

## Sumario

- . Requerimientos para un agente probiótico
- . Administración y recuperación fecal de microorganismos probióticos
- . Efecto de la administración de la bebida Yakult en la ecología microbiana gastrointestinal

## Probióticos

La fermentación de la leche ha sido utilizada por el hombre desde tiempos ancestrales como una estrategia para la conservación de la leche fresca. Al inicio del S. XX, Metchnikoff <sup>(1)</sup> publicó una serie de ensayos titulados "La prolongación de la vida. Estudios optimistas" en los que señalaba que los habitantes de algunas regiones rurales de Bulgaria que consumían yogurt diariamente, poseían una longevidad mayor a la del europeo promedio en esa época. De acuerdo a esta teoría, la putrefacción generada por bacterias proteolíticas en el intestino grueso causaba autointoxicación y este efecto dañino podría ser prevenido por la administración oral diaria de yogurt. Metchnikoff adoptó el hábito de consumir este alimento con bacterias lácticas (muy probablemente *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*) y promovió su consumo diario. Por esta razón, el consumo de yogurt ganó popularidad en esa época. Esta situación es considerada por algunos expertos como el inicio del actual campo de los probióticos.

El término de *probióticos* fue usado por primera vez en 1965 por Lilly & Stillwell<sup>(2)</sup> en una publicación en la que describe la estimulación del crecimiento de *Tetrahymena pyriformis* por algunos agentes producidos por *Colipodium campylum*. Probióticos, es un término biológico que tiene un significado opuesto al de los antibióticos. El término de probióticos fue definido por Parker y cols<sup>(3)</sup>. Para referirse a "organismos y sustancias que contribuyen al balance intestinal". En 1989, Fuller <sup>(4)</sup> objetó la definición de Parker, ya que consideraba que esta definición no permitía distinguir a los antibióticos usados para promover el crecimiento de animales, por lo que propuso la siguiente definición en la que enfatiza la importancia de las bacterias vivas: "suplementos alimenticios de microorganismos vivos que afectan benéficamente la salud del hospedero animal al mejorar su balance microbiano intestinal". Posteriormente, otras investigaciones sugirieron que los microorganismos probióticos no se pueden restringir a microorganismos que tienen un efecto sobre la flora intestinal, sino que se deberían de incluir aquellos microorganismos con efectos sobre la microflora vaginal y respiratoria. En 1992, Havenaar & Huis in't Veld<sup>(5)</sup> propusieron otra definición: "un monocultivo o un cultivo mixto de microorganismos vivos que son aplicados a los animales o al hombre, afectando benéficamente al hospedero al mejorar las propiedades de la flora del individuo".

En 1995, Fuller<sup>(6)</sup> propuso que "un probiótico es una preparación consistente de microorganismos vivos o de estimulantes microbianos que afectan la microflora del animal, planta o animal que los recibe, de forma benéfica". Posteriormente, Gibsori<sup>(7)</sup> sugirió que las sustancias que promueven el crecimiento de organismos probióticos (p.e.

oligosacáridos que promueven el crecimiento de especies de *Bifidobacterium*) podrían ser distinguidos de los agentes probióticos empleando el término de "prebióticos".

En este boletín, los agentes probióticos son definidos de acuerdo a algunos estudios realizados en el Instituto Central de Investigaciones Microbiológicas de Yakult, como "bacterias vivas o muertas o sustancias promotoras del crecimiento, o sustancias que los contienen, los cuales contribuyen a la salud del hospedero al modificar la flora intestinal y mejorar el sistema inmune después de su administración oral.

## Requerimientos para un agente Probiótico

En 1988, cuando los agentes probióticos fueron limitados únicamente a bacterias vivas, Kim<sup>(9)</sup> propuso varios requerimientos para un agente probiótico. Estos incluyeron 1) ser miembro de la flora intestinal normal del hospedero, 2) resistir a las barreras de la parte superior del tracto gastrointestinal (ácido gástrico, ácido biliares, etc. ) y poseer una gran capacidad de propagación en el intestino grueso, 3) poseer un efecto benéfico sobre el hospedero, y 4) permanecer viables durante el almacenamiento del producto. En contraste a los antibióticos, los probióticos son seguros y no poseen efectos adversos sobre el hospedero, además de que son baratos y fáciles de ingerir. En la actualidad el concepto de probióticos además incluye a bacterias muertas y componentes bacterianos. Esto hace que los requerimientos para este tipo de agentes probióticos deban de ser definidos.

