

## INMUNONUTRICIÓN

**06** *Lactobacillus plantarum* C4 inhibe la respuesta de citoquinas proinflamatorias inducida por bacterias patógenas en macrófagos murinos por un mecanismo independiente de la interleuquina 10.

*Jiménez-Valera M<sup>1</sup>, Moreno E<sup>1</sup>, Ruiz-López M<sup>1</sup>D<sup>2</sup>, Bergillo-Meca T<sup>2</sup>, Moreno-Montoro M<sup>2</sup>, Lasserrot A<sup>3</sup>, Ruiz-Bravo A<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y <sup>2</sup>Departamento de Nutrición y Bromatología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. 18071 Granada; <sup>3</sup>Empresa Biotmicrogen S.L., Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, 18100 Armilla, Granada.

En estudios previos, la cepa C4 de *Lactobacillus plantarum* ha mostrado capacidad para inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias en ratones infectados experimentalmente con *Listeria monocytogenes*. El objetivo de este trabajo fue investigar la influencia de C4 en la respuesta de los macrófagos murinos RAW 264.7 a bacterias Gram-positivas y Gram-negativas potencialmente enteropatógenas. Monocapas de células RAW se incubaron durante 4 h con suspensiones de *Yersinia enterocolitica*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* y *Listeria monocytogenes*, a una concentración final de  $10^6$  bacterias viables por ml. La concentración de citoquinas en los sobrenadantes de los cultivos se determinó mediante inmunoensayos comerciales. La cepa C4 no indujo producción de las citoquinas proinflamatorias IL-1 $\alpha$  e IL-12. *L. monocytogenes* y *S. typhimurium* indujeron IL-1 $\alpha$ , mientras que *Y. enterocolitica*, *E. coli* y *S. typhimurium* indujeron IL-12. Cuando C4 se incubó conjuntamente con las otras cepas, inhibió la producción de IL-1 $\alpha$  por *L. monocytogenes* y *S. typhimurium*, y de IL-12 por *Y. enterocolitica* y *E. coli*. Curiosamente, cuando se determinaron los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10, se observó que C4 no solo no indujo esta citoquina, sino que inhibió su producción inducida por *E. coli*, *L. monocytogenes*, *Y. enterocolitica* y *S. typhimurium*. El paralelismo en las determinaciones de IL-1 y de IL-10 no es sorprendente, ya que la expresión de los genes de ambas citoquinas está promovida por factores de transcripción de la misma familia NF- $\kappa$ B. En conclusión, la acción antiinflamatoria de C4 no parece mediada por la inducción de IL-10.

#### 14 La ingesta regular del probiótico *Lactobacillus plantarum* 3547 mejora los marcadores de inflamación medidos en la fase acuosa de las heces en población con sobrepeso y obesidad

López-Plaza B, Bermejo LM, Sarrion-Pelous MD, Ariza-Astolfi MJ, Thabata KW, Palma-Milla S, Lisbona-Catalan A, Gómez-Candela C. Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ). Grupo de Investigación en Nutrición y Alimentos Funcionales (NUTRINVEST). Paseo de la Castellana 261, 28046, Madrid.

El objetivo de este estudio ha sido valorar el efecto de la ingesta regular del probiótico *Lactobacillus plantarum* 3547 (*Lp3547*) sobre los marcadores de inflamación medidos en la fase acuosa de heces (FAH) de personas con sobrepeso y obesidad.

Se llevó a cabo una intervención nutricional con mantenimiento del patrón de actividad física y del dietético habitual, paralelo, doble ciego y controlado con placebo, de 10 semanas de duración en voluntarios de ambos sexos con sobrepeso y obesidad (IMC $\geq$ 27- $<$ 35), de 45-60 años, sin enfermedades crónicas ni tratamiento farmacológico. Tras 2 semanas de estabilización de la dieta y supresión de alimentos fermentados los participantes fueron aleatorizados en 2 grupos: Grupo Probiótico (GLP;  $n=9$ ) que consumió una cápsula diaria de *Lp3547* ( $5 \times 10^9$  ufc) y Grupo Placebo (GP;  $n=11$ ) cuya cápsula contenía maltodextrina. Al inicio y al final de la intervención se recolectaron muestras de heces que fueron centrifugadas para determinar el perfil inflamatorio en la FAH mediante ELISA. Parámetros bioquímicos, antropométricos y dietéticos fueron evaluados.

Al inicio de la intervención ambos grupos presentaban valores similares de citoquinas en FAH. Al finalizar la intervención los participantes que pertenecieron al GLP presentaron una disminución significativa de IL1 $\beta$  comparada con los pertenecientes al GP

( $-70,8 \pm 124,0$  vs  $10,1 \pm 23,3$  pg/ml) ( $p < 0,05$ ). La IL-1 $\alpha$  presentó un aumento significativo en los participantes del GP entre el inicio y el fin de la intervención ( $628,5 \pm 643,8 \rightarrow 932,2 \pm 576,4$  pg/ml) ( $p < 0,05$ ) mientras que los pertenecientes al GLP permanecieron estables ( $765,6 \pm 739,1 \rightarrow 627,6 \pm 413,1$  pg/ml). El resto de las citoquinas no sufrieron cambios significativos.

