



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DE *Pediococcus pentosaceus* SOBRE LA FUNCIÓN DE BARRERA INTESTINAL EN UN MODELO *IN VIVO* DE COLITIS ULCEROSA AGUDA”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN FARMACIA**

**PRESENTA**

**M en F. LORENA JULIETA TORRES  
AGUILAR**

**DIRECTOR DE TESIS**

**DR. JORGE ALBERTO REYES ESPARZA**

**CUERNAVACA, MORELOS      JUNIO 2019**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA  
Doctorado

"2019, a 100 años del asesinato del General Emiliano Zapata Salazar"

Cuernavaca, Mor., a 15 de marzo de 2019  
Folio: FF/D/SAc/CIP/DF/016/2019

**M. F. LORENA JULIETA TORRES AGUILAR**  
**ESTUDIANTE DEL PROGRAMA DE DOCTORADO**  
**PRESENTE**

Por este conducto le informo que Consejo Interno de Posgrado en la sesión ordinaria del 13 de marzo de 2019 ratificó el jurado asignado el 14 de febrero de 2018. Jurado asignado para presentar la defensa oral de la tesis titulada:

**"Evaluación del efecto de *Pediococcus pentosaceus* sobre la función de barrera intestinal en un modelo in vivo de colitis ulcerosa aguda"**

<b>Dra. Verónica Rodríguez López</b>	<b>PRESIDENTE</b>
<b>Dra. Judith González Christen</b>	<b>SECRETARIO</b>
<b>Dr. Vicente Madrid Marina</b>	<b>VOCAL 1</b>
<b>Dra. Maria de Lourdes Rodríguez Fragoso</b>	<b>VOCAL 2</b>
<b>Dr. Alfonso Leija Salas</b>	<b>VOCAL 3</b>
<b>Dra. Leticia González Maya</b>	<b>VOCAL 4</b>
<b>Dra. Della Vanessa López Guerrero</b>	<b>VOCAL 5</b>

De acuerdo al Artículo 101° (Reglamento General de Posgrado). - *Será requisito previo al examen de grado, que los integrantes de la Comisión Revisora, emitan su voto y opinión favorables en términos de que la tesis reúne los requisitos para ser presentada y defendida ante el examen correspondiente. Lo cual no compromete el dictamen de la evaluación de examen.*

Asimismo, le recuerdo que es responsabilidad de usted enviar los respectivos ejemplares a su comité sinodal y dar seguimiento a las correspondientes revisiones para poder concluir este importante proceso.

Sin más por el momento, me despido de usted, no sin antes felicitarla por estar próxima a obtener el título de Doctora en Farmacia.

Atentamente  
**Por una humanidad culta**  
*Una universidad de excelencia*

**DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA**  
**JEFE DE POSGRADO**



C.c.p. Dra. Verónica Rodríguez, Dra. Judith González, Dr. Vicente Madrid, Dra. Lourdes Rodríguez, Dr. Alfonso Leija, Dra. Leticia González, Dra. Della López.  
JCRL/alm

Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México. C.P. 62209, edificio 61 ala C 2° piso, Tel. (777) 329 79 86, 329 7000, Ext. 7996/ doctoradofarmacia@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA  
2017-2023

**MI MAS PROFUNFO AGRADECIMIENTO AL CONSEJO  
NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA (CONACYT) POR  
LA BECA OTORGADA NÚMERO: 384041 PARA LA  
REALIZACIÓN DE ESTE PROYECTO**

**Y POR EL APOYO DE BECAS MIXTAS 2016 NO. 291062  
Y DE LA BECA DE ESTANCIAS NACIONALES E  
INTERNACIONALES FOMIX QUE ME AYUDARON PARA  
MI ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN EN LA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE BARCELONA**

*A Dios, a mis padres,  
a Fercha, a Rico y a mi milagríto "Richie"*

*"Cualquier cosa es posible si tienes suficiente valor"*

*J.K Rowling*

## **AGRADECIMIENTOS**

*La presente Tesis Doctoral es el resultado de un gran esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, han sido muchos los que han participado. Por tal motivo a través de estas palabras quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que durante estos años de trabajo han estado a mi lado y que han contribuido a que esta tesis haya llegado a su conclusión.*

*A mis directores de Tesis el **Dr. Jorge Reyes** y a la **Dra. Lourdes Rodríguez**, por aceptarme para realizar esta tesis Doctoral bajo su dirección, por su dedicación y por su ayuda, paciencia y ánimo en los momentos complicados. Gracias por permitirme formar parte de la familia*

*L-6*

*A mi comité tutorial a la **Dra. Judith González** y al **Dr. Javier Ventura**, gracias por su gran asesoramiento.*

*A mi comité evaluador la **Dra. Verónica Rodríguez**, **Dra. Judith González**, **Dr. Alfonso Leija**, **Dra. Lourdes Rodríguez**, **Dra. Leticia Gonzalez**, **Dr. Vicente Madrid** y a la **Dra. Vanessa López** por brindarme parte de su tiempo para la revisión y evaluación de esta tesis.*

*A mis grandes amigas Ana Isabel y Lucía Corona quienes siempre han estado conmigo con los mejores consejos.*

*A mis compañeros y amigos del Laboratorio 6 Toñita, Janet, Rebe, Karen, Gabby, Anahí, Brissa, Daniel, Jorge y Norma por hacerme el trabajo tan agradable y apoyarme en mis experimentos.*

*Y sobre todo a mi familia, por confiar en mí. A mis padres Fernando Torres y Martha Aguilar, a mi hermana, Fercha, por apoyarme en todas mis decisiones, por preocuparse por mí y estar siempre a mi lado. A mi amor Rico, por estar todos estos años en todo momento, por tu ayuda, gran paciencia y por tus grandes consejos y sobre todo por haberme dado el ser más maravilloso del mundo mi hijo "Richie" mi motivo de vida.*

*¡A todos, muchas gracias!*

## V. INDICE GENERAL

<b>V.</b>	<b>ÍNDICE GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>VI.</b>	<b>ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS</b>	<b>4</b>
<b>VII.</b>	<b>RESUMEN</b>	<b>5</b>
<b>VIII.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>7</b>
1.1	Anatomía y fisiología del intestino humano	8
1.2	Digestión y absorción de nutrientes en la mucosa intestinal	10
1.3	Función de barrera intestinal	11
1.3.1	Permeabilidad intestinal	12
1.3.2	Uniones Intercelulares	13
1.3.2.1	Uniones estrechas	13
1.3.2.2	Uniones de anclaje	15
1.3.2.3	Desmosomas	15
1.4	Tracto intestinal y la microbiota	16
2.	Enfermedad Inflamatoria Intestinal	19
2.1	Colitis ulcerosa	20
2.2	Epidemiología	21
2.3	Manifestaciones clínicas	21
2.4	Complicaciones	22
2.5	Características genéticas	22
2.6	Respuesta Inmune de la mucosa	23
2.6.1	Defectos en la función de barrera epitelial lleva a una inflamación intestinal	23

2.7	Papel de las Uniones estrechas en la inflamación intestinal	24
2.8	Tratamiento farmacológico para la colitis ulcerosa	25
2.8.1	Aminosalicilatos	25
2.8.2	Corticoides	26
2.8.3	Inmunosupresores	27
2.8.4	Terapias biológicas	27
2.8.5	Bloqueo de citocinas proinflamatorias	27
2.8.6	Bloqueo de moléculas de adhesión	28
2.8.7	Antibióticos	28
2.9	Microbiota comensal y Enfermedad Inflamatoria intestinal (EII)	30
3.	Probióticos	30
3.1	Definición de probióticos	31
3.2	Probióticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales	33
4.	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	34
5.	Modelos in vivo de colitis ulcerosa	35
<b>IX.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>37</b>
<b>X.</b>	<b>HIPÓTESIS</b>	<b>38</b>
<b>XI.</b>	<b>OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b>	<b>38</b>
<b>XII.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>39</b>
<b>XIII.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>46</b>
<b>XIV.</b>	<b>DISCUSIÓN</b>	<b>66</b>
<b>XV.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>72</b>
<b>XVI.</b>	<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>73</b>
<b>XVII.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>	<b>74</b>
<b>XVIII.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>87</b>

## VI. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

	<b>Pág.</b>
Fig. 1 Representación de las uniones intercelulares	17
Fig. 2 Variación de la microbiota en diferentes regiones del tracto gastrointestinal	19
Fig. 3 Enfermedades asociadas con disbiosis intestinal.	20
Fig. 4 Esquema de tratamiento del estudio del efecto de <i>P. pentosaceus</i> sobre un modelo <i>in vivo</i> de colitis aguda.	41
Fig. 5 Efecto del tratamiento con <i>P. pentosaceus</i> a diferentes dosis sobre la morfología histológica de colon de ratones BALB/c.	47
Fig. 6 Efecto de la administración de 3.5% (p/v) de DSS sobre el porcentaje de pérdida de peso en ratones BALB/c.	49
Fig. 7 Efecto de la administración de 3.5% (p/v) de DSS en ratones BALB/c sobre el índice de la actividad de la enfermedad.	50
Fig. 8 Efecto de <i>P. pentosaceus</i> a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ , $1 \times 10^8$ , $1 \times 10^9$ y $1 \times 10^{10}$ UFCs) sobre el índice de la actividad de la enfermedad en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c	51
Fig. 9 Efecto de <i>P. pentosaceus</i> a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ , $1 \times 10^8$ , $1 \times 10^9$ y $1 \times 10^{10}$ UFCs) sobre el índice de diarreas en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c	52
Fig. 10 Efecto de <i>P. pentosaceus</i> a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ , $1 \times 10^8$ , $1 \times 10^9$ y $1 \times 10^{10}$ UFCs) sobre el índice de hemorragia fecal en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c	53
Fig. 11 Efecto de <i>P. pentosaceus</i> a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ , $1 \times 10^8$ , $1 \times 10^9$ y $1 \times 10^{10}$ UFCs) sobre el índice de pérdida de peso en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c	53
Fig. 12 Efecto de <i>P. pentosaceus</i> a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ , $1 \times 10^8$ , $1 \times 10^9$ y $1 \times 10^{10}$ UFCs) sobre la longitud del colon en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c	54
Fig. 13 Efecto de diferentes dosis de <i>P. pentosaceus</i> ( $1 \times 10^7$ , $1 \times 10^8$ , $1 \times 10^9$ y $1 \times 10^{10}$ UFCs) sobre la morfología microscópica del colon de ratones BALB/c con colitis inducida con DSS	55
Fig. 14. Efecto de <i>P. pentosaceus</i> (dosis $1 \times 10^{10}$ UFC) sobre la permeabilidad	57



intestinal en la colitis inducida con DSS en Ratones BALB/c.

Fig. 15 Efecto de *P. pentosaceus* sobre la inmunohistoquímicas de las proteínas ocludina y claudina-2 en un modelo *in vivo* de colitis aguda. 59

Fig. 16 Efecto de *P. pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre los niveles de TNF séricos en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c. 61

Fig 17. Efecto de *P. pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  and  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre los niveles de IL-6 séricos en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c 61

Fig.18 Efecto de *P. pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre los niveles de IL-10 séricos en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c 62

Fig.19 Efecto de *P. pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre los niveles de IL-4 séricos en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c 63

Fig. 20 Efecto de pre-tratamiento y el tratamiento de *P. pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre los cantidad de lactobacilos en muestras fecales de ratones BALB/c con colitis inducida con DSS 64

Fig. 21 Efecto de pre-tratamiento y el tratamiento de *P. pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre los cantidad de coliformes en muestras fecales de ratones BALB/c con colitis inducida con DSS 65

## TABLAS

Tabla 1. Características principales de la colitis ulcerosa 21

Tabla 2. Proteínas de unión estrecha de interés en la colitis ulcerosa 25

Tabla 3. Mecanismos de acción de los probióticos 32

Tabla 4. Modelos animales de enfermedades inflamatorias del intestino con defectos primarios de origen epitelial intestinal 36

Tabla 5. Cálculo del índice de actividad de la enfermedad (IAE). 39

Tabla 6. Efecto del tratamiento con *P. pentosaceus* a diferentes dosis sobre el peso, longitud del colon, consistencia de las heces y presencia de hemorragias en ratones BALB/c sanos. 50

## VII. RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar el efecto de diferentes dosis de *Pediococcus pentosaceus* sobre los síntomas de la colitis así como en la función de barrera en un modelo *in vivo* de colitis ulcerosa aguda inducida con dextrán sulfato de sodio (DSS)

**Metodología.** La colitis aguda fue inducida en ratones BALB/c con la administración de DSS en el agua para beber *ad libitum* por 7 días. En el día 2 durante la inducción de la colitis, cuatro grupos recibieron diferentes dosis de *P. pentosaceus* por vía oral por día, un grupo recibió un pre-tratamiento de 7 días antes y después de la inducción de la colitis. Se evaluó la severidad de la colitis basado en el índice de actividad de la enfermedad (IAE), la longitud del colon y el daño histológico, también se evaluó la permeabilidad intestinal al dextrán-isotiocianato de fluoresceína en el modelo *in vivo* de colitis aguda y se determinaron los niveles séricos de citocinas (IL-4, IL10, IL-6 y TNF), así como los niveles de lactobacilos y coliformes totales. En este estudio también se observó la expresión de las proteínas de uniones estrechas Claudina- 2 y Ocludina.

**Resultados:** El tratamiento y el pre-tratamiento con *P. pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFCs retrasó la aparición de diarreas, hemorragias y el Índice de la actividad de la enfermedad, a su vez mejoró la longitud del colon y disminuyó la permeabilidad intestinal comparado con el grupo DSS. Los niveles de citocinas inflamatorias IL-6 y TNF fueron disminuidos, además *P. pentosaceus* restauró la disrupción de las proteínas de uniones estrechas disminuyendo la expresión de Claudina-2 e incrementando la de ocludina. Adicionalmente, el tratamiento con *P. pentosaceus* modificó la microbiota fecal incrementando el número de lactobacilos, mientras que los niveles de coliformes fueron disminuidos.

**Conclusión:** *Pediococcus pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFCs mejoró la severidad de la colitis aguda inducida con DSS y mejoró la función de barrera epitelial y esto se debió a la disminución de la respuesta inflamatoria, así como por la disminución de bacterias enteropatógenas y al mejoramiento de la distribución de las uniones estrechas. Por lo anterior, *Pediococcus pentosaceus* puede ser un tratamiento prometedor para la colitis ulcerosa.

## ABSTRACT

**Aims:** To evaluate the effect of different doses of *P. pentosaceus* on colitis symptoms as well as in the intestinal barrier function in an *in vivo* model of acute ulcerative colitis induced with dextran sodium sulfate (DSS).

**Methodology:** Acute colitis was induced in BALB/c mice via the administration of 3.5% DSS in drinking water administered ad libitum for 7 days. On day 2 during the induction of colitis, four groups received different doses of *Pediococcus pentosaceus* ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ , and  $1 \times 10^{10}$  Colony Forming Units (CFUs)) via gastric tube once per day, one group received a pre-treatment 7 days before and after of the induction of colitis. We assessed the severity of colitis based on disease activity index (DAI), colon length and histological damage; colonic permeability to fluorescein isothiocyanate–dextran (FITC-dextran) was measured *in vivo*. The expression of the tight junction proteins Claudin-2 and Occludin was also observed in this study.