## Administración y recuperación fecal de microorganismos probióticos.

En humanos saludables, la flora intestinal permanece relativamente estable. Por esta razón, cualquier efecto benéfico de un microorganismo probiótico en individuos saludables se puede confirmar o evaluar únicamente como cambios deseables de la flora intestinal dentro de un rango normal. Los microorganismos probióticos no colonizan el intestino humano y se dejan de detectar en las heces humanas siempre después de suspender su administración.

Se ha estudiado la relación entre la dosis administrada de un microorganismo probiótico y la cuenta detectada en heces<sup>(8)</sup>. Para el caso del *Lactobacillus casei* cepa Shirota, el cual es resistente a los jugos gástricos y secreciones biliares, se recuperaron  $10^8$  y  $10^7$  células por gramo de heces después de la administración de  $10^{10}$  y  $10^9$  células/ml respectivamente. Ya que la cantidad promedio de heces generadas en un día es de 150g, el número de bacterias detectadas fue similar al administrado. Esto sugiere que después de la administración oral, la cuenta del *Lb. casei* Shirota muestra una disminución debido al efecto antimicrobiano del ácido gástrico y secreciones biliares, pero alcanza su nivel basal después de reproducirse en el intestino delgado, antes de pasar al intestino grueso.

La flora intestinal se alimenta de los nutrientes residuales que pasan por el intestino delgado y alcanzan el intestino grueso sin haber sido absorbidos. Tales nutrientes incluyen almidones no digeribles o no absorbidos, y varios tipos de fibra dietética (fuentes de carbono) y así como de aminoácidos y péptidos no absorbidos (fuente de nitrógeno). Los nutrientes derivados del hospedero, y que incluyen a células

descarnadas del epitelio intestinal y mucina secretada, son también utilizados por la flora intestinal.

Ya que las bacterias lácticas poseen requerimientos nutricionales complejos, crecen en la parte más distal del intestino delgado (la cual es abundante en nutrientes) y presentan un crecimiento muy pobre en el intestino grueso. Para el estudio de las interacciones entre las bacterias lácticas y la flora del hospedero, es importante el asegurar un nivel suficiente de recuperación fecal de la bacteria probiótica. Para el caso del *Lb. casei* Shirota, durante el consumo diario de un frasco de Yakult ( $10^7$  -  $10^8$  céls/g), asegura el dominio de esta bacteria entre las otras bacterias lácticas intestinales del hospedero, y permite determinar una serie efectos asociados a su consumo.

## **Efecto de la administración de la bebida Yakult en la ecología microbiana gastrointestinal.**

A pesar de la gran cantidad de literatura sobre los efectos benéficos del consumo de productos probióticos, existe una posición de escepticismo de diversos especialistas, debido principalmente a la falta de estudios bien planeados, y así como de un desconocimiento del ecosistema microbiano. Algunos estudios realizados en Japón y en Holanda demostraron de forma independiente el efecto del consumo de la bebida Yakult sobre la microbiología de la flora intestinal.

**Estudio japonés.** En Japón un grupo de 20 voluntarios con una edad entre 22 y 25 años, fueron divididos aleatoriamente en un grupo experimental (n=10) y un grupo control (n=10). Al grupo experimental le fue administrado Yakult en su presentación comercial ( $7.5 \times 10^8$  /ml). Al grupo control se le administró leche sin el *Lb. casei* Shirota envasada en botellas idénticas a las empleadas para el producto fermentado. Después de un período de 2 semanas, el grupo experimental comenzó a recibir 240 ml (80 ml x 3/día) de la bebida Yakult por 4 semanas, mientras el grupo control recibió durante el mismo periodo únicamente leche envasada. Después de este período, existió otro de recuperación en el cual no se administro nada a ambos grupos. Al final de cada período, en las semanas 2, 6 y 8 se colectaron muestras fecales y se analizaron para determinar la cuenta de *Lb. casei* Shirota, bifidobacterias y enterobacterias, enzimas fecales y una muestra sanguínea para evaluar un posible efecto sobre la respuesta inmune por medio del análisis de varios tipos celulares.

**Estudio holandés.** En este estudio participaron un total de 20 individuos sanos, con una edad entre 40 y 65 años. Los individuos fueron divididos en dos grupos similares al estudio japonés y sometidos a los mismos períodos también. Durante el período de administración de 4 semanas, cada voluntario en el grupo experimental recibió 300 ml de la bebida Yakult diariamente (3 x 100 ml/día), con una cuenta viable de  $1 \times 10^9$  céls/ml, mientras que el grupo control recibió únicamente leche envasada.

