



**FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**

**ROL DE LOS PROBIÓTICOS EN LA DISBIOSIS INTESTINAL Y EN LA
ENFERMEDAD DE CROHN**

UNA REVISIÓN

**PROYECTO DE MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN
TECNOLOGÍA MÉDICA**

**AUTORES: JANETT FIGUEROA ESPINOZA Y SUSANA VÁSQUEZ CERDA
PROFESORA GUÍA: T.M. DRA. VERÓNICA CARRASCO SÁNCHEZ**

TALCA, CHILE

2022

CONSTANCIA

La Dirección del Sistema de Bibliotecas a través de su unidad de procesos técnicos certifica que el autor del siguiente trabajo de titulación ha firmado su autorización para la reproducción en forma total o parcial e ilimitada del mismo.



Talca, 2023

DEDICATORIA

A la memoria de mi papá Daniel, quien habría querido estar conmigo viviendo mis logros; a mi mamá Janet, por su apoyo incondicional; a mi familia, que estuvieron apoyándome en cada momento; a mis libros, la saga de Harry Potter y la serie The Bing Bang Theory quienes me ayudaron a sobrellevar el estrés; y a la persona que me sacó a flote cuando lo necesité, yo.

Janett Figueroa

A mis padres adoptivos, Pablo y Daisy, quienes me acompañaron en cada paso de este proceso y me inspiraron por su constante apoyo y motivación a seguir adelante a pesar de los obstáculos. A mi hermanito, Juan Pablo quien me acompañó a lo largo de esta etapa en innumerables noches y días de trabajo, y que con su compañía hizo que todo fuera mejor. A mi pareja Iver, quien siempre ha creído en mí y me ha motivado a creer y valorar mis capacidades.

Susana Vásquez

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios que me ha dado fortaleza.

A mi profesora de memoria Verónica Carrasco quien nos guío a mí y a Susana para lograr este proyecto, además de aportar a nuestro aprendizaje.

A mi compañera de memoria y amiga Susana Vásquez, por su apoyo, cariño y todas las ganas que le puso a este proyecto.

A mi familia por sus palabras de aliento, mis amigos por su contención y a mi amiga Javiera Torres por todas las veces que nos juntamos a comer y avanzar en esto.

A los profesores y los auxiliares Víctor, Jimena y Luis de bioquímica y microbiología, junto con Jeannette de computación por su cercanía y compañía todos estos años

Y a todas las personas que de una u otra forma aportaron al desarrollo de esta memoria.

Janett Figueroa

Agradezco a mis padres, por apoyarme en este proyecto.

A mi profesora guía, Verónica Carrasco por su compromiso y dedicación para que este trabajo resultara como queríamos, entregando sus conocimientos y recomendaciones fomentando nuestro continuo aprendizaje.

A mi compañera y amiga Janett, por entregar lo mejor de sí para lograr esta memoria.

A todos quienes indirectamente permitieron realizar este trabajo.

Susana Vásquez

I. ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. RESUMEN.....	1
2. INTRODUCCIÓN.....	2
3. OBJETIVOS	4
4. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA.....	5
5. MARCO TEÓRICO	6
5.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PROBIÓTICOS..	6
5.2 PROBIÓTICOS EN LA DISBIOSIS INTESTINAL	8
5.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS EN LA DISBIOSIS INTESTINAL	11
5.3.1 Adhesión celular y producción de mucina.....	11
5.3.2 Exclusión competitiva de probióticos a través de la generación de metabolitos bioactivos	13
5.3.3 Actividad enzimática	18
5.3.4 Modulación del sistema inmunológico	21
5.3.4.1 Modulación de la Inmunoglobulina A secretora (SIgA) y la producción de citoquinas.....	23
5.4 PROBIÓTICOS EN LA ENFERMEDAD DE CROHN.....	27
5.4.1 Enfermedad de Crohn	27
5.4.2 Estudios <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de probióticos sobre la enfermedad de Crohn.....	29
5.4.3 Estudios clínicos sobre el uso de probióticos en la enfermedad de Crohn.....	34
6. CONCLUSIÓN.....	43
7. BIBLIOGRAFÍA.....	44

II. ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Criterios de selección de una cepa probiótica	7
Figura 1. Papel de los probióticos relevantes para las enfermedades intestinales a través de la recuperación de la disbiosis en la microbiota intestinal.....	10
Figura 2. Acción de probióticos sobre la microbiota	18
Figura 3. Principales efectos de los probióticos en el sistema inmune.....	24
Figura 4. Mecanismo de acción de probióticos.....	26
Tabla 2. Acción de cepas probióticas sobre pacientes con enfermedad de Crohn.....	40

1. RESUMEN

En las últimas décadas, las patologías asociadas al aparato gastrointestinal han aumentado exponencialmente afectando a gran parte de la población. Debido a esto, han surgido diversos fármacos y tratamientos buscando mejorar esta situación, dentro de los cuales se encuentran los probióticos.

Se ha evidenciado que su consumo se caracteriza por fortalecer el sistema gastrointestinal, brindando protección y reduciendo el riesgo de que el hospedero se infecte con los patógenos que allí habitan. Los ensayos clínicos y los experimentos *in vivo* e *in vitro*, han contribuido a comprender las importantes funciones que desempeñan los probióticos en las enfermedades asociadas con el microbioma intestinal humano.

Las alteraciones en la microbiota intestinal observadas en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y, en particular, en la enfermedad de Crohn, justifican la administración de agentes probióticos en el tratamiento médico de esas afecciones.

Específicamente para la remisión de la enfermedad de Crohn, los datos hasta el momento no son concluyentes. Probióticos como *Lactobacillus GG* y *Saccharomyces boulardii*, evidenciaron resultados que impiden concluir certeramente respecto a su eficacia probiótica. Por otra parte, ensayos que utilizaron de la cepa *E. coli* Nissle 1917, para prevenir la recurrencia clínica y/o endoscópica en pacientes con enfermedad de Crohn, demostraron su potencial eficacia.

Dada la importancia de estos enfoques para la salud pública, es oportuno reiterar información fáctica y de apoyo sobre su aplicación y uso clínico. Es por esto que esta revisión tiene como objetivo revisar el rol de los probióticos en la disbiosis intestinal y la forma en la que actúan a nivel digestivo. Además, se discutirá el mecanismo de acción de estas sustancias que presentan resultados beneficiosos en la salud del huésped, con énfasis en la enfermedad de Crohn, proporcionando un enfoque en base a diversos estudios científicos y resumiendo el conocimiento actual sobre los efectos sobre la microbiota intestinal en estos pacientes.

Palabras Claves: Probióticos, disbiosis, intestinal, inflamación, Crohn

2. INTRODUCCIÓN

A lo largo de los años se han desarrollado una serie de estudios e investigaciones que buscan determinar la importancia de la microbiota humana. El microbioma intestinal alberga cientos de especies bacterianas que viven en simbiosis, formando un complejo con funciones nutricionales y metabólicas, otorgando protección antimicrobiana y mantención del sistema gastrointestinal del huésped.

El término microbiota hace referencia a una comunidad de microorganismos vivos que residen juntos en un nicho biológico como por ejemplo el intestino humano. Por otra parte, el microbioma son los microorganismos, metabolitos y genes en un nicho ecológico (1).

La microbiota intestinal desempeña un papel importante en los procesos metabólicos del huésped (por ejemplo, en la regulación de la absorción de colesterol, la presión arterial y el metabolismo de la glucosa), y estudios metagenómicos recientes han revelado que están implicados en la modulación inmunitaria del huésped y que influyen en su desarrollo y fisiología (desarrollo de órganos) (2). Cuando hay una alteración del microbioma intestinal se habla de que existe disbiosis y para combatirla se recomienda el consumo de probióticos, (3), los cuales se pueden definir como "microorganismos vivos que al administrarse en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped." (4). Es posible encontrar estos microorganismos en productos alimenticios fermentados y lácteos principalmente, además de formulaciones farmacéuticas, las cuales se encuentran disponibles en el mercado (5).

Su mecanismo de acción sobre la disbiosis radica principalmente en actuar como competidores de patógenos a nivel intestinal y en la generación de sustancias antimicrobianas. Asimismo se ha reportado que presentan otros beneficios terapéuticos tales como efectos anticancerígenos y antiinflamatorios (6).

Una de las enfermedades con mayor prevalencia a nivel mundial que causa disbiosis intestinal es la enfermedad de Crohn, la cual forma parte del grupo de enfermedades denominadas enfermedades inflamatorias intestinales, la cual puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo y tiende a tener un compromiso segmentario. Las áreas que se comprometen con mayor frecuencia son el íleon terminal y el ciego, donde se definen como áreas

comprometidas aquellas que presentan úlceras. Esta enfermedad se caracteriza por episodios de actividad y remisión de la inflamación, de curso progresivo que puede avanzar a la estenosis o formación de fistulas (7).

Existen estudios que han identificado defectos en la microbiota asociada a mucosa y fecal con esta patología, esta pérdida de variabilidad microbiana se encontró por medio de comparaciones con individuos controles sanos. Conocer cómo los probióticos actúan a nivel intestinal para regular la disbiosis y la Enfermedad de Crohn es relevante para identificar las causas de la disbiosis y las posibles líneas de investigación ya sea para entender de una manera más amplia la patogenia de la enfermedad, como para poder avanzar en los tratamientos.

Por lo tanto el objetivo de este documento es revisar en la literatura reciente los efectos de cepas probióticas sobre disbiosis intestinal en modelos experimentales *in vitro*, *in vivo* y en estudios clínicos, efectuando un mayor énfasis en la Enfermedad de Crohn.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general:

Revisar el rol de los probióticos en la disbiosis intestinal, con énfasis en su actividad terapéutica sobre la enfermedad de Crohn

3.2 Objetivos específicos:

- I. Definir características generales de los probióticos y sus mecanismos de acción
- II. Describir el rol que ejercen los probióticos sobre la disbiosis intestinal
- III. Describir la enfermedad de Crohn y analizar el rol terapéutico de los probióticos sobre esta patología

4. METODOLOGÍA DE BÚSQUEDA

La presente revisión bibliográfica fue confeccionada en base a la búsqueda de información disponible sobre probióticos y su importancia en la microbiota humana, considerando artículos publicados principalmente durante los últimos 5 años.

De este modo, para la recopilación de antecedentes, fueron consultadas las bases de datos de *PubMed*, *Scielo*, *Web of Science* y *Scopus*, iniciando la búsqueda con el término “*probiotics*” obteniéndose 37698, 736, 33524, 64928 resultados respectivamente. La búsqueda se filtró utilizando las palabras “*disbiosis*” y “*microbiome*”, además de incorporar el rango de años desde 2012-2022.

Asimismo, se refinó la selección de documentos con las palabras “*Crohn disease*” en el título para disminuir el rango de búsqueda.

Finalmente esta revisión se realizó en base a 106 artículos publicados en revistas de corriente principal pertenecientes a las bases de datos ya mencionadas.

5. MARCO TEÓRICO

5.1. DEFINICIÓN Y CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LOS PROBIÓTICOS

De acuerdo con la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO, por su sigla en inglés *Food and Agriculture Organization*) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), los probióticos son microorganismos vivos que, cuando se consumen en cantidades adecuadas confieren al huésped un beneficio para su salud (8).

En Chile, el régimen de control sanitario establecido por el Instituto de Salud Pública (ISP), indica que para los productos en formas farmacéuticas orales, elaborados con *Lactobacillus spp.* y otros probióticos se requiere una concentración mínima de 10^7 unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de producto terminado (9) para que su consumo logre mantener el equilibrio de la flora intestinal y/o regular el tránsito intestinal y pueda contribuir estimular el sistema inmune.

Dentro de las bacterias que se consideran probióticos se encuentran las cepas pertenecientes a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* y se les reconoce como organismos generalmente seguros o GRAS (por su sigla en inglés *Generally Regarded as Safe*) y con presunción calificada de seguridad o QPS (*Qualified Pre sumption of Safety*) de acuerdo con la FDA (*Food and Drug Administration*) y la EFSA (*European Food Safety Authority*) (10,11).

Para que un microorganismo con actividad probiótica sea considerado como tal, aparte de ser consumido en cantidades adecuadas, debe mantenerse viable a través de su paso por el sistema digestivo cuando son consumidos por vía oral (6), puesto que en éste existen ácidos, enzimas, mucosas y otras barreras tanto físicas como químicas que dificultan la sobrevivencia de los probióticos en este conducto. Además, deben ser tolerados por el sistema inmune intestinal, interactuar con él y participar en el metabolismo local (12).

Dentro de los criterios de selección de una cepa probiótica se encuentran la seguridad, funcionalidad y uso tecnológico, los cuales se desglosan en la Tabla 1.

Tabla 1. Criterios de selección de una cepa probiótica. Tomada y adaptada de
(Markowiak. 2017) (13)

Criterios	Propiedades requeridas
Seguridad	<ul style="list-style-type: none"> ● Origen humano o animal ● Aislado del tracto gastrointestinal de individuos sanos ● Historial de uso seguro ● Identificación diagnóstica precisa (fenotipo y genotipo) ● Ausencia de datos sobre asociación con enfermedades infecciosas ● Incapaz de escindir las sales de ácidos biliares ● Sin efectos adversos ● Ausencia de genes responsables de generar resistencia antibióticos
Funcionalidad	<ul style="list-style-type: none"> ● Competitividad respecto a la microbiota que habita el ecosistema intestinal ● Habilidad para sobrevivir y mantener la actividad metabólica, y crecer en el sitio de interés ● Resistencia a las sales biliares y enzimas ● Resistencia a una disminución del pH estomacal ● Competitividad respecto a las especies microbianas que habitan el ecosistema intestinal ● Actividad antagonica hacia patógenos (<i>H. pylori</i>, <i>Salmonella spp.</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Clostridium difficile</i>) ● Resistencia a bacteriocinas y ácidos producidos por la microbiota intestinal endógena ● Adherencia y habilidad de colonizar sitios específicos del hospedero, y un nivel de sobrevivencia adecuado en el sistema gastrointestinal

Uso tecnológico

- Facilidad para producir grandes cantidades de biomasa y alta producción de cultivos
 - Viabilidad y estabilidad de las propiedades deseadas durante el proceso de fijación (congelación, liofilización), preparación y distribución de productos probióticos
 - Alta tasa de supervivencia en productos terminados (en condiciones aeróbicas y microaerófilas)
 - Garantía de las propiedades sensoriales deseadas en los productos terminados (en el caso de la industria alimentaria)
 - Estabilidad genética
 - Resistencia a bacteriófagos
-

5.2 PROBIÓTICOS Y DISBIOSIS INTESTINAL

Para poder comprender y analizar la acción que hoy en día ejercen los probióticos sobre la disbiosis intestinal, es necesario entender la fisiología y los mecanismos que están involucrados en este proceso.

La microbiota intestinal humana está compuesta por comunidades microbianas complejas y diversas que están asociadas con la salud en el hospedero. Se cree que la microbiota intestinal está compuesta por alrededor de 100 billones de células microbianas que le proporcionan una amplia gama de funciones metabólicas (14). Una de ellas es la producción de enzimas que transforman a los polisacáridos complejos de la dieta, que el intestino humano no puede digerir ni absorber, en monosacáridos y ácidos grasos de cadena corta (AGCC), principalmente ácido acético, propiónico y butírico. Los 2 primeros se absorben a la circulación portal y el tercero es empleado por los colonocitos como fuente de energía. Los AGCC pueden ser transportados al hígado para ser usados en la síntesis lipídica (15,16,17). La cantidad de AGCC en el colon y en la sangre son importantes para la inmunorregulación del hospedero.

