

EFFECTO DE LA INTERRUPCIÓN EN EL CONSUMO DE LECHE CONTENIENDO L. CASEI SOBRE EL SISTEMA INMUNE

Julieta Giral - María F. Muñiz - Lucía N. Hernández
María M. Ruben - J. Mario Céspedes*

RESUMEN: Se evaluó la respuesta inmune luego de la interrupción en la ingesta continuada durante un mes de una leche fermentada conteniendo *Lactobacillus casei* DN-114001 como probiótico. Para ello, se recurrió a la medición directa no invasiva de la concentración de Inmunoglobulina A secretora (IgA-s) en saliva de un grupo de 25 jóvenes de entre 20 y 30 años de edad. Previo al inicio de la experiencia, se les tomó muestras de saliva a cada individuo, para tener los datos basales de IgA-s como referencia. En el momento que finalizó el período de consumo continuo, se colectaron nuevas muestras de saliva, y posteriormente a los 15 y 40 días de haber finalizado el mismo. Al analizar las concentraciones de IgA-s salival en cada uno de los individuos en los diferentes momentos evaluados, se observó un aumento de los valores de IgA-s inmediatamente de terminada la ingesta comparados con los controles previos al consumo del probiótico, tendencia que se mantuvo a los 15 y a los 40 días de la suspensión. Específicamente, a los 40 días de finalizada la ingesta, el 81% de los individuos mostró valores mayores en la concentración de IgA-s salival con respecto al valor inicial de referencia previo a la ingesta. Estos resultados, muestran una vez más, el efecto benéfico producido por el consumo regular de este probiótico sobre la actividad inmunomoduladora y que la interrupción de dicho consumo en los 40 días posteriores, no provoca una disminución en la concentración de IgA-s salival con respecto a los datos basales de referencia.

Palabras claves: *lactobacillus casei* - probióticos - respuesta inmune - IgA secretora.

ABSTRACT: In this study, we sought to evaluate the immune response after the break in a month continued intake of a fermented milk containing *Lactobacillus casei* DN-114001 as probiotic. To do this, they resorted to non-invasive direct measure of the secretory immunoglobulin A (IgA-s) concentration in the saliva of a group of 25 young people between 20 and 30 years old. Prior to the beginning of the experiment, they took saliva samples from each individual, to have the baseline data of IgA-s as a reference. In the time period ending continuous consumption, we collected new samples of saliva, and then at 15 and 40 days have ended. By analyzing the concentrations of salivary IgA-s in each of the individuals evaluated at different times, there was an increase in IgA-s values immediately terminated intake compared to baseline prior to probiotic consumption, a trend that remains at 15 and 40 days of suspension. Specifically, at 40 days of completion of the intake, 81% of

* Julieta Giral y María F. Muñiz son licenciadas en Nutrición (UCEL).

Lucía N. Hernández es licenciada en Estadística y becaria del CONICET en la facultad de Cs. Económicas y Estadística de la UNR.

María M. Ruben es magíster y licenciada en Nutrición, docente de la UCEL de las cátedras Nutrición Normal II, Nutrición Infantil y carrera de Licenciatura de Fisiopatología y Dietoterapia del Niño de la en Nutrición. E-mail: mercedesruben@hotmail.com.

J. Mario Céspedes es docente e investigador de la UCEL en el área de Microbiología de los Alimentos. E-mail: cespedesjm@gmail.com

individuals showed higher values in the concentration of salivary IgA-s with respect to the initial reference value prior to intake. These results show once again the beneficial effect produced by the regular consumption of this probiotic on the immunomodulatory activity and that disruption of such consumption by at least 40 days later, causes a decrease in the concentration of salivary IgA-s with respect to the reference baseline data.

Keywords: *Lactobacillus casei* - probiotic - immune response - IgA secretory

Introducción

Durante décadas se han acumulado evidencias sobre las propiedades y efectos beneficiosos, generados por los probióticos vehiculizados en los alimentos, en la salud del ser humano y, aunque existe abundante bibliografía al respecto, todavía se requiere mayor evidencia experimental, clínica y epidemiológica (1, 2, 3).

La Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) definen a los probióticos como microorganismos que producen efectos benéficos en la salud del consumidor cuando son administrados en dosis adecuadas (4). Uno de los beneficios a resaltar es la mejora en la respuesta inmune en quienes consumen *L. casei* DN-114001 como probiótico específico, en cantidad suficiente, vehiculizado en leches fermentadas, como surge del estudio efectuado en el año 2009 en niños de 3 a 4 años, en quienes el consumo continuado durante cuatro semanas aumentó significativamente las concentraciones de Inmunoglobulina A secretora (IgA-s) en saliva (5). Dado que la función principal de la IgA-s es modular las defensas a nivel de las mucosas, esto permitiría la reducción de infecciones respiratorias y gastrointestinales.

