos y periodistas especializados

sugieran que los estudios financiados por la industria están inherentemente sesgados, y deberían ser descartados, aún cuando los sectores industriales que financian esta clase de estudios cada vez más están tomando medidas que reducen ese sesgo eventual. Las guías generales para reportar (y por ende, para conducir) un ensayo clínico, están disponibles [21]; también está disponible un trabajo que habla de específicamente sobre la realización de estudios clínicos con probióticos [22]. Los ensayos deberían ser registrados previamente al reclutamiento de los participantes, ante una organización de registro de ensayos (por ejemplo, *clinicaltrials.gov*, la *International Clinical Trials Registry Platform*, etc). El proceso de registro de ensayos establece una historia de dicho ensayo, su diseño, sus objetivos (primarios y secundarios), los detalles de financiamiento y otros aspectos, que proporcionan transparencia y desfavorecen cambios post hoc, que podrían dar un giro en los resultados. Etapas posteriores incluyen las premisas de que ningún ensayo debería permanecer no-divulgado a causa de resultados no favorables; el patrocinador del estudio debería dar control sobre la publicación al investigador principal; todos los conflictos de interés deberían ser declarados en los informes de resultados; finalmente, todas las comunicaciones concernientes al estudio deberían ser justas con los resultados obtenidos. Este punto parece –en la era de la publicidad instantánea– ser una fuente habitual de sesgo, y no se limita a la industria promoviendo sus propios intereses. Las universidades, revistas, e investigadores, son habitualmente responsables de elegir encabezados o títulos para atraer la atención del lector, mucho más promisorios de lo que en realidad reflejan los resultados de sus estudios.

V. MECANISMOS COMPARTIDOS Y BENEFICIOS CENTRALES DE PROBIÓTICOS

Es casi un axioma en el campo de los probióticos que los efectos benéficos son específicos de cada cepa. Sin embargo, con la creciente evidencia clínica, está claro que muchos beneficios clínicos asociados con los probióticos no se limitan a una única cepa [23]. Los datos disponibles pueden, en cambio, ser interpretados como una expresión de la existencia de mecanismos subyacentes compartidos, que resultan en el efecto clínico, presentes en muchas cepas de una misma especie [24]. Los mecanismos compartidos podrían incluir la producción de acetato o lactato, la presencia de estructuras de superficie celular que interaccionan con las células inmunes del hospedador, la presencia de proteínas que se unen al mucus y que refuerzan la persistencia en el tracto digestivo, o la producción de bacteriocinas específicas anti patógenos [25].

Es muy probable que para cualquier cepa probiótica, muchos mecanismos operen concertadamente para alcanzar el efecto clínico. Sin embargo, un beneficio clínico particular podría ser alcanzado por un mecanismo predominante. Las cepas que expresen este mecanismo, expresen o no otras funciones menos esenciales, podrían desempeñarse de modo similar, en términos generales y en relación con dicho beneficio clínico.

VI. IMPLICANCIAS CIENTÍFICAS Y REGULATORIAS DE LOS MECANISMOS COMPARTIDOS ENTRE TAXONES PROBIÓTICOS

En la actualidad, los requerimientos regulatorios para el desarrollo y comercialización de una droga probiótica, o un agente bioterapéutico vivo, son razonablemente claras. Pero los caminos para el desarrollo y comercialización de un alimento probiótico, de un suplemento alimentario o un producto de salud natural, no tanto. En relación con la comunicación de los beneficios de salud de los probióticos, los marcos regulatorios de los diferentes países difieren en cuanto a qué tipo de reivindicaciones o alegatos de salud están permitidos [26, 27], los requisitos para aprobar esas reivindicaciones, y el tipo de evidencia necesaria para permitir tal alegato [28]. Un ejemplo de la falta de alineamiento entre la ciencia y la perspectiva regulatoria se encuentra en la Unión Europea. La UE no ha aprobado aún ninguna reivindicación de salud para los probióticos, con excepción de los cultivos de yogur, para los cuales se puede comunicar que son capaces de reducir los síntomas de la intolerancia a la lactosa (EFSA, 2010). Esta situación ha conducido a la mayoría de los países miembros de la UE a concluir que como el propio término “probiótico” tiene implícito un beneficio de salud, y como ningún beneficio de salud ha sido aprobado aún, entonces el uso del término “probiótico” queda prohibido en el rotulado. Sin embargo, como se discutió antes en este documento, un panel de consenso conformado por expertos analizó la totalidad de datos acumulados en un grupo de especies de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, y concluyó que es razonable esperar algún beneficio de salud para ciertas especies [29]. Las implicancias de esta interpretación de la evidencia científica es que no sería confundir a los consumidores al utilizar la palabra “probiótico” en un producto que proporcione una cantidad mínima (10⁹ UFC totales por porción de alimento) de una cepa viva de alguna de las especies consideradas (*Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve* y *B. longum*) y *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. paracasei*, *L. plantarum*, *L. rhamnosus* y *L. salivarius*). Los expertos también concluyeron, sin embargo, que las reivindicaciones de cualquier beneficio más allá de “contiene probióticos” deberían ser demostradas con una evaluación clínica específica de cepa.

El marco regulatorio a los alimentos y suplementos probióticos varía entre diferentes regiones y aún entre países vecinos. No existe una armonización global de la definición del término “probiótico” ni un acuerdo sobre el criterio mínimo que un producto debe satisfacer para ser rotulado como “probiótico”. Una propuesta reciente de la comisión del Codex Alimentario está apuntando a corregir esta situación. Una propuesta para el desarrollo de armonizadas sobre el uso de probióticos en alimentos y suplementos dietarios fue presentada en Berlín en diciembre de 2017, por la Asociación Internacional de Probióticos (IPA, por sus siglas en inglés). Esta propuesta tiene el potencial para mejorar la calidad de los productos ofrecidos, promover un mercado competitivo, y proteger globalmente a los consumidores de productos fraudulentos.

VII. EL FUTURO DE LOS PROBIÓTICOS

El campo de los probióticos está preparado para un avance considerable. Las investigaciones sobre el microbioma humano han permitido identificar muchas condiciones donde la microbiota de los pacientes difiere de aquella de los individuos sanos. Esto ha llevado a formular la hipótesis de que nuestros microorganismos residentes tienen un papel fundamental en la génesis o el desarrollo de las enfermedades, aunque en la mayoría de los casos la causalidad no ha sido debidamente determinada. Sabemos que la microbiota difiere en individuos con ciertas enfermedades respecto a individuos sanos, pero no sabemos si esas diferencias contribuyen a la enfermedad, o son consecuencias de la misma. Existen ciertos factores confusores, como las medicaciones, la diarrea/constipación y el estado de salud general de los pacientes, que impactan en la microbiota fecal. En este sentido, hay un gran interés en evaluar la hipótesis de que ciertos microorganismos probióticos podrían corregir la disbiosis de la microbiota, obteniendo beneficios clínicos.

Los esfuerzos de investigación están enfocados más allá de los probióticos tradicionales, en la búsqueda de nuevos microbios que puedan efectivamente atenuar enfermedades, o directamente evitar su aparición. Los microbios que son miembros de la microbiota humana “sana”, han sido identificados y son objeto de estudio. Por ejemplo, *Akkermansia mucinophila* (Cani and de Vos 2017) [30] y *Eubacterium hallii* (Udayappan, Manneras-Holm et al. 2016) [31] están siendo evaluados por su habilidad para mejorar la sensibilidad a la insulina. Otros usos novedosos de los probióticos incluyen mejoras en condiciones psicosociales (ansiedad, depresión, humor) (Taylor and Holscher 2018), [32] salud de la piel (Levkovich, Poutahidis et al. 2013) [33], peso corporal (John, Wang et al. 2018) (Crovesy, Ostrowski et al. 2017) [34, 35], salud metabólica en mujeres embarazadas (Zheng, Feng et al. 2018) [36], y nutrición animal (Markowiak and Slizewska 2018) [37]. Los probióticos podrían mejorar los parámetros de crecimiento infantil (Onubi, Poobalan et al. 2015) [38] y reducir la incidencia de enfermedades infecciosas (Panigrahi, Parida et al. 2017) [39] en países en desarrollo donde la malnutrición puede ser prevalente. Se están implementando a la vez programas gubernamentales dirigidos a introducir productos lácteos conteniendo probióticos en comunidades necesitadas (Reid, Kort et al. 2018) [40], incluso en Argentina (Villena y col., 2012; Bortz y Thomas, 2017) [41, 42]. Otro campo en desarrollo para la intervención con probióticos, es el uso de estos microorganismos como parte de los esfuerzos en casos de desastre (Koehlmoos 2010). Los probióticos podrían tener un papel en el acortamiento de los plazos de recuperación en condiciones tales como diarrea infecciosa aguda pediátrica, diarrea persistente, y también pueden ayudar a prevenir infecciones respiratorias y gastrointestinales.

Un concepto que está evolucionando en el campo de los probióticos y de los alimentos fermentados conteniendo microorganismos vivos, desde la perspectiva de la salud pública, es el valor de las guías dietarias que los incluyan (Hill and Sanders 2013, Sanders, Lenoir-Wijnkoop et al. 2014) [43, 44]. En la actualidad, pocos países

reconocen el valor de consumir microorganismos vivos (Smug, Salminen et al. 2014) (Ebner, Smug et al. 2014) [45, 46]. No obstante, la evidencia muestra cada vez más, respaldada por hipótesis fuertes que surgen a partir de los estudios del Microbioma Humano, que el consumo de microorganismos “seguros” vivos está asociado con la salud. La junta académica de directores del ISAPP recomendó al Comité Asesor de las Guías Dietarias de los EE.UU. que analice la evidencia disponible sobre el impacto de los alimentos que contienen cultivos vivos y activos en el mantenimiento de la salud a largo plazo, y en la reducción del riesgo de enfermedad (<http://www.health.gov/dietaryguidelines/dga2015/comments/readCommentDetails.aspx?CID=61>; <https://www.regulations.gov/document?D=FNS-2018-0005-4366>). El tiempo dirá si las agencias encargadas de promover la política pública incorporan el concepto de que consumir microorganismos vivos, incluyendo a los probióticos, debe ser recomendado.

VIII. CONCLUSIONES

La evidencia que respalda el rol de los probióticos en la salud intestinal ha alcanzado niveles suficientes para llevar a cabo revisiones con peso estadístico. Cada día se acumula más evidencia que respaldan los beneficios intestinales y más allá del intestino. La relativa falta de comprensión de esta evidencia por parte de los entes regulatorios y de salud pública dificulta la llegada de estas alternativas a poblaciones que podrían beneficiarse de información clara y precisa sobre los probióticos. Esfuerzos continuos de comunicación por parte de organizaciones científicas tales como la ISAPP (www.ISAPPscience.org) posiblemente clarifiquen la información confusa que circula entre consumidores y profesionales de la salud acerca de los probióticos, y faciliten un uso basado en la evidencia.

IX. AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al Prof. Daniel M. Tancredi por su ayuda para abordar la temática del valor de los meta-análisis de participantes individuales.

X. BIBLIOGRAFIA CITADA

[1] Agerholm-Larsen, L., M. L. Bell, G. K. Grunwald and A. Astrup (2000). “The effect of a probiotic milk product on plasma cholesterol: a meta-analysis of short-term intervention studies.” *Eur J Clin Nutr* 54(11): 856-860.

- [2] AlFaleh, K. and J. Anabrees (2014). "Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD005496.
- [3] Allen, S. J., E. G. Martinez, G. V. Gregorio and L. F. Dans (2010). "Probiotics for treating acute infectious diarrhoea." *Cochrane Database Syst Rev*(11): CD003048.
- [4] Anukam, K., E. Osazuwa, I. Ahonkhai, M. Ngwu, G. Osemene, A. W. Bruce and G. Reid (2006). "Augmentation of antimicrobial metronidazole therapy of bacterial vaginosis with oral probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 and *Lactobacillus reuteri* RC-14: randomized, double-blind, placebo controlled trial." *Microbes Infect* 8(6): 1450-1454.
- [5] Bernaola Aponte, G., C. A. Bada Mancilla, N. Y. Carreazo and R. A. Rojas Galarza (2013). "Probiotics for treating persistent diarrhoea in children." *Cochrane Database Syst Rev*(8): CD007401.
- [6] Boyle, R. J., F. J. Bath-Hextall, J. Leonardi-Bee, D. F. Murrell and M. L. Tang (2008). "Probiotics for treating eczema." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD006135.
- [7] Cai, J., C. Zhao, Y. Du, Y. Zhang, M. Zhao and Q. Zhao (2018). "Comparative efficacy and tolerability of probiotics for antibiotic-associated diarrhea: Systematic review with network meta-analysis." *United European Gastroenterol J* 6(2): 169-180.
- [8] Cani, P. D. and W. M. de Vos (2017). "Next-Generation Beneficial Microbes: The Case of *Akkermansia muciniphila*." *Front Microbiol* 8: 1765.
- [9] Crovesy, L., M. Ostrowski, D. Ferreira, E. L. Rosado and M. Soares-Mota (2017). "Effect of *Lactobacillus* on body weight and body fat in overweight subjects: a systematic review of randomized controlled clinical trials." *Int J Obes (Lond)* 41(11): 1607-1614.
- [10] Dalal, R., R. G. McGee, S. M. Riordan and A. C. Webster (2017). "Probiotics for people with hepatic encephalopathy." *Cochrane Database Syst Rev* 2: CD008716.
- [11] Ebner, S., L. N. Smug, W. Kneifel, S. J. Salminen and M. E. Sanders (2014). "Probiotics in dietary guidelines and clinical recommendations outside the European Union." *World J Gastroenterol* 20(43): 16095-16100.
- [12] EFSA Panel on Dietetic Products, N. a. A. (2010). "Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006." *EFSA Journal* 8(10): 1763.
- [13] Eloë-Fadrosch, E. A., A. Brady, J. Crabtree, E. F. Drabek, B. Ma, A. Mahurkar, J. Ravel, M. Haverkamp, A. M. Fiorino, C. Botelho, I. Andreyeva, P. L. Hibberd and C. M. Fraser (2015). "Functional dynamics of the gut microbiome in elderly people during probiotic consumption." *MBio* 6(2).
- [14] Eskesen, D., L. Jespersen, B. Michelsen, P. J. Whorwell, S. Muller-Lissner and C. M. Morberg