Además, la microbiota es capaz de modular los genes que afectan la disposición de la energía en los adipocitos (18).

Así, una población microbiana intestinal bien equilibrada (homeostática) es esencial para que el huésped y la microbiota coexistan en una relación mutuamente beneficiosa.

La falta de mantenimiento de la homeostasis intestinal, conduce a cambios negativos en el metabolismo del huésped que están relacionados con enfermedades crónicas tales como las enfermedades inflamatorias intestinales (EII), el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y el síndrome metabólico. Por tanto, diversos factores implicados en la regulación del microbioma intestinal son claves en la prevención y en el tratamiento de estas complicaciones (19).

En este contexto, los probióticos se presentan como una promisoriosa estrategia para tratar la disbiosis, ya que se ha evidenciado que son capaces de restaurar la diversidad microbiana y alterar la microbiota intestinal perturbada con mecanismos de acción específicos que hasta la fecha no han sido completamente dilucidados (20,21).

Sin embargo, se ha documentado que uno de los más importantes es la exclusión competitiva, lo cual hace referencia a la situación en la que una especie de bacteria compite por los sitios receptores en el tracto intestinal más vigorosamente que otras especies (22).

Así, la reducción del pH luminal, la competencia por las fuentes nutricionales y la producción de metabolitos activos, se encuentran entre los principales mecanismos propuestos para la exclusión competitiva de patógenos (23). De esta forma, al modificar las condiciones gastrointestinales, los probióticos permiten que la cantidad de bacterias dañinas disminuya, debido a que no pueden sobrevivir en un ambiente con esas nuevas características y, a su vez, que las bacterias que favorecen la homeostasis de la microbiota interna, proliferen (24).

En cuanto a los metabolitos activos provenientes de probióticos, éstos parecen desempeñar un papel importante en la modulación de diversas vías metabólicas y de señalización en las células. De hecho, se ha informado que los componentes del metaboloma probiótico (ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y aminas, entre otros) interactúan con múltiples objetivos en algunas vías metabólicas que regulan la proliferación celular, la diferenciación, la apoptosis, la inflamación, la angiogénesis y la metástasis (25).

Actualmente, algunas cepas probióticas se utilizan en conjunto con medicación tradicional para el tratamiento de patologías asociadas a la disbiosis intestinal, incluyendo alteraciones como la diarrea infecciosa, la enterocolitis necrotizante y, más recientemente, en procesos inflamatorios crónicos como la enfermedad inflamatoria intestinal o en trastornos funcionales como el cólico del lactante o el estreñimiento (26).

En la Figura 1 se muestra la relación entre los probióticos, la microbiota intestinal y la enfermedad.

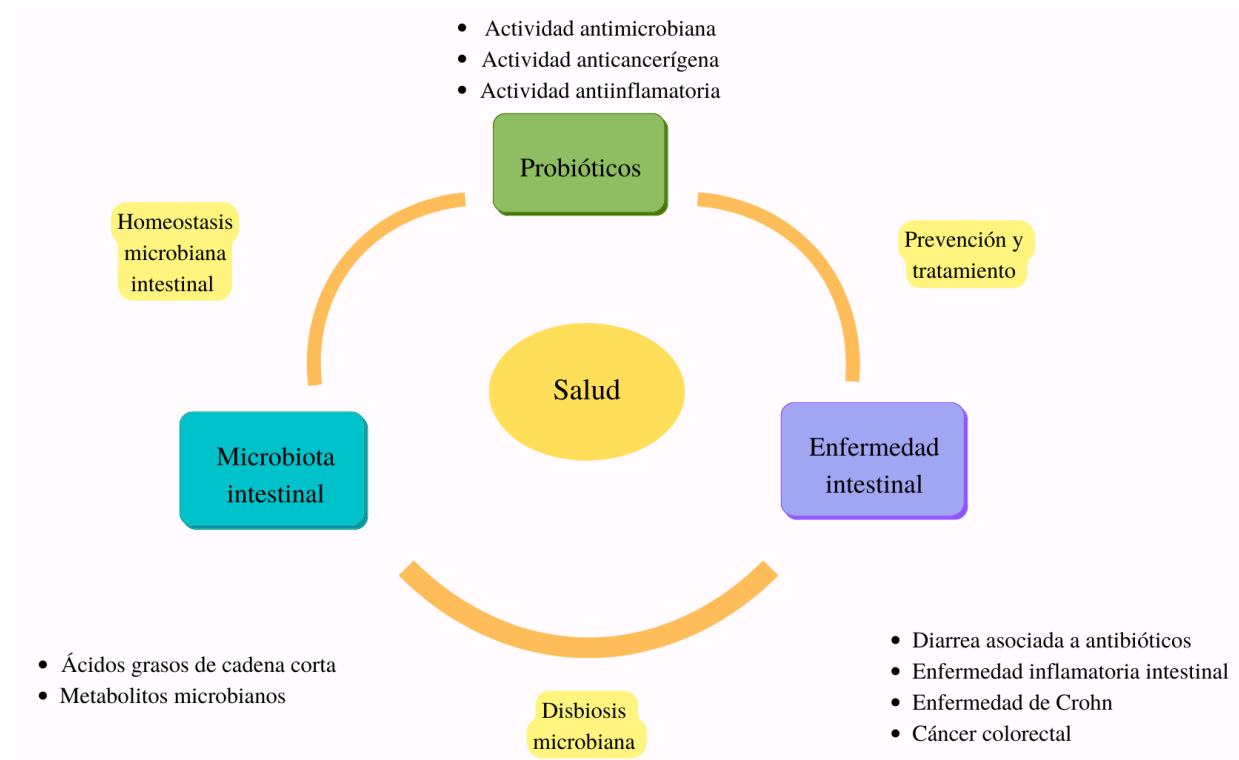


Figura 1. Papel de los probióticos relevantes para las enfermedades intestinales a través de la recuperación de la disbiosis en la microbiota intestinal. Tomada y adaptada de: (Seon-Kyun S-K et al. Microbiol. Biotechnol., 2019) (27)

5.3 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS PROBIÓTICOS EN LA DISBIOSIS INTESTINAL

La acción de los probióticos en el huésped involucran la colonización y posterior normalización de comunidades microbianas intestinales perturbadas a través de los siguientes mecanismos:

- Adhesión celular y producción de mucina (28,29)
- Exclusión competitiva de patógenos a través de la producción de sustancias antimicrobianas, tales como bacteriocinas y ácidos grasos de cadena corta (AGCC) (30,31)
- Modulación de actividades enzimáticas relacionadas con la metabolización de varios carcinógenos y otras sustancias tóxicas (31,32,33). De manera similar, los metabolitos probióticos pueden interactuar con el eje cerebro-intestino y desempeñar un papel en el comportamiento de este eje (24,34,35).

Es por acción de estos mecanismos que se puede mejorar el ambiente intestinal, neutralizar microorganismos patógenos, regular la inflamación y respuesta inmune generando los principales efectos benéficos en el huésped lo que ha contribuido a su uso e importancia en la disbiosis intestinal (31).

5.3.1 Adhesión celular y producción de mucina

Como se mencionó anteriormente, uno de los requisitos de las cepas probióticas consiste en que debe tener la capacidad de adherirse a la mucosa intestinal para la colonización y la posterior interacción con el huésped (36).

Se ha demostrado que proteínas del tipo adhesinas superficiales de *Lactobacillus* promueven esta adhesión. Estas adhesinas corresponden a estructuras bacterianas que median el proceso de fijación a la superficie y su función es facilitar la unión a la capa mucosa (37).

El mecanismo de adherencia bacteriana que está mejor estudiado es el que presenta la mayoría de bacterias Gram negativo y que está mediado por unas estructuras denominadas fimbrias o pilis. A través de ellas la bacteria contacta con la superficie de la célula huésped.

Normalmente, la proteína localizada en el extremo de la fimbria es la adhesina propiamente tal, que se adhiere a un receptor de la célula huésped constituido por regla general por residuos de hidratos de carbono de glucoproteínas o glucolípidos (38).

Además, se ha evidenciado que el pretratamiento de células epiteliales intestinales porcinas con *Lactobacillus rhamnosus* aumenta la expresión de las proteína zónula ocludens-1 y ocludina, y del mismo modo mejora la fosforilación de Akt (también conocida como proteína cinasa B) la que transfiere señales dentro de la célula (39). De esta forma, el probiótico mantiene la barrera epitelial y promueve la activación de las células epiteliales intestinales en respuesta a una infección bacteriana por *E. coli* (40).

Así lo evidencia el estudio realizado por Zhang y col (2015) (40) en donde se preincubaron células J2 epiteliales intestinales porcinas (IPEC-J2) con y sin *L. rhamnosus* ATCC 7469 y luego se expusieron a *Escherichia coli enterotoxigénica* F4+ (ETEC F4+). Se observaron aumentos en la expresión de ARNm de *Toll like receptor 4* (TLR4) y receptores NOD2 a las 3 h después de la exposición a ETEC F4+, pero estos aumentos fueron atenuados por el tratamiento con *L. rhamnosus*. La expresión de ARNm de TLR2 y NOD1 aumentó en células pretratadas con *L. rhamnosus*. El pretratamiento con *L. rhamnosus* contrarrestó los aumentos de concentración de TNF- α inducidos por F4+ ETEC. Además, mejoró la fosforilación de Akt y aumentó la expresión de la proteína ocludina y ZO-1.

En síntesis, los hallazgos sugieren que *L. rhamnosus* protege a las células epiteliales intestinales del daño inducido por ETEC F4+, en parte a través de la respuesta antiinflamatoria que involucra la sinergia entre TLR2 y NOD1. Además, *L. rhamnosus* promueve la activación de Akt independiente del receptor del factor de crecimiento epidérmico fosforilado, que puede activar las células epiteliales intestinales en respuesta a la infección bacteriana, lo que a su vez aumenta la integridad de las uniones estrechas y, por lo tanto, mejora la función de barrera y restringe la invasión de patógenos.

La preincubación con *L. rhamnosus* fue superior a la coincubación en la reducción de la adhesión de ETEC F4+ a las células IPEC-J2 y, posteriormente, en la atenuación de la destrucción de la capa de mucina inducida por ETEC F4+ y en la supresión de la apoptosis.

Los datos indican que una cepa seleccionada de *L. rhamnosus* interactúa con las células epiteliales intestinales porcinas para mantener la barrera epitelial y promover la activación de las células epiteliales intestinales en respuesta a la infección bacteriana, protegiendo así a las células de los efectos nocivos de ETEC F4+.

5.3.2 Exclusión competitiva de probióticos a través de la generación de metabolitos bioactivos

El término “resistencia a la colonización” se refiere al uso de probióticos para prevenir o tratar patógenos entéricos, principalmente mediante la liberación de compuestos activos (41). En particular, se ha reportado que aquellos producidos por cepas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *Saccharomyces* previenen las afecciones gastrointestinales causadas por *Clostridium difficile*, *Helicobacter pylori* y *Escherichia coli* enteroagregativa (42,43,44,45,46,47).

Un ejemplo de esto es el estudio realizado por Kumar y col. (2016) (42) quienes evaluaron los efectos antimicrobianos *in vitro* e *in vivo* de *Lactobacillus plantarum* y *Lactobacillus acidophilus* de forma individual y sinérgica frente a *E. coli* enteroagregativa multirresistente (MDR-EAEC). Este estudio reportó que cuando se usaban estos probióticos a una tasa de dosis de 10^{10} UFC, se inhibía el crecimiento de *E. coli* a las 72 h de contacto, mientras que a concentraciones más bajas (10^8 y 10^9 UFC), las cepas de MDR-EAEC fueron inhibidas a las 96 horas.

El efecto antimicrobiano sinérgico de ambas cepas probióticas (cada una a 10^{10} UFC) fue altamente significativo e inhibió el crecimiento de los aislamientos MDR-EAEC en un tiempo menor (24 horas).

Para la evaluación *in vivo*, estos investigadores alimentaron a animales murinos por vía oral con 10^7 UFC de MDR-EAEC. En el tercer día posterior a la infección, a los ratones los alimentaron por vía oral con las cepas probióticas (cada una a 10^{10} UFC). En comparación con el control, después del tratamiento observaron una reducción significativa en los recuentos de MDR-EAEC en las heces al día 2 y en los tejidos intestinales a los días 3 y 4. Incluso, los cambios histopatológicos del íleon y colon generados por *E. coli* a partir del día 6 post tratamiento con probióticos fueron regenerativos, mostrándose éstos con aspecto normal.

Por lo tanto, este estudio sugirió que estas cepas probióticas (*L. plantarum* y *L. acidophilus*) podían servir como terapias alternativas contra infecciones asociadas a MDR-EAEC en humanos y animales.

Estos resultados se condicen con los reportados por Fajardo-Argoti y col. (2021) (48), quienes estudiaron *in vitro*, bajo condiciones gastrointestinales simuladas, la actividad antimicrobiana del sobrenadante de *L. plantarum* sobre *E. coli* O157:H7, obteniendo resultados positivos cuando contactaron el probiótico con el patógeno, atribuyendo la acción inhibitoria del patógeno a la presencia de diversas sustancias en el sobrenadante, tales como ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, bacteriocinas y probablemente otras no identificadas (49).

La respuesta antagónica de *L. plantarum* es similar a lo reportado por Vera-Mejía y col. (2018) (50). Su trabajo se basó en la caracterización, mediante pruebas *in vitro*, de dos cepas de *L. plantarum* (22 LMC y 41 LMC) aisladas de la mucosa del ciego de cerdos criollos.

Estos investigadores evaluaron la actividad probiótica de las cepas mediante pruebas de estabilidad de crecimiento a diferentes temperaturas (30, 37 y 45°C) y pH (3,4; 4; 5,4; 6,7; 7,5), así como la capacidad de acidificación del medio de cultivo, la tolerancia al jugo gástrico artificial y a las sales biliares. Se realizaron pruebas de adherencia como autoagregación e hidrofobicidad y antagonismo microbiano ante cuatro patógenos.

Las cepas crecieron en todas las condiciones evaluadas y mostraron potencialidades probióticas por su resistencia al tratamiento con sales biliares hasta las 24 horas; con jugo gástrico artificial se observó crecimiento microbiano desde 4,20 - 5,17 log UFC/ml a los 90 minutos; resultando ser autoagregantes e hidrofóbicas. Además inhibieron el crecimiento de *E. coli*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus* y *Listeria monocytogenes*.

La cepa *L. plantarum* 22 LMC presentó los mejores resultados como probiótico, determinando que la actividad estaba mediada por ácido láctico y el peróxido de hidrógeno.

Para la aplicación en los animales de las BAL, la actividad antagonista es un criterio fundamental para la selección de nuevas cepas, ya que reducen la frecuencia de las infecciones intestinales y de las mucosas (51,52).

Por su parte Sánchez et al. (2015) (53) reportaron que la producción del peróxido de hidrógeno y ácido láctico por cepas de *Lactobacillus* influye en la colonización de patógenos a nivel intestinal, esto debido a que estas sustancias alteran la permeabilidad celular del patógeno y producen un descenso del pH intracelular, impidiendo su adhesión.