**Results:** The treatment and pre-treatment with *P. pentosaceus* at the dose of  $1 \times 10^{10}$  CFUs delayed the appearance of diarrhea and hemorrhages and the index of the activity of the disease, in turn, improved the length of the colon and decreased the intestinal permeability compared with the DSS group. The levels of inflammatory cytokines IL-6 and TNF were substantially attenuated, in addition *P. pentosaceus* restored the distress of the tight junction proteins decreasing the expression of Claudin-2 and increasing occludin expression. Additionally, the fecal microbiota showed an enrichment in the abundance of Lactobacilli, while the levels of coliforms were diminished

**Conclusion:** *Pediococcus pentosaceus* at the dose of  $1 \times 10^{10}$  UFCs improved the severity of acute colitis induced with DSS and improved the epithelial barrier function was mediated via improving tight junction proteins and down-regulating the inflammatory response, as well as the decrease of enteropathogenic bacteria. Therefore, *P. pentosaceus* could be a promising probiotic in ulcerative colitis

## VIII. INTRODUCCIÓN

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) comprende a la enfermedad de Crohn (EC) y a la colitis ulcerosa (CU). Ambas enfermedades son problemas cada vez más importantes en los países industrializados y se han asociado con el riesgo de cáncer de colon<sup>i</sup>. La colitis ulcerosa es una enfermedad inflamatoria crónica del colon, cuyos síntomas característicos comprenden hemorragia rectal o diarrea sanguinolenta, dolor abdominal, fiebre, pérdida de peso y malestar general<sup>ii</sup>. A pesar de los recientes avances en la comprensión de la genética, inmunidad y mecanismos inflamatorios, así como posibles factores ambientales que contribuyen a la enfermedad, la patogénesis exacta sigue siendo elusiva. Dentro de los factores generalmente implicados en la fisiopatología de la colitis destacan una respuesta inmune anormal, defectos en la función de la barrera intestinal y la microbiota intestinal. Se ha demostrado que la barrera intestinal dañada aumenta la exposición de células inmunes a antígenos derivados de la microbiota residente del tracto intestinal, dejando a una inestable respuesta inmune<sup>iii</sup>. De hecho, se ha observado un incremento de la permeabilidad epitelial en pacientes con (CU). La permeabilidad intestinal paracelular en personas sanas está controlada y regulada por el complejo proteico de unión apical, este complejo consiste de las uniones estrechas y las subyacentes uniones adherentes. Las uniones estrechas regulan el flujo por la vía de la ruta paracelular y previene la difusión de proteínas y lípidos entre los dominios de membrana plasmática apicales y basolaterales<sup>iv</sup>. El complejo de uniones estrechas está constituido por proteínas transmembrana como ocludina y la familia de las claudinas y también por proteínas ligadoras como zonula ocludens-1 (ZO-1) que se afilan con la actina del citoesqueleto. En personas con (EII) se ha demostrado la redistribución y regulación a la baja de varias proteínas de unión estrecha<sup>v</sup>. No ha sido implicado específicamente un microorganismo para el desarrollo de la CU, sin embargo especies de *Lactobacillus spp* y *Pediococcus spp*. están ausentes en pacientes con CU<sup>vi</sup>. Los tratamientos actuales para la CU se han centrado en la inflamación y en la supresión del sistema inmune como los esteroides, tiopurinas y anticuerpos anti-TNF, a pesar de ello, están limitados por sus efectos secundarios asociados con una supresión crónica del sistema inmune, falta de cumplimiento de los pacientes y a las recaídas<sup>vii</sup>. Por consiguiente, se buscan constantemente nuevas alternativas para el tratamiento de la CU. Una de las últimas incorporaciones al gran arsenal terapéutico es el uso de probióticos.

Los probióticos han sido definidos como bacterias vivas que al administrarse en cantidades adecuadas, mejoran la salud del huésped<sup>viii</sup>. Los probióticos tienen efectos anti-inflamatorios y mejoran la función de barrera intestinal por diferentes mecanismos tanto en humanos con CU como en varios modelos *in vivo* de colitis (ratones Knockout de IL-10, o en ratones inducidos con un agente químico como el dextran sulfato de sodio DSS)<sup>ix</sup> Debido a lo anterior en este estudio nos preguntamos si la bacteria ácido láctica *Pediococcus pentosaceus* ayuda a la sintomatología de la colitis aguda mejora la función de barrera intestinal, regula la microbiota intestinal y ejerce efecto antiinflamatorio en un modelo *in vivo* de colitis aguda inducida con DSS.

### **1.1 Anatomía y fisiología del intestino humano**

El tracto gastrointestinal (TGI) cumple la función de digerir alimentos y absorber los nutrientes, pero además tiene una función de barrera, ya que está en contacto con multitud de microorganismos. Sumando a esto, otro aspecto importante es que TGI es el mayor órgano del sistema inmunológico humano. Anatómicamente se compone de diferentes secciones: boca, faringe, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y ano. Cada una de estas secciones realiza diferentes funciones y para ello tienen diferentes estructuras y secreciones.<sup>x</sup>

El término “mucosa” se emplea para designar a los epitelios que revisten las cavidades del organismo que se comunican con el exterior, como la de los aparatos respiratorio, genitourinario y digestivo. La superficie mucosa del TGI (200-300 m<sup>2</sup> en el adulto) constituye la mayor interfase de nuestro organismo con el mundo exterior. Se trata del lugar donde se realiza la digestión y absorción de los nutrientes y, simultáneamente, debe actuar como barrera frente a agentes nocivos, incluyendo microorganismos patógenos.<sup>xi</sup>

Entre los mecanismos que tienen este cometido se encuentran diversos factores no inmunológicos, como las secreciones gástrica, pancreática y biliar, la motilidad, el *mucus* o el recambio celular. Además de estos factores fisiológicos, la microbiota y el sistema inmunológico (que incluye tanto el tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal como a la inmunidad sistémica) crean y mantienen una barrera adicional. Dentro de la mucosa intestinal y para llevar a cabo estas funciones, existen diferentes tipos celulares.

El epitelio intestinal está compuesto por una monocapa de células epiteliales especializadas y polarizadas que se renueva continuamente cada 3 a 5 días. Las células

madre epiteliales intestinales pluripotentes residen en la base de las criptas (criptas de Lieberkuhn) y generan células que migran hacia la punta de la vellosidad donde tiene lugar la diferenciación final.<sup>xii</sup>

Las células que están más directamente expuestas a la luz intestinal son los enterocitos, Los enterocitos son elementos clave del revestimiento epitelial, adaptados para desarrollar la función digestiva, metabólica y el mantenimiento de la integridad física de la barrera.<sup>xiii</sup> Por este motivo, su superficie externa presenta numerosas microvellosidades, pequeños pliegues densamente agrupados que aumentan la superficie de absorción de los enterocitos. También intervienen en el desarrollo de la actividad inmunológica ya que expresan receptores implicados en la respuesta inmunitaria innata,<sup>xiv</sup>

Otro grupo celular que integra la mucosa intestinal corresponde a las células caliciformes, células epiteliales especializadas en la secreción de glicoproteínas llamadas mucinas, que forman una capa de *mucus* responsable de la protección de las células epiteliales del contacto directo con el ambiente existente en la luz intestinal. Las mucinas que se encuentran en mayor proporción en el moco del intestino y estómago son las MUC2 y las MUC5AC.<sup>xv</sup>

Por otra parte, también se encuentran otras células como las células M, que son responsables de captar moléculas del lumen intestinal y transferirlas a la lámina propia;<sup>xvi</sup> las células Paneth, que tienen una función defensiva segregando sustancias bactericidas como lisozima; las células enteroendocrinas, que liberan hormonas que coordinan diferentes funciones intestinales.<sup>xvii</sup>

Las células inmunitarias del tracto gastrointestinal conforman el denominado tejido linfoide asociado al intestino (gut-associated lymphoid tissue, GALT). El GALT organizado está compuesto de estructuras linfoides, principalmente folículos linfoides, placas de Peyer y ganglios mesentéricos.<sup>xviii</sup>

Bajo el epitelio se encuentra en primer lugar la membrana basal y a continuación, una capa de tejido conjuntivo denominada lámina propia. Esta última capa contiene diversas células inmunocompetentes, incluyendo células dendríticas, macrófagos y linfocitos residentes, que forman una unidad funcional con el epitelio. Estas células reciben y procesan las moléculas captadas por las células M. esto es de gran importancia puesto

que son encargadas de filtrar el paso de nutrientes sin dejar pasar agentes potencialmente perjudiciales para el organismo.<sup>xix</sup>

Existe una gran similitud entre la estructura histológica del intestino delgado y del grueso, aunque hay algunas diferencias a destacar. En el intestino delgado las criptas y vellosidades, junto con las microvellosidades de los enterocitos, confieren una gran superficie para la absorción de nutrientes. En el colon no es necesaria esta gran área ya que la absorción se restringe fundamentalmente a agua y electrolitos. Por este motivo, la mucosa colónica carece de vellosidades y microvellosidades.<sup>xx</sup>

Por otro lado, las células caliciformes secretoras de moco son mucho más abundantes en el epitelio colónico que en el intestino delgado.

Otro aspecto muy importante del epitelio colónico es que se renueva constantemente. Esta renovación se lleva a cabo en las criptas de Lieberkühn, invaginaciones que tienen una profundidad de alrededor de 50 células, que se encuentran en gran número en la mucosa colónica.

En el fondo de las criptas se localizan las células precursoras. Estas células se dividen por mitosis continuamente permitiendo la renovación del epitelio mediante proliferación y diferenciación de las células recién formadas, a medida que éstas suben a lo largo de la cripta. Las células maduras pierden su capacidad de dividirse de nuevo y finalmente mueren por apoptosis, exfoliándose a la luz intestinal.<sup>xxi</sup>

El proceso de maduración es clave para el correcto funcionamiento de la mucosa. En el adenoma esta secuencia está alterada, ocurriendo una mitosis continua de las células sin sufrir el proceso de diferenciación, de manera que el compartimento donde proliferar puede llegar a ocupar la cripta completa.<sup>xxii</sup>

### **1.3 Digestión y absorción de nutrientes en la mucosa intestinal**

Como se comentó anteriormente, una de las principales funciones del TGI es la digestión y absorción de los nutrientes procedentes de la dieta. Para esto se segregan diferentes enzimas a lo largo del tubo digestivo cuya función es hidrolizar las moléculas en otras más sencillas, que puedan atravesar la mucosa para incorporarse al torrente circulatorio.<sup>xxiii</sup>

El proceso comienza en la cavidad bucal. Las glándulas salivales secretan amilasa, que degrada parte del almidón y lipasa salival, que actúa sobre las grasas dando lugar a

compuestos más sencillos como los ácidos grasos. En el estómago las células principales secretan pepsina una endopeptidasa que degrada proteínas a péptidos. En el duodeno se liberan ácidos biliares y diversos tipos de enzimas. La función de los ácidos biliares es permitir que las grasas puedan ser atacadas en medio acuoso. Entre las enzimas encontramos amilasa pancreática, lipasa pancreática, tripsina y quimiotripsina. La amilasa pancreática continúa degradando el almidón, mientras que la lipasa pancreática lo hace con las grasas. Las otras enzimas degradan péptidos menos complejos, producidos tras la acción de la pepsina.<sup>xxiv</sup>

En la mucosa del yeyuno e íleon se produce lactasa, maltasa y diferentes peptidasas, para completar lo máximo posible la digestión de los nutrientes aportados en la dieta. La fracción no absorbida y los restos que no han podido ser digeridos pasaran al intestino grueso, en donde se finalizará el proceso digestivo gracias a la microbiota intestinal. Los microorganismos presentes en el colon, debido a su gran cantidad y diversidad, poseen el arsenal enzimático necesario para fermentar esos restos.<sup>xxv</sup>

### **1.3 Función de barrera intestinal**

El tracto gastrointestinal, desde el comienzo de la vida extrauterina, está expuesto a una gran carga de antígenos extraños, entre ellos: microorganismos y moléculas tóxicas. Por lo tanto, su capacidad de actuar como una barrera contra las moléculas potencialmente dañinas y para defender contra las bacterias patógenas es fundamental en el mantenimiento de la homeostasis inmune intestinal.<sup>xxvi</sup> De hecho, se han encontrado diferentes mecanismos por los cuales el intestino sirve como una barrera protectora eficaz. Uno de ellos de importancia para el soporte, es el epitelio intestinal, en donde las células epiteliales intestinales (CEI) son los principales tipos celulares que entran en el contacto con el ambiente exterior y actúan como una primera línea de defensa en contra una serie de posibles estimulantes dañinos.<sup>xxvii-xxviii</sup>

La primera respuesta inmunitaria que se activa es inespecífica y la lleva a cabo el sistema inmunitario innato, que está ampliamente representado en el tracto gastrointestinal por las propias células epiteliales, células dendríticas, macrófagos y células natural killer (NK). Estas células reconocen patrones asociados a patógenos (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs) de componentes específicos de bacterias, hongos y virus, entre los cuales se encuentran los receptores de reconocimiento de patrones (pattern recognition receptors, PRRs) como los tipo Toll (toll-like receptor, TLR) y los receptores dominio de



oligomerización de unión a nucleótido (nucleotide-binding oligomerization domain receptors, NOD), entre otros. Estos receptores tienen una función dual y, gracias a la naturaleza polarizada del epitelio intestinal, permiten su segregación anatómica y, tanto *in vitro* como en modelos *in vivo*, demuestran la capacidad de respuesta diferencial de las células epiteliales entre la estimulación por la parte apical frente a la estimulación basolateral.<sup>xxix-xxx</sup> Así, en condiciones normales, la activación apical de los Receptores de reconocimiento de patrones PPRs por parte de las bacterias comensales ayuda a la secreción de sustancias antibacterianas y a mantener cierta tolerancia a la inflamación.<sup>xxxi</sup>

Otro mecanismo importante para mantener la función de barrera es a través de la presencia de una capa de glicocalix, que se forma a partir de mucinas que se unen a la membrana apical de las (CEI). Una capa gruesa de moco, que comprende diversos tipos de mucinas, forma un sistema adicional de protección.<sup>xxxii</sup> Las células caliciformes, las células productoras de moco, están presentes tanto en la cripta como en el epitelio de las vellosidades en todo el intestino delgado, colon y recto. La liberación masiva de gránulos de mucina se desencadena por la presencia de daños físicos, químicos o infecciosos.<sup>xxxiii-</sup>  
<sup>xxxiv</sup> Las funciones importantes de la capa de moco son formar una barrera protectora semipermeable y ayudar a acelerar la reparación del daño intestinal, particularmente a través del factor del trébol intestinal (CD73).<sup>xxxv</sup> Las mucinas también interactúan con los polisacáridos de la superficie de las células bacterianas y los apéndices de proteínas (como los flagelos), atrapando así las bacterias en el flujo de moco para que sean eliminadas por la peristalsis intestinal. En general, las bacterias no pueden subvertir estos mecanismos a menos que expresen mucinasas y factores de adherencia, colonización e invasión.<sup>xxxvi-xxxvii</sup>