- (2015). "Effect of the probiotic strain *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, BB-12(R), on defecation frequency in healthy subjects with low defecation frequency and abdominal discomfort: a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group trial." *Br J Nutr* 114(10): 1638-1646.
- [15] Glanville, J., S. King, F. Guarner, C. Hill and M. E. Sanders (2015). "A review of the systematic review process and its applicability for use in evaluating evidence for health claims on probiotic foods in the European Union." *Nutr J* 14: 16.
- [16] Goldenberg, J. Z., L. Lytvyn, J. Steurich, P. Parkin, S. Mahant and B. C. Johnston (2015). "Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea." *Cochrane Database Syst Rev*(12): CD004827.
- [17] Goldenberg, J. Z., C. Yap, L. Lytvyn, C. K. Lo, J. Beardsley, D. Mertz and B. C. Johnston (2017). "Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea in adults and children." *Cochrane Database Syst Rev* 12: CD006095.
- [18] Hao, Q., B. R. Dong and T. Wu (2015). "Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections." *Cochrane Database Syst Rev*(2): CD006895.
- [19] Hill, C., F. Guarner, G. Reid, G. R. Gibson, D. J. Merenstein, B. Pot, L. Morelli, R. B. Canani, H. J. Flint, S. Salminen, P. C. Calder and M. E. Sanders (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(8): 506-514.
- [20] Hill, C. and M. E. Sanders (2013). "Rethinking "probiotics"." *Gut Microbes* 4(4): 269-270.
- [21] Hoffmann, D. E., C. M. Fraser, F. B. Palumbo, J. Ravel, K. Rothenberg, V. Rowthorn and J. Schwartz (2013). "Science and regulation. Probiotics: finding the right regulatory balance." *Science* 342(6156): 314-315.
- [22] John, G. K., L. Wang, J. Nanavati, C. Twose, R. Singh and G. Mullin (2018). "Dietary Alteration of the Gut Microbiome and Its Impact on Weight and Fat Mass: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Genes (Basel)* 9(3).
- [23] Jones, M. L., C. J. Martoni and S. Prakash (2012). "Cholesterol lowering and inhibition of sterol absorption by *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242: a randomized controlled trial." *Eur J Clin Nutr* 66(11): 1234-1241.
- [24] King, S., J. Glanville, M. E. Sanders, A. Fitzgerald and D. Varley (2014). "Effectiveness of probiotics on the duration of illness in healthy children and adults who develop common acute respiratory infectious conditions: a systematic review and meta-analysis." *Br J Nutr* 112(1): 41-54.
- [25] Koehlmoos, T. P. (2010). "Evidence Aid and the disaster response in Pakistan and Haiti."

Cochrane Database Syst Rev 2011: ED000014.

[26] Kristensen, N. B., T. Bryrup, K. H. Allin, T. Nielsen, T. H. Hansen and O. Pedersen (2016). "Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials." *Genome Med* 8(1): e53867.

[27] Levkovich, T., T. Poutahidis, C. Smillie, B. J. Varian, Y. M. Ibrahim, J. R. Lakritz, E. J. Alm and S. E. Erdman (2013). "Probiotic bacteria induce a 'glow of health'." *PLoS One* 8(1): e53867.

[28] Liu, M. M., S. T. Li, Y. Shu and H. Q. Zhan (2017). "Probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea: A meta-analysis of randomized controlled trials." *PLoS One* 12(6): e0178870.

[29] Markowiak, P. and K. Slizewska (2018). "The role of probiotics, prebiotics and synbiotics in animal nutrition." *Gut Pathog* 10: 21.

[30] Martin-Cabezas, R., J. L. Davideau, H. Tenenbaum and O. Huck (2016). "Clinical efficacy of probiotics as an adjunctive therapy to non-surgical periodontal treatment of chronic periodontitis: a systematic review and meta-analysis." *J Clin Periodontol* 43(6): 520-530.

[31] Martinez, R. C., S. A. Franceschini, M. C. Patta, S. M. Quintana, B. C. Gomes, E. C. De Martinis and G. Reid (2009). "Improved cure of bacterial vaginosis with single dose of tinidazole (2 g), *Lactobacillus rhamnosus* GR-1, and *Lactobacillus reuteri* RC-14: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial." *Can J Microbiol* 55(2): 133-138.

[32] McNulty, N. P., T. Yatsunencko, A. Hsiao, J. J. Faith, B. D. Muegge, A. L. Goodman, B. Henrissat, R. Oozeer, S. Cools-Portier, G. Gobert, C. Chervaux, D. Knights, C. A. Lozupone, R. Knight, A. E. Duncan, J. R. Bain, M. J. Muehlbauer, C. B. Newgard, A. C. Heath and J. I. Gordon (2011). "The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins." *Sci Transl Med* 3(106): 106ra106.

[33] Miller, L. E. and A. C. Ouwehand (2013). "Probiotic supplementation decreases intestinal transit time: meta-analysis of randomized controlled trials." *World J Gastroenterol* 19(29): 4718-4725.

[34] Naidoo, K., M. Gordon, A. O. Fagbemi, A. G. Thomas and A. K. Akobeng (2011). "Probiotics for maintenance of remission in ulcerative colitis." *Cochrane Database Syst Rev*(12): CD007443.

[35] Onubi, O. J., A. S. Poobalan, B. Dineen, D. Marais and G. McNeill (2015). "Effects of probiotics on child growth: a systematic review." *J Health Popul Nutr* 34: 8.

[36] Panigrahi, P., S. Parida, N. C. Nanda, R. Satpathy, L. Pradhan, D. S. Chandel, L. Baccaglini, A. Mohapatra, S. S. Mohapatra, P. R. Misra, R. Chaudhry, H. H. Chen, J. A. Johnson, J. G. Morris, N. Paneth and I. H. Gewolb (2017). "A randomized synbiotic trial to prevent sepsis among infants in rural India." *Nature* 548(7668): 407-412.

- [37] Reid, G., R. Kort, S. Alvarez, R. Bourdet-Sicard, V. Benoit, M. Cunningham, D. M. Saulnier, J. E. T. van Hylckama Vlieg, H. Verstraelen and W. Sybesma (2018). "Expanding the reach of probiotics through social enterprises." *Benef Microbes*: 1-10.
- [38] Ritchie, M. L. and T. N. Romanuk (2012). "A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases." *PLoS One* 7(4): e34938.
- [39] Sanders, M. E. (2016). "Probiotics and microbiota composition." *BMC Med* 14(1): 82.
- [40] Sanders, M. E., A. Benson, S. Lebeer, D. J. Merenstein and T. R. Klaenhammer (2018). "Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims." *Curr Opin Biotechnol* 49: 207-216.
- [41] Sanders, M. E., J. T. Heimbach, B. Pot, D. J. Tancredi, I. Lenoir-Wijnkoop, A. Lahteenmaki-Uutela, M. Gueimonde and S. Banares (2011). "Health claims substantiation for probiotic and prebiotic products." *Gut Microbes* 2(3): 127-133.
- [42] Sanders, M. E., I. Lenoir-Wijnkoop, S. Salminen, D. J. Merenstein, G. R. Gibson, B. W. Petschow, M. Nieuwdorp, D. J. Tancredi, C. J. Cifelli, P. Jacques and B. Pot (2014). "Probiotics and prebiotics: prospects for public health and nutritional recommendations." *Ann NY Acad Sci* 1309: 19-29.
- [43] Sanders, M. E. and D. D. Levy (2011). "The science and regulations of probiotic food and supplement product labeling." *Ann NY Acad Sci* 1219 Suppl 1: E1-E23.
- [44] Shane, A. L., M. D. Cabana, S. Vidry, D. Merenstein, R. Hummelen, C. L. Ellis, J. T. Heimbach, S. Hempel, S. V. Lynch, M. E. Sanders and D. J. Tancredi (2010). "Guide to designing, conducting, publishing and communicating results of clinical studies involving probiotic applications in human participants." *Gut Microbes* 1(4): 243-253.
- [45] Singh, S., A. M. Stroud, S. D. Holubar, W. J. Sandborn and D. S. Pardi (2015). "Treatment and prevention of pouchitis after ileal pouch-anal anastomosis for chronic ulcerative colitis." *Cochrane Database Syst Rev*(11): CD001176.
- [46] Smug, L. N., S. Salminen, M. E. Sanders and S. Ebner (2014). "Yoghurt and probiotic bacteria in dietary guidelines of the member states of the European Union." *Benef Microbes* 5(1): 61-66.
- [47] Stensson, M., G. Koch, S. Coric, T. R. Abrahamsson, M. C. Jenmalm, D. Birkhed and L. K. Wendt (2014). "Oral administration of *Lactobacillus reuteri* during the first year of life reduces caries prevalence in the primary dentition at 9 years of age." *Caries Res* 48(2): 111-117.
- [48] Stewart, L. A. and J. F. Tierney (2002). "To IPD or not to IPD? Advantages and disadvantages of systematic reviews using individual patient data." *Eval Health Prof* 25(1): 76-97.

- [49] Sung, V., F. D'Amico, M. D. Cabana, K. Chau, G. Koren, F. Savino, H. Szajewska, G. Deshpande, C. Dupont, F. Indrio, S. Mentula, A. Partty and D. Tancredi (2018). "Lactobacillus reuteri to Treat Infant Colic: A Meta-analysis." *Pediatrics* 141(1).
- [50] Szajewska, H., A. Skorka, M. Ruszczynski and D. Gieruszczak-Bialek (2013). "Meta-analysis: Lactobacillus GG for treating acute gastroenteritis in children--updated analysis of randomised controlled trials." *Aliment Pharmacol Ther* 38(5): 467-476.
- [51] Szajewska, H., M. Urbanska, A. Chmielewska, Z. Weizman and R. Shamir (2014). "Meta-analysis: Lactobacillus reuteri strain DSM 17938 (and the original strain ATCC 55730) for treating acute gastroenteritis in children." *Benef Microbes* 5(3): 285-293.
- [52] Taylor, A. M. and H. D. Holscher (2018). "A review of dietary and microbial connections to depression, anxiety, and stress." *Nutr Neurosci*: 1-14.
- [53] Tierney, J. F., C. Vale, R. Riley, C. T. Smith, L. Stewart, M. Clarke and M. Rovers (2015). "Individual Participant Data (IPD) Meta-analyses of Randomised Controlled Trials: Guidance on Their Use." *PLoS Med* 12(7): e1001855.
- [54] Udayappan, S., L. Manneras-Holm, A. Chaplin-Scott, C. Belzer, H. Herrema, G. M. Dallinga-Thie, S. H. Duncan, E. S. G. Stroes, A. K. Groen, H. J. Flint, F. Backhed, W. M. de Vos and M. Nieuwdorp (2016). "Oral treatment with Eubacterium hallii improves insulin sensitivity in db/db mice." *NPJ Biofilms Microbiomes* 2: 16009.
- [55] van Baarlen, P., J. M. Wells and M. Kleerebezem (2013). "Regulation of intestinal homeostasis and immunity with probiotic lactobacilli." *Trends Immunol* 34(5): 208-215.
- [56] Xie, H. Y., D. Feng, D. M. Wei, L. Mei, H. Chen, X. Wang and F. Fang (2017). "Probiotics for vulvovaginal candidiasis in non-pregnant women." *Cochrane Database Syst Rev* 11: CD010496.
- [57] Zhang, G. Q., H. J. Hu, C. Y. Liu, Q. Zhang, S. Shakya and Z. Y. Li (2016). "Probiotics for Prevention of Atopy and Food Hypersensitivity in Early Childhood: A PRISMA-Compliant Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials." *Medicine (Baltimore)* 95(8): e2562.
- [58] Zheng, J., Q. Feng, S. Zheng and X. Xiao (2018). "The effects of probiotics supplementation on metabolic health in pregnant women: An evidence based meta-analysis." *PLoS One* 13(5): e0197771.

ASOCIACIÓN INTERNACIONAL DE PROBIÓTICOS: UNA PERSPECTIVA GLOBAL

George Paraskevakos

george@internationalprobiotics.org

• *Director Ejecutivo de la Asociación Internacional de Probióticos (IPA), EE.UU.*

RESUMEN

El mercado de los probióticos continua teniendo un crecimiento sin precedentes, año tras año. En calidad de “La Voz Global de los Probióticos®”, la Asociación Internacional de Probióticos (IPA, por sus siglas en inglés) y sus muchos colaboradores, tienen una perspectiva sobre los datos de mercado que muestran no solo que el mismo ha crecido durante los últimos 3 a 5 años, sino que también seguirá creciendo durante los siguientes 5 años. La evolución del sector de probióticos y su meteórico ascenso están permanentemente sostenidos por los trabajos científicos publicados en torno a los beneficios del consumo de probióticos. Más allá de una industria que crece, basada en trabajos científicos, este progreso no ocurre sino con numerosos desafíos. En este capítulo se explora el crecimiento de la industria de los probióticos, y se analiza cómo este crecimiento supera al de otros suplementos o ingredientes funcionales para alimentos. Consecuentemente, este capítulo también se dedica a analizar la variabilidad de los marcos regulatorios de diferentes regiones del mundo, que –por momentos– se desarrollan independiente del crecimiento tecnológico y científico que este sector ha visto durante los últimos años.

I. INTRODUCCIÓN

I.A. PROBIÓTICOS; UN MERCADO QUE EXPERIMENTA UN CRECIMIENTO SIN PRECEDENTES

Este capítulo está centrado en definiciones y marcos regulatorios de los probióticos y los productos que los contienen. Por lo tanto, son necesarias las siguientes definiciones.