En su ensayo, Sánchez et al. caracterizaron *in vitro* 17 cepas de *Lactobacillus spp.* aisladas del tracto intestinal de terneros neonatos, para luego seleccionar las mejores como candidatas probióticas y utilizarlas posteriormente en estudios *in vivo*. Se evaluó su capacidad probiótica mediante pruebas *in vitro*. Primero, se determinó su crecimiento a diferentes temperaturas (30, 37 y 45°C), pH (2,5; 3,4; 5,4; 6,4) y capacidad de acidificación del medio de cultivo. Posteriormente, se preseleccionaron 10 cepas de *Lactobacillus spp.* que crecieron en todas las condiciones evaluadas.

A continuación se evaluaron sus características funcionales: la tolerancia al jugo gástrico artificial y a las sales biliares, así como su actividad de antagonismo microbiano ante cuatro agentes patógenos. Se obtuvo que cuatro cepas de *Lactobacillus spp.*, mostraron potencialidades probióticas por su resistencia al tratamiento con sales biliares hasta las 24 horas, y con jugo gástrico artificial se observó crecimiento microbiano de 3,52-6,5 Log UFC/ml a los 90 minutos.

Además, inhibieron el crecimiento de cepas de *Salmonella spp.*, *S. aureus*, *E. coli* y *L. monocytogenes*. Se evaluó el perfil de susceptibilidad a 13 antimicrobianos y la mayoría de las cepas reveló resistencia a tres de ellos.

Por otra parte, Tejero-Sarinena et al. (2013) (54) evaluaron en un ensayo *in vitro* la influencia de tres probióticos individuales: *Lactobacillus casei* NCIMB 30185 (PXN 37), *L. acidophilus* NCIMB 30184 (PXN 35), *Bifidobacterium breve* NCIMB 30180 (PXN 25) y una mezcla probiótica que contenía las anteriores cepas más otras doce cepas pertenecientes a los

géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Lactococcus*, *Streptococcus* y *Bacillus* sobre la supervivencia de *Salmonella Typhimurium* y *Clostridium difficile* utilizando cultivos discontinuos anaerobios con pH controlado.

Los cambios en los grupos bacterianos relevantes y los efectos de la adición de probióticos en la supervivencia de los dos patógenos se evaluaron durante 24 horas. El análisis cuantitativo de las poblaciones bacterianas reveló que hubo un aumento significativo en el número de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, en comparación con el control (sin probióticos agregados).

De los tratamientos con probióticos, dos cepas individuales, a saber, *L. casei* NCIMB 30185 (PXN 37) y *B. breve* NCIMB 30180 (PXN 25), fueron las más potentes para reducir el número de *S. Typhimurium* y *C. difficile*.

El acetato se encontró en las concentraciones más altas en todos los recipientes y el lactato y el formiato generalmente se detectaron en cantidades más altas en los recipientes con adición de probióticos en comparación con los controles.

Finalmente, Tejero-Sarinena et al. (2013) (54) postularon que los probióticos inhibían los patógenos mediante la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), tales como el ácido acético, propiónico, ácidos butírico y láctico.

En cuanto a los AGCC, es sabido que éstos ayudan a mantener un pH adecuado en la luz del colon, lo cual es imperativo en la expresión de numerosas enzimas bacterianas y en el metabolismo de compuestos extraños y carcinógenos en el intestino (55).

Islam (2015) (56) en su publicación sobre el uso clínico de probióticos, también sugirió que diversos probióticos producen una amplia variedad de compuestos anti-patógenos, como bacteriocinas, etanol, ácidos orgánicos, diacetilo, acetaldehídos, peróxido de hidrógeno (H₂O₂) y péptidos. Entre estos compuestos, los péptidos y las bacteriocinas, en particular, participan principalmente en el aumento de la permeabilidad de la membrana de las células diana, lo que conduce a la despolarización del potencial de membrana y, en última instancia, a la muerte celular.

De manera similar, la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) por parte de estas bacterias provoca la oxidación de los grupos sulfhidrilos, lo que produce la desnaturalización de varias enzimas que resultan en la peroxidación de los lípidos de la membrana, aumentando así la permeabilidad de la membrana del microorganismo patógeno y, en consecuencia, la muerte celular (47,57,58).

Además de producir compuestos bioactivos antimicrobianos que afectan directamente a los patógenos, los probióticos también estimulan las vías de defensa anti-patogénicas del huésped.

Una de sus funciones conocidas es la estimulación o activación de la vía involucrada en la producción de defensinas, que son péptidos antimicrobianos catiónicos producidos en varios tipos de células, incluidas las células de Paneth en las criptas del intestino delgado y las células epiteliales intestinales, estas moléculas efectoras de naturaleza catiónica pertenecen a la inmunidad innata y su función radica en la acción de su amplio espectro antimicrobiano y efectos inmunomoduladores (55, 59, 60).

Otro mecanismo por el cual los probióticos ejercen actividad anti-patogénica es compitiendo por los sitios de unión y receptores de patógenos, así como por los nutrientes disponibles y el crecimiento (59, 61).

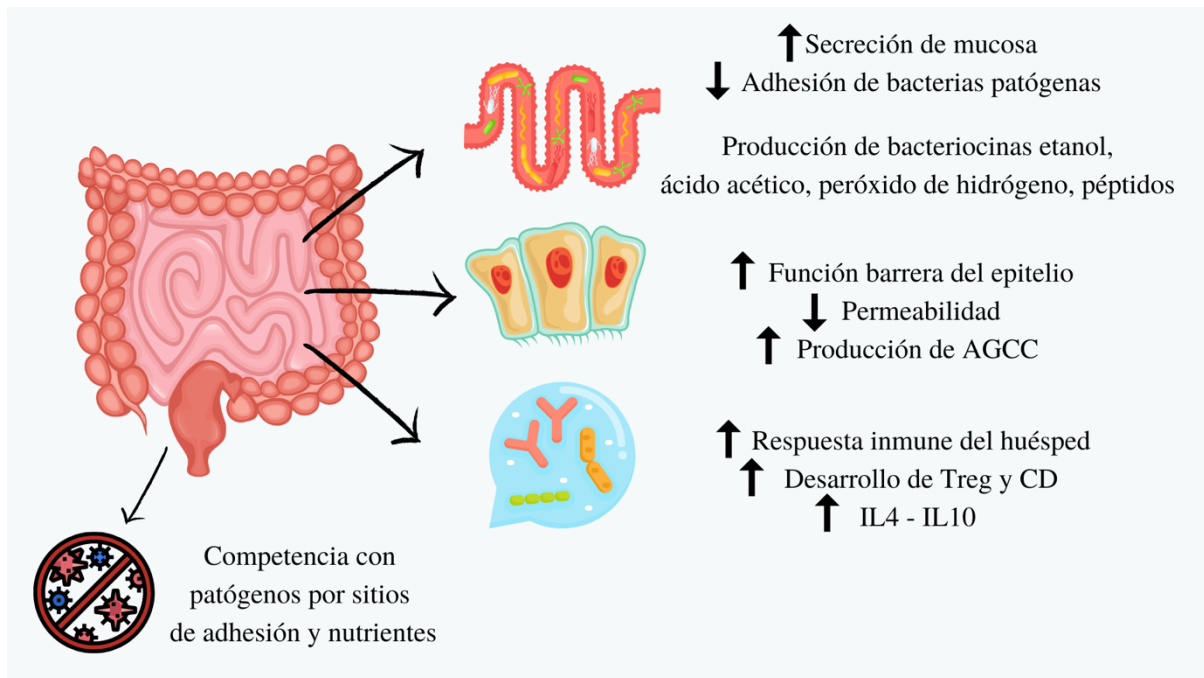


Figura 2. Acción de probióticos sobre la microbiota. Los probióticos ejercen diversas funciones sobre la microbiota, las cuales incluyen actividades metabólicas, promoción de la respuesta inmune y competencia con patógenos para evitar colonización. Elaboración propia Figueroa, J. Vásquez, S. (2022)

5.3.3 Actividad enzimática

La actividad enzimática de los probióticos en el lumen intestinal puede desempeñar un papel relevante en los efectos biológicos de estos mismos. Se ha evidenciado que *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* exhiben más de 20 actividades enzimáticas diferentes, siendo la actividad β -galactosidasa la más estudiada hasta el momento (62), esta enzima también llamada lactasa, cataliza la hidrólisis de enlaces galactosídicos beta-1,4 de la lactosa en sus monómeros galactosa y glucosa, además de catalizar la síntesis de oligosacáridos. Esta enzima da a los microorganismos potencial probiótico en el alivio de los síntomas de tolerancia a la lactosa (63,64).

También se ha reportado que postbióticos generados por bacterias lácticas, tienen efecto inhibitorio sobre la actividad de β -glucuronidasa a nivel intestinal (65)

Las enzimas β -glucuronidasa (GUS) expresadas por la microbiota gastrointestinal, se encuentran en la interfaz de una simbiosis metabólica entre el microbio y el huésped, donde median la reactivación de moléculas importantes para la salud y la enfermedad.

Las enzimas GUS microbianas generan fármacos tóxicos y carcinógenos en el tracto gastrointestinal de los mamíferos (66), y sus actividades están asociadas con una mayor incidencia de cáncer intestinal (67).

Las proteínas GUS del tracto gastrointestinal, también procesan moléculas endógenas, incluidos los glucurónidos de hormonas y neurotransmisores (68,69,70). Estas observaciones han dado lugar a hipótesis que relacionan las enzimas GUS microbianas con la toxicidad gastrointestinal, el desarrollo de cáncer y una mayor incidencia de enfermedad de Crohn (71,72,73).

Un estudio de Rowland et al. (1998) (65) en ratas reportó que la alimentación con *B. longum* dio lugar a una disminución del 30% de la actividad de β -glucuronidasa, la cual, como se ha mencionado, se asocia con la inhibición de la formación de criptas aberrantes y es un marcador preneoplásico temprano de potencial maligno en el proceso de carcinogénesis del colon (71,74).

También se ha documentado que la simbiosis de probióticos y prebióticos reduce la actividad de la aminotransferasa hepática, lo que se traduce en un posible tratamiento de la enfermedad del hígado graso no alcohólico (EHGNA) en adultos (75).

Por otra parte, los probióticos están involucrados en el metabolismo de los ácidos biliares, entre otros, debido a la capacidad de algunas cepas bacterianas para hidrolizar las sales biliares.

La hidrolasa de sales biliares (HSB) es una enzima producida por especies bacterianas de varios géneros asociados con el tracto gastrointestinal (en su mayoría comensales Gram positivo), incluidos *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Clostridium* y *Bacteroides*.

La actividad de la HSB también se ha identificado en el patógeno gastrointestinal *L. monocytogenes* y en los patógenos oportunistas *Enterococcus faecalis* y *Xanthomonas*

maltophilia. Las HSB generalmente se encuentran ubicadas intracelularmente, son insensibles al oxígeno y tienen un pH óptimo ligeramente ácido, generalmente entre pH 5 y 6 (76).

El efecto hipocolesterolémico de las cepas activas de HSB se logra principalmente mediante la participación de las enzimas HSB en la circulación enterohepática de los ácidos biliares.

Las sales biliares primarias conjugadas, como los compuestos orgánicos más abundantes de la bilis, se secretan en la bilis, se almacenan en la vesícula biliar, se liberan en el duodeno en respuesta a las hormonas intestinales y se mueven progresivamente a lo largo del intestino delgado a través del peristaltismo. Al llegar al íleon, el transportador de ácidos biliares ileales (IBAT, SLC10A2) mueve los ácidos biliares desde el lumen intestinal hacia el enterocito, y el transportador de solutos orgánicos α/β , una proteína heterodimérica, exporta los ácidos biliares hacia la vena porta para regresar a el hígado (77,78).

Las cepas probióticas activas de HSB ejercen su efecto hipocolesterolémico a través de la reacción de desconjugación, ya que esta reacción conduce a una menor solubilidad y reabsorción de las sales biliares, lo que resulta en la excreción de mayores cantidades de ácidos biliares libres en las heces.

Por lo tanto, la desconjugación de las sales biliares podría conducir a una reducción en los niveles de colesterol sérico, ya sea aumentando la síntesis de ácidos biliares a partir del colesterol para reemplazar la pérdida en las heces, o reduciendo la solubilidad del colesterol y la consiguiente absorción del colesterol a través del lumen intestinal (77,78,79).

Dado que el colesterol es poco soluble en agua, su absorción depende de las propiedades solubilizantes de los ácidos biliares. La desconjugación de las sales biliares conduce a la inhibición de la formación de micelas de colesterol que pueden reducir la absorción de colesterol en los intestinos (80).

5.3.4 Modulación del sistema inmunológico

La microbiota intestinal modula el sistema inmunitario mediante la producción de moléculas con funciones inmunomoduladoras y antiinflamatorias capaces de estimular las células inmunitarias. Estos efectos inmunomoduladores se deben a la interacción de las bacterias probióticas con las células epiteliales, dendríticas y con los monocitos, macrófagos y linfocitos (81).

Como indica la literatura, el sistema inmunitario se divide en sistemas innato y adaptativo. La respuesta inmunitaria adaptativa depende de los linfocitos B y T, que se unen a antígenos específicos. Por el contrario, el sistema innato responde a estructuras comunes, denominadas patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP por la sigla en inglés de *pathogen-associated molecular patterns*), compartidas por la mayoría de los patógenos. La respuesta primaria a los patógenos se produce mediante los receptores de reconocimiento de patrones (PRR por sus siglas en inglés *patterns recognition receptors*), que se unen a los PAMP (80,81,82)

Los PRR comprenden a los receptores denominados *toll-like* (TLR por sus siglas en inglés *toll-like receptor*) (80). En los mamíferos, la familia TLR incluye 11 proteínas (TLR1–TLR11), y la activación de los TLR ocurre después de la unión del ligando a las repeticiones extracelulares ricas en leucina, las que se expresan en diversas células inmunitarias y no inmunitarias, tales como las células B, células asesinas naturales, células dendríticas (CD), macrófagos, células de fibroblastos, células epiteliales y células endoteliales (80, 82).

En humanos, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9 se encuentran en la superficie de los endosomas, donde responden principalmente a los PAMP basados en ácidos nucleicos de virus y bacterias.

Se ha demostrado que la señalización mediada por TLR controla la maduración de las células dendríticas y que, particularmente, la señalización de TLR9 es esencial para la mediación del efecto antiinflamatorio de los probióticos (82). El subconjunto de células T, que participa en la regulación del equilibrio inmunitario, está finamente ajustado por el huésped y los microbios con los que interactúa, por lo que el desequilibrio entre las células T auxiliares

(Th) efectoras y las células T reguladoras (T-regs) conduce a una respuesta inmune alterada. Es en este punto en donde los probióticos ayudan a preservar la homeostasis intestinal, al modular la respuesta inmune e inducir el desarrollo de T-regs (83,84).

Algunos de los compuestos que se han implicado en los efectos de la microbiota en las células huésped son ligandos derivados de microbios de receptores similares a los TLR, como el lipopolisacárido (LPS) y la flagelina, que activan, respectivamente, TLR-4 y TLR-5 y modulan distintos aspectos del metabolismo del huésped y las respuestas inmunitarias. Además, la asociación a largo plazo de bacterias comensales dentro del intestino hace que el sistema inmunitario innato los reconozca como inofensivos (85,86).