En conclusión, se puede indicar que el consumo regular durante 8 semanas del probiótico *Lp3547* mejora el perfil inflamatorio intestinal disminuyendo los niveles de IL-1 $\beta$  y estabilizando los de IL-1 $\alpha$  en personas con un sobrepeso y obesidad.

El presente estudio ha sido apoyado por grupo CARINSA a través del proyecto HUENUFOOD (CEN-20101016) del programa CENIT del Ministerio de Economía y Competitividad de España.

#### 25 Propiedades antiinflamatorias (IL-10) e inducción de respuestas adaptativas de tipo Th1 de las cepas bacterianas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BS 01 (LMG P-21384) y *Lactobacillus rhamnosus* LR 05 (DSM 19739)

Palomares O<sup>1</sup>, Nicola S<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Complutense de Madrid, <sup>2</sup>Departamento de Inmunología y Citofluorimetría, Biolab research srl, Novara, Italia.

La alergia es una enfermedad mediada por linfocitos Th2 caracterizada por la producción de IgE frente a sustancias inocuas denominadas alérgenos. Diversos estudios demuestran la utilización beneficiosa de probióticos en prevención y tratamiento de la alergia pero los mecanismos inmunológicos implicados no están totalmente dilucidados. El objetivo de este trabajo es estudiar las respuestas inmunitarias *in vitro* que las cepas bacterianas probióticas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BS 01 y *Lactobacillus rhamnosus* LR 05 inducen en células sanguíneas periféricas mononucleares (PBMC). Las cepas probióticas BS 01 y LR 05 inducen proliferación de PBMC modificando significativamente el porcentaje de células del sistema inmune innato y adaptativo. BS 01 y LR 05 inducen un descenso significativo del porcentaje de monocitos CD14<sup>+</sup> y un aumento significativo del porcentaje de células CD16<sup>+</sup>/CD56<sup>+</sup> y células dendríticas Lin<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup> en PBMC. BS 01 aumenta significativamente el porcentaje de células T CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> sin alterar el porcentaje de células T CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> o células B CD19<sup>+</sup>/CD20<sup>+</sup>. LR 05 incrementa el porcentaje de células T CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> y células B. Ambas cepas inducen la producción de IL-12p70 e IL-10 con clara predominancia de la citoquina inmunoreguladora IL-10. Además, se observa un incremento en citoquinas Th1 (IFN- $\gamma$ ) y Th2 (IL-4) con claro predominio de respuestas Th1. En resumen, este trabajo demuestra que las cepas probióticas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BS 01 y *Lactobacillus rhamnosus* LR 05 presentan propiedades antiinflamatorias e inmunoreguladoras que favorecen la generación de respuestas de tipo Th1, lo que sugiere su utilización terapéutica para el tratamiento de la alergia.

#### 31 Nueva síntesis enzimática y caracterización estructural de dos oligosacáridos potencialmente bioactivos

Díez-Munición M<sup>1</sup>, Herrero M<sup>1</sup>, Jimeno ML<sup>2</sup>, Montilla A<sup>1</sup>, Corzo N<sup>1</sup>, Olano A<sup>1</sup>, Moreno FJ<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Dpto. Bioactividad y Análisis de Alimentos. Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, CIAL (CSIC-UAM), c/Nicolás Cabrera 9, 28049 Madrid, Spain. <sup>2</sup>Centro Química Orgánica "Lora-Tamayo" (CSIC), c/Juan de la Cierva 3, 28006 Madrid, Spain.

La producción de nuevos oligosacáridos bioactivos con actividad prebiótica suscita en la actualidad un gran interés debido a su posible uso como ingredientes funcionales. En el presente trabajo, se describe la producción de dos oligosacáridos con potencial bioactividad, denominados glucosil-lactosa ( $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\alpha$ -D-Glu-(2 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-Glu) y lactulosacarosa ( $\beta$ -D-Gal-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-Fru-(2 $\rightarrow$ 1)- $\alpha$ -D-Glu), mediante síntesis enzimática empleando una dextranasa (EC 2.4.1.5) de *Leuconostoc mesenteroides* B512-F. Estos trisacáridos se sintetizaron como consecuencia de la transferencia de la unidad de glucosa de la sacarosa (donante) a la lactosa y lactulosa (aceptores), dando lugar a rendimientos en peso respecto a los aceptores de partida de hasta un 50% y un 35%, respectivamente, bajo las condiciones óptimas de reacción.

Atendiendo a las estructuras elucidadas por RMN (fig. 1), ambos oligosacáridos podrían presentar actividad prebiótica debido a que se ha descrito que el enlace  $\alpha$ -(2 $\rightarrow$ 1) presenta una alta resistencia a la digestión gastrointestinal en animales y humanos. Además, el trisacárido glucosil-lactosa, es un derivado galactosilado de la kojibiosa (2-O- $\alpha$ -D-glucopiranosil-D-glucosa), disacárido que presenta un gran potencial prebiótico según diversos estudios descritos en la bibliografía. Igualmente, la lactulosacarosa, al tener lactulosa como estructura base, debe poseer las propiedades beneficiosas atribuidas a este disacárido, tales como la estimulación selectiva de las bacterias beneficiosas en el intestino grueso y la regulación del tiempo de tránsito intestinal. Asimismo, dado su mayor peso molecular con respecto a la lactulosa, podría presentar la capacidad de ser fermentada en las zonas más distales del colon, que es la región del intestino grueso que presenta una mayor incidencia de patologías digestivas y oncológicas. En el futuro se realizarán estudios que permitan determinar la potencial bioactividad de estos trisacáridos.