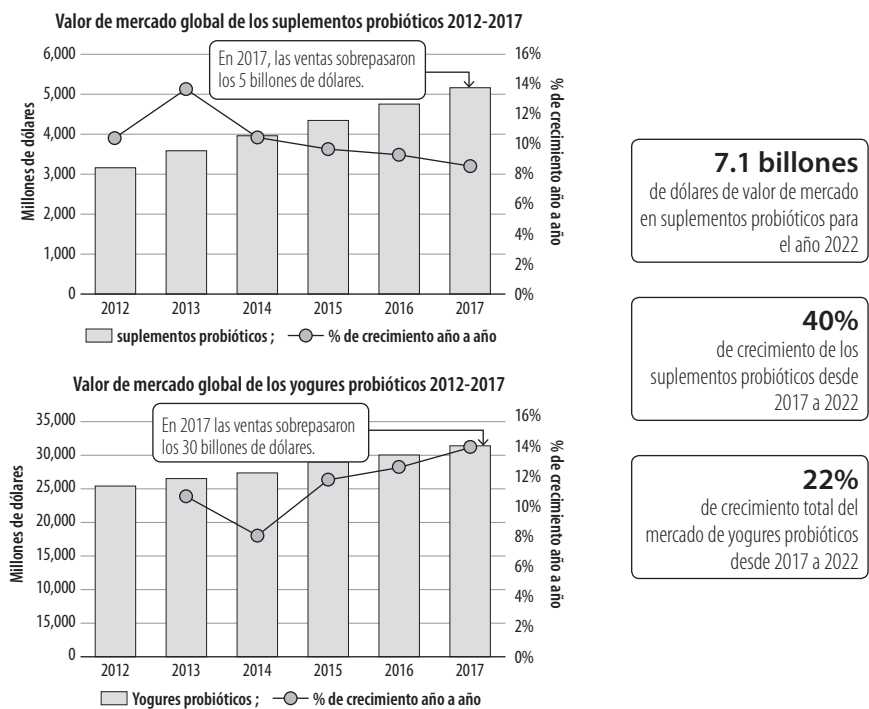
Suplementos probióticos: se trata de microorganismos benéficos (usualmente bacterias) que son comercializadas, generalmente en forma deshidratada, en cápsulas, pastillas, comprimidos o polvos, y pertenecen principalmente a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Las bacterias probióticas modifican favorablemente el balance de la microbiota intestinal, inhiben el crecimiento de bacterias nocivas, promueven la buena digestión, refuerzan el sistema inmune, incrementan la resistencia a infecciones, solo por mencionar algunos de los beneficios ya probados. Este grupo incluye ciertas formas de suplementos dietarios, e incluye también a los probióticos basados en *Saccharomyces boulardii*. El término “suplementos probióticos” excluye a productos como yogures con pre o probióticos. El término también excluye a los prebióticos.

Yogures probióticos: se consideran yogures pre/probióticos todas las variantes de yogures con cepas probióticas y/o prebióticos agregados, debidamente documentados. Las cepas genéricas probióticas incluyen –pero no se limitan a– *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei*, entre otros. Los microorganismos probióticos documentados son denominados con un código alfanumérico adicional a la especie, que designa la cepa; estos son (pero no se limitan a): *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (Chr. Hansen), *Bifidobacterium lactis* DN 173010, también conocido como *Bifidus ActiRegularis* (presente en el producto Activia de Danone), *Bifidobacterium lactis* HN019 (Danisco), *L. acidophilus* LA-5 (Chr. Hansen), *L. acidophilus* NCFM (Danisco), *L. rhamnosus* LGG (Valio), *L. rhamnosus* HN001 (Danisco), *L. paracasei* 431 (Chr. Hansen), *L. paracasei/casei* Shirota (propiedad de Yakult), *L. paracasei* DN114011 (propiedad de Danone, DanActive), *L. plantarum* 299V (Probi AB). Por su parte, la mayor parte de los prebióticos son oligosacáridos, como los fructooligosacáridos (FOS), xilooligosacáridos (XOS), povidextrosa, galactooligosacáridos (GOS), lactulosa, tagatosa e inulina.

Los analistas de la industria han intentado anticipar las ventas y el crecimiento, pero cada vez que se detienen a mirar, los números han evolucionado. La IPA colabora con varias compañías de *data mining*, y fuentes de información. Para este capítulo, nuestro estimado acerca del mercado de probióticos –tanto en forma de alimentos

como en forma de suplementos– cerró el año 2017 en los 42,5 billones de dólares [1]. Se anticipa que ese número crecerá a 50 billones de dólares, y hemos estimado que será tan alto como 70 billones de dólares dentro de los próximos 7 años. Una predisposición creciente hacia los alimentos funcionales, junto con consumidores que se inclinan hacia la medicina preventiva, al tiempo que su conocimiento y uso se expande globalmente, hace que la industria probiótica sea estimada en 77 billones de dólares para el año 2025 [2] (ver **Figura 1**). La tendencia demográfica es uno de los factores contribuyentes al crecimiento del mercado de los probióticos. Una población que envejece y vive más tiempo, y que busca estilos de vida más sanos, en combinación con una mayor disponibilidad de información y mayor conocimiento de los beneficios y la eficacia de los probióticos, han promovido este mercado [3]. Los consumidores informados están adoptando medidas preventivas. Con los costos de salud alcanzando los trillones de dólares, y representando entre el 10 y 20% del PBI de numerosos países [4] los consumidores más informados están comenzando a darse cuenta de la importancia de las intervenciones preventivas.

Figura 1. Predicción del crecimiento de la categoría “probióticos”, al año 2022.



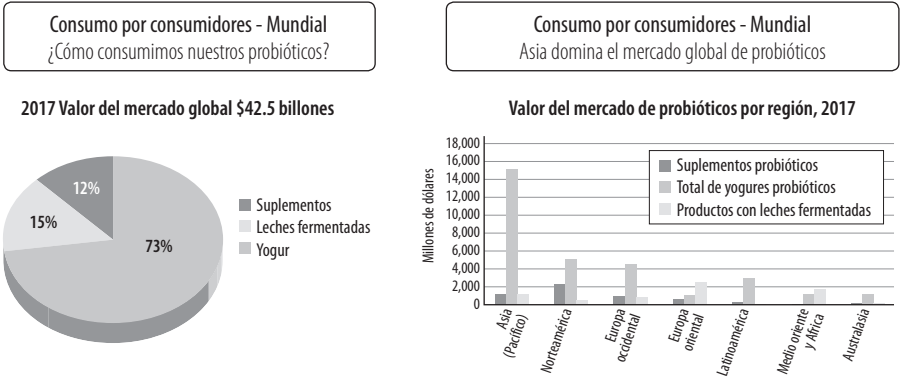
Algunos de los sectores que deben ser considerados dentro de este crecimiento son los alimentos que contienen probióticos naturales –como el yogur–, las leches fermentadas y productos fortificados con probióticos, tales como bebidas, barras de

cereal/proteínas, y *sauerkraut* o *kimchi*, por nombrar algunos. Es igualmente importante incluir o considerar a los suplementos dietarios dentro de este grupo, puesto que estos no solo están sufriendo cambios en sus formatos y sistemas de administración, sino que además están cambiando los marcos regulatorios que afectan cómo se desarrollan sus respectivos mercados [5]. La misión y alcances de la AIP se concentran exclusivamente en el segmento de los probióticos de uso humano; el segmento de uso veterinario está creciendo también a un paso fervoroso, puesto que los probióticos son cada vez más utilizados en alimentos para la producción animal, en reemplazo de los antibióticos, y su importancia no debiera ser, bajo ningún modo, menospreciada.

Los diferentes países y regiones son muy particulares en cuanto a cuáles son las fuentes de probióticos que prefieren. Algunas personas prefieren formas autóctonas de alimentos fermentados, como el *kimchi* en Corea del Sur, el yogur en Europa o las leches agrias en los países de Medio Oriente, como fuentes de microorganismos beneficiosos, antes que los suplementos [6]. A medida que la mayor parte de las dietas cambian, incluyendo más alimentos empaquetados y procesados, la demanda de suplementos se verá cada vez más estimulada también. Por el contrario, lo opuesto también es cierto en áreas del mundo donde los alimentos ricos en probióticos o productos fermentados no han sido incorporados, en los que puede observarse una rápida aceptación y crecimiento del consumo de ese segmento; ejemplos de este fenómeno son el *kefir* y la *kombucha*, que han sido incorporados (incluso) al vocabulario de los consumidores norteamericanos [7].

Los probióticos son consumidos de muchas maneras, y las preferencias de los consumidores varían entre regiones. La segmentación del mercado de los probióticos varía según sean incorporados a alimentos, suplementos o bebidas. Los alimentos que contienen probióticos pueden ser lácteos (yogur bebible o firme) y no lácteos (bebidas vegetales fermentadas). Es sabido que –globalmente– el grueso del consumo de probióticos es en forma de yogur [8] (ver **Figura 2**). Esta información es difícil de reunir, principalmente luego de que en Europa se prohibió el uso del término “probiótico”; sin embargo, analistas contratados por la AIP rastrearon todos los yogures probióticos conteniendo la declaración de “probióticos” en la etiqueta, la declaración de “cultivos vivos”, o la especificación e identificación de las cepas probióticas utilizadas, en el rótulo. Los analistas también buscaron en las listas de ingredientes para encontrar cualquier cepa probiótica, si acaso esta no hubiera sido claramente mencionada en la etiqueta. Adicionalmente, los cultivos iniciadores (o *starters*) para yogures también fueron incorporadas en estas cifras, siempre y cuando estuvieran adecuadamente indicados en la etiqueta o en la lista de ingredientes. Independientemente de la prohibición que pesa sobre el término “probiótico”, hay todavía una gran cantidad de marcas en Europa que comercializan probióticos de diferentes maneras; estas marcas ofrecen productos que contienen cultivos vivos, microorganismos o “biocultivos vivos”. Todos estos tipos de yogures han sido considerados probióticos para los cálculos antes mencionados.

Figura 2. Consumo de probióticos y desglose regional.



Se observa el predominio del yogur, principalmente en la región de Asia.

La segmentación de la categoría de productos probióticos, y de su mercado, tiene diferentes interpretaciones y significados dependiendo de las fuentes con las que la IPA trabaja. Con el objetivo de ganar transparencia, hemos intentado aquí delinear toda la segmentación de la categoría, y de listar las regiones [9].

II. SEGMENTACIÓN DEL MERCADO Y DE LA CATEGORÍA DE PRODUCTO

- i. Alimentos probióticos
 - a. Lácteos
 - Yogures (firmes o que se consumen con cuchara), quesos,
 - b. No lácteos, y alimentos fermentados
 - Kimchi, Sauerkraut, Tempeh, salchichas,
 - c. Cereales y alimentos horneados
 - Masa agria, pan
 - d. Alimentos deshidratados
 - Barritas con probióticos, frutas deshidratadas, barritas de proteínas
- ii. Suplementos probióticos
 - a. Suplementos dietéticos
 - La clasificación depende de la región; el formato es el mismo
 - b. Nutrientes especiales
 - Pueden ser alimentos, o alimentos con propósitos médicos especiales, o alimentos medicinales
 - c. Fórmulas infantiles

iii. Bebidas probióticas

- a. Lácteas
 - Yogures bebibles, leches agrias, kefir
- b. No-lácteas
 - Kombucha, té, soja

III. SEGMENTACIÓN DEL MERCADO EN ÁREAS ESPECÍFICAS DEL MUNDO

i. Norteamérica

- a. EE.UU., Canadá, México

ii. Europa

- a. Europa Occidental, Europa Central
 - Reino Unido, Italia, Francia, Suecia, Finlandia
- b. Europa del Este
 - Incluye Rusia

iii. Asia

- a. Incluye China, Japón e India

iv. Latinoamérica

- a. Incluye Brasil

v. Medio Oriente y África

- a. Medio Oriente
- b. África

Tabla 1. Estimaciones del mercado probiótico y predicciones por región [10].

Estimaciones y predicciones por aplicación, del mercado probiótico en EE.UU. (2014-2025, en millones de dólares)

Aplicación	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	CAGR (2018-25)
Alimentos probióticos	562.7	589.9	619.4	651.5	686.4	724.9	767.9	815.1	867.5	926.7	994.4	1,071.9	6.6 %
Bebidas probióticas	4,520.0	4,769.6	5,042.1	5,338.7	5,663.4	6,022.1	6,423.2	6,865.2	7,358.1	7,915.8	8,555.3	9,289.2	7.3 %
Suplementos dietarios probióticos	1,978.0	2,099.3	2,232.1	2,377.0	2,536.1	2,712.1	2,909.3	3,127.2	3,370.8	3,646.9	3,963.8	4,328.0	7.9 %
Total	7,060.7	7,458.7	7,893.6	8,367.2	8,886.0	9,459.1	10,100.5	10,807.5	11,596.4	12,489.4	13,513.5	14,689.2	7.4 %

Estimaciones y predicciones por aplicación, del mercado probiótico en Europa (2014-2025, en millones de dólares)

Aplicación	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	CAGR (2018-25)
Alimentos probióticos	579.6	568.0	558.2	550.1	543.0	536.8	531.1	527.8	525.7	526.9	530.6	535.7	-0.2 %
Bebidas probióticas	7,129.5	7,009.3	6,910.0	6,832.1	6,766.4	6,710.5	6,660.7	6,642.0	6,637.5	6,674.0	6,744.4	6,831.5	0.1 %
Suplementos dietarios probióticos	731.0	723.2	717.3	713.6	711.0	709.5	708.5	710.7	714.5	722.8	734.8	748.7	0.7 %
Total	8,440.2	8,300.5	8,185.5	8,095.8	8,020.5	7,956.7	7,900.2	7,880.6	7,877.8	7,923.6	8,009.8	8,115.9	0.2 %

Estimaciones y predicciones por aplicación, del mercado probiótico en Asia del pacífico (2014-2025, en millones de dólares)