Las bacterias comensales inducen un patrón inusual de maduración de las CD, de modo que conservan la capacidad de impulsar T-regs. De esta forma, es probable que los trastornos inmunorreguladores ocurran comúnmente primero en aquellas personas cuyos sistemas inmunitarios innatos son menos eficientes para impulsar la T-regs.

El aumento de células dendríticas reguladoras (CD-reg) y T-regs inducido por mecanismos inmunorreguladores de la microbiota propia del intestino están mediados, en parte, por la liberación de Interleuquina 10 (IL-10) y factor de crecimiento transformador beta (TGF- β por su sigla en inglés *transforming growth factor beta*) (80,83,84).

Min y Rhee (2015) (87) en su estudio sobre el papel de la microbiota en la inmunología intestinal, revisaron las influencias de la microbiota en el desarrollo del sistema inmunitario de la mucosa intestinal que incluye tejidos linfoides asociados al intestino (también denominados GALT por su siglas en inglés de *Gut-Associated Lymphoid Tissue*), barrera de la mucosa, células Th17, T-regs, CD, células linfoides innatas, células B productoras de IgA y células plasmáticas.

Concluyendo del mismo modo, el rol transcendental de la microbiota intestinal en la homeostasis inmune y la autoinmunidad que previamente ha sido revisado ampliamente por Wu y Wu (2012) (88), en donde se destaca la importancia de la microbiota intestinal al regular la homeostasis inmune innata y adaptativa, y a su vez, la forma en que afecta el desarrollo de enfermedades autoinmunes no solo intestinales sino también sistémicas.

En un estudio realizado por Smits H. et al (2005) (89) se ha sugerido que algunos probióticos como *L. reuteri* y *L. casei* actúan sobre las CD derivadas de monocitos, impulsando el desarrollo de células T-regs que producen mayores niveles de IL-10.

Además, en otro estudio realizado por Konstantinov et al. (2008) (90) se ha demostrado que la proteína extracelular A de la capa S (SlpA) secretada por *L. acidophilus* NCFM se une a CD-SIGN e induce la producción de IL-10 en las CD.

De la misma forma, Kwon et al. (2010) (91) en su ensayo sobre la supresión de trastornos inmunitarios por medio de la administración de probióticos, ha evidenciado que la administración de un pequeño consorcio de bacterias probióticas, constituido por especies de los géneros *Lactobacillus*, *Streptococcus* y *Bifidobacterium*, aumenta la expresión de IL-10, TGF- β y ciclooxigenasa 2 (COX2) en las CDs. Estas CD reguladoras pueden impulsar la diferenciación de las células FoxP3⁺ T-regs, que a su vez suprimen una serie de estados inflamatorios experimentales.

Estos hallazgos sugieren que los probióticos actúan como agentes antiinflamatorios al influir en las CD para inducir un estado de falta de respuesta al promover el desarrollo de T-reg y, por lo tanto, pueden ser útiles en el tratamiento de varias enfermedades inflamatorias del tracto digestivo, incluidas las enfermedades atópicas y autoinmunes.

5.3.4.1 Modulación de la Inmunoglobulina A secretora (SIgA) y la producción de citoquinas

La sIgA es secretada por las células B intestinales y se expresa en la superficie basolateral del epitelio intestinal como un transportador de anticuerpos. Además, facilita la translocación de dímeros de IgA a las superficies lumbales de las células epiteliales.

Varios estudios han informado que los probióticos muestran una potente estimulación de la producción de sIgA, lo que mejora la función de barrera intestinal (92,93).

Lo que ocurre, es que interactúan con células inmunitarias específicas e intestinales, lo que da como resultado un aumento en la producción de citoquinas requeridas.

Se ha reportado que el consumo de *L. salivarius* CECT5713 produce un aumento del porcentaje de células *natural killer* (NK) y monocitos, así como de las concentraciones plasmáticas de inmunoglobulinas M, A y G e IL-10 en adultos sanos (94).

Por otra parte, *L. casei shirota* aumentó la expresión del marcador de activación CD69 en las células T y las células NK circulantes e indujo un aumento en las concentraciones de IFN- γ , IgA1 e IgA2 en la saliva de la mucosa en adultos sanos (95).

Recientemente, se ha evidenciado que la administración de *B. breve* CNCM I-4035 resultó en un aumento significativo en el contenido de sIgA fecal; las concentraciones plasmáticas de IL-4 e IL-10 también aumentaron, mientras que las concentraciones de IL-12 disminuyeron, en los sueros de voluntarios tratados con esta cepa. Se han obtenido resultados similares con otras 2 cepas probióticas, *L. rhamnosus* y *L. casei* (96).

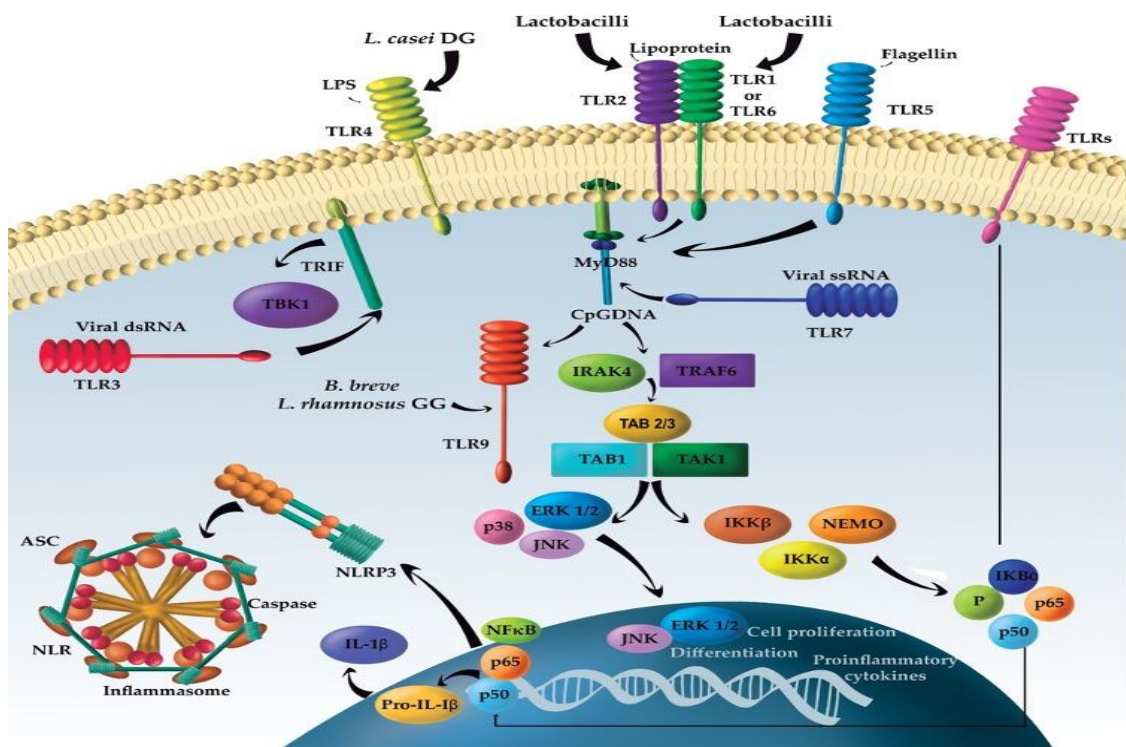


Figura 3. Principales efectos de los probióticos en el sistema inmune. Tomado y adaptado de: (Díaz. 2019) (62)

Los probióticos son capaces de suprimir la inflamación intestinal a través de la regulación a la baja de la expresión de TLRs, la secreción de metabolitos que pueden inhibir la entrada de TNF- α en las células mononucleares sanguíneas y la inhibición de la señalización de NF- κ B en los enterocitos (82). En este aspecto, la señalización por parte de los componentes de la pared celular de los *Lactobacilos* puede ocurrir potencialmente a través de la unión de TLR2 y TLR6, estimulando la producción de citoquinas.

Además, TLR2 reconoce el peptidoglicano, que es el componente principal de las bacterias grampositivas, incluidas las del género *Lactobacillus*. Así, *L. casei* 431 interactúa con las células epiteliales a través de TLR2, y la interacción entre *L. casei* y las células inmunitarias asociadas al intestino, inducen un aumento en la cantidad de receptores CD-206 y TLR2 (97). De hecho, varias cepas, como *L. plantarum* CCFM634, *L. plantarum* CCFM734, *L. fermentum* CCFM381, *L. acidophilus* CCFM137 y *S. thermophilus* CCFM218, estimulan la interacción TLR2/TLR6, la cual es esencial en los procesos de regulación inmunitaria (98)

Con respecto a las enfermedades intestinales, se ha informado que *L. rhamnosus* HN001 tiene actividad beneficiosa para el tratamiento de enfermedades inflamatorias como la enterocolitis necrosante (NEC). De esta forma, el ADN microbiano de *L. rhamnosus* HN001 puede activar TLR9, atenuando NEC *in vitro*, y no se ha descrito evidencia de toxicidad (99).

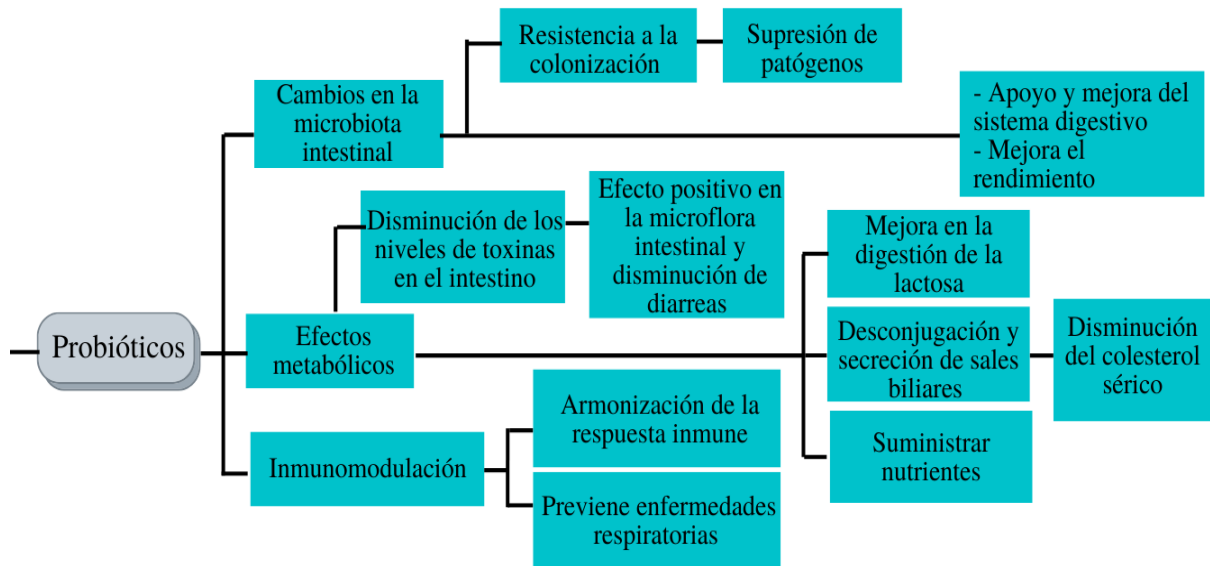


Figura 4.- Mecanismo de acción de probióticos en la disbiosis intestinal. Tomado y adaptada de (Markowiak. 2017) (100)

5.4 PROBIÓTICOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD DE CROHN

Se sabe que varias enfermedades intestinales como la diarrea asociada a antibióticos (101), la enfermedad inflamatoria intestinal (102), la enfermedad de Crohn (103) y el cáncer colorrectal (25), están estrechamente asociadas con la disbiosis de la microbiota intestinal, es decir, una alteración en la relación de bacterias intestinales beneficiosas para el huésped y las que son dañinas para él (104).

Se ha sugerido la administración de probióticos como un enfoque terapéutico para prevenir estas enfermedades intestinales por ser reconocidos en procesos de recuperación de la microbiota intestinal desequilibrada, reduciendo así la gravedad de estas enfermedades intestinales y aliviando los síntomas en el individuo que las padece (105, 106).

5.4.1 Enfermedad de Crohn

La enfermedad de Crohn (EC) es una afección inflamatoria crónica, remitente y recurrente que puede afectar cualquier segmento a lo largo del tracto gastrointestinal desde la boca hasta el ano (107).

Los síntomas de la EC pueden incluir úlceras orales, dolor abdominal, diarrea, obstrucción, fistulización a los tejidos circundantes, abscesos, desnutrición y anemia (108).

El diagnóstico y el seguimiento de la EC se realizan predominantemente mediante examen endoscópico e histológico, aunque estos pueden complementarse con el uso de datos de imagen, serológicos y fecales (109). No existe una cura conocida para la EC y el tratamiento se centra principalmente en la inducción y el mantenimiento de la remisión (enfermedad inactiva), la corrección de la desnutrición, el tratamiento de las complicaciones y la mejora de la calidad de vida de los pacientes (110).

La incidencia varía de 0,1 a 16 casos por cada 100.000 personas en todo el mundo (111). Es más común en el mundo industrializado, particularmente en América del Norte y Europa Occidental. Según cifras actuales, la prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en América Latina viene en aumento, es equivalente a muchos países en Asia y se aproxima a los países del sur y del este de Europa (112).

En Chile no existen estudios con un número significativo de pacientes que permitan describir las características epidemiológicas de la Enfermedad de Crohn. Sin embargo, estudios piloto en nuestro país indican que la incidencia de este problema de salud sería de 1,7 por 100.000 habitantes y una prevalencia de 30 por 100.000 habitantes (113).

Dentro de los últimos años ha ido en aumento la incidencia de la enfermedad y se asocia a los cambios en los estilos de vida y factores ambientales, como la industrialización, higiene, dieta occidentalizada, crecimiento económico y la movilización de las comunidades rurales a una urbanas (114,115,116).

Por otro lado, se debe tener presente las mejoras constantes en las herramientas diagnósticas lo cual también puede reflejar aumento en los casos gradualmente.

El principal tratamiento para la EC implica el uso de inmunosupresores, incluidos inmunomoduladores (p. ej., azatioprina, 6-mercaptopurina, metotrexato) y terapias biológicas (p. ej., infliximab, vedolizumab, ustekinumab). Estos medicamentos no siempre son efectivos (117) y puede exponer a los pacientes a riesgos potencialmente mayores, como infección, supresión de la médula ósea, malignidad cutánea y no cutánea y complicaciones metabólicas (118).

En consecuencia, es importante en la búsqueda de estudios de tratamientos complementarios y alternativos para la EC que presenten una disminución de los efectos secundarios producidos por el tratamiento actual (119, 120).

Aunque la etiología de la EC aún se desconoce, se cree que su patogénesis involucra la interacción entre factores genéticos y ambientales. En particular, el microbioma intestinal puede desempeñar un papel importante en la patogénesis y la actividad de la enfermedad, lo que genera un gran interés en el uso potencial de los probióticos como estrategia terapéutica a través de la manipulación del microbioma (121).