Una búsqueda pormenorizada al respecto, muestra que son relativamente pocos los estudios efectuados en seres humanos con el fin de evaluar la relación existente entre la ingesta de este probiótico y la respuesta inmune. Por otra parte, a pesar de que el *L. casei* es una bacteria aislada originalmente del intestino humano (6), no es capaz de colonizar definitivamente este nicho ecológico. Esto obliga entonces a su consumo en forma regular durante un cierto tiempo a fin de que se asegure una buena persistencia y una respuesta inmune significativamente favorable. Es importante destacar que durante su paso por el tracto gastrointestinal estas bacterias continúan siendo metabólicamente activas, no obstante, algunos resultados señalan que los probióticos pueden ser inmunológicamente activos sin requerir que las bacterias permanezcan viables (7, 8, 9, 10). Esto se debe posiblemente al papel beneficioso de las sustancias de vehículo o relleno y por lo tanto, alguno de estos efectos pueden no reproducirse cuando las mismas se cambian, o se modifican las condiciones de conservación del producto, lo cual determina diferencias en la viabilidad de la cepa o en su funcionalidad (11, 12).

Por otro lado, distintos ensayos clínicos realizados para evaluar la sobrevida y colonización de distintos probióticos en el tracto gastrointestinal (TGI), han tenido el mismo resultado: después de interrumpir su consumo, su excreción fecal persiste algunos días, pero en números cada vez menores hasta desaparecer. En el caso particular de los lactobacilos, después de finalizar un periodo de suplementación, el número total excretado en materia fecal sigue siendo alto durante dos semanas (13, 14). Esto indicaría su supervivencia a través del TGI y que para ejercer efectos benéficos en la salud del consumidor, es necesario que persistan en el mismo (15).

En muchos probióticos se ha demostrado acción inmunomoduladora, mediante inducción de la respuesta inmune local y sistémica. A nivel local, aumentan la producción de inmunoglobulinas, principalmente IgA-s. A nivel sistémico actúan como potentes adyuvantes, afectando la respuesta celular y humoral, activando el sistema retículoendotelial, incrementando la producción de algunas citoquinas activadoras del sistema inmune tales como interferón gamma (IFN- γ), interleuquina 10 (IL-10) y el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF α). La IgA-s, que provee la primera línea de defensa frente a agentes patógenos, constituye más del 80 % de todos los anticuerpos producidos. Está presente en las secreciones externas y también ejerce propiedades antimicrobianas en las células epiteliales durante su transporte a través del epitelio. Estas son las inmunoglobulinas predominantes en las secreciones externas, cantidad bien definida, que brinda una protección inmunológica específica para todas las superficies mucosas, al producir un bloqueo a este nivel, ante el ingreso al organismo de agentes patógenos (16). En este sentido, el efecto benéfico de algunos probióticos reside justamente en estimular por distintos mecanismos la producción de IgA-s, tanto a nivel local como sistémico (17).

Es así como la inmunomodulación, depende de la interacción de los probióticos con el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal y en tal sentido, la viabilidad de los probióticos es importante para estimular el sistema inmune mucoso, ya que su permanencia en sitios efectores de la respuesta inmune garantiza la ejecución de la misma (18). El proceso de inmunomodulación se evaluó en distintos estudios científicos donde se observa que la interacción es cepa dependiente. De esta manera, algunos antígenos se asocian a las células del sistema inmune presentes en las placas de Peyer (mucosa), mientras que en otros casos se describe la interacción con células de la lámina propia del intestino delgado y colon. Además, la administración por la vía oral de algunas cepas probióticas puede estimular el sistema inmune en otras mucosas como la bronquial y la de la glándula mamaria. Así mismo, se debe tener en cuenta el medio en que se vehiculizan estas bacterias, como en el caso de la leche fermentada que presenta otros componentes no bacterianos que contribuyen a la inmunogenicidad.

Recientemente se ha descubierto además que el ADN bacteriano contiene secuencias inmunoestimulantes (ISS-ADN), que interactúan con receptores específicos de las células epiteliales. Estas secuencias son potentes activadores de la inmunidad innata. Rachmilewitz *et al.* (año 2004), a través de un estudio que realizó en ratas, informaron que la administración de la ISS-ADN fue beneficiosa para la mucosa del colon en ratones con colitis (19). Madsen *et al.* (año 2004) por su parte, demostraron que el ADN bacteriano regula la secreción de citoquinas proinflamatorias (20).