Aplicación	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	CAGR (2018-25)
Alimentos probióticos	1,174.6	1,236.0	1,306.8	1,385.5	1,473.1	1,569.2	1,677.8	1,800.7	1,941.5	2,101.2	2,282.4	2,483.7	7.7 %
Bebidas probióticas	13,806.5	14,610.1	15,533.7	16,562.2	17,708.5	18,969.7	20,396.6	22,012.4	23,866.4	25,972.1	28,367.5	31,040.6	8.3 %
Suplementos dietarios probióticos	1,508.8	1,600.2	1,705.0	1,821.8	1,951.9	2,095.2	2,257.2	2,440.6	2,651.1	2,890.2	3,162.3	3,466.1	8.5 %
Total	16,489.9	17,446.3	18,545.4	19,769.4	21,133.5	22,634.0	24,331.6	26,253.7	28,459.1	30,963.5	33,812.1	36,990.4	8.3 %

Estimaciones y predicciones por aplicación, del mercado probiótico en América Central y del Sur (2014-2025, en millones de dólares)

Aplicación	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	CAGR (2018-25)
Alimentos probióticos	262.5	277.4	294.0	312.8	333.4	356.4	382.4	410.6	441.3	474.7	512.1	553.4	7.5 %
Bebidas probióticas	4,531.4	4,807.3	5,114.4	5,461.5	5,843.2	6,269.1	6,751.0	7,276.8	7,850.8	8,478.0	9,180.6	9,959.9	7.9 %
Suplementos dietarios probióticos	216.9	231.7	248.2	266.9	287.5	310.6	336.7	365.4	396.8	431.4	470.2	513.5	8.6 %
Total	5,010.7	5,316.4	5,656.6	6,041.2	6,464.1	6,936.0	7,470.1	8,052.8	8,688.9	9,384.0	10,162.9	11,026.8	7.9 %

Estimaciones y predicciones por aplicación, del mercado probiótico en Medio Oriente y África (2014-2025, en millones de dólares)

Aplicación	2014	2015	2016	2017	2018	2019	2020	2021	2022	2023	2024	2025	CAGR (2018-25)
Alimentos probióticos	145.6	152.0	159.2	167.2	175.8	186.5	197.7	210.2	223.9	239.1	256.3	275.0	6.6 %
Bebidas probióticas	2,889.9	3,030.9	3,188.0	3,364.0	3,551.7	3,784.8	4,030.0	4,303.3	4,603.7	4,938.9	5,318.3	5,732.1	7.1 %
Suplementos dietarios probióticos	119.3	126.3	134.2	143.0	152.5	164.0	176.3	190.1	205.2	222.2	241.5	262.6	8.1 %
Total	3,154.7	3,309.3	3,481.4	3,674.2	3,880.0	4,135.3	4,404.1	4,703.6	5,032.8	5,400.2	5,816.0	6,269.7	7.1 %

IV. OBSERVACIONES Y PREDICCIONES PARA EL 2025

Se espera que el **mercado norteamericano** continúe con un robusto crecimiento. El consumo permanente de alimentos procesados, el uso de antibióticos y la avidez de los consumidores por la información y métodos para cuidar su salud, mantendrán este mercado en sostenido crecimiento. Los probióticos particulares de cada región, las regulaciones y las innovaciones mantendrán esta tendencia.

Restringida por el marco regulatorio (NHCR, EC 1924/2006), la **Unión Europea** continuará experimentando un lento crecimiento de su mercado de probióticos. A pesar de que algunos suplementos probióticos han comenzado a mostrar un regreso a las góndolas, el crecimiento general sigue siendo moderado. Mientras todavía no se haya logrado ninguna reivindicación en términos de beneficios para la salud, y mientras persista la prohibición sobre el uso del término “probiótico” en el rotulado, la investigación e innovación también mostrarán un crecimiento lento. Los afiliados europeos de la IPA se encuentran trabajando para resolver los problemas regulatorios, y hay confianza en que se encontrará un camino para avanzar.

Por su parte, **Asia** experimentará una mejoría en la percepción de los probióticos por parte de los consumidores, en parte como consecuencia de estrategias competitivas adoptadas por ciertos actores globales que desean entrar en este mercado. La

demanda por parte de países como India y China, están promoviendo el crecimiento general de esta región. El incremento en la liquidez y la mejora en el estándar general de vida también están contribuyendo al crecimiento de este mercado. Se espera que el mercado chino de los probióticos muestre el mayor crecimiento en los años venideros, tanto en relación con el resto de Asia como en relación con el resto del mundo. La población añosa, el incremento de la prevalencia de enfermedades cardiovasculares, los problemas de salud mental, los trastornos digestivos y un crecimiento en la percepción de los beneficios de los probióticos, están detrás del crecimiento previsto. Los consumidores chinos tienen confianza en los productos probióticos que provienen de otros países.

Las economías líderes de **Latinoamérica** son las de Argentina, Brasil y Chile. Esta región parece estar transitando un proceso dicotómico. El mercado de los probióticos tendrá oportunidades de crecimiento a partir del incremento de enfermedades crónicas y otras dolencias relacionadas con el incremento del consumo de alimentos procesados, que –a su vez– está relacionado con insuficiente financiamiento del estado y situaciones de bajos ingresos. Como se mencionó antes, un incremento en la liquidez y en la conciencia de los beneficios de los probióticos –en combinación con mejores guías por parte de los gobiernos– conducirán el crecimiento del mercado.

El incremento en la conciencia sobre los beneficios de los probióticos en **Medio Oriente** y los países del **continente africano** impulsarán el crecimiento de ese mercado. Los productores internacionales continuarán estableciendo oficinas en esta región, para incrementar su presencia. Las compañías de esa región están enfocándose en elaborar productos en línea con los patrones de consumo tradicionales de los habitantes de la región, tales como yogures bebibles y leches fermentadas. La oportunidad en esta región vendrá de la mano de la mejoría en la percepción sobre los probióticos, y de una adecuada educación.

V. FACILITADORES DEL CRECIMIENTO

Debe decirse que las oportunidades de crecimiento estarán basadas en dos áreas clave: las **enfermedades crónicas** y la **prevención**. Como se mencionó antes, las tendencias demográficas sugieren que el gasto en salud de los gobiernos está en el orden de los trillones de dólares por año. La mayor expectativa de vida y la búsqueda de tratamientos no tradicionales para las enfermedades, son factores que empujarán al crecimiento del mercado de los probióticos. En paralelo, el hecho de que los consumidores estén mejor informados, y que busquen activamente estilos de vida más saludables –consumiendo suplementos– ha llevado esta “cultura de la prevención” a un nivel totalmente diferente. En un reporte recientemente solicitado por la AIP, se observó que 7 de cada 10 usuarios de probióticos practica la salud preventiva [11]; en consecuencia, es lógico pensar que la educación será importante para entender a los probióticos, y que ayudará a propiciar el uso a largo plazo y el compromiso por

parte de los consumidores. Otra clave importante para los usuarios de probióticos, es el conocimiento científico. La confianza de los consumidores de probióticos es un aspecto fundamental; más del 70% de los usuarios de probióticos se mostró preocupado por las falsas reivindicaciones que se hacen sobre estos productos, y el motivo de compra para más del 60% de los compradores fue la existencia de pruebas clínicas y sustento científico [12]. Finalmente, pero igualmente importante, el crecimiento de este mercado será consecuencia de la innovación y los avances tecnológicos. Nuevas formas de administración, de aplicación, posibilidades de combinación de ingredientes, nuevas patentes y aplicaciones según edad y género, contribuirán a diferenciar los productos ya disponibles, beneficiando a la industria y los consumidores.

Los aspectos clave que contribuirán al crecimiento global de las ventas de probióticos en los años venideros, son:

1. Educación y percepción

El crecimiento del mercado está siendo conducido por un aumento en la percepción que hay sobre los probióticos en las distintas plataformas globales, impulsada por la celeridad y practicidad que imponen las nuevas tecnologías, como las plataformas de medios sociales (Facebook, Twitter, Youtube, etc). Los programas de salud pública y los medios tradicionales también están destacando el rol de los probióticos en la salud.

2. Investigación y respaldo científico / aplicaciones e innovaciones

Debe destacarse que los probióticos ya no son relacionados a categorías de productos relacionados con la salud digestiva. En la década pasada, grandes proyectos –especialmente el Proyecto Microbioma Humano [13]– han impulsado la investigación que permitió establecer que la microbiota es un socio vital de los sistemas inmune, metabólico y respiratorio y que puede prevenir y/o colaborar en el tratamiento de muchas enfermedades y desórdenes crónicos. Esta notable expansión de sus posibilidades, o mejor dicho sus “capacidades descubiertas”, será una fuerza de impulso detrás de la tendencia a adoptar a los probióticos y sus aplicaciones.

3. Aspectos demográficos

Las poblaciones están envejeciendo en varios continentes, más notablemente en norteamérica y Europa Occidental; esto contribuirá a que se constituyan como grandes consumidores de probióticos. A medida que la gente envejece, las necesidades de salud se incrementan, así como también se incrementa el interés por los asuntos relacionados con el mantenimiento de la misma. Parte del capital se invierte en salud [14], y esto se asocia a una búsqueda de mejores cuidados. Sea si se trata de una transferencia de recursos dirigida a personas enfermas, o a las propias necesidades de cada individuo, es –en todo caso– un factor que impulsará el crecimiento del sector [15].

A su vez, los costos cada vez más altos de salud están impulsando una mayor atención a las estrategias de prevención. Los probióticos son parte de la estrategia

que muchos consumidores tienen en relación con la salud. Una revisión reciente delineó las posibilidades de integrar a los probióticos a la vida diaria, y se describieron las indicaciones de uso, junto con las investigaciones clínicas que se han realizado en este sentido [16].

VI. ESTADO DEL ARTE CIENTÍFICO EN USOS NO CONVENCIONALES DE LOS PROBIÓTICOS; NUEVAS OPORTUNIDADES

Avances recientes en tecnologías de secuenciación y perfilado genómico han conducido a una explosión de análisis de la microbiota, descubrimientos que una revisión realizada en 2015 [17] describió como *“comparable en influencia al descubrimiento de un nuevo órgano del cuerpo, que ofrece además una nueva ruta para la intervención terapéutica”*.

Los esfuerzos por trasladar este conocimiento revolucionario en estrategias de tratamiento y prevención para la salud continúan progresando más allá de los sitios tradicionales en los que se encuentra la microbiota, como el tracto gastrointestinal y otros sitios fácilmente accesibles, como la vagina, el tracto urinario y la cavidad oral. De hecho, evidencias cada vez más abundantes sugieren que la microbiota influye en la salud más allá de todos estos sitios.

En publicaciones científicas recientes, las alteraciones en la composición microbiana intestinal han sido asociadas con cambios marcados en el humor, en el dolor y la capacidad cognitiva, estableciendo una importancia crítica bidireccional entre el cerebro y el tracto gastrointestinal, tanto en la salud como en la enfermedad [18].

Agrandando aún más el alcance de los alcances de los descubrimientos científicos recientes, también la hipertensión, las dislipidemias, la obesidad y la diabetes muestran una interfaz compleja con la microbiota, aunque son solamente algunos de los factores que intervienen en dichas patologías [19, 20].

La ciencia asociada a los probióticos es potencialmente ilimitada, y elaborar cualquier artículo acerca de lo que se vendrá, es un desafío. Es importante notar que mientras diferentes acciones, como el Proyecto Microbioma Humano [21], buscan clarificar la información, el incremento en los estudios aleatorizados prospectivos en humanos traerán a la luz las relaciones causales, además de las casuales, entre los microorganismos y nuestro propio organismo. Una búsqueda en Pubmed revela más de 18.500 publicaciones, entre revisiones, artículos y ensayos clínicos, y esta es solamente una de las bases posibles para buscar [22]. La AIP está trabajando en una revisión comprensiva que se espera pueda ser finalizada en la segunda parte de 2018, trabajando sobre dos bases de datos sobre ensayos clínicos con probióticos realizados en seres humanos.

VII. REGULACIONES EN EL CAMPO DE LOS PROBIÓTICOS; UN PAISAJE DIVERGENTE

Los probióticos son únicos en muchos aspectos, desde su manufactura, sus requerimientos de almacenamiento y su estabilidad, así como también de sus requerimientos analíticos. Deben tomarse consideraciones delicadas cuando se aborda el modo en que los agentes reguladores ven su inclusión en guías y lineamientos. Pocas autoridades regulatorias alrededor del mundo han logrado establecer marcos regulatorios que son específicos para probióticos. Los probióticos no pueden ser incluidos en otras categorías de alimentos y suplementos dietarios, a la hora de establecer los comportamientos que la industria debiera tener; sin embargo, se suelen aplicar las regulaciones generales diseñadas para suplementos.

Los marcos regulatorios existentes son variados. En algunas instancias, el acceso a los mercados por parte de los probióticos está basado en aspectos de seguridad alimentaria, y no es necesario hacer (ni justificar) las reivindicaciones o alegatos sobre sus propiedades. En otros marcos, los suplementos probióticos solo pueden ser comercializados vía una pre-aprobación que les permita hacer reivindicaciones particulares o generales sobre sus propiedades benéficas.

Esta parte del capítulo resumirá algunos –pero no todos– de los marcos regulatorios existentes para los probióticos. Comparar diferentes guías sobre legalización que se aplican al sector de los probióticos puede conducir una discusión útil que las autoridades podrían tener en cuenta. Sería ideal alcanzar una armonización global en este tema; no obstante, esa sería una tarea que debería realizarse en el marco del Codex Alimentarius bajo el liderazgo del gobierno argentino, algo en curso y que constituye una iniciativa impulsada por la AIP desde 2017. Sin embargo, esa es una iniciativa a largo plazo.