Dada la asociación entre la disbiosis y la EC, existe la hipótesis de que los probióticos tienen un papel en la restauración de la eubiosis y tal vez en la mejora de la inflamación intestinal. Se cree que los probióticos funcionan a través de la acción competitiva con la microbiota comensal y patógena y a través de su influencia en la respuesta inmune (122).

A continuación, se analizan los trabajos que han reportado el estudio de probióticos sobre el tratamiento de la enfermedad de Crohn.

5.4.2 Estudios *in vitro* e *in vivo* de probióticos sobre la enfermedad de Crohn

A pesar de que se puede considerar la utilización de antibióticos como método idóneo para la manipulación de la flora intestinal, estos tiene sus desventajas, como la poca especificidad, aparición de resistencias y el posible sobre crecimiento de alguna cepa patógena (123,124). De ahí la importancia de las nuevas terapias como la probiótica que modifica la flora intestinal complementando el tratamiento en la EC.

La evidencia científica disponible reporta que entre las numerosas bacterias del microbioma intestinal, existen algunas que presentan un rol protector frente a bacterias patógenas y que inciden en la generación de la EC. Es el caso de *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) (serotipo O6:K5:H1) pertenece al serogrupo O6 común que es muy heterogéneo e incluye comensales no patógenos y también variantes patógenas (principalmente diarreicas y uropatógenas) (125).

Esta cepa, a diferencia de otras no patógenas, exhibe un patrón específico de factores de aptitud (p. ej., microcinas, adhesinas, proteasas) que incluyen al menos 6 sistemas diferentes de absorción de hierro (enterobactina, salmoquelina, aerobactina, yersiniabactina, EfeU) para la generación de energía a través de ATP, pero carece de factores de virulencia destacados (p. ej., α -hemolisina de *E. coli*, adhesinas P-fimbriales) (126,127,128,129,130). Así, la producción de microcinas H47 y M principalmente son las responsables del antagonismo de EcN hacia otros miembros de la microbiota intestinal (131,132,133).

La flagelina expresada por todas las *E. coli* es una proteína que compone la subunidad principal de los flagelos bacterianos y actúa como activador del sistema inmunitario innato del individuo por medio de una estimulación del receptor tipo Toll 5 que desencadenan respuestas inflamatorias en el huésped (134,135).

Por otro lado, la inducción de β -defensina 2 humana (hBD-2; péptidos antimicrobianos humanos) el que refuerza la barrera mucosa, limita la adherencia e invasión bacteriana y la actividad de la flagelina de EcN (136).

In vitro, se ha evidenciado que utilizando varios cultivos de líneas celulares, EcN inhibe la invasión de cepas bacterianas patógenas, induciendo una respuesta inmune celular en la mucosa intestinal.

Un ejemplo de ello es el estudio realizado por Wehkamp et al. (2004) (137) que tuvo por objetivo comparar cepas bacterianas probióticas como *Escherichia coli* Nissle 1917 con bacterias no probióticas, patógenas y no patógenas con respecto a los mecanismos de defensa innatos en la célula de la mucosa intestinal. Se incluyó la cepa Nissle 1917 de *E. coli* y una variedad de otras bacterias probióticas, incluidos los *Lactobacillus*, en contraste con más de 40 cepas diferentes de *E. coli*.

Se comprobó que EcN induce fuertemente la expresión del péptido antimicrobiano beta-defensina-2 humana (hBD -2) en células epiteliales intestinales Caco-2 de manera dependiente del tiempo y la dosis. La inducción de hBD-2 a través de *E. coli* Nissle 1917 se confirmó además mediante la activación del promotor hBD-2 y la detección del péptido hBD-2 en los sobrenadantes de cultivo de células Caco-2 tratadas con *E. coli* Nissle 1917. De esta forma, se demostró que bacterias probióticas como EcN pueden estimular la defensa innata

intestinal a través de la regulación al alza de péptidos antimicrobianos inducibles como hBD-2, el que puede contribuir a una barrera mucosa mejorada para las bacterias lumbinales.

Por otra parte, en un ensayo *in vivo* realizado por Altenhoefer et al (2004) (138), se evaluó la forma en que el probiótico *Escherichia coli* cepa Nissle 1917 interfiere con la invasión de células epiteliales intestinales humanas por diferentes patógenos bacterianos entero-invasores. De esta forma, se informó que la cepa probiótica de *Escherichia coli* Nissle 1917 del serotipo O6:K5:H1 protege a los lechones gnotobióticos de la infección con *Salmonella enterica serovar Typhimurium*.

Una importante propiedad de virulencia de *Salmonella* es la invasión de las células epiteliales del huésped. Por lo tanto, se probó la interferencia de la cepa Nissle 1917 de *E. coli* con la invasión de células INT407 por *Salmonella*.

La administración simultánea de EcN 1917 y *Salmonella*, dio como resultado una reducción de hasta el 70 % en la eficacia de la invasión de *Salmonella*. Además, la invasión de *Yersinia enterocolitica*, *Shigella flexneri*, *Legionella pneumophila* e incluso de *Listeria monocytogenes* fue inhibida por este probiótico, sin afectar la viabilidad de las bacterias invasoras. También se consiguieron tasas de invasión reducidas si la cepa Nissle 1917 se separaba de las bacterias invasoras así como de la monocapa INT407 mediante una membrana no permeable para las bacterias.

Finalmente, se concluyó que *E. coli* Nissle 1917 interfiere con la invasión bacteriana de las células INT407 a través de un componente secretado y no depende del contacto físico directo con las bacterias invasoras o las células epiteliales.

Además de brindar protección contra infecciones por patógenos intestinales, EcN ha demostrado poseer potentes propiedades inmunomoduladoras.

En diferentes modelos de cultivo celular se observó un efecto diferencial sobre distintas poblaciones de células T por EcN que podría ser la base de las propiedades inmunorreguladoras, permitiendo una respuesta inflamatoria potente pero limitada a nivel de la mucosa sin la posibilidad de reclutar más células T de la periferia. Esto da como resultado una secreción reducida de citocinas proinflamatorias (IL-2, IFN- γ y TNF- α) y una regulación

positiva de la secreción de IL-10, IL-8 e IL-1 β reguladoras (159,160). Se demostró además que estos efectos estaban mediados por la señalización del receptor tipo Toll-2 (TLR-2), expresada en las células T activadas (138).

Boudeau J et al (2003) (139) realizaron uno de los primeros estudios analizando el efecto de EcN en la enfermedad de Crohn (EC). En su ensayo analizó el efecto inhibitorio de esta cepa probiótica sobre la adhesión e invasión de células epiteliales intestinales por cepas *de E. coli* adherentes-invasoras aisladas de pacientes con EC. El estudio fue diseñado para examinar si esta cepa probiótica podría inhibir la capacidad de las cepas AIEC (*E. coli* adherente-invasiva) patógenas, aisladas de pacientes con enfermedad de Crohn, de adherirse a las células epiteliales intestinales e invadirlas *in vitro*.

Se logró demostrar que la EcN ejerce un efecto inhibitorio potente y específico sobre la adhesión de AIEC a las células epiteliales intestinales tanto en modelos experimentales de coinfección como de pre-incubación.

En experimentos de coinfección, en los que se usó una mezcla de EcN y AIEC LF82 para infectar monocapas celulares, se observó un fuerte efecto inhibitorio dependiente del tiempo y la dosis sobre la adhesión de LF82, que alcanzó el 96%.

La incubación previa de las células epiteliales con EcN antes de la infección con *E. coli* LF82 también evitó la adhesión de LF82 en función de la dosis y el tiempo, y se obtuvo un efecto inhibitorio máximo del 98%. El efecto inhibitorio de EcN no se limitó a la cepa LF82; también se observó con las otras seis cepas patógenas de AIEC aisladas de diferentes pacientes con enfermedad de Crohn incluidos en el estudio. Se obtuvieron efectos inhibitorios que alcanzaron el 92,5-99,9%.

De la misma forma, Huebner C et al. (2011) (140) estudiaron cómo este mismo probiótico *Escherichia coli* Nissle 1917, reduce la invasión de patógenos y modula la expresión de citocinas en células Caco-2 infectadas con *E. coli* LF82 asociada a la enfermedad de Crohn.

Las muestras en estudio se sometieron a períodos de incubación de 3, 6 y 9 horas. Después de 6 horas de coinfección, EcN mostró un efecto inhibitorio significativo sobre la invasión de la cepa LF82.

Por otra parte, en comparación con las células no infectadas, las células infectadas con la cepa LF82 secretaron niveles significativamente mayores de oncogén alfa ($\text{Gro-}\alpha$) regulado por el crecimiento, interleucina 8 (IL-8) y péptido quimiotáctico de monocitos 1 (MCP-1) durante todo el curso del experimento.

También se pudo detectar una mayor expresión del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) a las 6 y 24 horas post infección. La molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM1) y la interleucina 6 (IL-6) se elevaron en el sobrenadante a las 9 horas. Además, se detectaron cantidades más pequeñas del antagonista del receptor de IL-1 secretado (IL-1RA) en células Caco-2 infectadas a las 6 horas después de la infección en comparación con las células no infectadas.

En resumen, se sugiere que EcN protege a las células epiteliales intestinales de la respuesta asociada a la inflamación causada por la cepa LF82 al reducir la invasión de patógenos y modular la expresión de citoquinas. Este estudio es el primero que sabemos que muestra que EcN puede reducir algunos de los efectos negativos asociados con la cepa LF82 en una infección AIEC ya establecida y enfatiza el potencial de EcN en el tratamiento de la enfermedad de Crohn. En particular, el uso de este probiótico podría ser de interés en pacientes con EC portadores de AIEC patógenos (140).

Sorprendentemente, los efectos inhibidores observados con *E. coli* Nissle 1917 sobre la adhesión de AIEC en pacientes con enfermedad de Crohn analizados en esta revisión, son concordantes (137,138) sobre la adhesión de varios patógenos.

Es de esperar que se realicen estudios con poblaciones más numerosas, que permitan confirmar los hallazgos obtenidos en los ensayos mencionados y de este modo, aplicar tratamientos en base a estos probióticos de forma segura, controlada y con los medios adecuados para así mejorar la salud de pacientes con enfermedad de Crohn en sus distintas etapas.

5.4.3 Estudios clínicos sobre el uso de probióticos en la enfermedad de Crohn

En la mayoría de los ensayos clínicos que han usado probióticos en la EC se han realizado en personas con la enfermedad en remisión, esta medida es para evitar la recurrencia endoscópica y/o posible reactivación clínica. Los ensayos controlados sugieren beneficios en la sintomatología de los pacientes posterior al consumo de probióticos.

Prantera et al (2001)(141) estudiaron si la ingesta vía oral durante un año del probiótico *L. rhamnosus* (LGG, por corresponder a la cepa Gorbach-Goldin) prevenía o reducía las lesiones de Crohn recurrentes después de una cirugía de extirpación del intestino dañado.

Para esto, contaron con 45 pacientes, de los cuales a 23 se les suministraron 2 bolsas al día de Dicoflor, correspondiente a 6×10^9 UFC de LGG durante un período de 52 semanas, realizándose seguimientos a las semanas 13, 26, 39 y 52 de tratamiento. Los otros 22 pacientes sólo recibieron placebo.

Como resultado, se sospechó recurrencia clínica en el 16,6% de los pacientes tratados con LGG (24, 29 y 46 semanas) y en el 10,5% de los tratados con placebo (a las 13 y 15 semanas). A la semana 52, el 83,3% de los tratados con LGG y el 89,4% tratados con placebo continuaron en remisión clínica. Entre estos, el 60,0% de los tratados con el probiótico mostraron lesiones endoscópicas recurrentes en comparación con el 35,3% de los pacientes del grupo placebo.

Por lo tanto, la asignación al azar de ensayos controlados sobre el uso de probióticos en la EC han sido hasta la fecha decepcionantemente negativas. No lograron demostrar ningún efecto de *L. rhamnosus* GG ($n=23$) en comparación con el placebo ($n=22$) en la prevención de la recurrencia postoperatoria en la enfermedad de Crohn.

Un resultado similar se obtuvo en el estudio realizado por A. Van Gossum et al (2007) (142) en donde 70 pacientes adultos entre los 18 y 65 años de edad, con EC fueron inscritos antes de la resección ileocecal electiva y asignados aleatoriamente después de la cirugía al tratamiento diario con *Lactobacillus johnsonii*, LA1, Nestec (10^{10} UFC) (grupo A, $n = 34$) o placebo (grupo B, $n = 36$) durante 12 semanas. El objetivo principal de esta investigación, fue

evaluar el efecto de LA1 en la tasa de recurrencia endoscópica a las 12 semanas post operatorio. La estratificación se realizó según el estado de fumador en el momento de la aleatorización.

El tratamiento consistió en el probiótico *L. johnsonii*, (LA1, Nestec) en forma de liofilizado (10^{10} UFC/día) suministrados en combinación con una fórmula enteral a razón de 120 ml/día durante 12 semanas, en donde no se permitió ningún otro medicamento (incluidos los agentes antidiarreicos), ni tampoco otros productos fermentados ni yogures durante ese período.

La tasa de recaída se definió por un CDAI (Índice de actividad de la enfermedad de Crohn), >150 , el cual consiste en que el individuo está en remisión sintomática (CDAI <150) cuando se encuentra asintomático o sin secuelas inflamatorias sintomáticas. Los pacientes que requieren el uso de corticosteroides para su bienestar son “dependientes de esteroides” por ende, no se consideran como individuos en remisión. Los que tienen una enfermedad leve a moderada (CDAI 150-220) son ambulatorios y toleran la alimentación oral. Los que poseen una enfermedad moderada o severa (CDAI 220-450) no han respondido al tratamiento o sufren síntomas más graves y los que cursan con enfermedad grave tienen un CDAI >450 . con un aumento igual o mayor a 70 puntos el inicio de la enfermedad (142).

En base a la selección de pacientes en remisión por medio de la CDAI, 70 pacientes del estudio fueron aleatorizados asignándose un total de 34 pacientes al grupo LA1 y 36 al grupo placebo.

Después de 3 meses de tratamiento, la puntuación endoscópica media no fue significativamente diferente entre los dos tratamientos. El porcentaje de pacientes con recurrencia leve a moderada fue del 50% y 48% en los grupos LA1 y placebo, respectivamente. El porcentaje de pacientes con recidiva grave fue del 21% y del 15 % en los grupos LA1 y placebo, respectivamente.

Después de 4, 8 y 12 semanas de tratamiento, no hubo una modificación significativa de CDAI entre ambos tratamientos. Los niveles séricos diferenciales de PCR (nivel sérico a los 3 meses - nivel sérico en la cirugía) entre ambos grupos de tratamiento no fueron significativamente diferentes . En efecto, este estudio no logró comprobar ningún efecto protector de LA1 sobre la recurrencia endoscópica temprana en pacientes con EC que se

sometieron a una resección ileocecal. Además, la puntuación histológica, los parámetros inflamatorios séricos y la tasa de recaída clínica fueron similares en ambos grupos de tratamiento (142). Este corresponde al segundo estudio publicado posterior al realizado por Prantera et al (2001), en donde ambos obtuvieron conclusiones similares respecto al fracaso del tratamiento (141).