### 1.3.1 Permeabilidad intestinal

La permeabilidad intestinal se puede definir como la capacidad de la superficie de la mucosa a ser penetrada por las sustancias específicas. El paso de los nutrientes y la absorción de agua e iones se realiza a través del epitelio intestinal gracias a procesos de transporte activo (mediante transportadores) o pasivos (mediante difusión) de la luz intestinal al interior de la mucosa, desde donde pueden acceder al torrente circulatorio. Los enterocitos presentan una elevada actividad transportadora gracias a que poseen canales iónicos, transportadores y bombas en las membranas apical y basolateral. El transporte neto es el resultado del balance entre la absorción y la secreción. Este

transporte se lleva a cabo de forma selectiva mediante dos vías principales: la vía transcelular/transepitelial y la vía paracelular.<sup>xxxviii, xxxix y xl</sup>

- La permeabilidad paracelular es asociada con el transporte en el espacio entre las células epiteliales y está regulado por complejos intercelulares localizados en la unión de la membrana apical-lateral y a lo largo de la membrana lateral.<sup>xli</sup> Estas uniones intercelulares se clasifican en tres grupos funcionales: uniones estrechas, uniones de anclaje y (desmosomas) (Fig. 1). Esta vía constituye una barrera efectiva para el paso de antígenos luminales y es determinante en el establecimiento de la permeabilidad intestinal.<sup>xlii</sup>
- La vía transcelular permite el transporte de solutos a través de la membrana del enterocito. Existen diferentes mecanismos que median el paso de moléculas por la ruta transcelular. Los compuestos lipofílicos e hidrofílicos de pequeño tamaño difunden, por transporte pasivo, a través de la bicapa lipídica de la membrana de los enterocitos. Además, la permeabilidad epitelial viene condicionada por el transporte activo, mediado por transportadores y diferentes mecanismos de endocitosis, transcitosis y exocitosis para iones, aminoácidos o determinados antígenos. Las sustancias de gran tamaño, como proteínas y productos bacterianos, son captadas por las células mediante endocitosis y son transportadas activamente mediante el proceso de transcitosis vectorial, a través del citoplasma, para su posterior procesamiento y presentación, como parte de la respuesta inmunológica intestinal.<sup>xliii</sup>

### **1.3.2 Uniones intercelulares**

#### **1.3.2.1 Uniones estrechas**

El paso de moléculas pequeñas solubles en agua a través del epitelio se realiza a través de las uniones estrechas que sellan los espacios entre las células epiteliales. Las uniones estrechas (UE) son las uniones intercelulares más apicales y su función es primordial en el mantenimiento de la barrera y de la polaridad epitelial, limitando la difusión de iones y la translocación de antígenos luminales (microorganismos y sus toxinas) desde la región apical hacia la región basolateral de las membranas que limita.<sup>xliv,xlv</sup> Se componen de complejos multiproteicos constituidos por cuatro familias de proteínas transmembrana: ocludina, claudinas, moléculas de adhesión (*junctional adhesion molecules*, JAM) y

trichelulina, y se expresan predominantemente en células epiteliales y endoteliales, aunque también se encuentra en astrocitos, neuronas, macrófagos, células dendríticas y/o leucocitos.<sup>xlvi,xlvii</sup>

– La **occludina** participa en el ensamblaje y desensamblaje de las UE y su localización en la membrana está regulada por la fosforilación de los residuos específicos de Ser, Thr y Tyr. La ocludina altamente fosforilada en estos residuos está situada en las UE, mientras que la desfosforilada se encuentra redistribuida en el citoplasma, por lo que la alteración en el patrón de fosforilación de esta proteína puede llevar a la desestabilización de las UE e incrementar la permeabilidad paracelular.<sup>xlviii,xlix</sup>

– Las **claudinas** son el principal factor que determina la función de barrera de las UE, controlando el paso de iones a través del espacio paracelular y también están reguladas mediante la fosforilación específica en residuos de Ser y Thr. Estas proteínas forman canales con propiedades biofísicas similares a los canales iónicos, que permiten el paso preferente de ciertos iones.<sup>i</sup> La composición de claudinas varía considerablemente entre los segmentos intestinales debido a su función fisiológica específica, mostrando una disminución general de la permeabilidad en las regiones distales del tracto gastrointestinal.<sup>ii</sup>

– Las **JAM** son una subfamilia de inmunoglobulinas expresadas por células epiteliales y endoteliales, así como por leucocitos y plaquetas. Las proteínas JAM de las UE epiteliales son JAM-A, JAM-C, CAR, ESAM y JAM4, las cuales se asocian lateralmente a otras proteínas en los contactos intercelulares para facilitar el ensamblaje y la formación de UE funcionales y polarizadas.<sup>iii</sup> Las JAM están implicadas en la regulación de la permeabilidad intestinal y en la inflamación.<sup>iiii</sup>

– La tricelulina se localiza en los contactos intercelulares entre células adyacentes, facilitando la estabilidad y la formación de la barrera epitelial, sellando específicamente las láminas de células epiteliales frente al paso de macromoléculas, sin afectar significativamente la permeabilidad de iones.<sup>iv,lv</sup> Las proteínas transmembrana de las UE, claudinas, ocludina, y las JAM, están vinculadas a las fibras de actomiosina del citoesqueleto por miembros de la familia de proteínas adaptadoras *zonula occludens* ZO-1, ZO-2 y ZO-3. Estas proteínas desempeñan un papel fundamental en la permeabilidad celular, así como en la regulación de la adhesión, en la formación y estabilización de las UE y en la transmisión de señales desde las uniones intercelulares hacia el interior de la célula para la regulación de procesos celulares como la migración celular.<sup>lvi</sup>

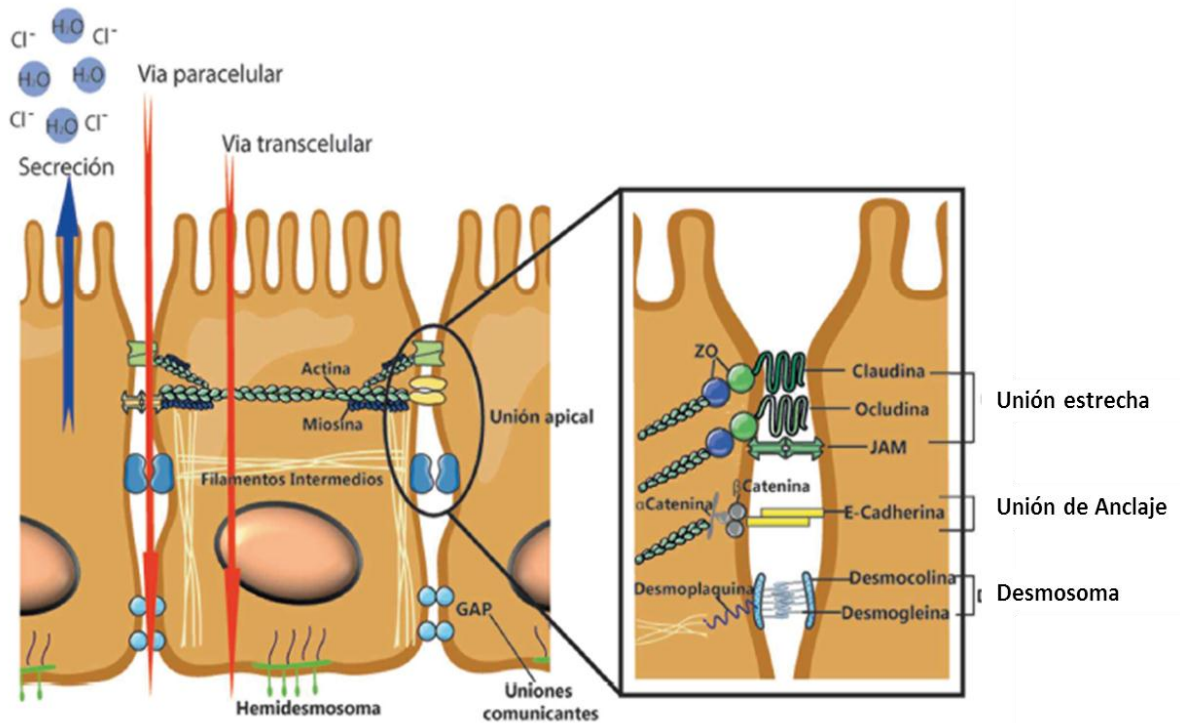
### **1.3.2.2 Uniones de anclaje**

Las uniones de anclaje conectan el citoesqueleto de cada célula con los de células vecinas o a la matriz extracelular, lo que les permite constituirse como unidades estructurales resistentes.

– Las uniones de anclaje regulan la adhesión entre células adyacentes mediante receptores de adhesión transmembrana y sus proteínas reguladoras asociadas a la actina. Esta unión del citoesqueleto de actina de ambas células se realiza a través de moléculas de adhesión transmembrana de la superfamilia de las cadherinas y cateninas y de complejos proteicos asociados a estas, que conectan con el citoesqueleto. Son necesarias para el ensamblaje y mantenimiento de las UE y varias proteínas reguladoras pueden afectar este componente estructural, como factores de crecimiento (EGFR) y proteínas reguladoras de la actina (Rho, GTPasas, miosina)<sup>lvii</sup>. Los complejos Cadherina-catenina son importantes no solo para ligar células adyacentes, sino también para mantener la polaridad celular, regulando la migración y proliferación epitelial y la formación de otros complejos adhesivos como los desmosomas.<sup>lviii</sup>

### **1.3.2.3 Desmosomas**

Los desmosomas, compuestos principalmente por desmogleína, desmocolina y desmoplaquina, son uniones intercelulares que proporcionan una fuerte adhesión entre las células, aunque son estructuras dinámicas cuya adhesividad puede cambiar entre estados de alta o baja afinidad durante procesos como el desarrollo embrionario y la curación de heridas. Debido a que también vinculan intracelularmente a los filamentos intermedios del citoesqueleto de las células vecinas, forman una red transcelular que confiere resistencia mecánica a los tejidos y permite que las células mantengan su morfología. Además, son centros de señalización y participan en varios procesos celulares como la diferenciación, la proliferación y la morfogénesis.<sup>lix</sup>

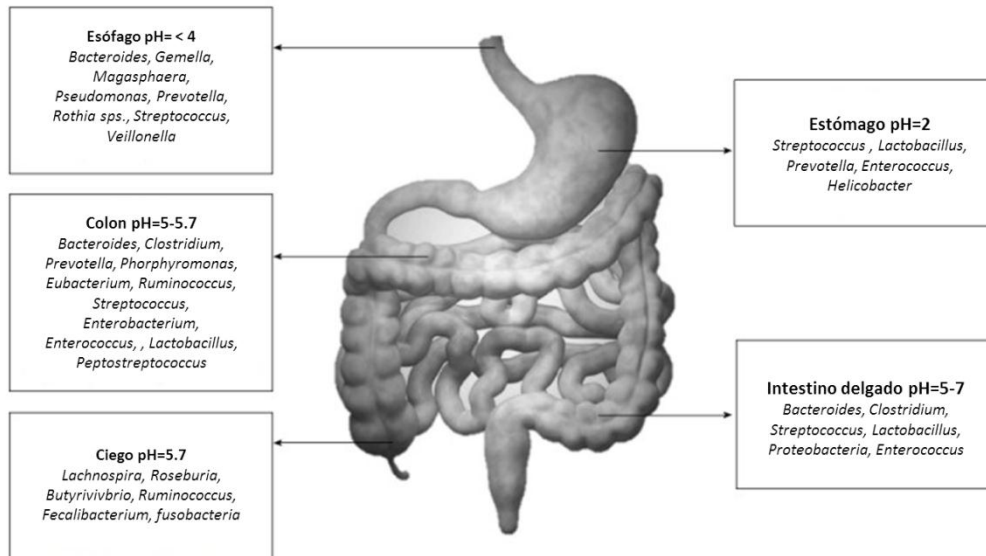


**Fig. 1. Representación de las uniones intercelulares.** Las sustancias que se encuentran en la luz intestinal pueden atravesar el epitelio a través de la ruta transcelular, o entre las células a través de la ruta paracelular. Los complejos de unión intercelulares, compuesto por uniones estrechas, uniones adherentes y desmosomas, son estructuras dinámicas que restringen el paso de macromoléculas de más de 50 Å.

#### 1.4 El Tracto gastrointestinal y la microbiota

El tracto gastrointestinal (GI) humano representa una de las mayores superficies de interacción entre el huésped, los factores ambientales y los antígenos en el cuerpo humano. En un tiempo de vida promedio, alrededor de 60 toneladas de alimentos pasan por el tracto gastrointestinal humano, junto con una gran cantidad de microorganismos del medio ambiente que imponen una gran amenaza a la integridad intestinal. La colección de bacterias, arqueas, hongos y virus que colonizan el tracto GI se denomina "microbiota intestinal" y ha evolucionado junto con el huésped durante miles de años para formar una relación de beneficio mutuo.<sup>lx-lxi</sup> Se ha estimado que el número de microorganismos que habitan en el tracto GI supera los  $10^{14}$ , lo que abarca aproximadamente 10 veces más células bacterianas que el número de células humanas y más de 100 veces la cantidad de

contenido genómico (microbioma) que el genoma humano.<sup>lxii</sup> Sin embargo, una estimación recientemente revisada ha sugerido que la proporción de células humanas: bacterias es en realidad más cercana a 1: 1.<sup>lxiii</sup> Debido a su gran contenido genómico y su complemento metabólico, la microbiota intestinal proporciona una variedad de propiedades beneficiosas para el huésped. Algunas de las funciones más importantes de estos microbios son ayudar a mantener la integridad de la barrera de la mucosa,<sup>lxiv</sup> proporcionar nutrientes como vitaminas<sup>lxv</sup> o proteger contra patógenos.<sup>lxvi</sup> Además, la interacción entre la microbiota comensal y el sistema inmunológico de la mucosa es crucial para la función inmunológica adecuada.<sup>lxvii</sup> Cada individuo está provisto de un perfil único de microbiota intestinal la cual está compuesta por diferentes especies de bacterias clasificadas taxonómicamente por género, familia, orden y filos. La microbiota intestinal de cada ser humano se moldea en la vida temprana ya que su composición depende de las transiciones del bebé (fecha de gestación del nacimiento<sup>lxviii</sup>, tipo de parto<sup>lxix-lxx</sup>, métodos de alimentación de la leche<sup>lxxi</sup>, período de destete) y factores externos como el uso de antibióticos<sup>lxxii</sup>. Esta microbiota nativa, personal y saludable, permanece relativamente estable en la edad adulta, pero difiere entre los individuos debido a los enterotipos, el nivel del índice de masa corporal (IMC), la frecuencia de ejercicio, el estilo de vida y los hábitos culturales y dietéticos. Por consiguiente, no existe una composición única de microbiota intestinal óptima, ya que es diferente para cada individuo. La microbiota intestinal varía según las regiones anatómicas del intestino, las cuales varían en términos de fisiología, pH y tensión de O<sub>2</sub>, velocidad de flujo digerido (rápido en la boca al ciego, más lento después), disponibilidad de sustratos y secreciones del huésped. El intestino delgado proporciona un entorno más desafiante para los colonizadores microbianos, dados los tiempos de tránsito bastante cortos (3 a 5 h) y las altas concentraciones de bilis. El intestino grueso, que se caracteriza por caudales lentos y un pH neutro a ligeramente ácido, alberga con mucho la mayor comunidad microbiana (dominada por bacterias anaerobias obligadas)<sup>lxxiii</sup> (Fig. 2).