VIII. LOS PROBIÓTICOS EN LAS DISTINTAS REGIONES DEL MUNDO

VIII.A. CANADÁ; LOS PROBIÓTICOS COMO PRODUCTOS DE SALUD NATURALES (PSN)

El departamento de salud de Canadá (*Health Canada*) entendió que hay diferencias entre las drogas y los suplementos dietarios. Los probióticos presentados en formatos que no sean alimentos, por ejemplo una cápsula, una tableta o en polvo, son clasificados como PSN desde que la Regulación para los Productos de Salud Naturales (RPSN) entró en vigencia en 2004 [23]. Los PSN son productos de bajo riesgo que pueden ser elegidos por los consumidores para su propio cuidado, o recomendados por actores del sistema de salud que los recomienden para usos prolongados. El brazo regulatorio debajo de *Health Canada* que controla los PSN, es el Directorado de

Productos de Salud Naturales (DPSN) [24]. El DPSN ha desarrollado un acercamiento único que facilita el cumplimiento por parte de la industria, y permite la innovación. Este acercamiento es estable, predecible, y propicia la investigación científica, que puede ser luego debidamente comunicada a los consumidores por intermedio del etiquetado de los productos.

El DPSN ha reconocido que los probióticos son únicos; en consecuencia, se han tenido algunas consideraciones especiales, y se han establecido una serie de previsiones y requerimientos. Para poder ser vendidos como PSN, los productos terminados conteniendo probióticos deben ser sometidos a un análisis pre-mercado, con la finalidad de obtener una autorización o una “licencia de producto”, con un número de Producto Natural, usualmente denominado NPN.

En Canadá, hay dos maneras de registrar un PSN probiótico:

- **Demostrando cumplimiento de la monografía sobre probióticos [25]:**

Esta monografía contiene el listado de todos los microorganismos vivos (y sus especies) [26] reconocidos como “seguros en términos generales” para el consumo humano, y proporciona además una serie de condiciones que dichas especies deben cumplir, como la identificación y la caracterización de su resistencia a antibióticos.

Cuando el producto terminado cumple por completo con todas las condiciones enumeradas, y el postulante respalda todos los datos del proceso de registro, se permite realizar una de estas tres reivindicaciones genéricas para el producto en cuestión: i) el producto ayuda a la salud gastrointestinal; ii) el producto es fuente de probióticos; iii) el producto contribuye a una microbiota intestinal favorable.

El DPSN reconoce estos efectos basándose en los conocimientos generales, y en la bibliografía específica. Consecuentemente, el DPSN considera que todas las cepas probióticas que cumplen con los requisitos de la monografía, son seguras y proporcionan alguno (o varios) de esos tres beneficios.

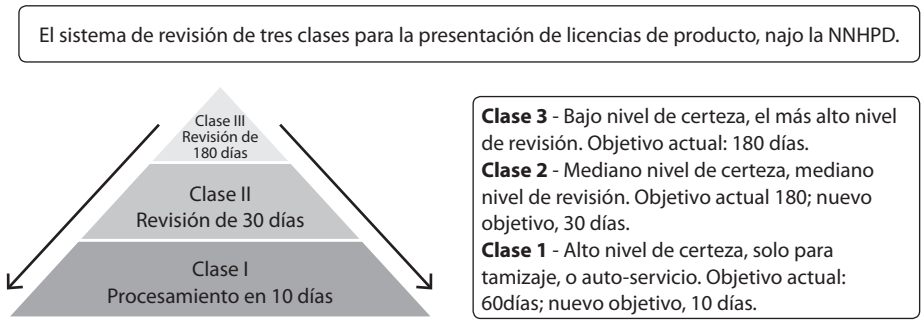
Esta clase de registro de producto se denomina “compendial/pre-aclaratoria” y el proceso de evaluación se denomina de “clase I”. La evaluación de clase I permite un rápido acceso al mercado, ya que no requiere mucho esfuerzo por parte de las autoridades regulatorias. En otros términos, el DPSN ha incluido en la monografía la información con la que ya están de acuerdo de antemano y, si los productos propuestos por los sectores industriales cumplen estos requisitos en su totalidad, el registro está pre-aprobado (aunque el proceso de registro sigue siendo necesario).

Para verificar el cumplimiento, el DPSN efectúa auditorías aleatorias entre todas las solicitudes de registro efectuadas, y si acaso se comprueba alguna irregularidad, se suspenden las licencias de producto.

- **Proporcionar otra evidencia, tal como estudios clínicos, en respaldo de reivindicaciones diferentes o de desviaciones de la monografía**

Por este camino, las reivindicaciones pueden ser elegidas por el postulante (esencialmente reivindicaciones relacionadas con la función o con la reducción de riesgos), y son evaluadas por el DPSN. Luego, basándose en un diálogo entre el postulante y el DPSN, la redacción puede ser discutida y cambiada para reflejar adecuadamente el resultado de los estudios clínicos citados, de un modo que el DPSN considere aceptable. Este tipo de registro se denomina “no tradicional”, y el proceso de evaluación se considera de “clase II” o “clase III”, dependiendo de cuán alejada esté la información respecto de la monografía, y de cuánto esfuerzo deba realizar la DPSN para comprobar esa información. Usualmente, la mayor parte de las postulaciones no tradicionales caen dentro de la clase III, y su aprobación toma 180 días luego de los 30 días iniciales en los que se determina la clase de proceso que sobrevendrá. La clase II está reservada a aquellos casos en los que un productor que ya ha recibido aprobación para un producto, tiene un cliente que desea distribuir su producto bajo una licencia propia, marca propia, etc. En ese caso, el productor puede autorizar al cliente a realizar una referencia cruzada a la postulación que ya ha sido aprobada para ese mismo producto. En ese caso, se realiza un proceso de evaluación de clase II, puesto que la DPSN no necesita evaluar todo el producto de nuevo; este proceso demora 30-60 días. Otro ejemplo de procesos de evaluación de clase II es cuando la fórmula del producto solo contiene ingredientes que ya han sido aprobados independientemente; un ejemplo de esto son los probióticos y las fibras. En estos casos, toda la información ha sido pre-aclarada; no obstante, el DPSN tiene que realizar una evaluación.

Figura 3. Sistema de revisión de Productos de Salud Naturales [27]



Debe destacarse que el DPSN tiene una base de datos de todos los productos registrados [28]. Además, los probióticos agregados a los alimentos (o en formato de

alimentos, como el yogur), en Canadá, poseen un marco regulatorio muy diferente y no son categorizados como PSN. No se requiere registro ni notificación a menos que se trate de alimentos nuevos o que se busque realizar una reivindicación acerca de sus efectos sobre la salud. Algunas especies de microorganismos elegibles con estos fines pueden ser utilizadas bajo reivindicaciones genéricas, siempre que se las emplee en 109 CFU/porción, sin realizar ningún registro ni notificación. Las reivindicaciones de estructura y función pueden ser realizadas libremente, siempre que existan los datos que las demuestren, y que puedan ser enviados a *Health Canada* bajo pedido.

VIII.B. ESTADOS UNIDOS: LOS PROBIÓTICOS COMO SUPLEMENTOS DIETARIOS

En EE.UU., los suplementos están regulados bajo la Norma de Salud y Educación sobre Suplementos Dietarios (NSED) de 1994 [29]. La NSED no define el término “probiótico” y no proporciona indicaciones específicas relacionadas con la naturaleza “viva” de estas “sustancias”. Sin embargo, como cualquier otro suplemento, se aplican los requerimientos y previsiones generales.

A diferencia de los medicamentos, la NSED ubica a los suplementos en la categoría de alimentos, para los cuales el acceso al mercado no requiere pre-aprobación garantizada por la FDA [30] para el producto terminado (como sí lo requieren los medicamentos). Este hecho ubica la responsabilidad en la industria, para garantizar que los productos son seguros bajo los usos recomendados; además, la industria debe asegurar que los productos cumplen las especificaciones correspondientes, y que son adecuada y verazmente etiquetados, y que los efectos adversos son reportados. Existiendo la NSED, la FDA debe demostrar que un producto es inseguro, antes de tomar cualquier acción contra él. Las reivindicaciones de estructura/función pueden ser hechas con libertad, siempre y cuando haya evidencia suficiente respaldándolas. Esta evidencia debe estar disponible, pero no necesariamente debe ser remitida ni aprobada por la FDA previamente a la comercialización del producto. Una vez que un producto terminado es comercializado, hay dos oficinas gubernamentales que aseguran el cumplimiento de la normativa, y las prácticas genuinas y seguras, siendo una de ellas la FDA, y la otra la Comisión de Comercio Federal (FTC, por sus siglas en inglés) [31]. Estas agencias monitorean las reivindicaciones para asegurar que las afirmaciones hechas sobre un suplemento no acercan al producto terminado a la definición de medicamento (es decir, controlan las reivindicaciones relativas a enfermedades) y que estas declaraciones son verídicas, no confusas y que están respaldadas por evidencia confiable.

Consecuentemente, no hay ningún proceso de registración ni aprobación pre-comercialización por parte de la FDA ni la FTC. Las reivindicaciones acerca de la estructura/función del producto deben notificarse –como máximo– dentro de 30 días luego de comenzada la comercialización, y cuando se refieren a nuevos ingredientes dietarios deben realizarse 75 días antes de la comercialización del producto. Hasta ahora, la FDA no ha definido cuándo una cepa probiótica es considerada un nuevo

ingrediente dietario, pero el marco regulatorio está cambiando. Las tendencias industriales están cambiando, y como la AIP está continuamente trabajando para promover la auto-regulación y transparencia –introduciendo mejores prácticas para la industria, como un mejoramiento del etiquetado y calificación de microorganismos probióticos [32]– se está considerando en EE.UU. la introducción de un proceso de registro, no solo por parte de la industria sino también por parte de las agencias regulatorias [33].

VIII.C. EUROPA; SUPLEMENTOS ALIMENTARIOS

La Agencia de Seguridad Alimentaria Europea (ASAE, o EFSA por sus siglas en inglés) ha establecido una lista de microorganismos que poseen Presunción Calificada de Seguridad (PCS) [34, 35]. Este inventario contiene todas las especies consideradas seguras para el consumo humano. Las cepas incluidas en este inventario deben cumplir los criterios que allí se establecen, como la caracterización y determinación de resistencia antibióticos, entre otros, y –para algunas especies particulares– una calificación adicional es requerida (por ejemplo, determinación de la capacidad para producir toxinas). Los productos que contienen microorganismos incluidos en la lista PCS acceden rápidamente al mercado por intermedio de un proceso de notificación. No es necesario, en esos casos, una aprobación pre-comercialización, a menos que se quiera realizar alguna reivindicación o alegato de salud.

Toda reivindicación o alegato de salud requiere una evaluación por parte de la ASAE, seguida de una autorización/prohibición de uso por parte de la Comisión Europea, y la publicación de un veredicto sobre dicho producto. Hasta el momento, ninguna reivindicación ha sido aceptada para los probióticos. Incluso, el propio término “probiótico” ha sido prohibido; desde entonces, el mercado se ha visto afectado, y la confianza de los consumidores se ha visto amenazada. Durante los últimos años, la EFSA (por sus siglas en inglés) ha mostrado mayor apertura al diálogo, y una búsqueda de mayor transparencia. La IPA y su socio europeo (la IPA-EU) continuarán trabajando para poder demostrar y comunicar a los consumidores las reivindicaciones sobre salud y probióticos.

VIII.D. AUSTRALIA; MEDICINA COMPLEMENTARIA [36]:

La Administración de Bienes Terapéuticos (ABT) permite a los probióticos –como a cualquier otra medicina complementaria (MC), el acceso al mercado de una de dos maneras:

- a. El MC está incluido en una lista de bajo riesgo**
 - i. Una MC ya incluida en una lista de bajo riesgo. El productor de una MC incluida en esta lista puede optar por elegir las indicaciones de una lista estándar, o reivindicar sus propias indicaciones, tales como “mantenimiento del estado de

salud” o “refuerzo del estado de salud”, siempre y cuando exista evidencia que respalde la indicación, y que dicha información esté disponible si se la solicita. Ejemplos de indicaciones estándar son: “ayuda a la digestión”, “ayuda a mantener una función digestiva saludable”, “ayuda, asiste o colabora en el mantenimiento general de la salud”, “puede colaborar en el manejo del Síndrome de Colon Irritable”.

b. Una medicina complementaria registrada

- i. Las reivindicaciones de una MC registrada deben ser pre-aprobadas de manera similar a lo que ocurre en el ámbito farmacéutico, y –por lo general– no es la forma elegida para los probióticos en Australia.

Con respecto a los probióticos en los alimentos, solo una reivindicación ha sido aprobada para los cultivos relacionados al yogur, que es que lo probióticos “mejoran la digestión de la lactosa”.

IX. RESUMEN GENERAL

La Tabla 1 proporciona una perspectiva rápida sobre el modo en que las autoridades regulatorias mencionadas en este capítulo consideran a los probióticos, de acuerdo con el país y la región.

Tabla 1. Probióticos, de acuerdo con las autoridades regulatorias según el país y la región.

Autoridad	Registro	Notificación	Reivindicaciones
Canadá (PSN)	(Rápido) (Moderado)		General Específico
EE.UU. (supl. dietario)		— **	Cualquiera (no relacionada a enfermedades)
Europa (supl. alimentario)	— *		—
Australia (medicina comp.)			Genéricas (listadas como “bajo riesgo”)

**Excepto para la reivindicación de una aplicación en salud (ninguna ha sido aprobada hasta ahora para los probióticos)*

***Excepto para un nuevo ingrediente dietario (75 días pre-comercialización), o una reivindicación sobre estructura/función (30 días post-notificación).*

X. PERSPECTIVAS Y DESAFÍOS

Los ingredientes probióticos son una categoría única por numerosas razones. La AIP continua promoviendo proyectos para un uso adecuado de los probióticos, tales como el desarrollo de guías para el etiquetado y la manufactura que garanticen la calidad de los productos probióticos. Los Buenos Procedimientos de Manufactura (en inglés GMP) son la base para todos los productores probióticos, pero la combinación de probióticos y nuevos formatos de comercialización tienen toda una nueva gama de estándares de calidad y consideraciones sobre los que la AIP continuará trabajando y publicando.

Los marcos regulatorios son otra de las áreas las cuales la AIP busca armonizar. Estos marcos resultan un terreno complejo para las compañías que buscan sumarse al mercado de los probióticos. La visión de la AIP es que eventualmente se logren desarrollar marcos regulatorios para los probióticos que encajen en todas las regiones del globo. La AIP trabaja diligente y específicamente en cada país, tratando de entender los diferentes requerimientos, para luego proponer un diálogo con las autoridades gubernamentales de un modo global.