## **Resultados.**

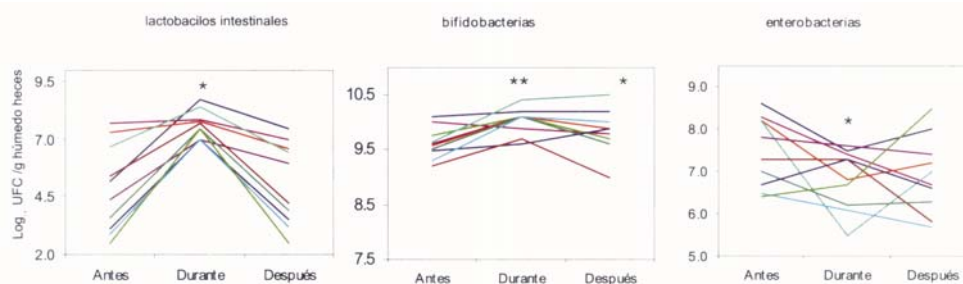
**Estudio japonés.** En el grupo experimental, se observa un incremento en la cuenta de lactobacilos fecales, de los cuales se observó un predominio del *Lb. casei* Shirota alcanzando un nivel de  $1 \times 10^8$  /g de heces. Sin embargo, después de que se suspendió el

consumo de la leche fermentada se observó una disminución al nivel basal inicial de esta bacteria. Junto con un incremento en los niveles de lactobacilos, se observó un incremento en las cuentas de *Bifidobacterium* y una disminución en el nivel de enterobacterias en el grupo experimental (Figura 1). Por el contrario, el grupo control no mostró diferencias en las cuentas bacterianas. El análisis de las enzimas fecales  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -glucosidasa y nitroreductasa, permitió observar una disminución en la actividad de estas enzimas por debajo del nivel basal. En este caso, tampoco se observó ningún cambio en el grupo control (Figura 2).

**Estudio holandés.** En el grupo experimental se observó también un incremento en los niveles de *Lb. casei* Shirota y bifidobacterias (Figura 3 y 4), junto con una disminución en los niveles de Clostridium (Figura 5). En el grupo control, no se observaron cambios en las cuentas bacterianas. Durante la ingestión del *Lb. casei* Shirota se observó también una disminución en la actividad de las enzimas fecales ( $\beta$ -glucuronidasa y  $\beta$ -glucosidasa respecto al grupo control).

**Discusión.** Resulta de gran interés que los estudios realizados en Japón y en Holanda permitieron observar efectos similares del consumo del *Lb. casei* Shirota en adultos saludables. La administración de la leche fermentada Yakult dio como resultado un incremento en los niveles de *Lb. casei* Shirota, otros lactobacilos intestinales, bifidobacterias y una disminución en los niveles de enterobacterias y clostridios.

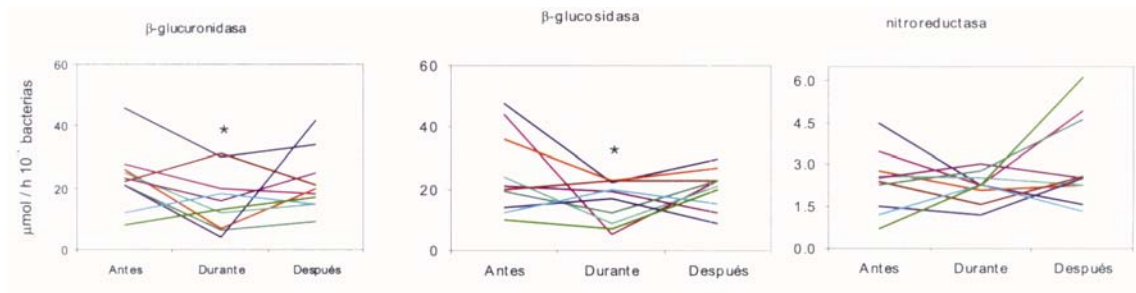
Este fenómeno se podría explicar como consecuencia de un cambio en las condiciones del ambiente gastrointestinal tales como competencia por nutrientes y un efecto inhibitorio del ácido láctico, o debido a una posible acción simbiótica<sup>(10)</sup> o antagónica<sup>(11)</sup>, como se determinó en estudios in Vitro. Se observó también que estos cambios en la flora estuvieron asociados a cambios en los niveles de las enzimas fecales  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -glucosidasa y nitroreductasa, enzimas que se ha propuesto pueden estar asociadas en la carcinogénesis del colon al convertir sustancias procarcinógenas a carcinógenos<sup>(12)</sup>. Aunque este estudio demostró que el consumo del *Lb. casei* Shirota en la bebida Yakult podría modificar el metabolismo bacteriano benéficamente, requiere de ser complementado con otros estudios en los que se evalúe el efecto de su consumo en la reducción del riesgo de cáncer. En este estudio, no se observaron efectos significativos sobre la respuesta inmune, tales como el número de células T, B, NK, INT- $\gamma$  y actividad de NK tanto en japoneses como en holandeses. De acuerdo a estas observaciones se puede concluir que la leche fermentada con el *Lb. casei* Shirota, no modifica la función del sistema inmune, al menos en individuos sanos.