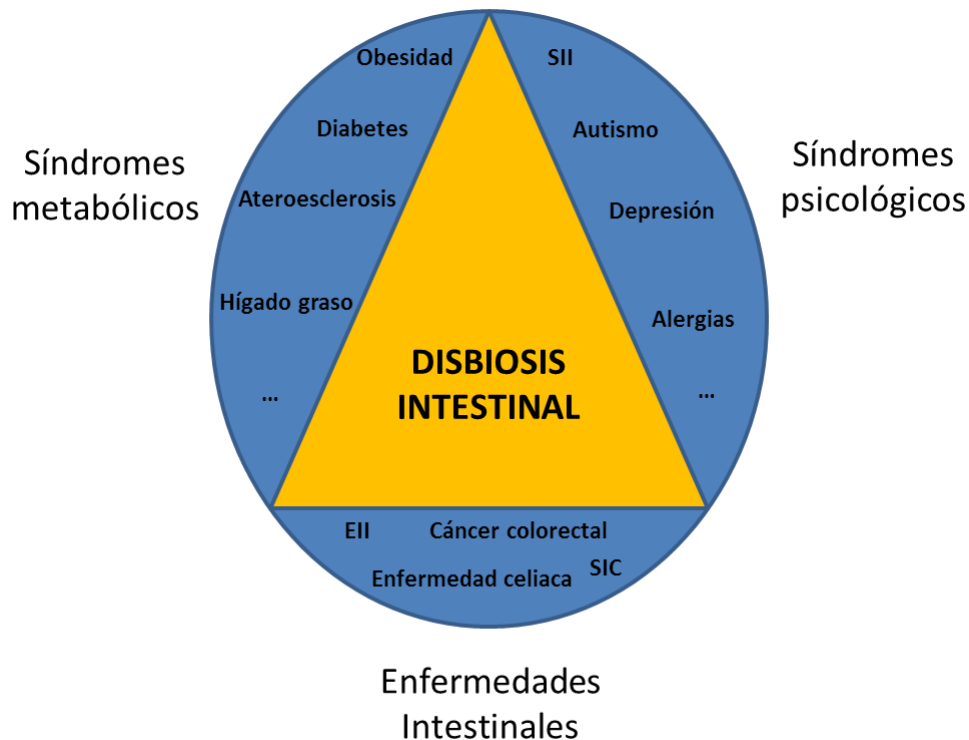
**Fig. 2 Variación de la microbiota en diferentes regiones del tracto gastrointestinal** <sup>lxxiv</sup>

Los filos microbianos intestinales dominantes son Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria, y Verrucomicrobia, los filos Firmicutes y Bacteroidetes representan el 90% de la microbiota intestinal. El filo Firmicutes está compuesto por más de 200 géneros diferentes, tales como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Clostridium*, *Enterococcus* y *Ruminococcus*. El género de *Clostridium* representan el 95% del filo Firmicutes. El filo Bacteroidetes consiste en géneros predominantes tales como *Bacteroides* y *Prevotella*. El filo Actinobacteria es proporcionalmente menos abundante y está representado principalmente por el género *Bifidobacterium*.<sup>lxxv</sup>

Nuestra microbiota tiene un papel importante en la salud humana y un desequilibrio de su composición (disbiosis) ha demostrado contribuir al desarrollo de muchas enfermedades intestinales y extraintestinales.

El tracto gastrointestinal es el principal sitio de interacción entre los microorganismos ambientales y los tejidos del huésped. Una alta biodiversidad de la microbiota intestinal está asociada con un estado saludable, mientras que una baja biodiversidad está vinculada a condiciones patológicas<sup>lxxvi</sup>. Más de 30 enfermedades están asociadas con un

cambio en la microbiota intestinal (disbiosis) y la lista aumenta continuamente. Se pueden mencionar las enfermedades inflamatorias intestinales, artritis reumatoide, aterosclerosis, y enfermedades inflamatorias crónicas como obesidad y diabetes. Estas enfermedades se pueden clasificar en: síndromes metabólicos, enfermedades intestinales y síndromes psicológicos <sup>lxxvii</sup> (Fig.3).



**Fig.3 Enfermedades asociadas con disbiosis intestinal.** SII, Síndrome de intestino irritable; EII, Enfermedad Inflamatoria intestinal y SIC, Síndrome del intestino corto. Enfermedad inflamatoria intestinal (EII) <sup>lxxviii</sup>

## 2. Enfermedad Inflamatoria intestinal EII

La enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa están consideradas enfermedades idiopáticas que afectan al tracto gastrointestinal. Ambos procesos se consideran con frecuencia juntos, bajo el nombre de enfermedad inflamatoria intestinal, debido a las múltiples semejanzas, como inflamación gastrointestinal, aumento y disminución de la gravedad y la intensidad de los síntomas y etiología desconocida. Sin embargo, existen



síntomas y características microscópicas diferentes, así como patrones distintos de afectación dentro del tracto gastrointestinal.

Debido a que nuestro modelo experimental tiene una mayor semejanza con la colitis ulcerosa que con Crohn, describiremos solo la primera.

## 2.1 Colitis ulcerosa

La colitis ulcerosa se caracteriza como una inflamación no infecciosa del tracto gastrointestinal, limitada al recto y al colon. Es un trastorno recidivante y remitente, con intervalos de remisión que alternan con períodos de inflamación sintomática. En la colitis ulcerosa, la inflamación se limita a la submucosa y la mucosa, la colitis ulcerosa es una enfermedad continua, sin lesiones a saltos entre las áreas de enfermedad. Casi siempre se afecta el recto, y las lesiones pueden progresar en sentido proximal desde allí. Se han descrito cuatro categorías principales de afectación del colon. En la proctitis sólo está afectado el recto. La proctosigmoiditis incluye afectación rectal con extensión al sigma. El término colitis del lado izquierdo se refiere a la enfermedad que se extiende continuamente desde el recto hasta el ángulo esplénico. La pancolitis es la inflamación más allá del ángulo esplénico, que se puede extender hasta el ciego (Tabla 1) <sup>lxix</sup>.

**Tabla 1. Características principales de la colitis ulcerosa** <sup>71</sup>

Característica	Colitis ulcerosa
Área afectada	Solo el colon
Distribución	Continua
Características histológicas	Mucosa / submucosa, abscesos de las criptas: úlceras superficiales
Características macroscópicas	Friabilidad de la mucosa, pseudopólipos, pérdida de haustras (crónica)
Síntomas	Colónicos <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diarrea con sangre y mucosidad.</li> <li>• Urgencia, tenesmo.</li> <li>• incontinencia</li> <li>• Calambres abdominales inferiores y dolor con la defecación</li> </ul> Sistémicos <ul style="list-style-type: none"> <li>• Cansancio, pérdida de peso</li> <li>• Malestar general, fiebre</li> </ul>

## 2.2 Epidemiología

La prevalencia e incidencia varían ampliamente y depende de múltiples factores, incluyendo el origen étnico y la localización geográfica. La prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal en la población mundial es de 100 por cada 100,000 con 10,000 casos nuevos diagnosticados anualmente. En México, no existen datos concluyentes, aunque la incidencia de la CU se encuentra entre 0.2% a 4.89% <sup>lxxx</sup>

La colitis ulcerosa tiene un patrón de incidencia bimodal. Los picos de inicio principales entre las edades de 15 y 30 años. Un segundo, y más pequeño, el pico de incidencia ocurre entre las edades de 50 y 70 años. Aunque algunos estudios muestran una ligera predilección por los hombres, la mayoría de los estudios no tienen ninguna preferencia con respecto al sexo. <sup>lxxxi</sup>

## 2.2 Manifestaciones clínicas

Los pacientes pueden presentar diferentes síntomas en función de la extensión de la enfermedad. En general, existe un patrón, en el que los síntomas pueden persistir durante días, semanas o meses y después ceder, con períodos asintomáticos que duran meses, años o incluso décadas. Los síntomas característicos comprenden hemorragia rectal o diarrea sanguinolenta, dolor abdominal, fiebre, pérdida de peso y malestar general. Los síntomas de la proctitis incluyen heces con sangre, tenesmo y/o defecación dolorosa. También puede existir urgencia y frecuencia, así como incontinencia fecal. Las manifestaciones extraintestinales asociadas con la actividad de la enfermedad incluyen episcleritis, escleritis y uveítis, artropatías periféricas, eritema nodoso y pioderma gangrenoso. Las manifestaciones extraintestinales independientes de la actividad de la colitis incluyen artropatías axiales, sacroileitis y espondilitis anquilosante. Una manifestación hepática extraintestinal significativa de la colitis ulcerosa incluye la colangitis esclerosante primaria y se asocia con un mayor riesgo de cáncer colorrectal. <sup>lxxxii</sup>

### **2.3 Complicaciones**

En los pacientes con inflamación extensa o grave u otros problemas como la displasia epitelial o el cáncer que están en su fase crónica pueden desarrollar complicaciones agudas como la hemorragia grave y el megacolon tóxico. Los factores de riesgo para el cáncer incluyen la larga duración de la enfermedad, independientemente de la actividad clínica; la enfermedad extendida; el inicio de la enfermedad a edad temprana; la inflamación grave; la presencia de colangitis esclerosante primaria y una historia familiar de cáncer colorectal<sup>lxxxiii</sup>. Más del 20% de los pacientes con EII desarrollan cánceres asociados con colitis dentro de los 30 años de la aparición de la enfermedad, y aproximadamente el >50% de estos pacientes mueren a causa de ellos. Notablemente, pacientes que desarrollan EII a una edad temprana (<30 años) tienen un riesgo mucho mayor de desarrollar cáncer.<sup>lxxxiv</sup>

### **2.5 Características genéticas**

Se comprobó que de los 47 locus identificados asociados a la colitis ulcerosa, 19 son específicos de esa enfermedad y 28 son compartidos con la enfermedad de Crohn (20-21). Las regiones de riesgo ECM1, HNF4A, CDH1 y LAMB1 se relacionan con la disfunción de la barrera epitelial; la asociación con DAP indica una relación con la apoptosis y la autofagia, y las asociaciones con PRDM1, IRF5, NKX2-3 sugieren defectos en la regulación de la transcripción. Asimismo, se han identificado otros genes que tienen relación con la señalización de la IL-23 tanto en la colitis ulcerosa como en la enfermedad de Crohn (IL23R, STAT3 JAK2, IL12B y PTPN2) y con el sistema inmune, en particular HLA-DR y genes implicados en la diferenciación de las células T colaboradoras tipo 1 y 17 (Th1 y Th17) tales como IL10, IL7R, IL23R, IFN- $\gamma$  y. En conjunto, los estudios indican tanto las variantes de genes específicos y no específicos se asocian con la colitis ulcerosa, y las dos formas de EII comparten ambas vías de la enfermedad<sup>22</sup>.

## 2.6 Respuesta inmune de la mucosa

En la colitis ulcerosa se observan anomalías en la respuesta inmunológica humoral y celular. Es común la elevación de IgM, IgA e IgG, pero en la colitis ulcerosa en particular, hay un aumento desproporcionado de los anticuerpos IgG1. La diferencia entre la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn está dada por las células T CD4+ de la mucosa, las que se dividen en dos linajes: células T cooperadoras, Th1 y Th2. La enfermedad de Crohn es una condición similar Th1, a juzgar por la mayor producción de interferón- $\gamma$ . Por el contrario, la colitis ulcerosa tiene una respuesta Th2 atípica, según lo indica la presencia de células T NK no clásicas en el colon, secretoras de abundante IL-13, mediadora de la citotoxicidad de las células epiteliales, la apoptosis, y la disfunción de la barrera epitelial<sup>lxxxv</sup>. Las células T polarizadas Th2 productoras de IL-5 están presentes en colitis ulcerosa<sup>lxxxvi</sup>. El equilibrio entre Th1 y Th2 ha sido usado para diferenciar entre la colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn. Se ha reportado en pacientes con CU un incremento de los niveles de IL-18 comparados con controles o con pacientes con EC<sup>lxxxvii</sup>. Otras citocinas elevadas tanto en EC como en CU son la IL-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF)<sup>lxxxviii</sup>.

### 2.6.1 Defectos en la función de barrera epitelial lleva a una inflamación intestinal

Aparte del papel central de las células epiteliales intestinales en mantener la función de la barrera mucosa a través de la activación de la respuesta inmune innata, éste también constituye una capa impermeable que tiene la capacidad de absorber selectivamente lo que es necesario para el organismo, y también para negar el paso de otras moléculas patógenas o nocivas<sup>lxxxix</sup>. La alteración de esta barrera física selectiva, puede inducir una hiperactividad de la respuesta inmune de la mucosa y una inflamación intestinal crónica. De hecho, desde 1972, cuando Shorter y col. postularon que un defecto primario en la permeabilidad intestinal puede llevar al desarrollo de una inflamación persistente en el intestino, ha incrementado la evidencia para apoyar esta teoría. Conforme a esta hipótesis, varios estudios han reportado cambios en los complejos de unión de las células epiteliales intestinales, los cuales inducen un cambio dramático en la permeabilidad intestinal tanto en modelos animales de inflamación intestinal como en pacientes con EII<sup>xc</sup>.

## **2.7 Papel de las Uniones estrechas en la inflamación intestinal**

Las uniones estrechas (UEs) son esenciales en la regulación de la permeabilidad intestinal y la difusión de iones y moléculas a través de la superficie epitelial luminal. Las UEs consisten en al menos 50 diferentes proteínas asociadas a membranas localizadas entre las regiones apicales y laterales de células epiteliales polarizadas que ligan a células vecinas y regulan el flujo entre espacios celulares. Las proteínas de UEs incluyen a: 1) proteínas de membrana integral, tanto como las moléculas de uniones adherentes, claudinas y ocludinas las cuales se extienden dentro de los espacios intercelulares y funcionan como una puerta , 2) proteínas ligadoras del citoesqueleto citoplásmico, como las cingulina, zonula ocludens-1,-2 y-3 (ZO-1,-2,3), las cuales anclan las proteínas de membrana a el citoesqueleto y 3) varias proteínas de señalización que pueden activar varias cascadas de señalización a la baja, actuar como factores de transcripción y servir como reguladores del ciclo celular. Se ha demostrado en varios estudios la asociación directa entre el daño de las proteínas UEs y la inflamación con la gran mayoría de datos generados en humanos con CU y en modelos animales de inflamación intestinal.