Finalmente, la AIP está observando cuál es el mejor sector para introducir a los probióticos globalmente. A través de sus iniciativas, el objetivo de la AIP es asegurar que los productos probióticos que sean introducidos en el mercado sean de alta calidad, proporcionen beneficios a los consumidores y estén respaldados por sólidas evidencias científicas. La seguridad del consumidor y la calidad de los productos probióticos son temáticas por las cuales la AIP trabaja a través de la elaboración de estándares de manufactura, a los que la industria y los miembros de la AIP deben adherir, y que –a su vez– pueden proporcionar guías para los organismos regulatorios.

XI. BIBLIOGRAFÍA CITADA

[1] Euromonitor International – A custom report for the International Probiotics Association, April 2018

[2] Grand View Research – Probiotic Market Estimates and Trend Analysis a commissioned report by the International Probiotics Association

[3] Tapping the growing probiotic supplements market – Supply Side West Workshop 2016 Ewa Hudson Euromonitor

[4] Health expenditure and financing. OECD (Organization for Economic Co-operation and Development)

- [5] Grand View Research – Probiotic Market Estimates and Trend Analysis a commissioned report by the International Probiotics Association
- [6] Global Probiotic Insights – Euromonitor International 2016 Matthew Oster; IPA World Congress Chicago
- [7] Mintel – Kombucha Insights October 2016
- [8] Euromonitor Consulting – Global overview IPA EU commissioned report Oct 2017
- [9] Grand View Research – Probiotic Market Estimates and Trend Analysis a commissioned report by the International Probiotics Association
- [10] Grand View Research – Probiotic Market Estimates and Trend Analysis a commissioned report by the International Probiotics Association
- [11] Kantar Media – the MARS Consumer Health Study; an annual survey of 19,500+ U.S. adults capturing key healthcare data
- [12] The National Marketing Institute - Understanding the E.U. Adult Probiotic; NMI's Global Supplement/OTC/Rx Database™(SORD)
- [13] <https://commonfund.nih.gov/hmp/overview>
- [14] <https://www.nextavenue.org/boomers-wealth-transfer/>
- [15] <https://www.hhnmag.com/articles/5298-Boomers-Will-Transform-Health-Care-as-They-Age>
- [16] https://academic.oup.com/cid/article/60/suppl_2/S85/379032
- [17] <http://gut.bmj.com/content/early/2015/09/02/gutjnl-2015-309990.long>
- [18] www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4517425/
- [19] www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4621279/
- [20] www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25047574
- [21] www.hmpdacc.org/
- [22] www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=probiotics
- [23] www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/natural-non-prescription.html

[24] www.canada.ca/en/health-canada/corporate/about-health-canada/branches-agencies/health-products-food-branch/natural-non-prescription-health-products-directorate.html

[25] <http://webprod.hc-sc.gc.ca/nhpid-bdipsn/atReq.do?atid=probio>

[26] <http://webprod.hc-sc.gc.ca/nhpid-bdipsn/search-rechercheReq.do>

[27] www.canada.ca/en/health-canada/services/drugs-health-products/natural-non-prescription/approach.html

[28] webprod5.hc-sc.gc.ca/lnhpd-bdpsnh/index-eng.jsp.

[29] ods.od.nih.gov/About/DSHEA_Wording.aspx

[30] www.fda.gov/Food/DietarySupplements/default.htm

[31] www.ftc.gov/about-ftc

[32] <http://internationalprobiotics.org/resources/guidelines/>

[33] <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dta.1892/epdf>

[34] <http://www.efsa.europa.eu/fr/efsajournal/pub/587>

[35] <http://www.efsa.europa.eu/fr/node/912926>

[36] <https://www.tga.gov.au/complementary-medicines>

ACORTANDO LA BRECHA EN LA REGLAMENTACIÓN SOBRE PROBIÓTICOS EN EL CONO SUR: ESCENARIO EN ARGENTINA

Susana Beatriz Fattori
prosaludables@gmail.com

María Eliana Coria
prosaludables@gmail.com

• Facultad de Medicina – Universidad de Buenos Aires.

Andrea Virginia Moser
prosaludables@gmail.com

RESUMEN

A pesar de que hay una definición de probióticos reconocida internacionalmente, actualmente no hay una armonización clara en la regulación sobre probióticos a nivel internacional. Algunos países han incluido en su legislación alimentaria normativa sobre probióticos, mientras que otros aún no cuentan con regulaciones específicas sobre ellos.

Actualmente, en el mercado se comercializan alimentos rotulados y publicitados empleando el término “probiótico” a los que se les adjudican beneficios para la salud. Esto podría conducir a una interpretación incorrecta y confusión del concepto de probióticos por parte de los consumidores. En Argentina, el marco regulatorio en materia de probióticos se encuadra en el artículo N° 1389 del Capítulo XVII del Código Alimentario Argentino (CAA) y contempla una definición de “probióticos” y una definición de “alimento con probióticos”, un protocolo de evaluación para que una cepa pueda ser utilizada como ingrediente probiótico en alimentos, y condiciones para el rotulado de alimentos con probióticos. Se llevó a cabo un relevamiento de la situación normativa referente a microorganismos probióticos en el Cono Sur y en otras partes del mundo. Se comprobó que Brasil, Colombia y Ecuador han adoptado una definición de probióticos que está alineada con la definición

propuesta por FAO/OMS y que algunos de los países relevados cuentan con requisitos específicos para calificar cepas como probióticas. Para asegurar la aplicación de criterios uniformes y objetividad, tanto por parte de las autoridades regulatorias como de la industria, se considera prioritario disponer de una normativa armonizada internacionalmente.

I. INTRODUCCIÓN

La variación de las legislaciones nacionales y la ausencia de un entendimiento común internacional sobre el significado del término “probiótico”, junto con la falta de requisitos fundamentales para demostrar esa condición, pueden conducir a interpretaciones erróneas sobre el concepto. Estas interpretaciones pueden ser erróneas tanto por parte de los elaboradores como de los consumidores. Asimismo, la falta de consenso sobre este término puede llevar a un uso incorrecto del mismo por parte de la industria, sin un respaldo científico que habilite a emplearlo en las publicidades; además, esta falta de entendimiento podría conducir a un inadecuado etiquetado de alimentos y a inevitables e innecesarios obstáculos al comercio.

II. NORMATIVA ALIMENTARIA EN ARGENTINA

En la Argentina, el marco regulatorio en materia de alimentos se encuadra en el **Código Alimentario Argentino** (CAA), Anexo I del Decreto Reglamentario Nº 2126/71 de la Ley 18.281, que establece las disposiciones higiénico-sanitarias, bromatológicas y de identificación comercial para los alimentos. Dicho código es la norma fundamental del **Sistema Nacional de Control de Alimentos**, se actualiza permanentemente y se incorpora toda la normativa vigente referente a la elaboración, transformación, transporte, distribución y comercialización de todos los alimentos para el consumo humano (815/99). El objetivo es mantener su adecuación a los adelantos en la materia, tomando como referencia las normas internacionales y los acuerdos celebrados en el Mercado Común del Sur (MERCOSUR).

Su actualización se lleva adelante a través de la **Comisión Nacional de Alimentos** (CONAL), organismo técnico que se encarga de las tareas de asesoramiento, apoyo y seguimiento del Sistema Nacional de Control de Alimentos, establecido por el Decreto Nº 815 de 1999 [1]. La CONAL está integrada por representantes del Ministerio de Salud de la Nación, Ministerio de Agroindustria de la Nación, Secretaría de Comercio y de las autoridades sanitarias de las diversas regiones que conforman el territorio nacional [2]. El Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación, a través del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) participa en carácter de consultor permanente [3] y convoca especialistas en temas particulares cuando lo considera necesario.

El órgano de consulta obligatoria de carácter no vinculante, para las decisiones que eleva la CONAL es el Consejo Asesor de la Comisión, y está conformado por representantes del sector empresario, de los consumidores y de los trabajadores de la industria alimentaria, según lo establece el Decreto Nº 815 de 1999. La Comisión se reúne en sesiones ordinarias anuales no inferiores a cuatro y sus decisiones se adoptan por consenso. Además, determina la necesidad de formación de grupos de trabajo *ad hoc* y nombra el miembro coordinador de estos.

El MERCOSUR es un foro de carácter regional, integrado inicialmente por Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay, que tiene por objeto mantener un diálogo documentado sobre cuestiones relacionadas con los alimentos. El 26 de marzo de 1991 los cuatro estados parte firmaron el Tratado de Asunción constituyendo el MERCOSUR, con el objeto de conformar una unión aduanera. El 17 de diciembre de 1994 se suscribió el Tratado de Ouro Preto, que creó su estructura institucional y le proporcionó personería jurídica de derecho internacional.

La normativa armonizada en ese ámbito se incorpora al CAA a través de la CONAL.

III. REGULACIÓN SOBRE PROBIÓTICOS EN PARTICULAR

Los probióticos –en la Argentina– pueden ser registrados como “probióticos” para uso como ingrediente en alimentos o como “alimentos con probióticos”, en el caso que se desee solicitar la autorización del alimento en lugar del ingrediente. Los “probióticos” se encuentran legislados en el CAA, en el artículo Nº 1389 del Capítulo XVII sobre alimentos de régimen o dietéticos. Dicho artículo los define como aquellos microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios para la salud del consumidor. Para que una cepa microbiana pueda ser utilizada como ingrediente probiótico para alimentos, debe cumplir con un protocolo de evaluación que incluye los siguientes requisitos mínimos:

- Identificación de la cepa o caracterización del microorganismo (género/especie/subespecie).
- Caracterización de la cepa que incluye demostrar, mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*, que el microorganismo resiste el pasaje a través de las principales barreras del organismo, arribando viable al intestino (resistencia gástrica, resistencia a bilis y resistencia a lisozima).
- Demostración, mediante ensayos *in vivo* e *in vitro* de los efectos probióticos adjudicados al microorganismo.
- Comprobación de la seguridad que demuestre que la cepa probiótica no es riesgosa para la salud, que no presenta o promueve la translocación bacteriana (pasaje de bacterias del intestino más allá de los nódulos mesentéricos) en las concentraciones en que se encuentra en el alimento, que no es portadora de genes de resistencia a antibióticos, del factor de virulencia responsable de actividad hemolítica y que no produce toxinas.

El artículo además establece una definición de “alimento con probióticos”, entendiéndose como aquél que contiene una carga de células viables comprendida entre

10⁶ y 10⁹ Unidades Formadoras de Colonia/gramo (UFC/g) durante su período de duración mínima, y para el cual se ha demostrado la funcionalidad que se le atribuye a la(s) cepa(s) probiótica(s) que contiene, mediante ensayos *in vivo* con el alimento tal cual se va a consumir. En el rotulado de esos productos debe constar la denominación de venta del alimento seguida de la frase “con probióticos”, y la identificación precisa de la o las cepas agregadas y la cantidad de células viables de cada una de ellas (en UFC/g).

IV. ANTECEDENTES QUE LLENARON EL VACÍO REGULATORIO EN ARGENTINA

A principios de los años 2000, la Argentina no contaba con una armonización clara con respecto al uso del término “probiótico”, a pesar de que el concepto era conocido desde hacía más de un siglo, y el término se venía utilizando en el mundo desde 1980.

Los consumidores encontraban en el mercado alimentos que se rotulaban y publicitaban empleando el término “probiótico”, y a los que se le adjudicaban beneficios para la salud de modo tal que se podía interpretar que dichos beneficios se debían a la presencia de microorganismos probióticos; esto conducía a una mala interpretación y confusión del concepto. El número y tipo de alimentos y bebidas con agregado de probióticos disponibles en el comercio aumentaba considerablemente con el paso del tiempo [4].

La industria alimentaria planteaba situaciones en las cuales se generaban problemas en el comercio, tanto nacional como internacionalmente, debido a la ausencia de una norma. Como consecuencia, surgió la necesidad de establecer una definición y requisitos para la evaluación de un microorganismo probiótico. En el año 2005 la CONAL estimó necesaria la conformación de un grupo de trabajo con el objeto de proponer una definición y parámetros para los probióticos y determinó que el INAL estaría a cargo de la coordinación de dicho grupo [5]. El Grupo de Trabajo, dando cumplimiento a ese mandato, propuso una definición y un protocolo de evaluación de un probiótico como ingrediente para alimentos y un listado de microorganismos probióticos reconocidos; así, en agosto de 2009, presentó ante la CONAL el informe final del Grupo [6]. Para la redacción del proyecto, el Grupo tomó como referencia documentación de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y bibliografía internacionalmente reconocida [7]. El Grupo estuvo conformado por representantes de organismos oficiales, de universidades nacionales y de la industria [8].

Por otra parte, la Argentina tampoco contaba con reglas claras para comunicar o publicitar los potenciales beneficios para la salud de los alimentos o sus componentes y era necesario evitar que -por medio de la publicidad- los consumidores decidieran elegir determinados alimentos en función de los atributos publicitados, inducidos a ello equivocadamente. Por este motivo, en el año 2009 se comenzó a

trabajar en una norma para la autorización de uso de las declaraciones de propiedades saludables en la publicidad de los alimentos en el marco del **Observatorio de la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica** (ANMAT). El Observatorio está constituido por un Comité Asesor Científico Académico y por diferentes Foros de Diagnóstico Participativo, y es una herramienta institucional que se propone generar información confiable y oportuna relacionada con los distintos productos y procesos que son competencia de la ANMAT. Sus foros reúnen a representantes de instituciones de salud, organismos oficiales y privados, sociedades científicas y organizaciones no gubernamentales con el objetivo de analizar distintos aspectos o problemáticas relevantes y evaluar líneas de acción que permitan mejorar o modificar las distintas situaciones planteadas [9, 10].