**Figura 1.**

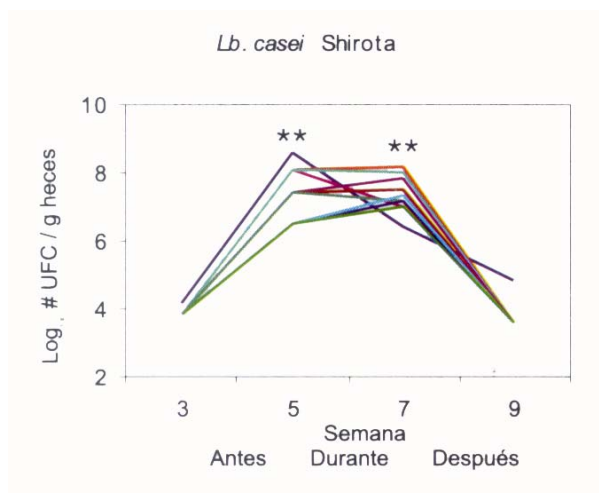
Estudio japonés: cambio en la microflora fecal en el grupo experimental al que se administró *Lb. casei* Shirota (n=10) en la semana 2 (antes de la administración),

semana 6 (durante la administración) y semana 8 (después de la administración). Cada línea representa los valores de un individuo. Los asteriscos señalan diferencias significativas de la línea basal: \* $P < 0.05$ , \*\* $P > 0.01$ .



**Figura 2.**

Estudio japonés: cambio en la actividad enzimática fecal en el grupo experimental al que se administró *Lb. casei* Shirota (n=10) en la semana 2 (antes de la administración), semana 6 (durante la administración) y semana 8 (después de la administración). Cada línea representa los valores de un individuo. Los asteriscos señalan diferencias significativas de la línea basal: \* $P < 0.05$ , \*\* $P > 0.01$ .