**Tabla. 2 Proteínas de unión estrecha de interés en la colitis ulcerosa <sup>xci</sup>**

Proteínas de unión estrecha	Función	Expresión en la Colitis Ulcerosa Activa
Claudina 1	Estrechamiento del epitelio capaz de iniciar el enlazamiento de las uniones estrechas	↑
Claudina 2	Proteína importante formadora de poros, capaz de iniciar la formación de enlazamiento de las uniones estrechas, decremента la función de barrera de Claudina 1 y Claudina 4	↑↑
Claudina 4	Estrecha el epitelio, disminuye la conductancia paracelular a través de la disminución de la permeabilidad del sodio	↓
Claudina 18	Función incierta	↑
Ocludina	Enlaza ZO-1, regula la permeabilidad paracelular, función en adhesión celular	↓
ZO-1	Regula las interacciones proteína-proteína, enlaza al citoesqueleto de actina, es una proteína de anclaje	↓

## 2.8 Tratamiento farmacológico para la colitis ulcerosa

El tratamiento de la colitis ulcerosa tiene como objetivos principales promover la remisión del ataque agudo de la enfermedad y reducir la incidencia de recurrencias. Se emplean fármacos clásicos como aminosalicilatos, corticoides, inmunosupresores y antibióticos, así como nuevas terapias biológicas desarrolladas en los últimos años.

### 2.8.1 Aminosalicilatos.

Los aminosalicilatos son fármacos que contienen en su estructura la molécula de 5-aminosalicilido (5-ASA) o mesalazina. El primer fármaco empleado fue la sulfasalazina, en la que se une, mediante un puente “azo”, una molécula de ASA a otra de sulfapiridina, que actúa de molécula transportadora (asegurando la disponibilidad del 5-ASA en el colon y previniendo su absorción y metabolismo en el intestino delgado). Así, el 5-ASA es liberado en el colon gracias a las azobacterias, que rompen este puente “azo”.<sup>xcii</sup> La sulfasalazina presenta dos problemas: en primer lugar, que la molécula de sulfapiridina es la responsable de la mayoría de las reacciones adversas atribuidas a este fármaco y, en

segundo lugar, que al liberarse en el colon no va a ser activa en la enfermedad de Crohn que se manifieste en el intestino delgado. Esto ha hecho que se hayan desarrollado nuevas formas farmacéuticas para transportar el 5-ASA <sup>xciii</sup>

El mecanismo de acción de la mesalazina no está del todo definido, aunque diferentes estudios *in vitro* han demostrado su efecto modulador sobre la síntesis y liberación de leucotrienos (LTB4) y prostaglandinas (PGE2), sobre la producción de determinadas citocinas proinflamatorias (TNF, IL-1 e IL-2) y sobre la producción de radicales libres de oxígeno. <sup>xciv</sup> Son necesarias concentraciones elevadas en la luz intestinal para poder ejercer su efecto terapéutico, por lo que son preferibles formas farmacéuticas que liberen localmente la 5-ASA en la mucosa.

Los aminosalicilatos están indicados en los brotes inflamatorios de intensidad leve, tanto en la Enfermedad de Crohn como en la colitis ulcerosa y en el mantenimiento de la remisión de la colitis ulcerosa. <sup>xcv</sup>

### 2.8.2 Corticoides

Los corticoides actúan a través de la inhibición de la transcripción de interleucinas, de la supresión del metabolismo del ácido araquidónico y de la estimulación de la apoptosis de linfocitos de la lámina propia del intestino <sup>xcvi</sup>

Los corticoesteroides, tales como prednisona, prednisolona metilprednisolona, constituyen el tratamiento de elección de los brotes moderados y graves de la enfermedad y en los casos de falta de respuesta a los salicilatos. Sin embargo, en un 20-30% de los casos no hay respuesta (corticorrefratariedad) y es necesario aplicar otros tratameintos. Los corticoides, por su gran número de efectos secundarios, no constituyen un tratamiento adecuado para mantener la remisión de la enfermedad, pero en ocasiones no es posible suspenderlos (corticodependencia). De forma general, se debe evitar su administración en tratamientos prolongados, a favor de otras terapias con menos efectos tóxicos. Esto ha condicionado al desarrollo de corticoides de administración oral o rectal de actuación local, efectivos en la EII y a la vez con un menor número de reacciones adversas sistémicas <sup>xcvii</sup>.

En la actualidad, se está evaluando el papel de la budesonida oral y en edema en el tratamiento de la colitis ulcerosa, aunque ya se ha comprobado su eficacia en la CU activa <sup>xcviii</sup>. La administración intravenosa de los corticoides está justificada cuando los enfermos requieran hospitalización.

### 2.8.3 Inmunosupresores

La justificación en la utilización desde hace varias décadas de estos fármacos reside en las múltiples alteraciones de tipo inmunológico que caracterizan a la EII. Las principales indicaciones son: corticodependencia y corticorrefractoriedad, enfermedad fistulosa, enfermedad perianal, prevención de la recurrencia post-quirúrgica en la EC, pouchitis y retraso del crecimiento en niños. Entre los inmunosupresores encontramos azatioprina (AZA), metotrexato y ciclosporina.

La AZA es metabolizada *in vivo* para dar 6-mercaptopurina (6-MP), la cual puede seguir dos vías metabólicas distintas: degradación en metabolitos inactivos o la generación de ácido tiosínico, nucleótido derivado de la 6-tioguanina.<sup>xcix</sup> Este último se acumula intracelularmente y es considerado como el metabolito activo responsable del efecto citotóxico de estos fármacos, ya que inhibe la síntesis de purinas, las interconversiones de nucleótidos, la síntesis de ARN y ADN, así como la replicación cromosómica. Todo este conjunto de procesos hace que se inhiba la proliferación y activación de los linfocitos ante la respuesta inmune que se tiene lugar en la EII.

Tanto la AZA como la 6-MP son eficaces en la inducción de la remisión y en el mantenimiento de la misma, tanto en CU como en EC. La AZA debe mantenerse durante largos periodos de tiempo para mantener bajo control la enfermedad. El efecto secundario más preocupante es la posibilidad de la inducción de neoplasias a largo plazo.<sup>c</sup>

El metotrexato se utiliza en el caso de intolerancia o falta de respuesta a la AZA o a la 6-MP y es eficaz, tanto en la enfermedad activa, como en el mantenimiento de la remisión. Inhibe la síntesis de citocinas y eicosanoides, pero el mecanismo de acción no se conoce del todo.<sup>ci</sup>

La ciclosporina, que inhibe de forma selectiva las células CD4<sup>+</sup> y la liberación de citocinas, se ha utilizado en los brotes corticorrefractorios de la colitis ulcerosa y en la Enfermedad de Crohn<sup>cii</sup>

#### 2.8.4 Terapias biológicas

Dentro del término terapias biológicas se engloban diferentes actuaciones terapéuticas que tienen en común actuar en puntos aislados del proceso inflamatorio. Se incluyen en este grupo diferentes estrategias. Por un lado el bloqueo de la acción de citocinas proinflamatorias como TNF, IFN $\gamma$ , IL-6 o IL-7 y por otro lado la interferencia en el reclutamiento de células inflamatorias mediante anticuerpos frente a moléculas de adhesión.



### 2.8.5 Bloqueo de citocinas proinflamatorias

Dado el importante papel del TNF en el desarrollo de la EII, esta citocina constituye una diana clave en el tratamiento de estos procesos crónicos. El infliximab es un anticuerpo monoclonal anti-TNF quimérico (ratón-Humano). El CDP571 y el adalimumab o (CDP870) son anticuerpos monoclonales anti TNF con mayor proporción humanizada. Los tres son útiles en la remisión de la EC activa <sup>ciii, civ y cv</sup> y el infliximab ha demostrado ser eficaz en el mantenimiento de la remisión a corto plazo.<sup>cvi</sup>

El TNF ejerce sus efectos proinflamatorios a través de su unión con dos receptores específicos transmembrana, P55 y p75.

Igualmente, IL-12 e INF- $\gamma$  son citocinas claves en el desarrollo de la respuesta inmune TH1 (47). Tanto el Fontolizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-INF- $\gamma$  (48). Como el J695 (ABT-874) un anticuerpo monoclonal humano anti IL-12 (49) han mostrado ser efectivos en la enfermedad activa.

Muchos son los agentes desarrollados para tratar de inhibir los procesos de activación y proliferación de los linfocitos. En este sentido, la terapia anti-CD4 con el uso de anticuerpos monoclonales como CM-T412, MAX.16H5 y BF-5, ha inducido remisión en pacientes con EC como en CU <sup>cvi</sup>. Con el objeto de inhibir la proliferación de células T se han desarrollado anticuerpos frente IL2R, daclizumab basiliximab, obteniendo buenos resultados en la CU <sup>cvi</sup>.

### 2.8.6 Bloqueo de moléculas de adhesión

El reclutamiento de células inflamatorias desde la circulación sistémica se considera una etapa crítica de la amplificación de la respuesta inflamatoria. El natalizumab es un anticuerpo monoclonal de ratón humanizado frente  $\alpha 4$ -integrina, que inhibe, por tanto, la migración trans-endotelial. Este tratamiento ha demostrado ser eficaz en la inducción de la remisión, tanto en pacientes de EC como de CU <sup>cix</sup>.

### 2.8.7 Antibióticos

El papel de los antibióticos parece más evidente en la EC que en la CU. El metronidazol ha mostrado ser útil como terapia primaria en tratamientos de pacientes con EC, así como para evitar recurrencia del proceso inflamatorio tras resección intestinal. El cirpofloxacino ha demostrado también su efectividad en la EC activa, aunque de forma discreta en pacientes con CU <sup>cx</sup>

A pesar del amplio abanico de posibilidades terapéuticas, aun no existe un tratamiento ideal para la colitis ulcerosa, con un perfil adecuado de eficacia y seguridad, por lo que existe una demanda de nuevas estrategias terapéuticas eficaces y exentas de reacciones adversas. Por eso, profundizar en el papel de agentes con pocos efectos adversos puede ser de gran interés. En este sentido se puede considerar el empleo de diferentes tipos de cepas bacterianas con potencial probiótico, que hayan demostrado en diferentes estudios una posible actividad en la colitis ulcerosa, y a la vez que hayan demostrado seguridad.

## 2.9 Microbiota comensal y Enfermedad Inflamatoria intestinal (EII)

Nuestro actual entendimiento de la patogénesis de la EII involucra interacciones entre la susceptibilidad del hospedero (predisposición genética), inmunidad de la mucosa y el medio intestinal. La creciente evidencia de que la microbiota comensal está implicada en la respuesta inflamatoria en individuos genéticamente susceptibles. El papel perjudicial de los microorganismos que causan EII y la prevención de esta enfermedad en condiciones libres de gérmenes ha sido establecido en modelos animales. La enfermedad inflamatoria intestinal está presente en un huésped predispuesto, cuando el sistema inmune adaptativo monta una hiper-respuesta a un disparador en la microbiota intestinal <sup>cxix</sup>

La evidencia que apoya esta hipótesis incluye: 1) La inflamación en EII ocurre en las áreas de mayor densidad de bacteria intestinal (íleon y colon), 2) el uso de antibióticos de amplio espectro mejora la inflamación intestinal crónica. 3. Modelos animales de EII se mantienen sanos cuando se crían en un ambiente libre de gérmenes, sin embargo, desarrollan la inflamación después de la colonización con bacterias comensales <sup>cxii</sup>

En pacientes con colitis ulcerosa presentan irregularidades microbianas (disbiosis), en el cual ha sido caracterizado por un incremento en *Rhodococcus spp.*, *Shigella spp.*, y *Escherichia spp.*, pero un decremento en ciertos *bacteroides spp.* Más específicamente, *Campylobacter spp.* *Enterobacteriae* y *Helycobacter* fueron las más prevalentes en muestras de pacientes con CU, también en ensayos serológicos se identificó a *Fusobacterium varium* como un potencial contribuyente para la inflamación intestinal en la CU, interesantemente en estudios de hibridación in-situ de muestras de pacientes afectados por CU se encontró que *Lactobacillus spp.* y *Pediococcus spp.* estaban ausentes <sup>cxiii-cxiv</sup>.

Con todo lo anterior, es evidente que las interacciones entre los complejos factores microbianos, genéticos, inmunológicos y ambientales son críticos para la patogénesis de la EII. La agresiva respuesta inmune celular a la microbiota y el desarrollo de la inflamación es causada por una pérdida en la función de barrera de células epiteliales, la sobre-expresión de marcadores pro-inflamatorios, la deficiencia en señales de protección y la presentación antigénica anormal, de acuerdo con modelos animales.

Esta asociación entre la microbiota intestinal y el desarrollo de IBD ha dejado a la investigación de potenciales tratamientos para modificar la composición de la microbiota intestinal, entre ellas se basan en la utilización de probióticos, el potencial de estos agentes como seguros y naturales ha incrementado en estudios *in vitro*, *in vivo* y en humanos con EII <sup>cxv</sup>.

### 3. Probióticos

#### 3.1 Definición de probióticos

El término probiótico es derivado de la palabra griega que significa “para la vida” y es utilizado para definir a organismos vivos no patógenos y sus efectos derivados en el hospedero. El término “probiótico” fue por primera vez introducido por Vergin, cuando él estaba estudiando los efectos de los antibióticos y otras sustancias microbianas en la población microbiana del intestino <sup>cxvi</sup>

. El término probiótico fue entonces redefinido por Lilly y Stillwell como “un producto producido por un microorganismo estimulando el crecimiento de otro microorganismo”. Subsecuentemente el término fue definido más a fondo por Fuller como “microorganismos no patógenos los cuales cuando son ingeridos ejercen una influencia positiva en la salud o fisiología del hospedero”. La última definición presentada por la FDA (Food and Drug Administration) y por la ONU (Organización mundial de la salud) conjuntamente es “microorganismos vivos los cuales cuando son administrados en adecuadas cantidad confieren un beneficio saludable al hospedero”. Algunos de los microorganismos probióticos popularmente utilizados son *Lactobacillus rhamnosus*,

*Lactobacillus reuteri*, *Bifidobacterium longum*, ciertas cepas de *Lactobacillus casei*, *Lactofacillus acidophilus*, *Bacillus coaguands*, *Escherichia coli* Nissle 1917, *Enterococcus Faecium* SF68 y la levadura *Saccharomyces boulardy*. Bacterias formadoras de esporas del genero *Bacillus*. Estos probióticos son agregados a los alimentos, particularmente en productos de leche fermentada, únicamente con un microorganismo o en combinación con otro u otras cepas probióticas.<sup>cxvii</sup> Nuevos géneros y cepas de probióticos están emergiendo continuamente con esfuerzos de investigación más avanzados y enfocados. Los productos probióticos pueden contener ya sea una simple cepa o una mezcla de dos o más cepas. Ej. VSL#3 es una mezcla de 8 diferentes cepas probióticas. Los efectos de los probióticos son específicos de cada cepa y no deben ser generalizados. Una simple cepa puede demostrar diferentes beneficios cuando es utilizada individualmente y en combinación. Los beneficios de una formulación probiótica también difieren con el grupo de pacientes. Estudios limitados que han sido llevados han demostrado eficacia con probióticos multicepas<sup>cxviii</sup>.