Queda claro entonces, que no todos los probióticos comparten las mismas propiedades inmunomoduladoras y que los resultados y los artículos de revisión provenientes de estudios realizados con cepas específicas, no pueden ser utilizados como prueba para avalar los efectos sobre la salud de cepas que no han sido incluidas en el estudio.

Evidencia científica de los beneficios específicos generados por diferentes cepas de *L. casei*.

* Participa en el proceso de “resistencia a la colonización” porque se asocian hábilmente a las defensas biológicas del intestino. Con respecto a su capacidad antagonista con enteropatógenos, se verificó su acción en distintos estudios con varios microorganismos como *Helicobacter pylori*, *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* enteropatógena. La misma se

debe principalmente a la competencia en los lugares de adherencia, producción de sustancias inhibitorias y capacidad inmunomoduladora a nivel humoral y celular (21, 22, 23, 24).

* Hatakka K.; Savilahti E.; Ponka A. *et al.* (año 2001), pusieron en evidencia el efecto del consumo prolongado de leches fermentadas conteniendo *L. casei*, en los procesos infecciosos en niños (25). Turchet P. *et al.* (año 2003), en un estudio llevado a cabo con adultos que consumieron leche fermentada con *L. casei* DN-114001, observaron una reducción en la duración de infecciones respiratorias en pacientes con riesgo y se comprobó un efecto inmunogénico por disminución en la incidencia invernal de las mismas (26).

* Mejora la inmunocompetencia en adultos aumentando los linfocitos CD56 o células “natural killer” (TNK) y modulando el incremento de cortisol (27), mientras que en ancianos aumenta la eficacia inmunitaria favoreciendo la capacidad defensiva de los monocitos mediante un incremento de su actividad fagocítica y oxidativa (28).

* *L. casei* es efectivo en las enfermedades inflamatorias del intestino, pero los estudios clínicos con pacientes con enfermedad inflamatoria aún son escasos (29).

* La incorporación a una dieta con cepas de *L. casei*, produjo en la etapa aguda de diarrea una respuesta humoral no específica (células secretoras de IgG, IgA e IgM) y un incremento posterior de IgA-s (30).

* En experimentos en animales se determinó que aumenta la actividad fagocítica en macrófagos peritoneales y células productoras de IgA-s ante la infección de *E. coli* enteroinvasiva (31).

* En casos de infección por *Shigella* spp. se comprobó que *L. casei* reguló la transcripción de genes que codifican para sustancias pro-inflamatorias como las citoquinas y moléculas de adhesión inducidas por la *Shigella* (32).

* *E. coli* enteropatógena induce el aumento de permeabilidad del epitelio intestinal y *L. casei* anularía este efecto y la posterior adhesión del patógeno (33). También se ha demostrado efecto inhibitorio frente a *E. coli* O157:H 7 (34).

* Se demostró antagonismo con *Salmonella typhimurium* debido a un aumento de la fagocitosis, actividad antibacteriana y respuesta inmune humoral (35).

* El consumo regular de *L. casei* DN114001 podría ser considerado como una estrategia a considerar dentro de la profilaxis contra la inmunosenescencia (36).

* Los resultados obtenidos en un estudio *in vitro*, realizado en el año 2005 por investigadores de la Facultad de Ciencias Químicas de Chihuahua (México), en el que se utilizó *L. casei* DN114001, señalaron la capacidad de este probiótico de reducir de manera significativa el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y controlar el crecimiento de *E. coli*. No se observó actividad de bacteriocina, por lo que la inhibición se atribuye al efecto conjunto de los diversos metabolitos producidos durante la fermentación láctica (37).

* Produce el aumento de activadores del sistema inmune específico como interferón gama e interleuquinas, inmunoglobulinas, y aumento de los macrófagos y linfocitos (38).

* Con respecto a su acción sobre *Rotavirus*, el mecanismo involucraría la modificación del receptor viral, debido a un factor soluble que modifica la glicosilación y galactosilación en la mucosa intestinal reduciendo la infección de los “villi” (39).

Dosis diaria de probióticos a consumir

Con respecto a la dosis con que deben ser ingeridos, los estudios que documentan la eficacia de cepas específicas a una determinada dosis, no constituyen evidencia suficien-

te como para respaldar los efectos sobre la salud a una dosis más baja. En relación con esto último, la dosis de probióticos necesaria varía enormemente según la cepa y el producto y no es posible establecer una dosis general para los probióticos; que por otra parte debe estar basada en estudios efectuados en seres humanos y deben mostrar un beneficio real para la salud.