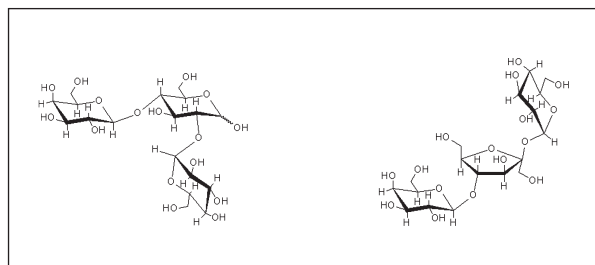


Fig. 1.—Estructuras elucidadas por RMN de los trisacáridos glucosil-lactosa (izquierda) y lactulosacarosa (derecha).

### 38 Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) protects intestinal barrier against damage produced by the secreted autotransporter serin protease SAT

Toledo L, Giménez R, Aguilera L, Aguilar J, Badía J, Baldomà L. Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona i Institut de Biomedicina la Universitat de Barcelona. Av. Diagonal, 643. 08028-Barcelona

*Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) is a harmless probiotic used in the treatment of intestinal disorders due to its beneficial effects on intestinal epithelial barrier and immune function. EcN is able to establish itself in the human intestine and out-compete pathogens by expressing numerous fitness factors such as adhesins, proteases and microcins, most of them encoded by specific genes mainly clustered in four islands. One of these factors is the serin protease autotransporter Sat, which has been proposed to act as a virulence factor in some enteropathogenic *E. coli* strains by promoting lesions in the tight junctions of polarized Caco-2 cells. Proteomic studies performed by our group identified Sat in EcN culture supernatants. Here we present Sat functional studies. The *sat* gene from EcN was cloned and the encoded protein shown to display serin protease activity *in vitro*. The function of Sat on the intestinal barrier integrity was assessed using monolayers of polarized Caco-2 cells incubated with wild type EcN, the knockout mutant EcN *sat::cm* and the non-adherent *E. coli* strain HB101, as well as with the same strains transformed with the recombinant plasmid expressing Sat. After three-hours incubation TER and paracellular permeability to <sup>14</sup>C-mannitol were measured. A significant increase in paracellular permeability was only observed with the recombinant HB101 strain expressing Sat. Expression of this protease in the genomic background of the probiotic strain EcN did not alter the barrier permeability. The same results were obtained when Caco-2 monolayers were incubated with concentrated culture supernatants collected from these strains.

### 44 Effect of cocoa fibre on the intraepithelial lymphocyte composition in rat colon

Massot-Cladera M, Rigo MM, Abril-Gil M, Franch A, Castellote C, Pérez-Cano FJ, Castell M

Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain. Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA), Barcelona, Spain

We have previously demonstrated that a 10% cocoa diet induces significant changes in the rat lymphocytes from Peyer's patches and mesenteric lymph nodes<sup>1</sup>. Moreover, it also affects the microbiota composition in rats<sup>2</sup>. The aim of the present study was to establish whether the cocoa diet was also influencing the intestinal effector cells, by means of the analysis of the colon intraepithelial lymphocyte (IEL) population. Moreover, as these modulatory effects could be attributed to flavonoids or other compounds present in cocoa such as fibre, a cocoa-fibre-enriched diet was also studied. For three weeks Wistar rats were fed either standard diet, diet containing 10% cocoa (with 0.2% polyphenols, 5.5% soluble fibre and 16.5% insoluble fibre), or two other diets with same proportion of insoluble fibre, one based on cocoa fibre and other containing inulin. Faecal and caecal pH levels were determined along and at the end of the study, respectively. After the nutritional intervention, colon IEL were phenotyped by immunofluorescence staining and flow cytometry analysis. Cocoa fibre, cocoa and inulin diets decreased both faecal and caecal pH. The cocoa group, but not the cocoa fibre-diet, reduced the proportion of TCR $\alpha\beta$ +CD3+CD8 $\alpha\beta$ + and TCR $\alpha\beta$ +CD3+CD4+ IEL. In addition, it increased NK-IEL proportion and the percentage of CD103+ IEL. These results demonstrate that faecal pH might be a good indicator of changes in microbiota. On the other hand, the cocoa fibre seems not to be the responsible of the changes observed on the intestinal immune system after cocoa nutritional intervention.

Referencias:

1. Ramiro-Puig E, et al. Intestinal immune system of young rats influenced by cocoa-enriched diet. *J Nutr Biochem* 2008; 19: 555-565.
2. Massot-Cladera M, et al. Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk. *Arch Biochem Biophys* 2012; 15: 105-112.