La investigación en probióticos, en particular *Lactobacilli* ha crecido exponencialmente durante las últimas dos décadas como puede verse en el hecho que comparado a los 180 artículos de investigación publicados durante 1980 y 2000, más que 5700 artículos de investigación fueron publicados durante 2000 a 2014 con la búsqueda “probiotic lactobacillus “ (PubMed 2014)<sup>cxix</sup>.

La FAO y la OMS han presentado conjuntamente directrices para establecer un enfoque sistemático para una evaluación eficaz de los probióticos en los alimentos a fin de fundamentar las declaraciones de propiedades saludables y los beneficios. Algunos de los requisitos previos de un organismo probiótico ideal son: 1. No ser patógeno, 2. Que produzcan ácido láctico, 3. genéticamente estable, 4. Propiedades genotóxicas, 5. Ser tolerante al ambiente ácido y a las sales biliares. 6. Tener una adhesión efectiva en el intestino. Las directrices de la FAO / OMS sobre probióticos podrían utilizarse como un estándar mundial para evaluar los probióticos en los alimentos que podría resultar en la confirmación de propiedades saludables. Las guías hacen necesario llevar a cabo las siguientes actividades.

1. Identificación de la cepa
2. Caracterización funcional de la cepa para seguridad y propiedades probióticas
3. Validación de los beneficios a la salud en estudios humanos

4. Etiquetado honesto y no engañoso de declaraciones de eficacia y contenido para toda la vida útil<sup>cxv</sup>.

Dada la evidencia del papel de la flora intestinal en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria del intestino, hay un mayor interés en la manipulación de la microbiota intestinal para un lograr un beneficio terapéutico para la colitis ulcerosa.

### 3.2 Probióticos para el tratamiento de enfermedades inflamatorias intestinales

El daño en la función de barrera epitelial es observado en varias condiciones incluyendo EII, infecciones entéricas y en algunas enfermedades autoinmunes como Diabetes tipo1. El aumento de la función de barrera intestinal puede ser un importante mecanismo por el cual los probióticos benefician al hospedero en estas enfermedades. Los probióticos pueden influenciar en las interacciones célula a célula de la mucosa y la estabilidad celular por el aumento de la función de barrera entre la modulación del citoesqueleto y la fosforilación de las proteínas de uniones estrechas<sup>cxvi</sup>. La función de barrera intestinal es mantenida por varios sistemas interrelacionados incluyendo la secreción de moco, secreción de cloro y agua y la unión entre las células epiteliales a las uniones apicales por las proteínas de unión estrecha. La ruptura de la función de barrera epitelial es observada en varias condiciones como la EII <sup>82</sup>

**Tabla 3. Mecanismos de acción de los probióticos** <sup>cxvii</sup>

Acción	Mecanismo
Inhibición de bacterias patógenas entéricas	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Decremento del pH luminal</li> <li>- Secreción de proteínas bactericidas</li> <li>- Resistencia a la colonización</li> <li>- Bloqueo de la unión epitelial</li> </ul>
Mejoramiento de la función de barrera epitelial y mucosa	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Producción de ácidos grasos de cadena corta</li> <li>- Incremento de la producción de moco</li> <li>- Incremento de la integridad de barrera</li> </ul>
Modifica la respuesta inmune	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Incrementa IL-10 y TGF-<math>\beta</math>, decremента TNF</li> <li>- Incrementa la producción de inmunoglobulina A</li> </ul>

IL-10 interleucina -10, TGF- $\beta$  factor  $\beta$  transformante de crecimiento, TNF factor de necrosis tumoral

El incremento de la función de barrera puede ser un importante mecanismo por el cual bacterias probióticas benefician al hospedero en enfermedades inflamatorias intestinales (71). El aumento de la función de barrera ha sido observado tanto en modelos *in vitro* e *in vivo*. La mezcla del probiótico VSL#3 normalizó la integración de barrera en las diferencias del potencial transepitelial y el flujo de manitol a través del epitelio intestinal en ratones<sup>cxxiii</sup>. Además en un cultivo *in vitro* utilizando células epiteliales T84, VSL#3 pero no otras bacterias probióticas, *L.reuteri*, *S.bovis* y una no patogénica *E.coli* decrementó la permeabilidad en las monocapas y conductancia, indicando que el incremento en la resistencia fue específico de una o más de las bacterias de VSL#3. El incremento de la integridad de barrera en respuesta a bacterias probióticas ha sido observado en animales saludables y en modelos animales de colitis. Por ejemplo, en ratas saludables *L. brevis* aumento la función de barrera por la permeabilidad a manitol<sup>cxxiv</sup>. En un modelo de colitis inducido con metotrexato, *L. plantarum* y *L. reuteri* aumentaron la función de barrera<sup>cxxv</sup>. Sin embargo el incremento de la función no ha sido observado en todas en todos los modelos de colitis estudiada. El mecanismo por el cual las bacterias probióticas aumentan la función de barrera intestinal de la mucosa es incierto, pero pueden estar relacionadas a alteraciones en la secreción de moco o cloro o por cambios en la expresión de proteínas de uniones estrechas. Algunas bacterias probióticas modifican la expresión de genes de MUC y la secreción de moco. Por ejemplo, *L. plantarum* 299v incremento la expresión de mRNA de MUC2 y MUC 3 cuando se incubaron con la línea celular epitelial HT-29<sup>cxxvi</sup>. VSL#3 y *E. coli* de Nissle incrementaron la expresión del gen y la proteína de MUC2, MUC3 y MUC5AC<sup>cxxvii-cxxviii</sup>. Algunos probióticos se limitan a la secreción de cloro y agua. Por ejemplo *S. thermophilus* y *L. acidophilus* revirtieron el incremento de la secreción de cloro inducido con *E.coli* enteroinvasiva en una línea celular epitelial<sup>cxxix</sup>. Las proteínas de uniones estrechas son estructuras dinámicas sujetas a cambios estructurales. En un modelo *in vivo* de colitis inducido con DSS en ratones BALB/c el probiótico VSL#3 incrementó la expresión y la distribución de las proteína de uniones estrechas ocludina, zonula ocludens-1 y claudin -1,-3,-4 y -5 y también ayudo a prevenir el radio apoptótico epitelial, sugiriendo que los probióticos son importantes en la preservación de la arquitectura del citoesqueleto<sup>cxxx</sup>. *S. thermophilus* y *L. acidophilus* incrementaron (actina, ocludina) pertenecientes a las proteínas de las uniones estrechas, en un ensayo con líneas celulares epiteliales<sup>cxxxi</sup>. *E. coli* de Nissle puede contrarrestar los efectos de *E. coli* enteropatógena en monocapas de células epiteliales T-84. Este efecto es llevado por la alteración en la señalización de la protein Kinasa C y un incremento en la redistribución y

expresión de la proteína zonula occludens-2 (ZO-2), un factor crucial en el mantenimiento de la función de las uniones estrechas<sup>cxxxii</sup>.

#### **4.0 *Pediococcus pentosaceus***

*Pediococcus pentosaceus* es una bacteria gram positiva, en forma de cocos. <sup>cxxxiii</sup> Se ha demostrado su capacidad probiótica debido a su gran resistencia a las condiciones gastrointestinales en ensayos *in vitro*, *Pediococcus pentosaceus* fue capaz de sobrevivir a un pH bajo (pH 1.8), a tolerar a las sales biliares y a las enzimas de la saliva. <sup>cxxxiv-cxxxv</sup> Por otro lado, se ha demostrado su habilidad para adherirse a la mucosa de células Caco-2 <sup>cxxxvi</sup>. Debido a la producción de bacteriocinas, *P. pentosaceus* es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium smegmatis*, *Clostridium perfringens* y *Staphylococcus epidermidis*. Se ha descrito que estas bacteriocinas son capaces de producir poros y lisar las bacterias y potencian el efecto de algunos antibióticos como ciprofloxacina <sup>cxxxvii</sup>.

Se han hecho estudios *in vivo* en donde se ha demostrado el efecto de *P. pentosaceus* sobre diferentes modelos inflamatorios, en donde se ha observado su efecto inmunomodulador y sobre la función de barrera:

En un modelo de colitis infecciosa inducida con *Clostridium difficile* el tratamiento preventivo con *P. pentosaceus* LI05 a la dosis de  $3 \times 10^9$  UFC mejoró el porcentaje de sobrevivencia de los ratones, disminuyó los niveles de citocinas inflamatorias en suero (IL-1 $\alpha$ , IL-6 y TNF), y en tejido colónico, además, incrementó la expresión de las proteínas de uniones estrechas ZO-1, Claudina-2 y ocludina que se ven disminuidas en este modelo <sup>cxxxviii</sup>.

Se demostró en un modelo de cirrosis hepática inducida con CCl<sub>4</sub> que la administración oral de *P. pentosaceus* LI05 a una dosis de ( $3 \times 10^9$  UFC/ml) previno la fibrosis hepática y reguló a la baja la expresión de genes profibrogénicos. También las endotoxinas séricas, la translocación bacteriana y la destrucción de la ultraestructura de la mucosa intestinal fue reducida en las ratas tratadas con *P. pentosaceus*, indicando el mantenimiento de la barrera intestinal como un mecanismo de acción, esto se confirmó con la reducción no solo de las citocinas inflamatorias intestinales (IL-6, TNF y IL-17A), sino también por la reducción de la expresión de los receptores TLR2, TLR4, TLR5 and TLR9, también se observó en este estudio un incremento potencial de bacterias benéficas como

*Elusimicrobium* y *Prevotella* y una disminución en bacterias patógenas como *Escherichia*  
cxxxix .

También se ha evaluado el efecto de *P. pentosaceus* GS4 sobre un modelo de carcinogénesis inducida con azoximetano en ratones albinos. En donde se observó que el tratamiento con *P. pentosaceus* GS4 ( $1.1 \times 10^9$  UFC/ml) mejoró a nivel histopatológico la arquitectura del hígado y el riñón, además de que disminuyó los niveles de biomarcadores de función hepática. La intervención del probiótico *P. pentosaceus* GS4 redujo las deformidades estructurales intestinales y la actividad de fosfatasa alcalina, las cuales se ven afectadas con la intoxicación por azoximetano<sup>cxl</sup>.

Debido a que varias cepas de *P. pentosaceus* han probado tener propiedades inmunomoduladoras así como de incremento de función de barrera en diferentes modelos *in vivo* nosotros decidimos evaluar el efecto de *Pediococcus pentosaceus* sobre un modelo de colitis ulcerosa inducida con Dextrán sulfato de sodio (DSS)

## 5. Modelos *in vivo* de colitis ulcerosa

Desde épocas pasadas se han desarrollado diferentes modelos de EII. Estos modelos pueden ser divididos dentro de modelos de colitis espontánea, modelos de colitis inducible, modelos modificados genéticamente y modelos de transferencia adoptiva (Tabla 2). Aunque estos modelos no representan la complejidad de la enfermedad en humanos, son valiosos e indispensables herramientas que nos proveen de un amplio rango de opciones para la investigación de diversos factores implicados en la patogénesis de la EII y evaluación de diferentes opciones terapéuticas<sup>cxli</sup>. Los modelos murinos de inflamación intestinal inducidos químicamente son uno de los más utilizados, debido a que son sencillos para inducir la aparición, duración y gravedad de la inflamación y porque son inmediatos y controlables. Tanto el Dextrán sulfato de sodio (DSS) ácido sulfónico trinitrobenceno (TNBS) inducen colitis y están bien establecidos como modelos de inflamación de la mucosa y que han sido utilizados por alrededor de 2 décadas en el estudio de la patogénesis de la EII y en estudios preclínicos. Sin embargo, el modelo de



colitis inducido por DSS se asemeja a la evolución clínica en humanos, además, tiene algunas ventajas cuando comparamos con otros modelos animales de colitis. Por ejemplo, un modelo agudo, crónico o recurrente puede ser producido fácilmente simplemente con un cambio en la concentración de la administración de DSS (en ratas y cepas de ratones). La colitis es inducida por la adición de DSS en el agua para beber. El modelo inducido por DSS para el estudio de la colitis asociada a la carcinogénesis ha sido revisado recientemente<sup>cxlii</sup>.

**Tabla. 4 Modelos animales de enfermedades inflamatorias del intestino con defectos primarios de origen epitelial intestinal<sup>cxliii</sup>.**

<i>Modelo animal</i>	<i>Localización de la enfermedad / fenotipo de la inflamación</i>
<b>Modelos inducidos químicamente</b>	
Colitis inducida con DSS	Colitis superficial
Colitis inducida con TNBS	Colitis transmural
<b>Modelos genéticamente modificados que afectan la integridad de la barrera epitelial</b>	
Knockout Mdr1a	Colitis transmural
N-cadherina <sup>-/-</sup>	Patchy focos de inflamación ileal
Knockout Gai2	Pancolitis superficial; incremento de la severidad en el colon distal
Knockout JAM-A	Colitis
<b>Modelos genéticamente modificados afectando la respuesta innata intestinal</b>	
Knockout TLR5	Colitis: 10% de incidencia de prolapso rectal
NEMO <sup>IEC-KO</sup>	Pancolitis
TAK1 <sup>IEK-KO</sup>	Enterocolitis
<b>Modelos genéticamente modificados afectando la integridad epitelial y la producción de moco</b>	
RBP-J <sup>IEC-KO</sup>	Colitis; prolapso rectal

<b>MUC2 Knockout</b>	Colitis superficial, mas severa en el colon distal
<b>POFUT1</b> <sup>IEC-KO</sup>	Enterocolitis
<b>Modelos espontáneos</b>	
<b>SAMP1/YitFc</b>	Segmental, discontinua, ileitis transmural, incremento de la severidad en el ileon terminal.
<b>C3H/HeJBir</b>	Colitis; localización primaria en el ciego

## VI. JUSTIFICACION

La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria crónica del colon. En los últimos años se ha incrementado en México la frecuencia de nuevos casos con CU. Además si la enfermedad es persistente se ha asociado con el riesgo de padecer cáncer de colon. Dentro de los factores generalmente implicados en la fisiopatología de la colitis destacan una respuesta inmune anormal, defectos en la función de la barrera intestinal, alteraciones en la microbiota intestinal y por factores ambientales (dieta y hábitos alimenticios). Los tratamientos actuales para la CU se han centrado en la inflamación y en la supresión del sistema inmune, a pesar de ello, están limitados por sus efectos secundarios. Por consiguiente, se buscan constantemente nuevas alternativas su tratamiento. Una de ellas es el uso de probióticos. Los probióticos tienen efectos anti-inflamatorios y mejoran la función de barrera intestinal por diferentes mecanismos tanto en humanos como en varios modelos *in vivo* de colitis. Se ha demostrado que en

pacientes con CU hay una disminución de las especies de *Pediococcus* en su microbiota intestinal, dado lo anterior nosotros proponemos a *Pediococcus pentosaceus* para mejorar la función de barrera intestinal y a su vez ser utilizada para el tratamiento de la colitis ulcerosa

## **V. HIPÓTESIS**

La administración de *Pediococcus pentosaceus* mejorará la sintomatología de la colitis ulcerosa e incrementará la función de barrera intestinal en un modelo *in vivo* de colitis aguda

### **I. OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de *Pediococcus pentosaceus* sobre la sintomatología de la colitis ulcerosa y la función de barrera intestinal en un modelo *in vivo* de colitis ulcerosa aguda

### **II. OBJETIVOS ESPECIFICOS:**

- a) Evaluar el efecto de la administración de *P. pentosaceus* a diferentes dosis en ratones BALB/c sanos sobre el peso, longitud del colon, consistencia de las heces, morfología microscópica del colon.