Según algunos autores, es imprescindible una cantidad de 10^7 - 10^8 UFC/g o ml del producto, lo cual aseguraría que un porcentaje importante de bacterias pueda llegar hasta el intestino y ejercer su efecto benéfico en la salud del consumidor. Cantidades menores a 10^6 UFC/g no provocan dichos efectos. Vinderola y Reinheimer, en el año 2000 indican que para asegurar el efecto probiótico se requieren concentraciones superiores a 10^7 UFC/g, vehiculizadas en leches fermentadas. Además, recomiendan ingerir al menos una dosis diaria para asegurar sus efectos benéficos, ya que en algunos estudios se observó que si se ingiere de forma alterna, aproximadamente 3 días a la semana, su acción es mucho menor o casi inapreciable (40,41).

En virtud de lo desarrollado precedentemente, fue de interés para los autores efectuar la “Evaluación de la respuesta inmune por intermedio de la variación en la concentración de la IgA-s en saliva, por su papel como molécula efectora de dicha respuesta, luego de interrumpir el consumo continuo del probiótico *L. casei* DN-114001 en personas sanas”,

Materiales y métodos

Tipo de estudio.

Se trata de una investigación clásica cuantitativa, mediante un estudio analítico experimental de tipo longitudinal.

a) Muestra

La muestra estuvo constituida por 25 alumnos de entre 20 y 30 años que concurren a la Universidad del Centro Educativo Latinoamericano situada en Av. Pellegrini 1352 de la ciudad de Rosario, provincia de Santa Fe, durante Octubre - Diciembre de 2010. Los 25 alumnos recibieron leche fermentada conteniendo el probiótico *L. casei* DN-114001.

Criterios de inclusión.

- Alumnos que aceptaron participar en el estudio
- Franja etárea: 20 – 30 años
- Ambos sexos

Criterios de exclusión.

- Alumnos con algún tipo de trastorno gastrointestinal.
- Alumnos que presentan intolerancia a la lactosa.
- Alumnos con algún tipo de proceso infeccioso agudo y/o crónico.
- Alumnos que no consumieron durante algún día de la semana la leche fermentada conteniendo *L. casei*.

b) Variables en estudio

- Variable Dependiente: Concentración de IgA-s salival.
- Variable Independiente: Momento de toma de muestra.

c) Definición de términos y operacionalización de variables

- **Concentración de IgA-s salival:** se refiere a los valores de IgA-s salival obtenidos en las muestras de saliva de cada joven, en los momentos de muestreo definidos, expresados en mg/dl.
- **Momento de toma de muestra:** la colección de muestra de saliva por parte de los jóvenes participantes en el estudio, se realizó en cuatro oportunidades:
- **Momento 1:** previo al inicio del consumo de probióticos.
- **Momento 2:** al final del consumo durante 30 días consecutivos.
- **Momento 3:** a los 15 días de finalizada la ingesta de probióticos.
- **Momento 4:** a los 40 días de finalizada la ingesta de probióticos.

d) Procedimiento e instrumentos de recolección de datos

- Cada alumno, ingirió 100 g diarios de leche fermentada conteniendo 10^8 UFC de *L. casei* DN 114001/ g, durante 30 días consecutivos.
- Muestras de saliva: la primera muestra, se colectó al comienzo del estudio, previo al inicio del consumo del probiótico, la segunda se obtuvo luego de la ingesta ininterrumpida durante 30 días de leche fermentada conteniendo *L. casei*. La tercera y cuarta muestra se obtuvieron a los 15 y 40 días respectivamente de haber interrumpido el consumo. Las tomas de muestras se realizaron mediante la salivación directa de los jóvenes en pequeños colectores descartables.
- La cuantificación de Ig A-s en las muestras de saliva se efectuaron en el Laboratorio de la Facultad de Química de UCEL mediante la técnica de inmuno-difusión radial.

e) Tratamiento estadístico

En principio se efectuó un análisis descriptivo de los datos obtenidos, donde se observan las características en las distribuciones de IgA-s salival en los distintos momentos de la toma de muestra, lo cual permitió percibir diferencias y similitudes entre las mismas. Posteriormente, con el objetivo de determinar si las diferencias encontradas entre los distintos momentos resultan estadísticamente significativas, se aplicaron las pruebas estadísticas correspondientes. En el caso de comparación de 2 distribuciones se aplicó la prueba de Wilcoxon y en el caso de comparación de más de 2 distribuciones se aplicó la prueba de Friedman. El valor $p < 0,05$ es considerado significativo.