Los pacientes en estudio fueron asignados aleatoriamente a uno de los siguientes tratamientos de mantenimiento durante seis meses: Grupo A (16 pacientes): mesalazina 500 mg en una preparación de liberación sostenida en microgránulos de etil-celulosa (Pentasa), dos cápsulas tres veces al día; o grupo B (16 pacientes): *Saccharomyces boulardii* 500 mg dos cápsulas por la mañana + Pentasa 500 mg dos cápsulas dos veces al día. Los pacientes fueron controlados al ingreso y después de tres y seis meses de tratamiento (o antes si los síntomas empeoraron) y se calculó el CDAI correspondiente.

Una recaída clínica se definió como CDAI >150 con un aumento de 100 puntos sobre los valores basales durante más de dos semanas.

Todos los pacientes completaron el estudio sin reportar ningún efecto secundario. Se observaron recaídas clínicas a los seis meses en 6 de los 16 pacientes con mantenimiento estándar de mesalazina y en 1 de los 16 pacientes que recibieron también *S. boulardii*. Siendo la diferencia estadísticamente. En este ensayo, se observaron recaídas clínicas de la enfermedad de Crohn en un grado significativamente menor en pacientes en tratamiento de mantenimiento con mesalazina más *Saccharomyces boulardii* (6,25%) que en sujetos que recibieron mesalamina sola (37,5%).

Sin embargo, estos resultados se contradicen con los encontrados en un estudio realizado posteriormente por A. Bourreille et al (2013) (143), Quienes utilizaron el probiótico denominado FLORABEST. Se trató de un ensayo aleatorizado, doble ciego, controlado con placebo, de 52 semanas de duración, cuyo objetivo era evaluar la eficacia profiláctica de *S. boulardii* en pacientes con EC.

Los pacientes fueron asignados al azar para recibir tratamiento oral de *S. boulardii* en una dosis diaria de 1 g o un placebo de presentación idéntica. Los tratamientos se iniciaron 4 semanas después de lograr la remisión de la EC y continuaron hasta el final del estudio en la

semana 52 o antes, luego de una visita de control en caso de recaída. Los pacientes fueron seguidos cada 12 semanas hasta el final del ensayo y luego fueron vistos 3 meses después para evaluar el porcentaje de recaídas.

Se determinaron las puntuaciones de CDAI, los hemogramas completos, la proteína C reactiva (PCR) y las tasas de sedimentación globular (VSG) en cada visita de seguimiento y en el caso de una recaída. Las recaídas se definieron por un CDAI superior a 220 puntos, por un CDAI entre 150 y 220 con un aumento de al menos 70 puntos sobre el valor basal, o por la necesidad de un procedimiento quirúrgico o la necesidad de iniciar un tratamiento médico específico para EC. El tiempo hasta la recaída se calculó desde el comienzo de la medicación del estudio hasta la fecha de la recaída o el final del ensayo.

La población para la evaluación de la eficacia incluyó a todos los pacientes aleatorizados que recibieron al menos una dosis del tratamiento del estudio y con al menos una medición variable durante el tratamiento disponible después de la inclusión, es decir, población por intención de tratar modificada (mITT). La población de seguridad incluyó a todos los pacientes que recibieron al menos una dosis del tratamiento del estudio.

De los 196 pacientes inscritos en el ensayo, 31 no cumplieron con los criterios de inclusión, principalmente porque no alcanzaron la remisión ($n=20$); 165 fueron aleatorizados y 84 fueron asignados para recibir *S. boulardii* y 81 para recibir el placebo. Seis pacientes no tenían datos para la evaluación del efecto del producto del estudio y se excluyeron de la población mITT. La eficacia se evaluó en los 159 pacientes restantes, 80 de los cuales fueron asignados al grupo de *S. boulardii* y 79 al grupo de placebo. La población por protocolo (PP) consistió en 125 pacientes, después de la exclusión de 34 pacientes por desviaciones importantes del protocolo. Las características basales fueron similares en los 2 grupos excepto por la localización de la enfermedad.

Para la semana 52, 80 pacientes habían experimentado una recaída, 38 (47,5%) en el grupo de *S. boulardii* y 42 (53,2%) en el grupo de placebo.

El porcentaje de recaídas durante el período de retiro del tratamiento de brote inicial fue similar en los 2 grupos, 18 (22,5%) en el grupo *S. boulardii* y 24 (30,4%) en el grupo

placebo ($p=0,26$). Un total de 14 pacientes (8,8%) recayeron tras la suspensión del tratamiento, 5 en el grupo *S. boulardii* y 9 en el grupo placebo (NS).

El CDAI medio disminuyó a lo largo del período de tratamiento en ambos grupos. Después del ajuste en el CDAI en la aleatorización y en el factor de estratificación, los cambios medios del CDAI desde el valor inicial en el punto final fueron 79,7 y 69,0 puntos en los grupos de *S. boulardii* y placebo, respectivamente. El efecto del factor de estratificación no fue estadísticamente significativo ($p=0,99$).

La interacción entre el grupo de tratamiento y el tabaquismo fue estadísticamente significativa ($p=0,016$). Los no fumadores que recibieron placebo tuvieron más recaídas (72,0%) que los tratados con *S. boulardii* (34,5%). Sin embargo, en fumadores y ex fumadores, la proporción de recaídas no fue significativamente diferente. Al ajustar por el factor de estratificación, los no fumadores tratados con *S. boulardii* tenían menos probabilidades de recaer que los que recibieron placebo, pero cuando se agruparon los no fumadores y los exfumadores, la el efecto de *S. boulardii* no siguió siendo estadísticamente significativo.

En general, en este ensayo la levadura probiótica *S. boulardii* fue bien tolerada pero no logró prevenir las recaídas clínicas durante el período de seguimiento de 1 año. Los pacientes con EC no grave representan el objetivo más atractivo para los probióticos, porque se cuestiona la eficacia terapéutica de la mesalamina y el uso a largo plazo de inmunosupresores y terapias biológicas conlleva el riesgo de EA graves. Por lo tanto, se excluyó deliberadamente a los pacientes con enfermedad grave (143).

La recurrencia clínica se eligió como criterio principal de valoración porque no se consideró necesaria la evaluación endoscópica para la vigilancia de la EC no grave. Además, en el momento en que se diseñó el estudio, el concepto de curación de la mucosa no se consideró tan relevante como ahora; por lo tanto, el control endoscópico no se programó sistemáticamente durante el seguimiento. Se midieron los parámetros biológicos de la inflamación en cada visita para asegurar que la recurrencia clínica estuviera asociada con la inflamación objetiva.

El número de pacientes y la duración de 1 año del ensayo se decidieron para garantizar suficiente poder estadístico y relevancia clínica. Los pacientes se estratificaron según el tipo de

tratamiento administrado durante el brote inicial, es decir, ya sea corticosteroides o salicilatos. Esta estratificación se planeó para evaluar un beneficio potencial de *S. boulardii* en pacientes con una enfermedad menos grave que no requieren esteroides. Desafortunadamente, entre los 159 pacientes de la población mITT, 28 fueron tratados con salicilatos sólo de acuerdo con la modesta eficacia de los salicilatos para inducir la respuesta o remisión de la EC.

Sin embargo, los resultados fueron muy similares en los 2 grupos, haciendo la hipótesis de un error de tipo II muy poco probable. Las características demográficas y clínicas de los pacientes estaban bien equilibradas entre los 2 grupos excepto por la localización de la enfermedad. Para descartar un posible sesgo, se realizó un análisis post hoc para determinar las variables potencialmente relacionadas con el riesgo de recaída. El análisis multivariado demostró que la localización de la enfermedad no influía en el riesgo de recaída.

También se evaluó el efecto del tabaquismo sobre la eficacia de *S. boulardii*, ya que previamente se ha demostrado que el tabaquismo aumenta el riesgo de brote de la enfermedad (144). En los pacientes con EC que recibieron *S. boulardii*, los porcentajes de recaída fueron del 54,5%, 55,6%, y 34,5% en fumadores, exfumadores y no fumadores, respectivamente. En pacientes que recibieron placebo, el porcentaje de recaída fue mayor en no fumadores (72,0%) que en fumadores (48,5%) y exfumadores (38,1%). Los no fumadores tratados con *S. boulardii* tenían menos probabilidades de experimentar una recaída que los que recibieron placebo. Sin embargo, este efecto beneficioso desapareció cuando los no fumadores y los fumadores anteriores se agruparon en un solo grupo. La interferencia entre *S. boulardii* y el tabaquismo sigue siendo especulativa, especialmente porque los efectos de la levadura y el tabaco en el tracto gastrointestinal son poco conocidos. Por lo tanto, no se puede excluir formalmente que el beneficio observado pueda ser consecuencia de una tasa de recaída anormalmente alta en los no fumadores tratados con placebo.

El probiótico fue bien tolerado y el número de eventos adversos y eventos adversos graves fue similar en ambos grupos de tratamiento. El cumplimiento fue excelente, siempre superior al 90%, y se obtuvieron resultados similares en la población PP, lo que demuestra que los resultados no se deben a un mal cumplimiento o desviación del protocolo.

Es importante señalar que los probióticos difieren fuertemente entre cepas, y no es posible extrapolar un efecto positivo o negativo obtenido con una cepa a otra. Las limitaciones

de este estudio son la ausencia de datos endoscópicos, debido a que no se realizó de forma rutinaria durante el período de estudio y además, el número limitado de pacientes tratados con salicilatos para su brote inicial. No obstante, el diseño y el elevado número de pacientes con enfermedad no grave, permiten obtener conclusiones firmes sobre los efectos de *S. boulardii* en la EC. Determinando así, que *S. boulardii* a una dosis diaria de 1g, no mostró ningún efecto beneficioso como terapia preventiva en pacientes con EC moderadamente grave.

La diferencia en los resultados planteados en los estudios realizados con *S. boulardii*, puede tener relación con el método aplicado para administrar el tratamiento, ya que en el ensayo de A. Bourreille et al (2013) (143), el probiótico se administró en cápsulas y en conjunto con pentasa y además, para obtener más información respecto a la evolución de los pacientes durante el estudio, se realizaron endoscopías periódicas para evaluar también el proceso inflamatorio que cursaban los individuos. Es de esperar que en el futuro, nuevos estudios aporten mayor información respecto a la eficacia de *S. boulardii*, que permita complementar los datos presentes en la literatura actual, sumado a otros factores que puedan influir en los resultados obtenidos.

Tabla 2. Acción de cepas probióticas sobre pacientes con enfermedad de Crohn.
Elaboración propia Figueroa, J. Vásquez, S. (2022)

Cepa de probiótico	Dosis usada	Comentario	Referencia
<i>Lactobacillus casei</i> subespecie <i>rhamnosus (LGG)</i>	Dicoflor en bolsas de 2.46 g que equivale a 6 mil millones de UFC/ 2 veces al día	No lograron demostrar ningún efecto de <i>L. rhamnosus</i> GG ($n=23$) en comparación con el placebo ($n=22$) en la prevención de la recurrencia postoperatoria en la enfermedad de Crohn.	C. Prantera et al (2001) (141)

<i>Lactobacillus johnsonii</i> (LA1, Nestec)	Forma liofilizada y mezclada con maltodextrina a razón de 10 ¹⁰ UFC/ 1 vez al día	No lograron comprobar algún efecto protector de LA1 sobre la recurrencia endoscópica temprana en pacientes con EC posterior a una resección ileocecal	A. Van Gossum et al (2007) (142)
<i>Saccharomyces boulardii</i>	1 gr por día	<i>S. boulardii</i> fue bien tolerada pero no consiguió prevenir las recaídas clínicas durante el período de seguimiento	A. Bourreille et al (2013) (143)
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917 <i>E. coli</i> K12 C600 control no probiótico	Cultivó en placa El número de <i>E. coli</i> Nissle 1917 se determinó restando el número de unidades formadoras de colonias recuperadas en placas	Estudio in vitro Demuestra que la <i>E. coli</i> Nissle 1917 ejerce un efecto inhibitor y específico sobre la adhesión de AIEC a las células epiteliales	Boudeau J et al (2003) (139)
<i>Escherichia coli</i> Nissle 1917	Cultivo en placa	El primero que sabemos que muestra que EcN puede reducir algunos de los efectos negativos asociados con la cepa LF82 en	Huebner C y col (2011) (140)

		una infección AIEC ya establecida	
--	--	-----------------------------------	--

6. CONCLUSIONES

La falta de mantenimiento de la homeostasis intestinal, conduce a cambios negativos en el metabolismo del huésped conduciendo a diversas enfermedades gastrointestinales inflamatorias. En este contexto, los probióticos se presentan como una estrategia promisoriosa para tratar la disbiosis, evidenciando su capacidad de restaurar la diversidad microbiana y disminuir la adhesión de agentes patógenos a la mucosa intestinal, mediante diversos mecanismos que aún no son completamente dilucidados.

Las investigaciones de probióticos realizadas para determinar sus efectos en la enfermedad de Crohn difieren sorpresivamente dependiendo de la cepa utilizada. Así mismo, se presentaron ensayos con resultados que se contraponen con otros, en donde evalúa la eficacia de la misma cepa.

En pacientes con enfermedad de Crohn luminal colónica o íleo-colónica, tratados con *Lactobacillus* y/o *Saccharomyces boulardii*, el tratamiento a largo plazo con probióticos no expone beneficios certeros en el mantenimiento de la remisión lograda por medio de la atención de la patología. Por otra parte, los datos recopilados en los estudios sobre el efecto del consumo de probióticos en la prevención de la remisión de la enfermedad, evidenciado en las endoscopías postoperatorias no son concluyentes, siendo necesaria la realización de más estudios para llegar a resultados convincentes sobre su acción.

Por otra parte, estudios que proponen a la cepa *E. coli* Nissle 1917 como tratamiento para pacientes con enfermedad de Crohn, fueron coincidentes al concluir que EcN protege a las células epiteliales intestinales de la respuesta asociada a la inflamación causada por la cepa LF82 al reducir la invasión de patógenos y modular la expresión de citoquinas.