Para llevar adelante el trabajo se conformó un Foro de Diagnóstico Participativo denominado “Criterios para la Definición de Declaraciones de Propiedades Saludables en los Alimentos”. Dicho foro se creó con el propósito de definir los criterios técnico-científicos para la evaluación de las declaraciones de propiedades saludables realizadas en alimentos, y contó con la participación de representantes del CONICET, del Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA), de la Sociedad Argentina de Nutrición (SAN), de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (FFyB) de la Universidad de Buenos Aires (UBA) y de la ANMAT. Para la redacción de la guía se tomaron como referencia las “Directrices Para el Uso de Declaraciones Nutricionales y Saludables” del Codex Alimentarius (CAC/GL 23-1997) [11], bibliografía internacionalmente reconocida y antecedentes normativos de los países que a la fecha habían implementado las declaraciones nutricionales y saludables en los alimentos.

V. LOGROS DEL TRABAJO EN ARGENTINA

Como resultado de varios años de trabajo la CONAL, en abril de 2011 recomendó la redacción de la regulación sobre probióticos y ordenó que se incorporara como artículo N° 1389 al CAA. En el Boletín Oficial (B.O.) N° 32.304 del 27 de diciembre de 2011, se publicó la Resolución Conjunta N° 261/2011 y 22/2011 [12] y la nueva normativa entró en vigencia a partir del día siguiente al de su publicación. Dicho artículo, además de las definiciones y el protocolo de evaluación, establece que los alimentos elaborados con probióticos serán autorizados por una Comisión Evaluadora integrada por profesionales especializados pertenecientes a la Autoridad Sanitaria o a los que esta designe a ese efecto para cada caso particular. En cumplimiento con lo establecido en el artículo N° 1389, la Disposición ANMAT N° 2873/2012 crea la **Comisión Evaluadora de Probióticos y Prebióticos**, coordinada por un representante del INAL y conformada por profesionales especializados pertenecientes a la Autoridad Sanitaria Nacional, expertos del CONICET, de Universidades Nacionales y otros organismos y/o instituciones que se convoquen especialmente [13]. Dicha Comisión es la encargada de la evaluación de los

ensayos presentados por los interesados, que requieran que sus productos sean registrados como microorganismo probiótico o como alimento con probióticos, de acuerdo con la legislación vigente. Esta Comisión –al ser consultada– emite una recomendación a la Autoridad Competente, con opinión fundada, luego de una evaluación de la documentación presentada. En aquellos casos en los cuales la Comisión se haya expedido favorablemente y haya recomendado la autorización de la denominación “alimento con probióticos”, y el mismo elaborador realiza una modificación en dicho alimento y pretende extrapolar al alimento modificado los resultados de los estudios ya evaluados por la Comisión, esta determina si es necesario la repetición de los ensayos *in vivo* con el alimento modificado para demostrar que un cambio de composición no altera el o los efectos probióticos que se intentan demostrar. La Comisión –además– está habilitada a evaluar casos en los cuales se solicite el registro de ingredientes como “prebióticos” para uso como ingrediente en alimentos o de “alimentos con prebióticos”, teniendo en consideración la legislación vigente en la materia, la que se encuentra incorporada en el artículo N° 1390 del CAA.

Como resultado del trabajo conjunto en el foro del Observatorio ANMAT, se elaboró una **“Guía para la Presentación y Evaluación Científica de Declaraciones de Propiedades Saludables en la Publicidad de los Alimentos”**. Dicha guía se incorporó al ordenamiento jurídico nacional mediante la Disposición ANMAT N° 7730/2011 [14] que fue publicada en el B.O. N° 32.280 del 18 de noviembre de 2011. La citada disposición crea la “Comisión Evaluadora para la Autorización de Declaraciones de Propiedades Saludables en Alimentos”, conformada por profesionales especializados pertenecientes a la Autoridad Sanitaria Nacional (Instituto Nacional de Alimentos), expertos pertenecientes al CONICET, a la SAN y a la FFYB de la Universidad de Buenos Aires y coordinada por un representante del INAL.

Es la encargada de evaluar y emitir informe fundado, aconsejando a la ANMAT acerca de la documentación presentada por los interesados que requieran la autorización de empleo de declaraciones de propiedades saludables en los mensajes que publiciten sus productos, en función de los requisitos establecidos en la Guía correspondiente [15].

VI. ESCENARIO ACTUAL DE LA REGULACIÓN SOBRE PROBIÓTICOS

A pesar de que hay una definición de probióticos reconocida internacionalmente [16, 17], actualmente no hay una armonización clara con respecto al uso del término “probiótico” en el ámbito internacional. Las regulaciones sobre probióticos están en discusión en muchos países, mientras que algunos han incluido en su legislación alimentaria normativa sobre probióticos.

En el ámbito del Codex Alimentarius, en la 39.^a reunión del Comité del Codex sobre nutrición y alimentos para regímenes especiales llevada a cabo en Alemania

en diciembre de 2017, se planteó comenzar a trabajar sobre directrices armonizadas sobre el uso de probióticos en alimentos y complementos alimenticios a fin de garantizar y mantener la calidad de los productos probióticos a escala mundial. En dicha oportunidad, Argentina manifestó su respaldo a la propuesta y su disposición a liderar el trabajo (REP18/NFSDU) [18]. El establecimiento de un criterio uniforme y un marco organizado para la comercialización de productos con probióticos proporcionará una valiosa guía para las agencias regulatorias, beneficios para los consumidores y la industria.

VII. SITUACIÓN REGIONAL

La legislación sobre probióticos en el Cono Sur y el Caribe se describe a continuación:

VII.A. MERCADO COMÚN DEL SUR (MERCOSUR)

En el ámbito del MERCOSUR no se ha armonizado todavía un reglamento sobre probióticos, ni sobre declaraciones de propiedades saludables en el etiquetado de los alimentos envasados.

VII.B. BRASIL

En Brasil, los productos encuadrados en las categorías de nuevos alimentos o nuevos ingredientes, de alimentos con alegaciones de propiedad funcional o de salud y de sustancias bioactivas aisladas o probióticos, requieren una evaluación de seguridad previa de la Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) [18]. La categoría de sustancias bioactivas y probióticos aislados que posean alegaciones de propiedades funcionales y/o de salud se encontraban regulados en la Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 2 de 06/01/2002, derogada por Resolução da Diretoria Colegiada - RDC Nº 243 de 26/07/2018 sobre los requisitos sanitarios de los suplementos dietarios [19]. Esta norma establece la definición de probióticos y la obligatoriedad de la comprobación de la seguridad de uso antes de la comercialización, además de otros requisitos tales como rotulado y comprobación de un efecto fisiológico o metabólico específico, que se comunicará mediante una alegación de propiedad funcional o de salud. La norma define probiótico como “microorganismo vivo que, cuando es administrado en cantidades adecuadas, confiere un beneficio para la salud del individuo”. En el rotulado de esos productos debe constar la cantidad de microorganismos viables para lograr el efecto alegado dentro del plazo de vida útil del producto.

En julio de 2018 se publicó la Resolução da Diretoria Colegiada RDC Nº 241 [20] que establece requisitos para la comprobación de la seguridad y los beneficios para la salud de los probióticos destinados al uso en alimentos y en suplementos dietarios.

Estos requisitos son:

- Identificación del microorganismo (género, especie y cepa).
- Demostración de la seguridad del microorganismo mediante estudios científicos que demuestren la ausencia de colonización permanente en el tracto digestivo humano; ausencia de patogenidad, de producción de sustancias o metabolitos que representen riesgos para la salud, de translocación y genes de resistencia a antibióticos; susceptibilidad, al menos, a dos antibióticos.
- Adicionalmente, cuando los probióticos no son aislados de alimentos o de microflora indígena humana o no poseen seguridad establecida a nivel de género o especie, presentación de estudios de genotoxicidad o mutagenidad; toxicidad aguda; toxicidad subcrónica; toxicidad crónica; toxicidad reproductiva y en el desarrollo.
- Para una alegación de propiedad funcional general o específica, demostración de la supervivencia de las cepas en las condiciones del tracto digestivo humano y las propiedades y mecanismos de acción del microorganismo.
- En el caso de una alegación de propiedad funcional relativa a la salud gastrointestinal, comprobación mediante estudios científicos randomizados, doble-ciego y placebo-controlados realizados con la cepa, con la población de destino o con una población cuyos beneficios sean extrapolables a la población de destino.
- Si la alegación de propiedad funcional es específica, presentación de estudios clínicos de calidad, randomizados, doble-ciego y placebo-controlados realizados con la población de destino y con la cepa o mezcla de microorganismos según el caso.

Dicha resolución establece –además– que para aquellos probióticos que vayan a ser destinados a alimentos para mujeres embarazadas o niños menores de tres años deben presentarse estudios clínicos randomizados, doble-ciego y placebo-controlados que avalen los efectos adversos y los parámetros de crecimiento y de desarrollo.

La nueva normativa se aplica conjuntamente con la Resolução - RES nº 17 de 30/04/1999 [21], que establece las directrices básicas para la evaluación de riesgo y seguridad de los alimentos, y con la Resolução - RES nº 18 de 30/04/1999, aplicable para evaluar y comprobar las propiedades funcionales o de salud alegadas en el rotulado de alimentos [22]. Además, actualmente está trabajando en la elaboración de una Guía para Instrução Processual de Petição de Avaliação de Probióticos para Uso

em Alimentos destinada a orientar a los interesados sobre el procedimiento para la solicitud de evaluación de probióticos para uso en alimentos, abordando aspectos relacionados con la identidad, seguridad y eficacia que no abarca los microorganismos no viables aunque hubiese evidencia de su beneficio para la salud ni se aplica a la evaluación de microorganismos genéticamente modificados. Se aplica en conjunto con los reglamentos técnicos específicos [23].

VII.C. CHILE

Este país no cuenta con una normativa específica para microorganismos probióticos. La Norma Técnica N° 191 sobre “Directrices Nutricionales para Declarar Propiedades Saludables de los Alimentos”, publicada en julio de 2017, enmarca a los bacilos vivos dentro de la regulación de las declaraciones de propiedades saludables en alimentos, y relaciona los *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp., y otros bacilos específicos con ciertos beneficios para la salud, alguno de los cuales se refieren al tracto gastrointestinal [24].

Para autorizar el empleo de las alegaciones en el rotulado y/o publicidad de los alimentos con adición de cepas de bacilos vivos deben contener el 100% de la cantidad de bacilos vivos declarados al final de la vida útil del alimento, la que debe ser al menos 10^7 UFC por gramo de producto terminado al final de su vida útil. Los lactobacilos deben ser resistentes a la acidez gástrica y a otras secreciones del aparato digestivo.

VII.D. COLOMBIA

Colombia incluye una definición de probióticos en su reglamento técnico sobre los requisitos de rotulado o etiquetado nutricional que deben cumplir los alimentos envasados para consumo humano en la RESOLUCIÓN NÚMERO 333 DE 2011 [25]. Entiende por probióticos a los cultivos vivos de microorganismos, generalmente bacterias, que sobreviven al tránsito a través de las partes superiores del intestino, y particularmente al ambiente ácido del estómago, adhiriéndose y colonizando el intestino y modificando favorablemente el balance microbiano.

En la misma resolución se incluyen condiciones para las declaraciones de propiedades de salud que relacionan el consumo de probióticos con una mejor función digestiva:

- El microorganismo o bacteria debe estar vivo.
- No ser patógeno y su medio natural ser el tracto digestivo humano.
- Ser capaz de sobrevivir en el tracto intestinal, es decir, ser resistente a los jugos gástricos y los ácidos biliares.

- Tener la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal.
- Tener la capacidad de colonizar el intestino.
- Tener la capacidad de sobrevivir a lo largo de la vida útil del producto al cual se adiciona.
- El alimento debe contener un número mayor o igual de bacterias viables de origen probiótico de 10^6 UFC/g en el producto terminado hasta el final de la vida útil.

VII.E. ECUADOR

En su Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 2395:2011, sobre requisitos para las leches fermentadas, define “leche fermentada adicionada con microorganismos probióticos” como la leche fermentada a la cual se le han adicionado bacterias vivas benéficas, que al ser ingeridas favorecen la microflora intestinal, y “probiótico” como microorganismo vivo que, suministrado en la dieta e ingerido en cantidad suficiente, ejerce un efecto benéfico sobre la salud, más allá de los efectos nutricionales. El contenido mínimo de bacterias probióticas debe ser de 10^6 UFC/g [26].

En su Norma Técnica Ecuatoriana NTE INEN 1334-3: 2011 [27] se establecen requisitos para las declaraciones de propiedades de salud que relacionan el consumo de probióticos con una mejor función digestiva en el rotulado de alimentos. El microorganismo o bacteria debe cumplir lo siguiente:

- Estar vivo, no ser patógeno y su medio natural es el tracto digestivo humano.
- Ser capaz de sobrevivir en el tracto intestinal, es decir, ser resistente a los jugos gástricos y los ácidos biliares.
- Tener la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal.
- Tener la capacidad de colonizar el intestino.
- Tener la capacidad de sobrevivir a lo largo de la vida útil del producto al cual se adiciona.

El alimento debe contener un número mayor o igual de bacterias viables de origen probiótico a 10^6 UFC/g en el producto terminado hasta el final de la vida útil.

VII.F. SECRETARÍA DE INTEGRACIÓN ECONÓMICA CENTROAMERICANA (SIECA)

La SIECA es el órgano técnico y administrativo del Proceso de Integración Económica Centroamericana, con personalidad jurídica de derecho internacional. Está integrado por Costa Rica, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Guatemala y Panamá. Vela por la correcta aplicación del Protocolo al Tratado General de Integración Económica Centroamericana (Protocolo de Guatemala) y demás instrumentos jurídicos de la integración económica regional, así como por la ejecución de las decisiones de los órganos del Subsistema Económico [28].