f) Resultados

Figura 1

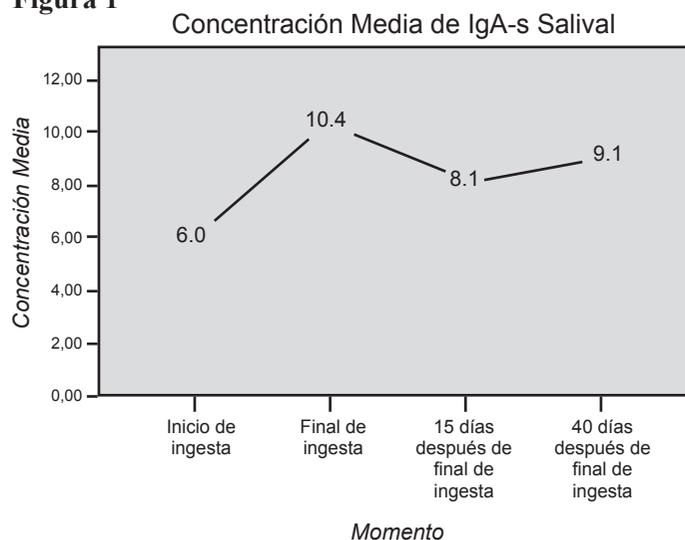
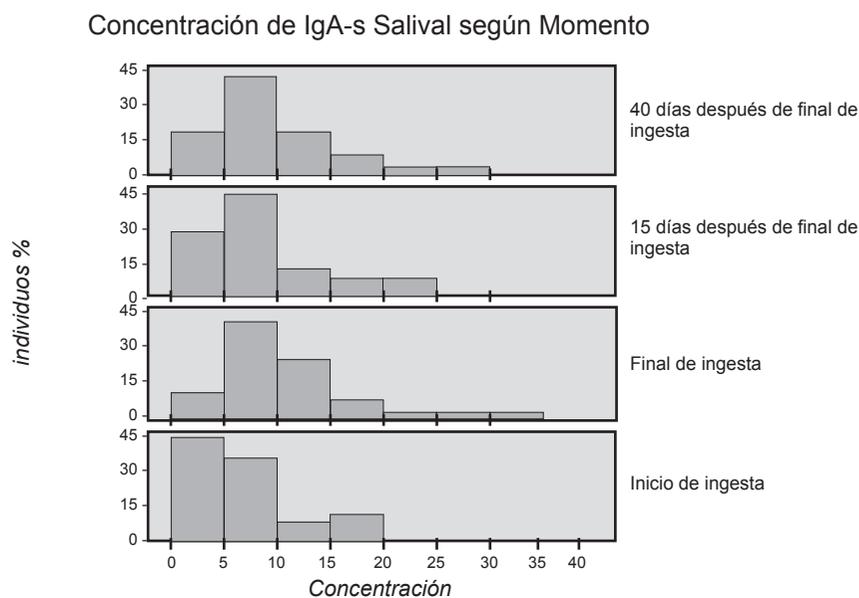


Figura 2



La Figura 1 exhibe los valores medios de concentración de IgA-s Salival de los individuos en los 4 momentos de toma de muestra. Dichos valores medios aumentan al final de la ingesta, respecto del inicio de la misma, y parecen mantenerse en el nuevo nivel en los dos momentos siguientes. Los histogramas de la Figura 2, corroboran este comportamiento. En estos se observa que, una vez finalizada la ingesta continua, la concentración de IgA-s salival presenta un desplazamiento hacia valores mayores respecto del inicio de la ingesta. El desplazamiento se mantiene en los dos momentos de medición siguientes, es decir a los 15 y 40 días posteriores.

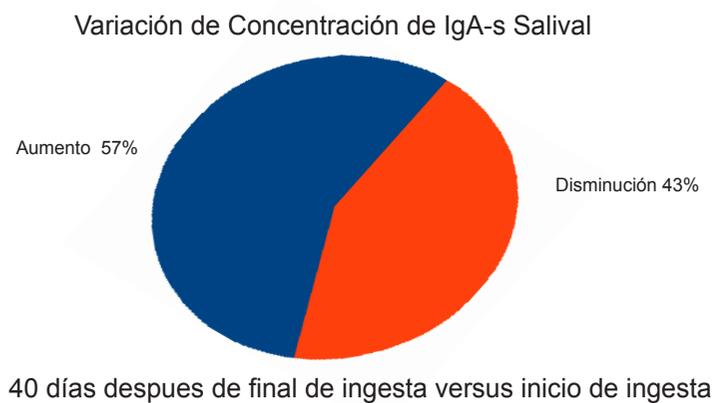
Figura 3



Figura 4



Figura 5



En la Figura 3 se puede observar que a los 40 días de haber finalizado la ingesta diaria del probiótico, el 81% de los individuos mostró valores mayores en la concentración de IgA-s respecto del valor inicial previo a la ingesta.