Es importante considerar que es necesario disponer de ensayos más completos, que abarquen a una población lo suficientemente significativa, de modo que se puedan implementar los resultados en pacientes con remisión de la enfermedad de Crohn en sus distintas fases y variaciones, y así brindarles un mejor estilo de vida.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Li J, Jia H, Cai X, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* 2014;32(8):834-41. DOI: 10.1038/nbt.2942
2. Oelschlaeger, T.A. Mechanisms of probiotic actions—A review. *Int. J. Med. Microbiol.* 2010, 300, 57–62.
3. Vieira AT, Fukumori C, Ferreira CM. Nuevos conocimientos sobre estrategias terapéuticas para la modulación de la microbiota intestinal en enfermedades inflamatorias. *Clin Transl Immunology* 2016; 5: e87.
4. Mendes MCS, Paulino DS, Brambilla SR, Camargo JA, Persinoti GF, Carvalheira JBC. La modificación de la microbiota mediante la suplementación con probióticos reduce el cáncer de colon asociado a la colitis en ratones. *World J Gastroenterol* 2018; 24: 1995-2008.
- 5.- Walker AW, Duncan SH, McWilliam Leitch EC, Child MW, Flint HJ. pH and peptide supply can radically alter bacterial populations and short-chain fatty acid ratios within microbial communities from the human colon. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71:3692-700; PMID:16000778; <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.71.7.3692-3700.2005>
6. Gorbach, S. 2000. Probiotics and gastrointestinal health. *The American Journal of Gastroenterology*, 95(1), S2–S4. doi:10.1016/s0002-9270(99)00806-0
7. Doherty, S., Gee, V., Ross, R., Stanton, C., Fitzgerald, G., Brodkorb, A., 2011. Desarrollo y caracterización de microperlas de proteína de suero como matrices potenciales de protección probiótica. *Hidrocoloides alimentarios*, 1604-1617.
8. Aguilar Toalá JE, García Varela R, García HS, Mata Haro V, González Córdova AF, Vallejo Córdoba B, et al. Postbióticos: un término en evolución dentro del campo de los alimentos funcionales. *Trends Food Sci Technol.* (2018) 75: 105-14. doi: 10.1016 / j.tifs.2018.03.009
9. Minsal. (2017, primavera). Resolución 860/17. Minsal. <https://www.carey.cl/download/filebase/newsalert/res-n-3435-probioticos.pdf>
10. Sheila M. Dreher Lesnick. (2019, mayo 10). FDA developing improved methodology for determining purity of probiotic products. US. FOOD AND DRUG. <https://www.fda.gov/vaccines-blood-biologics/science-research-biologics/fda-developing-improved-methodology-determining-purity-probiotic-products>
11. Bresson JR, Flynn A, Heinonen M, Hulshof K, Korhonen H, Lagiou P, Løvik M, Marchelli R, Martin A, Moseley B, Palou A, Przyrembel H, Salminen S, Strain S, Strobel S, Tetens I, Van den Berg H, Van Loveren H, Verhagen H (2008). LACTORAL and building of the natural

intestinal barrier - Scientific substantiation of a health claim related to LACTORAL (a combination of three probiotic strains: *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*) and building of the natural intestinal barrier pursuant - Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies. European Food Safety Authority (EFSA).

12. MINSAL. Protocolo 2016 Tratamiento con Infliximab o Adalimumab en la Enfermedad de Crohn grave o Enfermedad de Crohn con fístulas perianales complejas [Internet]. 2016. Available from: http://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/08/7_Protocolo-EC-1.pdf

13. Markowiak P, Slizewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. MDPI. 2017 Jul 24.

14. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006 Feb 24;124(4):837-48. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.017. PMID: 16497592.

15. Muller H, De Toledo FW, Resch KL Fasting followed by vegetarian diet in patients with rheumatoid arthritis: A systematic review. *Scand J Rheumatol*, 30 (2001), pp. 1-10. Medline.

16. Wolever TM, Spadafora P, Eshuis H. Interaction between colonic acetate and propionate in humans. *Am J Clin Nutr*, 53 (1991), pp. 681-687 Artículo. Medline.

17. Scheppach W. Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*, 35 (1994), pp. S35-S38. Medline.

18. Ruiz Alvarez Y, Peña P, Rodríguez Acosta M. Microbiota intestinal, sistema inmune y obesidad. *Revista Cubana Invest Biomed*, (2012), pp. 29

19. Bermudez Brito M, Plaza Díaz J, Muñoz Quezada S, Gómez Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* 2012;61:160–74.

20. Cani PD. Gut microbiota — at the intersection of everything? *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017;14:321–2.

21. Vieira AT, Fukumori C, Ferreira CM. New insights into therapeutic strategies for gut microbiota modulation in inflammatory diseases. *Clin Transl Immunology* 2016;5:e87.

22. Cicenía, A, Scirocco A, Carabotti M, Pallotta L, Marignani M, y Severi C. (2014). Postbiotic activities of lactobacilli-derived factors. *Journal of Clinical Gastroenterology* 48, 18-22.

23. Collado MC, Gueimonde M, Salminen S. Probiotics in adhesion of pathogens: mechanisms of action. In: Watson RR, Preedy VR, editors. *Bioactive foods in promoting health: probiotics and prebiotics*. 1st ed. London: Academic Press, Elsevier; 2010. p. 353–70.

24. Sanders ME, Heimbach JT, Pot B, Tancredi DJ, Lenoir-Wijnkoop I, Lähteenmäki-Uutela A, Gueimonde M, Bañares S. Health claims substantiation for probiotic and prebiotic products. *Gut Microbes*. 2011 May-Jun;2(3):127-33. doi: 10.4161/gmic.2.3.16174. Epub.
25. Kumar M, Nagpal R, Verma V, Kumar A, Kaur N, Hemalatha R, Gautam SK, Singh B. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutr Rev* 2013;71:23–34.
26. Borrueal N, Carol M, Casellas F, Antolin M, De Lara F, Espin E, et al. Increased mucosal tumour necrosis factor alpha production in Crohns disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* 2002; 51(5):659-664
27. Seon Kyun SK, Kim YT, Kwon J, Kim H, Jae Hyoung C, Bum Kim H, et al. Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. *JMB [Internet]*. 2019 Jul 1 [cited 2022 Apr 14]; Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0966842X21000056>
28. Bermudez Brito M, Plaza Díaz J, Muñoz Quezada S, Gómez Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab*. 2012; 61: 160-74.
29. Plaza Diaz J, Ruiz Ojeda FJ, Gil Campos M, Gil A. Mechanisms of action of probiotics. *Adv Nutr*. 2019; 10(suppl_1): S49-66.
30. Ogunbanwo S, Sanni A, Onilude A. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocina by *Lactobacillus brevis* OG1. *African J. of Biotech.*, 2 (7), 179-184. 2003.
31. Le Mair F, et al. *Probióticos y prebióticos. Guías Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología* (Febrero de 2007). Available from: <https://www.worldgastroenterology.org/UserFiles/file/guidelines/probiotics-and-prebiotics-spanish-2017.pdf>
32. Millette C, Dupont F, Shareck MT, Ruiz D, Archambault M. Purification and identification of the pediocin produced by *Pediococcus acidilactici* MM33, a new human intestinal strain, *J. of Appl. Microbiol.*, 104, 269-275, 2008.
33. Apajalahti J. Comparative Gut Microflora, Metabolic Challenges, and Potential Opportunities. *Journal of Applied Poultry Research*. 2005 Jul 2;vol 14.
34. Lorea Baroja M, Kirjavainen PV, Hekmat S, Reid G. Anti-inflammatory effects of probiotic yogurt in inflammatory bowel disease patients. *Clin Exp Immunol*. 2007 Sep;149(3):470-9. doi: 10.1111/j.1365-2249.2007.03434.x. Epub 2007 Jun 22. PMID: 17590176; PMCID: PMC2219330.
35. Cremonini F, Di Caro S, Nista EC, Bartolozzi F, Capelli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic-associated diarrhoea.

Aliment Pharmacol Ther. 2002 Aug;16(8):1461-7. doi: 10.1046/j.1365-2036.2002.01318.x. PMID: 12182746f.

36. Bermudez Brito M, Plaza Díaz J, Muñoz Quezada S, Gómez Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* 2012;61:160–74.

37. Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:8344–

38. Vila J, Soriano A, Mensa J. Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos, *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, Volume 26, Issue 1, 2008, Pages 48-55, ISSN 0213-005X.

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0213005X0872651X>.

39. Staal SP. Molecular cloning of the akt oncogene and its human homologues AKT1 and AKT2: amplification of AKT1 in a primary human gastric adenocarcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1987 Jul;84(14):5034-7

40. Zhang W, Zhu YH, Yang JC, Yang GY, Zhou D, Wang JF. A selected *Lactobacillus rhamnosus* strain promotes Egfr-independent Akt activation in an enterotoxigenic *Escherichia coli* k88-infected IPEC-J2 cell model. *PLoS One* 2015;10:e0125717.

41. Bermudez Brito M, Plaza Díaz J, Muñoz Quezada S, Gómez Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab* 2012;61:160–74.

42. Kumar M, Dhaka P, Vijay D, Vergis J, Mohan V, Kumar A, Kurkure NV, Barbuddhe SB, Malik SVS, Rawool DB. Antimicrobial effects of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus* against multidrug-resistant enteroaggregative *Escherichia coli*. *Int J Antimicrobial Agents* 2016;48:265–70.

43. Ducrotte P, Sawant P, Jayanthi V. Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol* 2012;18:4012–8.

44. McFarland VL. Probiotics for the primary and secondary prevention of *C. difficile* infections: a meta-analysis and systematic review. *Antibiotics (Basel)* 2015;4:160–78.

45. Aggarwal S, Upadhyay A, Shah D, Teotia N, Agarwal A, Jaiswal V. *Lactobacillus GG* for treatment of acute childhood diarrhoea: an open labelled, randomized controlled trial. *Indian J Med Res* 2014;139:379–85.

46. Mirnejad R, Vahdati AR, Rashidani J, Erfani M, Piranfar V. The antimicrobial effect of *Lactobacillus casei* culture supernatant against multiple drug resistant clinical isolates of *Shigella sonnei* and *Shigella flexneri* in vitro. *Iran Red Crescent Med J* 2013;15:122–6.

47. Ortega C, Fernández Román M. (2018). Trabajo fin de grado aplicaciones clínicas de los probióticos. Facultad de farmacia Universidad Complutense.
48. Fajardo Argoti C, Jurado Gámez H, Parra Suescún J. Viabilidad de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado bajo condiciones gastrointestinales simuladas e inhibición sobre *Escherichia coli* O157:H7. *rev.udca actual.divulg.cient.* 2021 June. Available from: www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262021000100014&lng=en.
49. Heredia Castro P, Hernández Mendoza A, González Córdova A, Vallejo Cordoba B. 2017. Bacteriocinas de bacterias ácido lácticas: mecanismos de acción y actividad antimicrobiana contra patógenos en quesos. *Interciencia.* 42(6):340-346. 10.1093/ajcp/45.4_ts.493
50. Vera Mejía R, Ormaza Donoso J, Muñoz Cedeño J, Arteaga Chávez F, Sánchez Miranda L. 2018. Cepas de *Lactobacillus plantarum* con potencialidades probióticas aisladas de cerdos criollos. *Revista de Salud Animal.* 40(2):e04.
51. Cotter PD, Hill C, Ross RP. Bacteriocins: developing innate immunity for food, *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 777-788. 2005
52. Svetoch EA, Eruslanov B, Pereygin V, Mitsevich EV, Mitsevich PI, Borzenkov V, Levchuk NV, Svetoch OE, Kovalev YN, Stepanshin YG, Siragusa NG, Bruce RS, Norman JS. Diverse Antimicrobial Killing by *Enterococcus faecium* E 50-52 Bacteriocin., *J. Agric. Food Chem.* 56, 1942-1948., 2008.
53. Sánchez L, Omura M, Lucas A, Pérez T, Llanes M, Ferreira CL. 2015. Cepas De *Lactobacillus* Spp. Con Capacidades Probióticas Aisladas Del Tracto Intestinal De Terneros Neonatos. *Rev Salud Anim.* 37(2):94-104.
54. Tejero Sarinena S, Barlow J, Costabile A, Gibson GR, Rowland I. Antipathogenic activity of probiotics against *Salmonella Typhimurium* and *Clostridium difficile* in anaerobic batch culture systems: is it due to synergies in probiotic mixtures or the specificity of single strains? *Anaerobe* 2013;24:60e5
55. Kareem KY, Ling FH, Chwen LT, Foong OM, Asmara SA. Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of *Lactobacillus plantarum* using reconstituted media supplemented with inulin. *Gut Pathog* 2014;6:1e7
56. Islam SU. Clinical uses of probiotics. *Medicine (Baltimore)* 2016;95:1e5.
57. Simova ED, Beshkova DB, Dimitrov P. Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. *J Appl Microbiol* 2009;106:692e701.

58. Ammor S, Tauveron G, Dufour E, Chevallier I. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small- scale facility. Screening and characterization of the antibacterial compounds. *Food Control* 2006;17:454e61
59. Figueroa-Gonzalez I, Cruz-Guerrero A, Quijano G. The benefits of probiotics on human health. *J Microb Biochem Technol* 2011;S1:003
60. Weinberg A, Quinones Mateu ME, Lederman MM. Role of human beta-defensins in HIV infection. *Adv Dent Res* 2006;19:42–48.
61. Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou, N, Fakiri E. Health benefits of probiotics: A review. *ISRN Nutr.* 2013, 2013, 481651.
62. Plaza Diaz J, Ruiz Ojeda FJ, Gil Campos M, Gil A. Mechanisms of Action of Probiotics, *Advances in Nutrition*, Volume 10, Issue suppl_1, January 2019, Pages S49–S66
63. Trevisan C, Bergamo E, Contiero J, Hojo O, Monti. Inmovilización de betagalactosidasa en silicona de poro controlado. *Braz. J. Microbiol. (Revista en línea)*.14 (1): 185-200.
64. Guadalupe C, Saez GD, Palacios JM, Zarate GV. Assesment of β -galactosidase activity of gras bacteria in order to select strains for probiotic/prebiotic purposes. Editorial: Universidad de San Pablo - Tucumán. 2017
65. Rowland IR, Rumney CJ, Coutts JT, Lievens LC. Effect of *Bifidobacterium longum* and inulin on gut bacterial metabolism and carcinogen-induced aberrant crypt foci in rats. *Carcinogenesis*. 1998 Feb;19(2):281-5. doi: 10.1093/carcin/19.2.281. PMID: 9498277.
66. Goldin BR. In situ bacterial metabolism and colon mutagens. *Annu Rev Microbiol.* 1986;40:367-93. doi: 10.1146/annurev.mi.40.100186.002055. PMID: 3535648.
67. Goldin BR, Gorbach SL. The relationship between diet and rat fecal bacterial enzymes implicated in colon cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1976 Aug;57(2):371-5. doi: 10.1093/jnci/57.2.371. PMID: 1003518.
68. Lombardi P, Goldin B, Boutin E, Gorbach SL. Metabolism of androgens and estrogens by human fecal microorganisms. *J Steroid Biochem.* 1978 Aug;9(8):795-801. doi: 10.1016/0022-4731(78)90203-0. PMID: 713557.
69. Winter J, Bokkenheuser VD. Bacterial metabolism of natural and synthetic sex hormones undergoing enterohepatic circulation. *J Steroid Biochem.* 1987;27(4-6):1145-9. doi: 10.1016/0022-4731(87)90201-9. PMID: 3320550.
70. Asano Y, Hiramoto T, Nishino R, Aiba Y, Kimura T, Yoshihara K, Koga Y, Sudo N. Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in

the gut lumen of mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2012 Dec 1;303(11):G1288-95. doi: 10.1152/ajpgi.00341.2012. Epub 2012 Oct 11.

71. Kim DH, Jin YH. Intestinal bacterial beta-glucuronidase activity of patients with colon cancer. *Arch Pharm Res*. 2001 Dec;24(6):564-7. doi: 10.1007/BF02975166. PMID: 11794536.

72. Grosse L, Pâquet S, Caron P, Fazli L, Rennie PS, Bélanger A, Barbier O. Androgen glucuronidation: an unexpected target for androgen deprivation therapy, with prognosis and diagnostic implications. *Cancer Res*. 2013 Dec 1;73(23):6963-71. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1462. Epub 2013 Oct 11. PMID: 24121496.

73. Gloux K, Anba Mondoloni J. Unique β -Glucuronidase Locus in Gut Microbiomes of Crohn's Disease Patients and Unaffected First-Degree Relatives. *PLoS One*. 2016 Jan 29;11(1):e0148291. doi: 10.1371/journal.pone.0148291. PMID: 26824357; PMCID: PMC4732671.