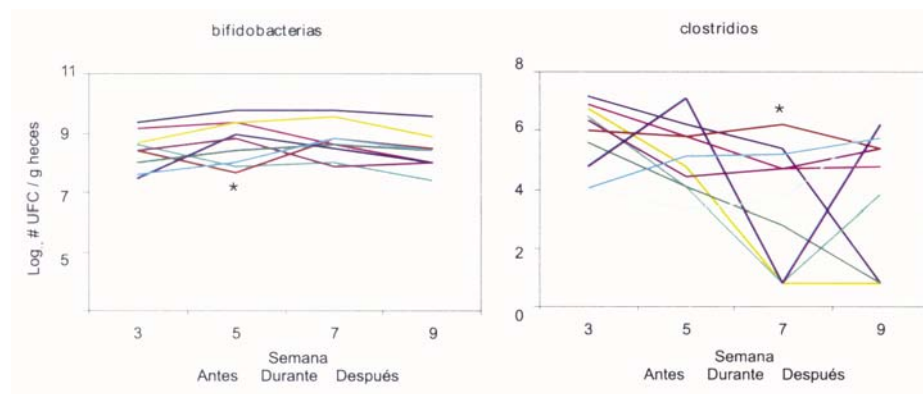


**Figura 3.**

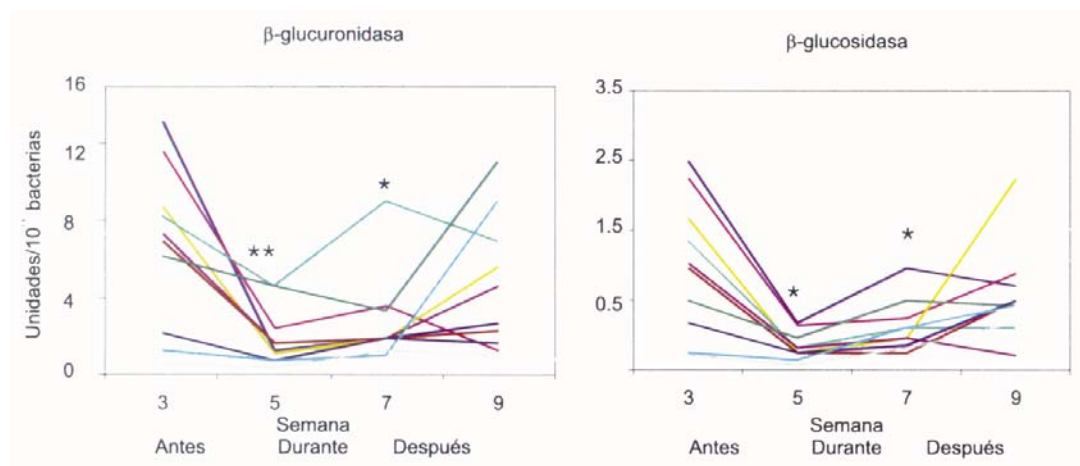
Estudio holandés: Recuperación en heces fecales de *Lb. casei* Shirota administrado en el grupo de estudio. Cada línea representa los valores de un individuo. Los asteriscos señalan diferencias significativas de la línea basal: \*\* $P > 0.01$ .

**Figura 4.**

Estudio holandés: Cambios en las cuentas fecales de bifidobacterias y clostridios en el grupo de estudio (n=10) al que se le administró *Lb. casei* Shirota en la semana 2 (antes de la administración), semana 6



(durante) y 8 (después). Cada línea representa los valores de un individuo. Los asteriscos señalan diferencias significativas de la línea basal: \*P>0.05.



**Figura 5.**

Estudio holandés: Cambios en las actividad enzimática fecal en el grupo experimental al que se administró *Lb. casei* Shirota (n=10) en la semana 2 (antes de la administración), semana 6 (durante) y semana 8 (después). Cada línea representa los valores de un individuo. Los asteriscos señalan diferencias significativas de la línea basa]: \*P>0.05, \*\*P<0.01.

## Referencias

1. Metchnikoff E. The prolongation of life. Optimistic Studies: William Heinemann, London, (1907).
2. Lilly D M and Stillwell R J. Probiotics, growth promoting factors produced by microorganisms: Science, 147,747-748(1965).
3. Parker R. B. Probiotics, the other half of the antibiotic story: Ann Nutr. Health, 29,4-8 (1974).
4. Fuller R. Probiotics in man and animals: J. Appl. Bacteriol, 66, 365378(1989).
5. Havenaar R and Huis in't Veld J H J: Probiotics, a general view: In *The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease* (Wood B J B ed.), Elsevier, London, p151-170 (1992).
6. Fuller R. Probiotics, their development and use: In *Old Herborn University Seminar Monograph 8* (van der Waaij D, Heidt P J and Rusch V C, eds.), Institute for Microbiology and Biochemistry, Herborn-Dill p1-8 (1995).
7. Gibson G R and Roberfroid M B. Dietary modification of the human colonic microbiota: Introducing the concept of probiotics: J. Nutr, 125, 1404-1412 (1995).
8. Tanaka R. Health effects of oral administration of *L. casei* strain Shirota: In *Lactobacillus casei* strain Shirota. Intestinal Flora and Human Health (Yokokiura T ed. ), Chiyoda Printing Communication, Tokyo, p103-106 (1999).
9. Kim H S. Characterization of lactobacilli and bifidobacteria as applied to dietary adjuncts: Cull. Dairy prod. J.,23, 6-9 (1988).
10. Cheng C C and Nagasawa T Associative relationships between bifidobacteria and lactobacilli in milk: Jpn. J. Zootech. Sci., 54, 740747(1983).
11. Lindgre S E and Dobrogoz W J. **Antagonistic activities** of lactic acid bacteria in food and feed fermentations: *FEMS Microbiol. Rev.*, 87,149-164(1990).
12. Rowland I R, Mallett A K and Wise A. The effect of diet on the mammalian gut flora and its metabolic activities: CRC Crit.Rev Toxicol.16, 31-103 (1985).