En las Figuras 4 y 5 se observa que a los 40 días después de finalizada la ingesta, el 45 % de los individuos mostró valores mayores en la concentración de Ig A-s respecto de los valores al final de la ingesta, y el 57 % mostró valores mayores respecto de los hallados a los 15 días de finalizada la ingesta.

La comparación de las distribuciones de concentración de los momentos 4 y 1, a través de la prueba de Wilcoxon, determinó que las diferencias encontradas son estadísticamente significativas ($p=0,006$). Mientras que la comparación de las distribuciones de concentración de los momentos 4, 3 y 2, a través de la prueba de Friedman, determinó que las diferencias no son estadísticamente significativas ($p=0,456$).

g) Discusión

Distintos estudios científicos sugieren que el consumo continuo de probióticos tendría una serie de beneficios potenciales para la salud, tanto gastrointestinales como inmunomoduladores, de interés en la prevención de enfermedades. No obstante, en lo que se refiere específicamente al efecto inmunoestimulante generado en particular por el *L. casei* DN-114001, son pocos los estudios que han evaluado el comportamiento del sistema inmune en periodos posteriores a la interrupción de su consumo prolongado.

Los hallazgos en investigaciones anteriores, señalaron que la administración diaria de este probiótico favorece el incremento de IgA-s. Un estudio realizado en niños de 3 y 4 años en el 2009 demostró un aumento significativo en las concentraciones de IgA-s salival luego del consumo continuo durante 4 semanas de leche fermentada conteniendo *L. casei* DN-114001 (2), tal como se observó en el presente estudio al finalizar el consumo diario durante 30 días del probiótico. Así mismo, otro estudio realizado en roedores por el Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA – CONICET) en el 2008, reveló un incremento de IgA-s en intestino delgado y colon, luego de ser alimentados por 98 días consecutivos con leche fermentada con *L. casei*. Distintas células fueron removidas de intestino para un examen histológico cuyos resultados determinaron aumento de IgA-s y de células productoras de citoquinas. Los autores afirmaron que, de acuerdo con los resultados obtenidos, la administración prolongada de esta leche fermentada tiene efectos moduladores sobre el sistema inmunitario asociado a intestino y sobre células distantes, como los macrófagos peritoneales (42).

Conclusión

En base a los resultados obtenidos, de las pruebas estadísticas y a los gráficos presentados precedentemente, queda establecido que la concentración de IgA-s salival aumenta luego de la ingesta diaria, durante 30 días consecutivos, de 100 g de leche fermentada conteniendo 10^8 UFC de *L. casei* DN- 114001/g, y podemos afirmar además, que la interrupción completa de dicho consumo no afecta la normal secreción de la IgA-s en saliva, al menos hasta los 40 días posteriores a la interrupción de la ingesta, en personas de 20 a 30 años.

Los efectos beneficiosos de los probióticos en la salud humana y en la nutrición están siendo cada vez más reconocidos y no hay duda de que en los próximos años, con mayores conocimientos sobre su funcionamiento, constituyan alternativas nutricionales que contribu-

yan a mejorar la salud de la población. En tal sentido, este estudio en particular empleando *L. casei* como probiótico, podría ser un aporte de interés para la realización de otras investigaciones tendientes a demostrar nuestra hipótesis con un mayor número de individuos, y durante un lapso de tiempo más prolongado.