En su Reglamento Técnico Centroamericano (RTCA 67.01.60:10) sobre Etiquetado Nutricional de Productos Alimenticios Preenvasados para Consumo Humano para la Población a Partir de 3 Años de Edad [29], se incluyen las declaraciones de propiedades saludables en las etiquetas de los alimentos preenvasados. En el Anexo G se encuentran los requisitos que deben cumplir los microorganismos o bacterias probióticos que se relacionen con algún beneficio en la salud:

- Estar vivo, no ser patógeno y su medio natural es el tracto digestivo humano.
- Ser capaz de sobrevivir en el tracto intestinal, es decir, ser resistente a los jugos gástricos y los ácidos biliares.
- Tener la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal.
- Tener la capacidad de colonizar el intestino.
- Tener la capacidad de sobrevivir a lo largo de la vida útil del producto en que se reproduzca.

El alimento debe contener un número mayor o igual a 10^6 UFC/g de bacterias viables de origen probiótico en el producto terminado hasta el final de la vida útil.

Los alimentos que contienen probióticos deben declarar los siguientes aspectos en su etiqueta:

- Nombre del género, especie y cepa de acuerdo con la nomenclatura internacional reconocida.
- Consumo recomendado para que el probiótico sea efectivo en relación con la mejora de salud declarada.
- Efectos beneficiosos que puedan proporcionar a la salud relacionados con la función digestiva e intestinal.

VIII. SITUACIÓN INTERNACIONAL

La normativa sobre probióticos en otros países es la que se detalla a continuación.

VIII.A. CANADÁ

Canadá cuenta con una guía titulada *Guidance Document – The Use of Probiotic Microorganisms in Food*, que tiene por finalidad clarificar el uso aceptable de declaraciones de propiedades saludables relativas a microorganismos “probióticos” en el rotulado y la publicidad de los alimentos. Debe usarse conjuntamente con otras regulaciones generales aplicables a alimentos.

En el documento citado anteriormente contempla el término “probióticos” y otros términos o representaciones similares en el texto o en los gráficos de las etiquetas de los alimentos y en la publicidad, que sugieren que un alimento confiere un beneficio para la salud como ejemplos de declaraciones de propiedades saludables. Recomendando que su uso siempre esté acompañado de un sustento específico y validado de los beneficios o efectos de los microorganismos probióticos contenidos en el alimento [30].

Una revisión sistemática de la evidencia científica más relevante debe ser empleada para respaldar una alegación o de efectos implícitos de cada una de las cepas a las que se les adjudican beneficios, en los valores de ingesta declarados. Algunas alegaciones de función, como las referidas al tránsito intestinal, no se consideran científicamente respaldadas cuando la evidencia se basa solamente en efectos en poblaciones enfermas (tratamiento de diarrea).

Cuenta además, con directrices para preparar la solicitud de uso de alegaciones de salud que proporcionan una guía para la identificación y evaluación de la evidencia disponible y la validación de las alegaciones [31].

VIII.B. ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

Estados Unidos no posee una definición regulada sobre probióticos. La Administración de Drogas y Alimentos (FDA) ha reconocido el estatus de sustancias que son “Generalmente reconocidas como seguras” (en inglés, GRAS) para algunas cepas de microorganismos bajo las condiciones de uso evaluadas [32].

En el año 2012 un grupo de trabajo realizó un análisis del marco regulatorio existente sobre probióticos y discutió posibles definiciones más allá de la recomendada por FAO/OMS con el objeto de aclarar el término “beneficio para la salud” y reflejar nuevos usos potenciales más allá del uso actual de los probióticos en alimentos o suplementos dietarios. En esa propuesta, un probiótico se definiría como microorganismos vivos, incluyendo esporas, que administrados directamente al huésped, ya sea por vía oral o tópica en cantidades adecuadas, confieren un beneficio medible/cuantificable y otorgan un beneficio para el bienestar físico, mental y/o social del huésped (humano o animal) [33].

VIII.C. EUROPA

Europa no cuenta con un estatus regulatorio ni directrices que definan la categoría de probióticos. Posee regulación referente a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos, la que está establecida en el Reglamento de la Comisión Europea N° 1924/2006 que entró en vigor en julio de 2007 [34]. Las declaraciones con relación a propiedades saludables deben estar respaldadas por estudios científicos. El organismo que decide si tales afirmaciones están sustentadas por datos fidedignos es la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (en inglés, EFSA); su opinión sirve como base para que la Comisión Europea y los Estados Miembro decidan si autorizan las alegaciones.

Uno de los Estados Miembro de la Unión Europea (UE), Italia, ha desarrollado ciertos requisitos para calificar cepas específicas como probióticas. Italia cuenta con directrices para el uso de bacterias y/o levaduras probióticas que se han empleado tradicionalmente, en alimentos y suplementos dietarios, para el balance de la flora intestinal que incluyen:

- Identificación de la especie y de la cepa.
- Contenido de microorganismos; la cantidad de células vivas, por día y por porción recomendada de producto, debe ser al menos 10^9 células vivas, salvo en el caso de que se demuestre mediante estudios científicos que empleando otras cantidades se alcanza el efecto esperado.
- Evaluación de la seguridad de cada cepa, cuando la cepa pertenezca a una especie ampliamente caracterizada en términos de seguridad de uso, tal como se define en los documentos de EFSA para el estado “Presunción Cualificada de Seguridad” (en inglés, QPS) de algunos grupos bacterianos. El perfil de resistencia a antibióticos se exige en todos los casos.

Solo los productos que cumplen con sus directrices pueden indicar el efecto: “capaz de mantener el equilibrio de la flora intestinal” y/o el término “probiótico” en el rótulo de los alimentos [35].

VIII.D. AUSTRALIA Y NUEVA ZELANDA

El instrumento legislativo en Australia y Nueva Zelanda es el *Australia New Zealand Food Standards Code*. Estos países no poseen ni una definición ni regulaciones específicas para “probióticos”, estos están contemplados dentro de la categoría de *novel food*, alimentos que requieren una autorización basada en la historia de su uso y de su seguridad [36]. Aquellos microorganismos que se incluyan en esta categoría deben estar respaldados por la siguiente información sobre:

- Su potencial patogenicidad.
- Los efectos del microorganismo sobre la microflora del intestino.
- El uso de ese microorganismo en alimentos o como un alimento en otros países.
- Estudios de tolerancia.

VIII.E. JAPÓN

En 1991, el Ministerio de Salud, Trabajo y Bienestar Social de Japón estableció un sistema regulatorio que denominó “Alimentos para Uso Específico de Salud” (en inglés, FOSHU) [37]. FOSHU hace referencia a alimentos que contienen ingredientes con funciones para la salud y que se encuentran aprobados oficialmente para alegar efectos fisiológicos en el cuerpo humano. Para estar en condiciones de comercializar esos alimentos se requiere una evaluación de su seguridad y de la efectividad de las funciones sobre la salud.

Dentro de los alimentos aprobados, que modifican las condiciones gastrointestinales, se encuentran las bifidobacterias y las bacterias lácticas. Para la aprobación de un alimento como FOSHU se debe:

Probar

- Efectividad sobre el cuerpo humano.
- Ausencia de cualquier problema de seguridad (ensayos de toxicidad en animales, efectos en caso de exceso, etc.).
- Empleo de ingredientes nutricionalmente apropiados (moderado uso de sal, etc.).

Garantizar

- La compatibilidad con las especificaciones del producto durante el tiempo de consumo.

Establecer

- Métodos de control de calidad tales como especificaciones de productos e ingredientes, procesos y métodos de análisis.

Actualmente Japón cuenta con probióticos aprobados para los que se requirió pruebas científicas.

IX. CONCLUSIONES

Argentina posee regulación específica para los probióticos, la que es independiente de su normativa sobre declaraciones de propiedades saludables en la publicidad de los alimentos, mientras que en la gran mayoría de los países los probióticos se regulan en el ámbito de las alegaciones de salud. Argentina y Brasil cuentan con un protocolo para la evaluación de un probiótico como ingrediente de alimentos, herramienta para comprobar que el uso de dicho término posee un sustento científico que lo avala.

Entre los países relevados en este capítulo está ampliamente aceptado que el concepto de probiótico hace referencia a microorganismos vivos y en todos los casos se los relaciona principalmente con efectos sobre la salud intestinal.

Brasil, Colombia y Ecuador han adoptado una definición de probióticos que está alineada con la definición propuesta por FAO/OMS.

El contenido mínimo de bacterias probióticas en el alimento está establecido en muy pocos países y en general es de 106 UFC/g en el producto terminado hasta el final de su vida útil. Italia se diferencia del resto ya que establece una cantidad mínima de 109 UFC/g expresada por día y por porción recomendada de producto.

La obligatoriedad de la comprobación de la seguridad de uso de la cepa en cuestión es un requisito común. La legislación de Brasil e Italia hacen hincapié específicamente en la demostración de la ausencia de genes de resistencia a antibióticos.

Los países del Cono Sur y el Caribe incluyen entre los requisitos mínimos que deben cumplir los probióticos, la resistencia a la acidez gástrica y otras secreciones del tracto digestivo.

La funcionalidad que se le adjudique a un microorganismo siempre debe ir acompañada de un sustento específico y validado de los beneficios o efectos de los microorganismos probióticos contenidos en el alimento o de pruebas científicas.

Los países no abordan un tratamiento relacionado con la producción de probióticos dentro de un sistema cerrado y controlado que garantice su calidad y pureza y conduzca a aspectos de control y aseguramiento de la calidad [39]. Japón contempla métodos de control de calidad para los alimentos FOSHU.

Finalmente se remarca que una normativa armonizada a nivel internacional es una herramienta valiosa para garantizar la aplicación de criterios uniformes en la instancia de evaluación de un microorganismo potencialmente probiótico.

X. BIBLIOGRAFÍA CITADA

[1] <http://www.conal.gob.ar/estatuto.php>

[2] servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/55000-59999/59060/norma.htm

[3] www.conal.gob.ar/estatuto.php

- [4] servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/190000-194999/192067/norma.htm
- [5] www.conal.gob.ar/actas/Acta_67.pdf
- [6] www.conal.gob.ar/actas/Acta_83.pdf
- [7] servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/190000-194999/192067/norma.htm
- [8] www.ancefn.org.ar/acciones/alimentos/Expositores/Fattori.pdf, consultado en junio de 2018.
- [9] www.anmat.gov.ar/Observatorio_ANMAT/Actividades_Observatorio.asp
- [10] servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/190000-194999/190064/norma.htm
- [11] www.fao.org/ag/humannutrition/33313-033ebb12db9b719ac1c14f821f5ac8e36.pdf
- [12] servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/190000-194999/192067/norma.htm
- [13] servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/195000-199999/197951/norma.htm
- [14] servicios.infoleg.gob.ar/infolegInternet/anexos/190000-194999/190064/norma.htm
- [15] www.anmat.gov.ar/boletin_anmat/noviembre_2011/Dispo_7730-11.pdf
- [16] Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada. 30 April – 1 May 2002
- [17] 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 and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid bacteria. Cordoba, Argentina, 1 - 4 October 2001.
- [18] www.fao.org/fao-who-codexalimentarius/meetings/archives/es/
- [19] Brasil. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 243 de 26/07/2018.
- [20] portal.anvisa.gov.br/consultas-publicas#/visualizar/364658. Consultada el 25 de junio de 2018.
- [21] portal.anvisa.gov.br/legislacao/?inheritRedirect=true#/visualizar/26333
- [22] portal.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/26339
- [23] portal.anvisa.gov.br/documents/3845226/0/Guia+Probioticos_Portal.pdf/e1bbf33e-719e-4f3e-84a0-7846bbe17972

- [24] www.ilsisurandino.cl/wp-content/uploads/2017/09/Resol-860-exenta.pdf
- [25] www.invima.gov.co/resoluciones-en-alimentos/res-333-de-feb-2011-rotulado-nutricional-pdf/detail.html
- [26] ia801904.us.archive.org/27/items/ec.nte.2395.2011/ec.nte.2395.2011.pdf
- [27] www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2014/07/ec.nte_1334.3.2011.pdf
- [28] www.sieca.int/index.php/acerca-de-la-sieca/informacion-general/que-es-la-sieca/
- [29] www.sieca.int/index.php/integracion-economica/instrumentos-juridicos/actos-administrativos/consejo-de-ministros-de-integracion-economica/resoluciones/
- [30] Guidance Document – The Use of Probiotic Microorganisms in Food. Food Directorate. Health Products and Food Branch. Health Canada. April 2009. <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/legislation-guidelines/guidance-documents/guidance-document-use-probiotic-microorganisms-food-2009.html>
- [31] The Guidance Document for Preparing a Submission for Food Health Claims. http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/guide-ld/health-claims_guidanceorientation_allégations-santé-eng.php
- [32] www.accessdata.fda.gov/scripts/fdcc/?set=GRASNotices&sort=GRN_No&order=DESC&startrow=1&type=basic&search=
- [33] www.law.umaryland.edu/programs/health/events/probiotics/documents/FinalWhitePaper.pdf
- [34] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX:32006R1924>
- [35] Commissione Unica per la Dietetica e la Nutrizione - Revision May 2013 - Guidelines on probiotics and prebiotics. http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_1016_ulterioriallegati_ulterioreallegato_0_alleg.pdf
- [36] Australia New Zealand Food Standards Code – Standard 1.5.1 – Novel foods. <https://www.legislation.gov.au/Details/F2017C00324>
- [37] www.mhlw.go.jp/english/topics/foodsafety/fhc/02.html
- [38] IPA. Proposal for New Work on Harmonized Probiotic Guidelines for use in foods and dietary supplements.

PARTICIPANTES DEL WORKSHOP

Este libro es el resultado del Taller organizado por el Instituto Danone Cono Sur, que reunió a más de 15 investigadores referentes de la región y del mundo, para abordar la temática de los probióticos desde una perspectiva múltiple.

Esteban Carmuega
Gabriela Catalani
Elena Coria
Bart Deggest
Juan De Paula
Guillermo Docena
Susana Fattori
Diego Giunta
Alejandra Larre
Claudio Magno
Rocio Martin
Andrea Moser
George Paraskevacos
Gabriela Perdigon
Adriana Pérez Chaia
Mary Ellen Sanders
Seppo Salminen
Julio Villena
Gabriel Vinderola
Ricardo Weill