**45 Influence of different sources of cocoa polyphenols on intestinal microbiota and IgA of Wistar rats**

Massot-Cladera M, Torres S, Abril-Gil M, Pérez-Berezo T, Franch A, Castell M, Pérez-Cano FJ.

Department of Physiology, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain. Institut de Recerca en Nutrició i Seguretat Alimentària (INSA), Barcelona, Spain

Previous studies performed in our laboratory showed that a 10% cocoa diet containing 0.2% (w/w) of polyphenols was able to affect the growth of certain species of gut microbiota<sup>1</sup> and diminish the synthesis of intestinal immunoglobulins<sup>2</sup>. The aim of the present study was to ascertain whether this modulatory effect could be attributed to flavonoids or to other compounds present in cocoa, such as fibre. For this purpose we used different sources of cocoa with distinct flavonoid and fibre composition. Briefly, Wistar rats were fed standard diet, diet containing 0.2% cocoa-polyphenols from defatted cocoa (Nutrexa SL) or diet containing 0.4% or 0.8% cocoa-polyphenols from non-fermented cocoa (Natraceutical Group), for four weeks. Intestinal IgA was quantified by ELISA and faecal microbiota composition was characterized by FISH coupled to flow cytometry analysis using specific probes directed to 16S rRNA of main bacteria groups. All polyphenol-enriched cocoa diets attenuated intestinal IgA production and IgA coating bacteria. Moreover, they modified gut microbiota composition, by means of reducing the proportion of *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* and *E.coli* groups and preventing the age-associated increase in the percentage of *Bacteroides*, *Streptococcus* and *Staphylococcus*. All these effects were independent of the flavonoid dose because the intake of diets with 0.2% polyphenols (high fibre) from defatted cocoa and 0.8% polyphenols from non-fermented cocoa (low fibre) were the most effective. Therefore, although these effects are mainly attributed to the polyphenols present in cocoa, other cocoa ingredients such as fibre or methylxanthines may be somehow playing a role.

Referencias:

1. Massot-Cladera M, et al. Cocoa modulatory effect on rat faecal microbiota and colonic crosstalk. *Arch Biochem Biophys* 2012; 15: 105-112.
2. Pérez-Berezo T, et al. Cocoa-enriched diets modulate intestinal and systemic humoral immune response in young adult rats. *Mol Nutr Food Res* 2011; 55S: 56-66.

**52 Alteración de la respuesta inmune frente a bacterias comensales y gliadinas en ratones envejecidos prematuramente**

De Palma G<sup>1</sup>, Vida C<sup>2</sup>, Santacruz A<sup>1</sup>, De Castro NM<sup>2</sup>, De la Fuente, M<sup>2</sup>, Sanz Y<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Ecología Microbiana y Nutrición. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Valencia. <sup>2</sup>Departamento de Fisiología. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía provocada por una reacción inmunológica anómala a las proteínas del gluten en individuos predispuestos. Los casos típicos se presentan en los primeros años de vida tras la exposición a la gliadina del gluten, pero los casos diagnosticados en la edad adulta están aumentando. Esto indica que otros factores están implicados en el desencadenamiento de esta patología, como puede ser el estrés. Dado que el estrés causa alteraciones en la comunicación entre los sistemas nervioso e inmunológico, contribuyendo al desarrollo de diversas patologías, el objetivo de este estudio ha sido determinar si la respuesta de esplenocitos y leucocitos derivados de nódulos linfáticos mesentéricos frente a gliadinas y bacterias intestinales, está alterada en ratones adultos prematuramente envejecidos (PAM) (animales caracterizados por presentar una respuesta alterada al estrés) en comparación con controles no prematuramente envejecidos (NPAM). Los esplenocitos de ratones PAM expuestos a gliadinas y al péptido 33-mer produjeron mayor síntesis de TNF- $\alpha$  ( $P=0.005$ ) y menor de IL-10 y un aumento del porcentaje de células T CD4+ y CD8+ en comparación con las células de ratones NPAM. Los leucocitos de ratones PAM incubados con péptido 33-mer, *B. bifidum* CECT 7365 y *Shigella* CBD8 secretaron menos IFN- $\gamma$  que los de ratones NPAM ( $P=0.010-0.044$ ), aunque la producción basal de esta citoquina fue mayor. Los resultados indican que los esplenocitos de PAM muestran una elevada respuesta inflamatoria frente a las gliadinas, lo que podría favorecer el desarrollo de la EC, siendo los PAM un buen modelo para esta patología.

Financiación: Ministerio Economía y Competitividad (AGL2011-25169 y Consolider Fun-C-Food CSD2007-00063); MICINN (BFU2011-30336); UCM (910379ENEROINN); RETICEF (RD06/0013/0003; RD12/0043/0018).

**53 Potencial antiinflamatorio de  $\alpha$ -glucanos producidos por bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de productos cárnicos**

Nácher-Vázquez M<sup>1,2</sup>, López P<sup>2</sup>, Prieto A<sup>3</sup>, Gil ML<sup>4</sup>, Gozalbo D<sup>4</sup>, y Aznar R<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Biotecnología, Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (CSIC), Burjassot, Valencia. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología Molecular y de Biología de las Infecciones, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid. <sup>3</sup>Departamento de Biología Medioambiental, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid. <sup>4</sup>Departamento de Microbiología y Ecología, Universidad de Valencia, Burjassot, Valencia.