Recibido: 2/11/11. Aceptado: 25/02/12.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ Slover, C. M. Lactobacillus: a Review. Clinical Microbiology Newsletter 2008; Vol.30, N° 4.
- ² Klaenhammer, T. R. Probiotic Bacteria: Today and Tomorrow. J. Nutr 2000; 130:415S – 416S.
- ³ Isolauri, E.; Seppo, S.; Ouwerhand, A. Probiotics. Best Practice and Research Clinical Gastroenterology 2004; Vol. 18, (2): 299 – 313.
- ⁴ Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organizations. Regulatory and clinical aspects of dairy probiotics. FAO/OMS Expert Consultation Report. 2001.
- ⁵ Céspedes, J.M.; Fernandez, J.; Pettinari, J.; Ruben, M.M. Variación de la concentración de IgA secretora salival en niños que ingieren leche fermentada conteniendo Lactobacillus casei como probiótico. Invenio 2010; N° 25: 125-134.
- ⁶ Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organizations. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Working Group Report 2002.
- ⁷ Nova, E.; Gómez, S.; Marcos, A. Alimentos funcionales. Aproximación a una nueva alimentación. Editores Dirección General de Salud Pública y Alimentación. Madrid 2008; Vol. 5: 88-104.
- ⁸ Meisel, H.; Bockelmann, W. Bioactive peptides encrypted in milk proteins: proteolytic activation and thropo functional properties. Lactic Acid Bacteria: genetics, metabolism and Applications. Foundation Antonie van Leeuwenhoek 1999; Vol. 76: 207-215.
- ⁹ Shihata, A.; Shah, N.P. Proteolytic profiles of yogurt and probiotic bacteria. International Dairy Journal 2000; Vol. 10: 401-408.
- ¹⁰ Beshkova, D.; Simova, E.; Frengova, G.; Simov, Z. Production of amino acids by yogurt bacteria. Biotechnology Prog. 2008; Vol. 14: 963-965.
- ¹¹ Vinderola, G.; Céspedes, M.; Mateolli, D.; Cardenas, P.; Lescano, M.; Aimaretti, N., Reinheimer, J. Changes in gastric resistance of Lactobacillus casei in flavoured commercial fermented milks during refrigerated storage. International Journal of Dairy Technology 2011; Vol. 64: 2.
- ¹² Martínez Alvarez, J.R.; Arpe Muñoz, C.; Urrialde, R.; Fontecha, J. Nuevos alimentos para nuevas necesidades. Nutrición y Salud 2008, Madrid; Vol. 3: 81-96.
- ¹³ Patel, J.R.; Dave, J.; Dave, R.I.; Sannabhadti, S.S. Effect of feeding milk fermented with mixed culture of human strains of lactobacilli on faecal lactobacilli and coliform counts in human test subjects. Indian J. Dairy Sci. 1992; Vol. 45: 379–382.
- ¹⁴ Sepp, E.; Mikelsaar, M.; Salminen, S. Effect of administration of Lactobacillus casei on the gastrointestinal microbiota of newborns. Microb Ecol Health Dis 1993; Vol. 6: 309–314.
- ¹⁵ Bottazzi, V. ; Mercenier, A. Propriétés prophylactiques et thérapeutiques des bactéries lactiques. (Prophylactic and therapeutic properties of lactic acid bacteria). Uriage France, Lorica 1994; Vol 2: 409–418.
- ¹⁶ Ochoa, M.Z. El Sistema Inmunológico de las Mucosas. Revista Cubana Med. Gen Integr. 2002; Vol. 5.
- ¹⁷ Marteau, P.; Seksik, P.; Jian, R. Probiotics and health: new facts and ideas. Curr Opin Biotechnol. 2002; Vol. 13: 486-489.
- ¹⁸ Bosscher, D.; Breynaert, A.; Pieters, L.; Hermans, N. Food-based strategies to modulate the composition of the intestinal microbiota and their associated health effects. J Physiol Pharmacol 2009; Vol. 60: 5-11.
- ¹⁹ Rachmilewitz, D., Katakura, K., Karmeli, F., Hayashi, T., Reimus Rudensky, B., Akira, S., Takeda, K, Lee, J.,; Takabayashi, K., Raz, E. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-infl ammato effects of probiotics in murine experimental colitis. Gastroenterology 2004; (126): 520-528.
- ²⁰ Jijon, H.; Backer J, Díaz H, Yeung H, Thiel D, Mckaigney C, De Simone C, Madsen K. DNA From Probiotic Bacteria Modulates Murine and Human Epithelial and Inmune Function. Gastroenterology 2004; (126): 1358 – 1373.