- b) Evaluar el efecto de diferentes dosis de *P. pentosaceus*, sobre un modelo experimental de colitis ulcerosa aguda, cuantificando el Índice de actividad de la enfermedad.
- c) Estudiar el efecto de *P. pentosaceus* sobre las características morfológicas del tejido intestinal en un modelo experimental de colitis ulcerosa aguda por medio de la tinción H&E.
- d) Evaluar el efecto de *P. pentosaceus* sobre la permeabilidad intestinal por la administración de FITC- dextrano fluorescente (DX-4000-FITC) en un modelo experimental de colitis ulcerosa aguda.
- e) Identificar el efecto de *P. pentosaceus* sobre la distribución de las proteínas de uniones estrechas (claudina-2 y ocludina), en muestras de tejido intestinal de ratones con colitis ulcerosa aguda mediante inmunohistoquímica
- f) Evaluar el efecto de *P. pentosaceus* sobre la cantidad de lactobacilos y coliformes presentes en muestras fecales en el modelo experimental de colitis ulcerosa aguda.
- g) Evaluar el efecto anti-inflamatorio de *P. pentosaceus* sobre los niveles séricos de citocinas (TNF $\alpha$ , IL-6, IL-10 e IL-4) en el modelo de colitis ulcerosa experimental

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

Los animales utilizados en este estudio fueron ratones BALB/c macho de 8 semanas de edad comprados de Laboratorios Harlan México. Los ratones se dejaron adaptar al ambiente del bioterio por una semana, se mantuvieron en un ambiente controlado con un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad a  $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Los animales tenían comida y agua ad libitum. Los experimentos se realizaron siguiendo las especificaciones técnicas para el cuidado y uso de los animales de laboratorio de la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999.<sup>cxliiv</sup>

### Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

*Pediococcus pentosaceus* fue aislada y caracterizada de la leche materna de un lactante de 2 meses, fue cultivada anaeróticamente en caldo MRS (BD Difco) a  $37^{\circ}\text{C}$  por ocho horas en un fermentador (Applikon Bio con un controlador ADI 1010). La biomasa de la bacteria se obtuvo realizando ciclos de centrifugación del cultivo obtenido a  $4^{\circ}\text{C}$ , 5000g por 10 minutos (320-R Hettich Zentrifugen). La biomasa se mantuvo en solución salina al 0.89% y se re-suspendió en 10% de leche en polvo descremada y congelada en hielo seco para su posterior liofilización; el liofilizado se mantuvo a  $4^{\circ}\text{C}$  previo a su uso.

### Evaluación del efecto de *P. pentosaceus* administrado a diferentes dosis en ratones BALB/c sanos.

Para este estudio se necesitaron 25 ratones BALB/c los cuales se dividieron en 5 grupos: 1. Control, 2. *P. pentosaceus*  $1\times 10^4$ , *P. pentosaceus*  $1\times 10^6$ , *P. pentosaceus*  $1\times 10^8$  y *P. pentosaceus*  $1\times 10^{10}$ . Los animales de los grupos 2, 3, 4 y 5 fueron tratados diariamente por vía oral, durante 5 días con diferentes dosis de *Pediococcus pentosaceus* ( $1\times 10^4$ ,  $1\times 10^6$ ,  $1\times 10^8$  y  $1\times 10^{10}$  Unidades Formadoras de Colonias (UFC), durante el tratamiento se monitoreó el peso de los animales, la consistencia de las heces y/o presencia de hemorragia perianal; los animales se sacrificaron el sexto día, se midió la longitud del colon y se hicieron histologías con tinción H&E del colon.

## Caracterización del modelo de colitis ulcerosa aguda inducida con Dextrán Sulfato de Sodio en ratones

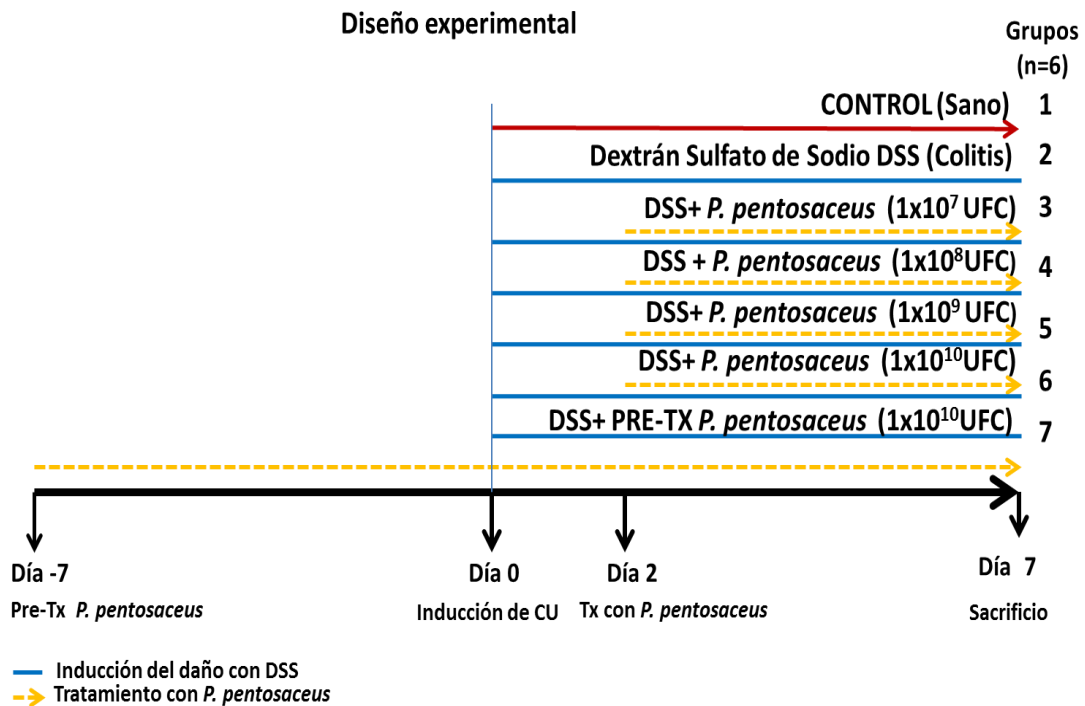
Para este estudio se utilizaron 24 ratones BALB/c macho con un peso aproximado de 20 a 22 g los cuales se dividieron en dos grupos, un grupo Control (n=3) y un grupo de animales a los que se les indujo la colitis ulcerosa (n=21). La colitis ulcerosa aguda fue inducida con 3.5% (p/v) de Dextrán sulfato de sodio DSS (PM de 40,000 Da, Sigma No. Cat. 42867) disuelto en el agua para beber de los animales y se les dio a libre acceso durante 7 días. El curso clínico de la colitis se controló diariamente mediante el índice de actividad de la enfermedad como lo describen Cooper y cols.<sup>cxiv</sup> el cual consiste de tres parámetros: pérdida de peso, consistencia de las heces, hemorragia perianal, el cual incluye los tres parámetros, así como una valoración numérica en donde se considera como un índice de 0 a animales saludables y un índice de 4 para la máxima actividad de colitis. El índice de actividad de la enfermedad (DAI) se determinó mediante la suma de las puntuaciones de: a) la pérdida de peso b) consistencia de las heces y c) el sangrado (dividido por 3). Cada puntuación se determinó como sigue, cambio en el peso (0: <1%, 1: 1-5%, 2: 5-10%,3:10-20% y 4:> 20%), la sangre en heces (0: negativo, 2: sangre oculta y o (4) hemorragias, y la consistencia de las heces (0: normal, 2: heces pastosas, 4: diarrea) como se describe en la tabla 5. Diariamente se sacrificaban tres animales del grupo de colitis, se obtuvieron muestras de intestino (región colon) se midieron y se almacenaron en una solución de formaldehído al 4% (Sigma No. Cat F8775), se realizaron cortes transversales del tejido almacenado aproximadamente de un centímetro los cuales se incluyeron en parafina.

Tabla 5. Cálculo del índice de actividad de la enfermedad (IAE).<sup>53</sup>

Índice	% de Pérdida de peso	Consistencia de las heces	Hemorragia perianal
0	Nada	Normal	Nada
1	1-5		
2	5-10	Heces pastosas	Sangrado oculto
3	10-20		
4	>20	Diarrea	Hemorragia grave

### **Efecto de *P. pentosaceus* a diferentes dosis sobre un modelo *in vivo* de colitis aguda.**

Para este estudio se utilizaron 42 ratones BALB/c macho con un peso aproximado de 20 a 22 g (edad 8 semanas), los cuales se dividieron en 7 grupos (n=6/cada uno). 1. Control sano; 2. DSS; 3. DSS+*P. pentosaceus*  $1 \times 10^7$ ; 4. DSS+*P. pentosaceus*  $1 \times 10^8$ ; 5. DSS+*P. pentosaceus*  $1 \times 10^9$ ; 6. DSS+*P. pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  y 7. DSS+Pre-*P. pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$ . La colitis aguda se indujo a los grupos 2, 3, 4, 5, 6 con dextrán sulfato de sodio (DSS) al 3.5% (p/v) en el agua para beber durante siete días, a partir del segundo día de la inducción de la colitis a los grupos (3, 4, 5 y 6) se les administró diariamente v.o *Pediococcus pentosaceus* a diferentes dosis  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC) hasta el séptimo día de la inducción de colitis; al grupo 7 se le administró diariamente v.o *P. pentosaceus* a una dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC siete días previos a la inducción de colitis y se siguió hasta el término del estudio como se muestra en la Fig. 1. Las bacterias liofilizadas se disolvieron en PBS y se administró diariamente un volumen de 100  $\mu$ l v.o al segundo día de la inducción de colitis ulcerosa con DSS, se evaluó el efecto de las diferentes dosis sobre el índice de la actividad de la enfermedad (IAE). Al cuarto día del inicio de la inducción de la colitis se obtuvieron muestras fecales de los animales y se almacenaron en microtubos estériles de 0.6  $\mu$ l posteriormente se cuantificó la cantidad de lactobacilos y coliformes totales. Después de la inducción de colitis (día 7) los animales se sacrificaron se obtuvo sangre del corazón por punción cardiaca con previa anestesia y se depositó en microtubos separadores de suero (BD Biosciences N.C 3659689). La sangre se centrifugó a 4°C, 12 000 g durante 15 min (modelo 5415 marca Eppendorf), el suero fue almacenado a -70 °C. Se tomaron muestras de intestino grueso, se almacenó una parte en una solución de formaldehído al 4%, se realizaron cortes transversales de la región del colon y se hizo la tinción H&E.



**Fig. 4** Esquema de tratamiento del estudio del efecto de *P. pentosaceus* sobre un modelo *in vivo* de colitis aguda.

### Identificación de la distribución de las proteínas de uniones estrechas (Claudina 2 y ocludina)

El método empleado para determinar la localización y expresión de las proteínas ocludina y claudina-2 fue por medio de Inmunohistoquímica indirecta, utilizando un sistema libre de biotina/peroxidasa/DAB (SLBP).<sup>cxlvi</sup>

De las muestras de hígado incluidas en parafina se realizaron cortes de 4 micras de grosor y fueron colocadas en láminas cargadas positivamente. Se realizó el proceso de desparafinado de las láminas con cortes en parafina, el cual consistió en poner las láminas en un horno a 60°C por 20 minutos, posteriormente fueron rehidratadas al pasar 5



minutos por Xilol absoluto (J.T. Baker), 30 segundos en xilol- alcohol absoluto (1:1 V/V (J.T. Baker)), 30 segundos en etanol absoluto (Fluka), 30 segundos en etanol al 80% y finalmente en agua destilada.

Terminado el proceso de rehidratación las muestras fueron sometidas al proceso de “recuperación del epítotope”, el cual es utilizado para dar una conformación estable a las proteínas de interés. Este proceso de recuperación del epítotope consistió en poner las laminillas con cortes histológicos en vasos de recubrimiento, los cuales contenían una solución de recuperación de antígeno (buffer de citrato de sodio para el caso de ocludina: 10mM citrato de sodio (Sigma), 0.01 mol/L 0.05% Tween-20 al 0.05% (Sigma), ajustado a pH 6). (E.D.T.A para el caso de claudina-2: 0.1M de E.D.T.A (Sigma), ajustado a pH 9). Los vasos de recubrimiento fueron colocados en autoclave y calentados por 20 minutos a 99°C, posteriormente los vasos de recubrimiento se dejaron enfriar por 20 minutos a temperatura ambiente.

Las laminillas se colocaron en un sistema de Inmunohistoquímica por capilaridad y se les agregó PBS-Tween. Se bloqueó la actividad de la peroxidasa endógena usando peróxido de hidrógeno (J.T. Baker) al 3% en metanol absoluto (J.T. Baker) por 5 minutos. Se lavó con agua destilada e inmediatamente se agregó el anticuerpo monoclonal de anti-occludina y anti-claudina 2 (dilución 1:25, 1:50 con PBS-T, respectivamente para cada proteína) en 1% BSA-PBS (Sigma) a las laminillas correspondientes y se dejó incubar por 40 minutos.

Terminada la incubación con anticuerpo primario se lavó con PBS y se agregó el anticuerpo secundario Mach 1 Mouse Probe Dropper Bottle (DB537) Biocare Medical con el cual se incubo por 30 minutos. Terminada la incubación con anticuerpo secundario se lavó con PBS-Twen. Enseguida se añadió el polímero Mach 1 Universal HRP- polymer dropper bottle (DB538) Biocare Medical, se dejó incubar por 20 minutos y se lavó con PBS-Twen. Posteriormente se agregó como cromógeno 0.5 mg/mL 3,3'-tetrahydrocloruro de diaminobenzidina (Sigma) e inmediatamente se pasó al microscopio para observar el cambio de coloración (entre 1 y 2 minutos aproximadamente).

Una vez que se observó el cambio de coloración se lavó la laminilla con PBS (Sigma) y se colocó en un recipiente con agua destilada. Las laminillas fueron contrastadas con hematoxilina y posteriormente montadas. El análisis se realizó mediante la observación de cinco secciones elegidas al azar por laminilla de tejido, a una

ampliación 20x y 40x en un microscopio óptico (modelo IX81, Olympus) se examinaron y fotografiaron las áreas o zonas con inmunorreactividad.