Entre los exopolisacáridos producidos por bacterias del ácido láctico (BAL), se encuentran los dextranos, homopolisacáridos de glucosa con enlaces  $\alpha$ -(1,6) y con ramificaciones  $\alpha$ -(1,3),  $\alpha$ -(1,4) o  $\alpha$ -(1,2) cuyo tamaño y grado de ramificación es dependiente de cepa. En el presente trabajo se estudió el potencial antiinflamatorio de tres  $\alpha$ -glucanos, producidos por dos *Lactobacilos* y un *Leuconostoc* aislados de productos cárnicos. Los  $\alpha$ -glucanos producidos en medio definido con sacarosa, fueron purificados para su posterior utilización en estudios con macrófagos intraperitoneales de ratón. Su caracterización mediante métodos físico-químicos reveló que, al igual que los dextranos comerciales producidos por una cepa de *Leuconostoc mesenteroides*, son (1,6)- $\alpha$ -glucanos con ramificaciones  $\alpha$ -(1,3). Los tres  $\alpha$ -glucanos ( $>2 \times 10^6$  Da), y dos dextranos comerciales, T10 ( $1 \times 10^4$  Da) y T2000 ( $2 \times 10^6$  Da), fueron utilizados en primer

lugar en ensayos de estimulación frente a macrófagos; se detoxificaron con polimixina B y se utilizaron en concentración de 50 µg/ml determinándose los niveles de la citocina proinflamatoria TNF-α por ELISA. En ninguno de los casos se observó respuesta, lo que apoya su utilización en aplicaciones sanitarias o agroalimentarias. En segundo lugar, se ensayó su potencial antiinflamatorio mediante ensayos de co-incubación con compuestos que desencadenan respuestas proinflamatorias como el lipopolisacárido (LPS) de *Escherichia coli* (0,25 µg/mL); Zymosan, partículas de paredes celulares de *Saccharomyces cerevisiae* (100 µg/mL); levaduras de *Candida albicans* (10<sup>7</sup>/mL), y curdlano, (1,3)-β-glucano lineal de *Alcaligenes faecalis* (20 µg/mL). Los niveles de TNF-α registrados se mantenían en presencia de Zymosan, levaduras ó curdlano, mientras que se reducían de forma significativa en respuesta al LPS.

### 58 Respuesta en tiempo real de la línea intestinal HT29 como medida de bioactividad de leche materna y de fórmula: ¿potencial área para aplicación de pro- y prebióticos?

Fernández-García M<sup>1</sup>, Solís G<sup>2</sup>, Gueimonde M<sup>1</sup>, Ruas-Madiedo P<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC). Villaviciosa, Asturias, mgueimonde@ipla.csic.es, ruas-madiedo@ipla.csic.es

<sup>2</sup>Servicio de Pediatría, Hospital Universitario Central de Asturias – Servicio de Salud del Principado de Asturias (HUCA-SESPA), Oviedo, Asturias

La alimentación con leche materna en los primeros estadios de vida es crucial para el correcto desarrollo intestinal y la maduración del sistema inmune del neonato, sin embargo las fórmulas infantiles no logran emular a la leche materna en cuanto a su bioactividad. En nuestro grupo hemos implementado una nueva técnica para analizar en tiempo real el comportamiento de líneas celulares en presencia de diversos bioactivos. Para ello empleamos el equipo RTCA-DP que registra cambios de impedancia relacionados con el estado de crecimiento (en proliferación o confluencia) y morfología de células eucariotas adherentes. En este trabajo se utilizó la línea celular de epitelio intestinal humano HT29 en estado proliferativo (en división) y confluyente diferenciado (monocapa) para evaluar su respuesta en presencia de leche humana y de fórmula. En el escrutinio inicial se analizaron 40 muestras de leche donadas por 11 madres en distintos periodos de lactancia (1, 10, 30 y 90 días) y 7 muestras comerciales de leche maternizada de inicio. Se observó que la mayoría de las leches maternas inhibieron la proliferación celular y afectaron a la integridad de la monocapa de HT29, mientras que de las células epiteliales en contacto con leches de fórmula se comportaron como el control en ausencia de bioactivos (medio de cultivo). Se pretende emplear esta técnica para analizar el potencial de cepas probióticas de la colección del IPLA, procedentes de diversos orígenes, que añadidas a una leche comercial de fórmula mimeticen el efecto bioactivo obtenido con la leche materna.