74. Kulkarni N, Reddy BS. Inhibitory effect of *Bifidobacterium longum* cultures on the azoxymethane-induced aberrant crypt foci formation and fecal bacterial β -glucuronidase. *Exptal Biol Med* 1994;207:278–83.

75. Buss C, Valle Tovo C, Miozzo S, Alves de Mattos A. Probiotics and synbiotics may improve liver aminotransferases levels in non-alcoholic fatty liver disease patients. *Ann Hepatol* 2014;13:482–

76. Begley M, Hill C, Gahan CG. (2006). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(3), 1729–1738.

77. Roberts MS, Magnusson BM, Burczynski FJ, Weiss M. (2002). *Clinical Pharmacokinetics*, 41(10), 751–790.

78. Russell DW. (2009). *Journal of Lipid Research*, 50, S120–S125.

79. Lye HS, Rahmat Ali GR, Liong MT. (2010). *International Dairy Journal*, 20(3), 169–175

80. Wang, D. Q. (2003). *Annals of Hepatology*, 2(3), 113–121.

81. D'Amelio P, Sassi F. Gut microbiota, immune system, and bone. *Calcif Tissue Int* 2017;102(4):415–25

82. Plaza Diaz J, Gomez Llorente C, Campaña Martin L, Matencio E, Ortuño I, Martínez Silla R, Gomez Gallego C, Periago MJ, Ros G, Chenoll E et al. Safety and immunomodulatory effects of three probiotic strains isolated from the feces of breast-fed infants in healthy adults: SETOPROB study. *PLoS One* 2013;8:e78111.

83. Gómez Llorente C, Muñoz S, Gil A. Role of toll-like receptors in the development of immunotolerance mediated by probiotics. *Proc Nutr Soc* 2010;69:381–9.

84. Brunser T O. El desarrollo de la microbiota intestinal humana, el concepto de probiótico y su relación con la salud humana. *Rev Chil Nutr.* 2013 Jul 9;vol 40.
85. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature* 2011;474:327-36.
86. Macpherson AJ, Harris NL. Interactions between commensal intestinal bacteria and the immune system. *Nat Rev Immunol* 2004;4:478-85.
87. Min YW, Rhee PL. The Role of Microbiota on the Gut Immunology. *Clin Ther* 2015;37:968-75.
88. Wu HJ, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes* 2012;3:4-14
89. Smits HH, Engering A, Van der Kleij D, de Jong EC, Schipper K, van Capel TM, et al. Selective probiotic bacteria induce IL-10-producing regulatory T cells in vitro by modulating dendritic cell function through dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin. *J Allergy Clin Immunol* 2005;115:1260-7.
90. Konstantinov SR, Smidt H, de Vos WM, Bruijns SC, Singh SK, Valence F, et al. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:19474-9.
91. Kwon HK, Lee CG, So JS, Chae CS, Hwang JS, Sahoo A, et al. Generation of regulatory dendritic cells and CD4⁺FoxP3⁺ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010;107:2159-64.
92. Uronis JM, Muhlbauer M, Herfarth HH, Rubinas TC, Jones GS, Jobin C. Modulation of the intestinal microbiota alters colitis-associated colorectal cancer susceptibility. *PLoS One* 2009;4:e6026.
93. Giorgetti G, Brandimarte G, Fabiocchi F, Ricci S, Flamini P, Sandri G, Trotta MC, Elisei W, Penna A, Lecca PG et al. Interactions between innate immunity, microbiota, and probiotics. *J Immunol Res* 2015:501361
94. Wang H, Gao K, Wen K, Allen IC, Li G, Zhang W, Kocher J, Yang X, Giri-Rachman E, Li GH et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG modulates innate signaling pathway and cytokine responses to rotavirus vaccine in intestinal mononuclear cells of gnotobiotic pigs transplanted with human gut microbiota. *BMC Microbiol* 2016;16(1):109.
95. Sierra S, Lara Villoslada F, Sempere L, Olivares M, Boza J, Xaus J. Intestinal and immunological effects of daily oral administration of *Lactobacillus salivarius* CECT5713 to healthy adults. *Anaerobe* 2010;16:195–200.

96. Plaza-Díaz J. Colonización, seguridad y tolerancia de *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 y *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 en adultos sanos y sus efectos sobre el metabolismo y sistema inmunitario en ratas Zucker. 2014. Tesis.
97. Vinderola G, Matar C, Perdígón G. Role of the epithelial cells in the immune effects mediated by gram-positive probiotic bacteria. Involvement of toll-like receptors. *Clin Diagn Lab Immunol* 2005;12:1075–84.
98. Ren C, Zhang Q, de Haan BJ, Zhang H, Faas MM, de Vos P. Identification of TLR2/TLR6 signalling lactic acid bacteria for supporting immune regulation. *Sci Rep* 2016;6:34561
99. Good M, Sodhi CP, Ozolek JA, Buck RH, Goehring KC, Thomas DL, Vikram A, Bibby K, Morowitz MJ, Firek B et al. *Lactobacillus rhamnosus* HN001 decreases the severity of necrotizing enterocolitis in neonatal mice and preterm piglets: evidence in mice for a role of TLR9. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2014;306:G1021–32.
100. Markowiak P, Slizewska K. Effects of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Human Health. *MDPI*. 2017 Jul 24.
101. Hempel S, Newberry SJ, Maher AR, Wang Z, Miles JN, Shanman R, Johnsen B, Shekelle PG. Probiotics for the prevention and treatment of antibiotic-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2012;307:1959–69.
102. Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, Quigley EM. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* 2010;59:325–32
103. Lichtenstein L, Avni Biron I, Ben Bassat O. Probiotics and Prebiotics in Crohn's Disease Therapies. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 2016, 30, 81–88.
104. Marteau P, Seksik P, Jian R. 2002. Probiotics and intestinal health effects: a clinical perspective. *Br. J. Nutr.* 88: S51-S57.
105. Wang W, Xing W, Wei S, Gao Q, Wei X, Shi L, et al. 2018. Semi-rational screening of the probiotics from the fecal flora of healthy adults against DSS-induced colitis mice by enhancing anti-inflammatory activity and modulating the gut microbiota. *J. Microbiol. Biotechnol.*

106. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RB, Flint HJ, Salminen S, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics Consensus Statement on the Scope and Appropriate Use of the Term Probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2014, 11, 506–514
107. Parve S, Malik KA, Ah Kang S, Kim HY. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. *J. Appl. Microbiol.* 2006, 100, 1171–1185.
108. McFarland LV. Meta Analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am. J. Gastroenterol.* 2006, 101, 812–822.
109. Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, Meurman J H, Poussa T, Näse L, Saxelin M, Ko R. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: Double blind, randomised trial. *Br. Med. J.* 2001, 322, 1327.
110. Olivares M, Diaz Ropero M, Gomez N, Sierra S, Lara Villoslada F, Martin R, Miguel Rodriguez J, Xaus J. Dietary deprivation of fermented foods causes a fall in innate immune response. Lactic acid bacteria can counteract the immunological effect of this deprivation. *J. Dairy Res.* 2006, 73, 492–498.
111. Olivares M, Diaz Ropero MA, Gomez N, Lara Villoslada F, Sierra S, Maldonado JA, Martin R, Lopez Huertas E, Rodriguez JM, Xaus J. Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, enhances the intestinal function of healthy adults. *Int. J. Food Microbiol.* 2006, 107, 104–111.
112. MINSAL. Protocolo 2016 Tratamiento con Infliximab o Adalimumab en la Enfermedad de Crohn grave o Enfermedad de Crohn con fístulas perianales complejas [Internet]. 2016. Available from: http://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2015/08/7_Protocolo-EC-1.pdf
113. Glenn G, Roberfroid M. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* 1995, 125, 1401–1412
114. Burisch J, Munkholm P. Inflammatory bowel disease epidemiology. *Curr Opin Gastroenterol* 2013; 29: 357- 62.
115. Ouakaa Kchaou A, Gargouri D, Bibani N, Elloumi H, Kochlef A, Kharrat J. Epidemiological evolution of epidemiology of the inflammatory bowel diseases in a hospital of Tunis. *Tunis Med* 2013; 91: 70-3.

116. Romberg Camps MJ, Hesselink van de Kruijs MA, Schouten LJ, Dagnelie PC, Limonard CB, Kester AD, et al. Inflammatory Bowel Disease in South Limburg (the Netherlands) 1991-2002: Incidence, diagnostic delay, and seasonal variations in onset of symptoms. *J Crohns Colitis* 2009; 3: 115-24
117. Chung WSF, Walker AW, Louis P, Parkhill J, Vermeiren J, Bosscher D, Duncan SH, Flint HJ. Modulation of the human gut microbiota by dietary fibres occurs at the species level. *BMC Biol.* 2016, 14, 1–13.
118. Crittenden R, Playne MJ. Nutrition News. Facts and functions of prebiotics, probiotics and synbiotics. In *Handbook of Probiotics and Prebiotics*; Lee, Y.K., Salminen, S., Eds.; Wiley-Interscience, Kansas State University: Hoboken, NJ, USA; Manhattan, KS, USA, 2008; pp. 535–582.
119. Jakubczyk E, Kosikowska M. Nowa generacja mlecznych produktów fermentowanych z udziałem probiotyków i prebiotyków, produkty synbiotyczne. *Prz. Mlecz.* 2000, 12, 397–400.
120. Moayyedi P, Ford AC, Talley NJ, Cremonini F, Foxx-Orenstein AE, Brandt LJ, Quigley EM. The efficacy of probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome: a systematic review. *Gut* 2010;59:325–32.
121. Gibson GR, Probert HM, Van Loo J, Rastall RA, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics. *Nutr. Res. Rev.* 2004, 17, 259–275.
122. Bouhnik Y, Raskine L, Simoneau G, Vicaud E, Neut C, Flourié B, Brouns F, Bornet FR. The capacity of nondigestible carbohydrates to stimulate fecal bifidobacteria in healthy humans: A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel-group, dose-response relation study. *Am. J. Clin. Nutr.* 2004, 80, 1658–1664.
123. Shanahan F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterology* 2001; 120:622-35.
124. Milner JA. Functional foods and health promotion. *J Nutr* 1999;129:S1395-7.
125. Blum G, Marre R, Hacker J. Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6. *Infection.* 1995; 23: 234–236.

126. Valdebenito M, Crumbliss AL, Winkelmann G, et al. Environmental factors influence the production of enterobactin, salmochelin, aerobactin, and yersiniabactin in *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *Int J Med Microbiol.* 2006; 296: 513–520.
127. Grozdanov L, Raasch C, Schultz J, et al. Analysis of the genome structure of the nonpathogenic probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol.* 2004; 186: 5432–5441.
128. Sun J, Gunzer F, Westendorf AM, et al. Genomic peculiarity of coding sequences and metabolic potential of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 inferred from raw genome data. *J Biotech.* 2005; 117: 147–161.
129. Grozdanov L, Zahringer U, Blum Oehler G, et al. A single nucleotide exchange in the *wzy* gene is responsible for the semirough O6 lipopolysaccharide phenotype and serum sensitivity of *Escherichia coli* strain Nissle 1917. *J Bacteriol.* 2002; 184: 5912–5925.
130. Blum Oehler G, Oswald S, Eiteljorge K, et al. Development of strain-specific PCR reactions for the detection of the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 in fecal samples. *Res Microbiol.* 2003; 154: 59–66.
131. Nissle A. Die antagonistische Behandlung chronischer Darmstoerungen mit Colibakterien [The antagonistic therapy of chronic intestinal disturbances]. *Med Klinik.* 1918: 29–30.
132. Papavassiliou J. Production of colicines in Simmons's citrate agar. *Nature.* 1959; 184: 1339–1340.
133. Patzer IS, Baquero MR, Bravo D, et al. The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors FepA, Cir, Fiu and IroN. *Microbiology.* 2003; 149: 2557–2570.
134. Gewirtz TA. TLRs in the gut. III. Immune responses to flagellin in Crohn's disease: good, bad, or irrelevant? *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2007; 292: G706–710.
135. Aubel van AR, Kestra AM, Krooshoop DJ, et al. Ligand-induced differential cross-regulation of Toll-like receptors 2, 4 and 5 in intestinal epithelial cells. *Mol Immunol.* 2007; 44: 3702–3714. [CrossrefPubMed](#)

136. Schlee M, Wehkamp J, Altenhoefer A, et al. Induction of human beta-defensin 2 by the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is mediated through flagellin. *Infect Immun*. 2007; 75: 2399–2407.
137. Wehkamp J, Harder J, Wehkamp K, Wehkamp von Meissner B, Schlee M, Enders C, Sonnenborn U, Nuding S, Bengmark S, Fellermann K, Schröder JM, Stange EF. (2004). NF-kappaB- and AP-1-mediated induction of human beta defensin-2 in intestinal epithelial cells by *Escherichia coli* Nissle 1917: a novel effect of a probiotic bacterium. *Infection and immunity*, 72(10), 5750–5758. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5750-5758.2004>
138. Altenhoefer A, Oswald S, Sonnenborn U, Enders C, Schulze J, Hacker J, Oelschlaeger TA. The probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 interferes with invasion of human intestinal epithelial cells by different enteroinvasive bacterial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2004 Apr 9;40(3):223-9. doi: 10.1016/S0928-8244(03)00368-7. PMID: 15039098.
139. Boudeau J, Glasser AL, Julien S, Colombel JF, Darfeuille Michaud A. Inhibitory effect of probiotic *Escherichia coli* strain Nissle 1917 on adhesion to and invasion of intestinal epithelial cells by adherent-invasive *E. coli* strains isolated from patients with Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003 Jul 1;18(1):45-56. doi: 10.1046/j.1365-2036.2003.01638.x. PMID: 12848625.
140. Huebner C, Ding Y, Petermann I, Knapp C, Ferguson LR. (2011). The probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 reduces pathogen invasion and modulates cytokine expression in Caco-2 cells infected with Crohn's disease-associated *E. coli* LF82. *Applied and environmental microbiology*, 77(7), 2541–2544. <https://doi.org/10.1128/AEM.01601-10>.
141. Prantera C, Scribano ML, Falasco G, Andreoli A, Luzi C. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus GG*. *Gut* 2002; 51: 405-9.
142. Van Gossum A, Dewit O, Louis E, de Hertogh G, Baert F, Fontaine F, et al. Multicenter randomized-controlled clinical trial of probiotics (*Lactobacillus johnsonii*, LA1) on early endoscopic recurrence of Crohn's disease after ileo-caecal resection. *Inflamm Bowel Dis* 2007;13(2):135e42.
143. Bourreille A, Cadiot G, Le Dreau G, Laharie D, Beaugerie L, Dupas JL, Marteau P, Rampal P, Moyse D, Saleh A, Le Guern ME, Galmiche JP; FLORABEST Study Group. *Saccharomyces boulardii* does not prevent relapse of Crohn's disease. *Clin Gastroenterol*

Hepatol. 2013 Aug;11(8):982-7. doi: 10.1016/j.cgh.2013.02.021. Epub 2013 Mar 1. PMID: 23466709.

144. Cosnes J, Carbonnel F, Carrat F, et al. Effects of current and former cigarette smoking on the clinical course of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1403–1411.