- ²¹ Midolo, P.D.; Lambert, J.R.; Hull, R.; Luo, F.; Grayson, M. L. In vitro inhibition of *Helicobacter pylori* NCTC 11637 by organic acid and lactic acid bacteria. *J. Appl. Bacteriol* 1995; Vol. 79.
- ²² Berner, M.F.; Brassart, D.; Neeser, J.R.; Serven, A.L. *Lactobacillus acidophilus* LA1 binds to cultured human intestinal cells lines and inhibits cell attachment and cell invasion by enterovirulent bacteria. *J. Appl. Bacteriol* 1994; Vol. 35.
- ²³ Meng-Tsung, T.; Girardin, S.; Regnault, B.; LeBourhis, I.; Dillies, M.; Copee, J.; Bourdet-Sicard, R.; Sansonetti, P.; Pedron, T. Antiinflammatory effect of *Lactobacillus casei* on *Shigella* infected human intestinal epithelial cells. *The Journal of Immunology* 2006.
- ²⁴ Medici, M.; Vinderola, C.G.; Weill, R.; Perdigon, G. Effect of fermented milk containing probiotic bacteria in the prevention of enteroinvasive *Escherichia coli* infection in mice. *J. Dairy Res* 2005; Vol. 72.
- ²⁵ Hatakka, K.; Savilahti, E.; Ponka, A. y cols. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ* 2001; Vol. 322: 1-5.
- ²⁶ Turchet, P.; Laurenzano, M.; Auboiron, S.; Antoine, J.M. Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot Study. *J. Nutr Health Aging* 2003; Vol. 7(2): 75-7.
- ²⁷ Marcos, A.; Wärnberg, J.; Nova, E.; Gómez, S.; Alvarez, A.; Alvarez, R.; Mateos, J.A.; Cobo, J.M. The effect of milk fermented by yogurt cultures plus *Lactobacillus casei* DN-114001 on the immune response of subjects under academic examination stress. *Eur J Nutr* 2004; Vol. 6: 381– 389.
- ²⁸ Parra, D., Martínez de Morentin, B.; Cobo, J.M.; Mateos, A.; Martínez, J.A. Monocyte Function in Healthy Middle-Aged People receiving fermented Milk Containing *Lactobacillus casei*. *J. Nutr Health Aging* 2004; Vol. 8(4): 208 –211.
- ²⁹ Guarner, F. Probióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal. *Nutr. Hosp.* 2003; Vol. 18(5): 275.
- ³⁰ Portier, A.; Boyaca, N.; Bougoudogo, F.; Dubarry, M.; Huneau, J.; Tome, D.; Dodin, A.; Coste, M. Fermented milk and increased antibody responses against Cholera in mice. *Int.J.Immunotherapy* 1993; Vol. 4.
- ³¹ Perdigon G, Macias M, Alvarez S, Oliver G, Pesce de Ruiz Holgado A. Sistemyc augmentation of the immune- response in mice by feeding fermented milk with *L. casei* and *L. acidophilus*. *Immunology* 1998; Vol. 63.
- ³² Oliver G. In vitro studies on the inhibition of the growth of *Shigella sonnei* by *L. casei* and *L. acidophilus*. *J. Appl. bacteriol* 1992; Vol. 73.
- ³³ Parassol N, Freitas M, Thoreux K., Dalmaso G, Bourdet-Sicard R, Rampal P. *Lactobacillus casei* DN-114001 inhibits the increased paracellular permeability of enteropathogenic *E. coli* – infected T84 cells. *Research in Microbiology* 2004; Vol 156.
- ³⁴ Dekker, J.; Collett, M.; Prasad J.; Gopal, P. Functionality of probiotics. *Pub.Med. Indexed for Medline* 2006.
- ³⁵ Paubert-Braquet, M.; Xiao Hu, G.; Gaudichon, C.; Hedef, N; Serikoff, A.; Bouley, C.; Bonavida, B.; Braquet, P.; Enhancement of host resistance against *Salmonella typhimurium* in mice fed a diet supplemented with yogurt or milks fermented with various *Lactobacillus casei*. *Int. J. Immunotherapy* 1995; Vol. 4.
- ³⁶ Cobo J. M. Nutrition Service DANONE. *Nutr. Hosp.* 2003; Vol. 18(5): 275.
- ³⁷ Gutierrez, N.; Gatelum, M.G.; Rodríguez, B.; Nevares, G. Control y reducción del crecimiento de *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus* en queso Chihuahua mediante el uso de un co-cultivo de *L. acidophilus* y *L. casei* durante su elaboración. *Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Chihuahua.* 2005.
- ³⁸ Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, Ainlomme H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr. Res.* 1992; Vol. 32: 141-144.
- ³⁹ Guerin Danan C, Meslin JC, Chambard A, Charpilienne A, Relano P, Bouley C, Cohen J. Food supplementation with milk fermented by *L. casei*. *DN* 2001; Vol. 114.
- ⁴⁰ Minelli EB, Benini A. Relationship between number of bacteria and their probiotic effect. *Microb. Ecol. Health Dis.* 2008; Vol. 20: 180-183.
- ⁴¹ Vinderola, C.G.; Reinheimer, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *Lactobacillus acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. *Int. Dairy J.* 2000; Vol. 10: 271- 275.
- ⁴² Moreno de Blanc, A.; Chaves S.; Perdigon G y cols. Efectos del consumo prolongado de probióticos en la inmunidad de las mucosas. Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-Conicet), Universidad Nacional de Tucumán, San Miguel de Tucumán, Argentina. *Immunobiology* 2008; Vol. 213(2): 97-108.
- ⁴³ Tormo, R.; Infante, D.; Roselló, E.; Bartolomé, R. Efecto de la ingesta de leche fermentada con *Lactobacillus casei* DN-114 001 sobre la flora intestinal. *An Pediatr (Barc).* 2006; Vol. 65: 448-453.