### 62 Impact of the commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* in a non active inflammation murine model

Martin R<sup>1,2</sup>, Chain F<sup>1</sup>, Lu J<sup>2</sup>, Jury J<sup>2</sup>, Gratadoux JJ<sup>1</sup>, Verdu E<sup>2</sup>, Bercik P<sup>2</sup>, Sokol H<sup>1,3</sup>, Langella P<sup>1,2</sup>, Bermudez-Humaran LG<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Commensal and Probiotics-Host Interactions Laboratory, INRA, UMR1319 Micalis, F-78350 Jouy-en-Josas, France. <sup>2</sup>Farncombe Family

Digestive Health Research Institute, McMaster University, 1200 Main St West, H.Sc. 3N6, Hamilton, Ontario, Canada. <sup>3</sup>Department of Gastroenterology and Nutrition, AP-HP, Hôpital Saint-Antoine F-75012 and UPMC Univ Paris 06 F-75005, Paris, France.

Irritable bowel syndrome (IBS) is a disorder characterized by chronic abdominal pain, discomfort, bloating, and a low-grade inflammation status in the gut<sup>1</sup>. Although its etiology is diverse, the development of more realistic animal models and reproducible readouts is still required in order to better mimic and study this disorder. The fact that a decrease in the abundance and biodiversity of the commensal bacterium *Faecalibacterium prausnitzii* has been observed in IBS-patients<sup>2</sup> combined to its protective role in acute chemical-induced colitis model<sup>3</sup> have led us to develop a new low-grade inflammation model to evaluate its properties.

In this study, we reproduced the recovery-recurrence periods observed in IBS-patients in a new chronic model characterized by two episodes of DiNitro-Benzene-Sulfonic-acid (DNBS)-challenge. We tested the effects of our model strain *F. prausnitzii* A2-165 and its supernatant and we compared its effect with that of a recombinant strain of *Lactococcus lactis* secreting biologically active anti-inflammatory interleukin-10. No significant differences were observed either in the macroscopic and microscopic scores or mieloperoxidase activity between DNBS-treated and untreated mice thus validating our model as a low-grade inflammation one. Finally, *in vivo* and *ex vivo* gut permeability, colonic serotonin levels and cytokine profiles were measured as readouts of a non-overt and active inflammation. Interestingly, significant protective effects in terms of permeability, immune activation and gut-function parameters were observed in mice treated with both *F. prausnitzii* and its supernatant.

These results confirm the high potential of *F. prausnitzii* as a novel probiotic to prevent and to treat IBS-patients.

#### References:

1. Ford AC, Talley NJ. *J Gastroenterol* 2011; 46(4): 421-31
2. Rajilić-Stojanović M, Biagi E, Heilig HG et al. *Gastroenterology* 2011; 141(5): 1792-1801.
3. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L et al. *PNAS USA* 2008; 105(43): 16731-16736.

### 70 Activación de macrófagos por β-glucanos bacterianos

Notarigo S<sup>\*</sup>, Fernández de Palencia P, Mohedano ML, López P

Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC). Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid.

Los exopolisacáridos (EPS) sintetizados por bacterias poseen diversas funciones como el reconocimiento e interacción celular, la adherencia a superficies y la formación de biofilms. Estudios previos han mostrado que estirpes de *Pediococcus parvulus* productoras de (1→3)-β-glucano con ramificaciones 1→2 son capaces de inmunomodular macrófagos humanos<sup>1,2</sup> y que la presencia de sus EPS potencia la adhesión de las bacterias a células epiteliales del intestino humano<sup>1,2</sup>. Además, el biopolímero producido por *P. parvulus* 2.6 y purificado ha mostrado un efecto prebiótico sobre *Lactobacillus plantarum* WCFS1 potenciando su crecimiento y viabilidad<sup>3</sup>.

En este trabajo hemos utilizado dicho β-glucano producido por las estirpes *P. parvulus* 2.6 y *Lactococcus lactis* NZ9000[pNGTF] y purificado<sup>4</sup>. Se ha analizado su influencia en la línea celular

THP-1 diferenciada a macrófagos, para los cuales el EPS no presentó efectos tóxicos.

El análisis de la influencia del  $\beta$ -glucano en la producción de citoquinas por THP-1 diferenciadas a macrófagos mostró un aumento de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-12 p40 e IL-10 indicando un efecto inmumomodulador.

Para comprobar si dicho efecto puede estar modulado por células epiteliales del intestino, se ha utilizado la técnica de los transwell de doble capa, la línea celular de enterocitos, Caco-2 en el inserto, y THP-1 72H PMA en la zona inferior. El análisis de los niveles de interleuquinas ha mostrado una modulación de las THP-1 72H PMA, por la interacción de las células Caco-2 con el  $\beta$ -glucano.

#### Referencias:

1. Fernández de Palencia P et al. Appl Environ Microbiol 2009; 75: 4887-4891.
2. Garai-Ibabe G et al. Bioresour Technol 2010; 101: 9254-9263.
3. Russo P et al. Int J Mol Sci 2012; 13: 6026-6039.
4. Notararigo S et al. Carbohydrate Polymers <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.05.016>.

## 71 Fitasas de bifidobacterias y su aplicación en alimentación

García-Mantrana I, Sanz-Penella JM, Yebra MJ, Haros M, Monedero V Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC). Av. Agustín Escardino 7, 46980 Paterna, Valencia. [btcmn@iata.csic.es](mailto:btcmn@iata.csic.es)

Algunas especies de bifidobacterias, como *Bifidobacterium longum* o *Bifidobacterium pseudocatenulatum*, muestran actividad fitasa capaz de degradar el mio-inositol hexakisfosfato (InsP<sub>6</sub> o fitato) presente en algunos productos de origen vegetal. El InsP<sub>6</sub> es considerado un antinutriente por su elevada capacidad de quelar minerales como el Ca, Zn, Mg o Fe, reduciendo su biodisponibilidad a nivel intestinal. Por esta razón, la actividad fitasa podría ser considerada como una cualidad probiótica. Las fitasas de las dos especies anteriores han sido aisladas y caracterizadas. Tanto las propias bifidobacterias como los enzimas purificados se han utilizado en la elaboración de alimentos de alto contenido en fitato, consiguiéndose su reducción y una acumulación de derivados de menor grado de fosforilación, algunos de los cuales poseen cualidades funcionales. Las especies de lactobacilos no presentan actividad fitasa, por lo que los genes de las fitasas de bifidobacterias han sido expresadas en *Lactobacillus casei*, confirmando esta nueva actividad a la cepa. *L. casei* expresando las fitasas de *B. longum* o *B. pseudocatenulatum* es capaz de degradar eficazmente el InsP<sub>6</sub> y dar lugar a acumulación de InsP<sub>3</sub>. Estos resultados abren las puertas a la elaboración de nuevos productos fermentados probióticos con un reducido contenido en fitatos.

## 75 Comparative study of the *in vitro* immunomodulatory effects of the probiotics *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Enterococcus faecalis* UGRA10

Rodríguez-Nogales A<sup>1</sup>, Algieri F<sup>1</sup>, Vezza T<sup>1</sup>, Garrido-Mesa N<sup>1</sup>, Rodríguez-Cabezas M<sup>2</sup>E<sup>1</sup>, Comalada M<sup>2</sup>, Utrilla M<sup>2</sup>P<sup>1</sup>, Martín-Bueno M<sup>2</sup>, Valdivia E<sup>2</sup>, Maqueda M<sup>2</sup>, Olivares M<sup>2</sup>, Zarzuelo A<sup>1</sup>, Gálvez J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Department of Pharmacology, CIBER-EHD, CIBM, University of Granada.

<sup>2</sup>Institute for Research in Biomedicine Barcelona, Barcelona.

<sup>3</sup>Department of Microbiology, University of Granada.

<sup>4</sup>Biosearch, Granada

Probiotics have shown to exert beneficial effects due to their immunomodulatory properties. The aim of the present study was to compare the *in vitro* effects of two probiotics *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Enterococcus faecalis* UGRA10 (live or death) in two different cell types involved in the immune response: Caco-2 cells (intestine epithelial cells) and RAW 264.7 cells (macrophages). In addition, we investigated the effects of these probiotics on the signalling pathways associated to mitogen-activated protein (MAP) kinases in Caco-2 cells.

Cells were incubated for 3 hours with each probiotic (live or death) (10<sup>8</sup> CFU/ml), and stimulated with LPS (100 ng/ml) or IL-1 $\beta$  (1 ng/ml) for 30 minutes (western blot) or 24 h (IL-8 or nitrite determination). Western blots were performed with protein extracts to analyze phosphorylated or total forms of p38 MAP kinase, p42/44 ERK or SAPK/JNK.

Both *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Enterococcus faecalis* UGRA10, live or death, inhibited the stimulated production of either IL-8 (Caco-2 cells) and nitric oxide (RAW 264.7) in a similar way. In the epithelial cells, this inhibitory effect was associated with a reduced phosphorylation of p42/44 ERK and SAPK/JNK when it compared with stimulated cells without probiotic.

In conclusion, the viability of either *E. faecalis* UGRA10 or *L. fermentum* CECT5716 to downregulate the stimulated immune response is not essential, and, at least in Caco-2 cells, this is obtained through inhibition of MAP kinase pathways for both probiotics.

## 79 Intestinal anti-inflammatory effects of *Bifidobacterium breve* CECT7263 in the TNBS model of rat colitis

Algieri F<sup>1</sup>, Rodríguez-Nogales A<sup>1</sup>, Garrido-Mesa N<sup>1</sup>, Zorrilla P<sup>1</sup>, Rodríguez-Cabezas M<sup>2</sup>E<sup>1</sup>, Utrilla M<sup>2</sup>P<sup>1</sup>, Olivares M<sup>2</sup>, Zarzuelo A<sup>1</sup>, Gálvez J<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>CIBER-EHD, Department of Pharmacology, Center for Biomedical Research, University of Granada, Spain. <sup>2</sup>Department of Immunology and Animal Sciences, Biosearch S.A., Granada, Spain

Different strains of *Bifidobacterium breve* have been reported to exert intestinal anti-inflammatory properties in experimental colitis. The present study evaluates the effects of *Bifidobacterium breve* CECT7263, a probiotic isolated from human milk, in the TNBS model of rat colitis.

*Bifidobacterium breve* CECT7263 (Biosearch, S.A.) was given orally (5 $\times$ 10<sup>8</sup> CFU/rat/day) to Wistar rats, for two weeks before TNBS colitis induction, and thereafter until colonic evaluation one week later; both macroscopically and biochemically: myeloperoxidase activity (MPO), TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels. Also, microbiological studies were performed in the luminal contents by determining lactobacilli and bifidobacteria (beneficial bacteria) as well as aerobic bacteria and enterobacteria (potential pathogen).

This probiotic showed intestine anti-inflammatory effect, as evidenced by an amelioration of the damaged colon and decreased MPO. These effects were associated with a significant reduction in colonic TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  levels, increased GSH content and reduced iNOS expression. The microbiological studies revealed that the probiotic increased the beneficial / potential pathogen bacteria ratio in comparison with untreated control rats.

We conclude that *Bifidobacterium breve* CECT7263 shows intestinal anti-inflammatory activity in TNBS-induced rat colitis, by ameliorating the altered immune response and restoring the altered microbiological composition in the colonic lumen.

### 80 Modulación de factores proinflamatorios asociados a la obesidad mediante administración de *Lactobacillus plantarum* 3547 en ratas Wistar

Taberno M<sup>1</sup>, Gómez-Candela C<sup>2</sup>, López-Plaza B<sup>2</sup>, Bermejo LM<sup>2</sup>, Caz JV<sup>1</sup>, Largo C<sup>1</sup>.

Instituto de Investigación Sanitaria del Hospital Universitario La Paz (IdiPAZ). <sup>1</sup>Cirugía Experimental. <sup>2</sup>Investigación en Nutrición y Alimentos Funcionales (NUTRINVEST). Paseo de la Castellana 261, 28046, Madrid.

Entre las alteraciones fisiológicas asociadas al desarrollo de la obesidad se han descrito cambios en la microbiota intestinal que pueden mediar en alteraciones en el sistema inmune y el desarrollo de un estado proinflamatorio. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto modulador en marcadores de inflamación de *Lactobacillus plantarum* 3547 (*Lp3547*) en ratas obesas.

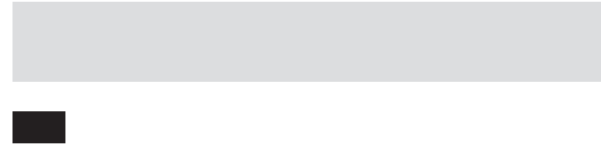
Ratas Wistar macho fueron suplementadas con dieta hipercalórica (grupos obeso) o una dieta estándar (grupos control) durante 22 semanas. Transcurrido este tiempo cada grupo se distribuyó en subgrupos de controles (control obeso OC y control normopeso NC) y tratados con *Lp3547* (probiótico obeso OP y probiótico normopeso NP). La suplementación se realizó durante 14 días a una dosis diaria de 2x10<sup>9</sup> ufc/kg/animal.

Los animales obesos tuvieron valores significativamente superiores de peso, depósitos grasos (retroperitoneal y epididimal) y leptina con respecto a los normopeso mientras que no observaron diferencias en el peso de hígado, perfil lipídico y glucosa plasmática o los niveles de insulina y resistina. Los animales suplementados *Lp3547* presentaron valores de IL10 significativamente superiores que sus respectivos controles (p<0.01).

Además, los animales OP mantuvieron niveles de TNF $\alpha$  equiparables a los controles normopeso, tanto a nivel plasmático como en tejido adiposo (p<0.01).

**Conclusión:** El *Lp3547* tiene un efecto sobre la inmunidad, modulando los niveles de IL10 en plasma, tanto en animales obesos como normopeso. Además tuvo capacidad de revertir el aumento de citoquinas proinflamatorias asociadas a la obesidad, tanto en plasma como en tejido adiposo.

El presente estudio ha sido apoyado por Grupo CARINSA a través del proyecto HUENUFOOD (CEN-20101016) del programa CENIT del Ministerio de Economía y Competitividad de España.



### 10 Flatulencia: características clínicas, fisiológicas y microbiológicas

Chaysavanh M<sup>1,2</sup>, Estrella, S<sup>1,2</sup>, Hernandez C<sup>1,2</sup>, Cuenca S<sup>1</sup>, Accarino, A<sup>1,2</sup>, Guyonnet D<sup>3</sup>, Santos J<sup>1,2</sup>, Guamer F<sup>1,2</sup>, Malagelada JR<sup>1,2</sup>, Azpiroz F<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Digestive System Research Unit, Institut de Recerca Hospital Universitari Vall Hebron, Barcelona. Departament de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra (Cerdanyola del Vallès). <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica en Enfermedades Hepáticas y Digestivas CIBERehd, Barcelona. <sup>3</sup>Danone Research, Paris.

Determinar la influencia de la dieta sobre los síntomas clínicos y la microbiota intestinal en pacientes con flatulencia.

Se estudiaron pacientes (n = 30) y sujetos sanos (n = 20) durante 3 días con su dieta habitual (basal), y durante otros 3 días con una dieta alta en residuos (flatulogénica).

En el periodo basal los pacientes registraron más síntomas abdominales que los sujetos sanos (5,8  $\pm$  0,3 vs 0,4  $\pm$  0,2 de molestia/dolor, respectivamente; p = 0,0001) y más evacuaciones