### **Permeabilidad intestinal de FITC- dextrano fluorescente (DX-4000-FITC) <sup>cxlvii</sup>**

Para este estudio se utilizaron 21 ratones BALB/c de un peso de 20-22g los cuales fueron divididos en tres grupos: 1. Control, DSS y DSS + *P. pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  (n=7): la colitis aguda fue inducida por la administración de DSS al 3.5% p/v en el agua para beber durante siete días. En el día 2 durante la inducción de la colitis a los animales del grupo DSS+ *P. pentosaceus* se les administró por v.o con ayuda de una cánula 100  $\mu$ l de una dosis de *P. pentosaceus* de  $1 \times 10^{10}$  UFC. En el séptimo día del estudio a los animales de cada grupo, se les mantuvo en ayuno durante 6 h se les administró Dextran- isotiocianato de fluoresceína (PM 4000 Da Sigma) por cánula intragástrica (500 mg / kg de peso corporal, 125 mg / ml). Después de 4 h, se sacrificaron a los animales y se obtuvo sangre del corazón, la sangre se depositó en microtubos separadores de suero (BD Biosciences N.C 3659689). La sangre se centrifugó a 4°C, 12 000 g durante 15 min (modelo 5415 marca Eppendorf). El suero se diluyó en un volumen igual de PBS (pH 7,4). La permeabilidad intestinal fue medida por la determinación de la intensidad de fluorescencia de FITC-dextran en el suero, se utilizó un espectofotómetro (modelo Victor X3 marca Perkin Elmer a una longitud de onda de 485 nm de excitación y 528 nm de emisión y se reportó en unidades arbitrarias de fluorescencia.

### **Determinación de niveles de citocinas Séricas TNF, IL-6, IL-10, IL-4**

Para la determinación de citocinas TNF, IL-6, IL-10 e IL-4 séricas se utilizó el kit ELISA tipo sándwich (Peprotech, Murine ELISA development kit) se llevó el procedimiento según las especificaciones de cada inserto de las diferentes citocinas evaluadas. Para este estudio se utilizó el suero de los animales que se obtuvieron al finalizar el diseño experimental.

### **Cuantificación de lactobacilos y coliformes de muestras fecales.**

Se obtuvieron muestras fecales de los animales al cuarto día del estudio se pesaron 10 mg de cada muestra y se homogenizaron en solución salina al 0.9% p/v. A continuación se hicieron diluciones seriadas 1:10 hasta 1:10<sup>8</sup>. Estas diluciones se cultivaron en medios específicos.

Para hacer el recuento de lactobacilos los contenidos fecales se cultivaron en agar MRS (Man Rogosa y Sharpe, Difco). Para el crecimiento de coliformes se empleó el medio BRV (Bilis Rojo Violeta). Se usaron placas Petri de 10 cm de diámetro en las que se vertió aproximadamente 15ml de medio de cultivo estéril. Las placas se inocularon con 200 ul de homogenado de heces en solución salina. En las placas de Petri se extendió el homogenado con una asa de cristal por toda la superficie del agar durante 15 segundos para asegurar una distribución homogénea. Los cultivos se inocularon a 37°C durante 24 horas después de su crecimiento se contó el número de colonias presentes. Los resultados se expresaron en Unidades Formadoras de Colonias (UFC) por mg de heces (media  $\pm$  desviación estándar).

### **Análisis estadístico**

Los datos se presentan como las medias  $\pm$  SEM de al menos tres experimentos independientes. Las comparaciones se realizaron mediante la prueba t de Student. Un valor de  $p < 0.05$  se consideró estadísticamente significativo. El análisis se realizó con el software GraphPad Prism (versión 16.0)

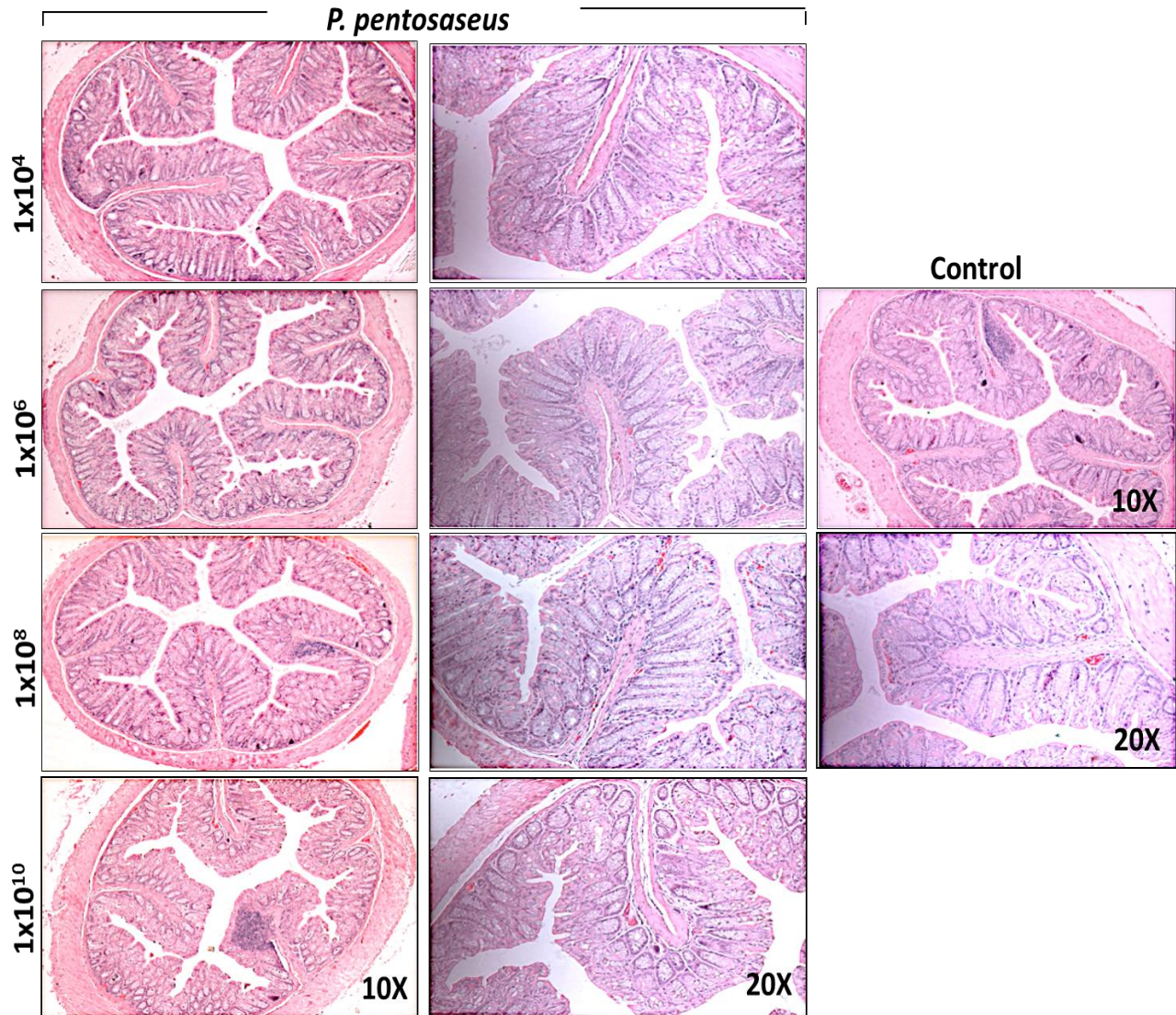
## **VIII. RESULTADOS**

Los ratones sanos tratados con diferentes dosis de *P. pentosaceus* ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^{10}$  UFC) no demostraron diferencias estadísticamente significativas en los parámetros evaluados (pérdida de peso, longitud del colon, cambios en la consistencia de las heces) comparado con el grupo control; Tabla 6. De igual manera el tratamiento con *P. pentosaceus* a diferentes dosis no mostró cambios en la arquitectura de las criptas de Lieberkühn, ni en las células caliciformes cuando se compararon con el grupo control (Fig. 5).

**Tabla 6. Efecto del tratamiento con *P. pentosaceus* a diferentes dosis sobre el peso, longitud del colon, consistencia de las heces y presencia de hemorragias en ratones BALB/c sanos.**

	<i>P. pentosaceus</i>				
	Control	1x10 <sup>4</sup>	1x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>8</sup>	1x10 <sup>10</sup>
<b>Peso (g)</b>	23.86 ± 0.79	23.44 ± 0.76	23.26 ± 1.14	22.92 ± 1.18	22.12 ± 0.97
<b>Longitud del colon (cm)</b>	11.28 ± 1.14	10.02 ± 0.45	10.04 ± 0.30	10.48 ± 0.30	10.36 ± 0.69
<b>Consistencia de las heces</b>	0	0	0	0	0
<b>Presencia de hemorragias</b>	0	0	0	0	0

*El peso y la longitud del colon son expresados como la media ± Error Estándar de la media; los datos de la consistencia y presencia de hemorragias en las heces son expresados como un puntaje (0-4). \* Indica una diferencia significativa comparada con el grupo control (p<0.05) (n=6).*



**Fig. 5 Efecto del tratamiento con *P. pentosaceus* a diferentes dosis sobre la morfología histológica de colon de ratones BALB/c.**

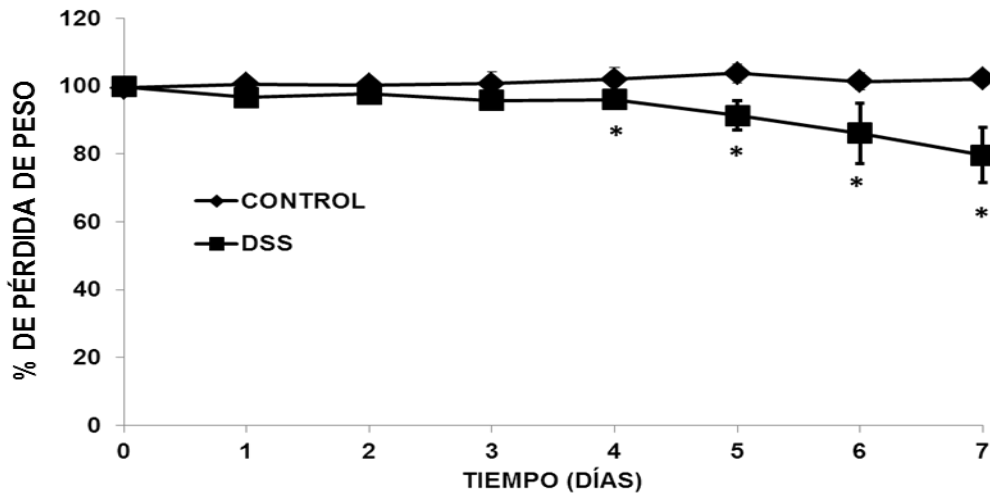
Fotomicrografía representativa del colon distal teñido con Hematoxilina y Eosina de un ratón de cada grupo: Control y los grupos tratados durante cinco días con *P. pentosaceus* a diferentes dosis:  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs (aumento: 10x y 20x).

## **Caracterización del modelo de colitis ulcerosa inducida con Dextrán Sulfato de Sodio (DSS)**

Un modelo experimental de colitis ulcerosa debe de mimetizar a la enfermedad de los humanos, además debe ser sencillo para inducir, no caro y ampliamente reproducible, debido a esto, nosotros escogimos el modelo de colitis ulcerosa inducida con Dextrán sulfato de Sodio. Este modelo se ha distinguido como un buen modelo de colitis experimental por su similitud en la etiología, patología y patogénesis de la colitis en humanos. Además la inducción es sencilla y se puede desarrollar una colitis aguda, crónica o carcinogénesis únicamente con un cambio de la concentración de DSS. Así mismo, puede ser reproducida en ratones, ratas hámster y cobayos. Para la inducción de colitis ulcerosa aguda se ha demostrado en varios estudios que se necesita entre 2-5% (p/v) de DSS durante 4-9 días.<sup>cxlviii</sup>

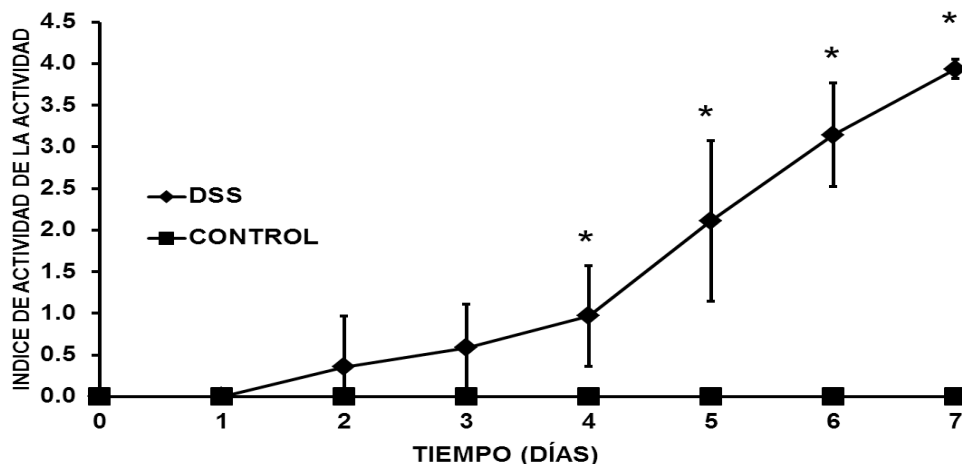
Para la inducción de colitis ulcerosa aguda en ratones Balb/c utilizamos 3.5% de DSS (p/v) durante 7 días. Las principales manifestaciones clínicas de la colitis ulcerosa en ratones son: pérdida de peso, diarrea con o sin moco y hemorragias.<sup>cxlix-cl</sup>

Estas manifestaciones se pudieron observar en los ratones Balb/c administrados con 3.5% (p/v) de DSS durante el transcurso de daño. En la Fig. 6 se observa el efecto de la exposición con Dextrán Sulfato de Sodio (DSS) sobre el peso de ratones Balb/c. Se puede observar que en los animales tratados con DSS presentaron una pérdida de peso estadísticamente significativa del 4.2% a partir del cuarto día de la exposición con DSS comparada con el grupo control ( $p < 0.05$ ). Este efecto se incrementó durante el transcurso de la exposición con DSS alcanzando una pérdida de peso del 22.51% al último día del estudio (día 7).



**Fig. 6** Efecto de la administración de 3.5% (p/v) de DSS sobre el porcentaje de pérdida de peso en ratones BALB/c. n= 21 al inicio del estudio n=3 al final del estudio. \*p<0.05 al compararse con el grupo control.

Para evaluar el grado de colitis ulcerosa en los animales se obtuvo el índice de la actividad de la enfermedad como lo describe Cooper y colaboradores.<sup>53</sup> Para ello se evaluaron tres características presentes en los animales: porcentaje de pérdida de peso, consistencia de las heces y presencia de hemorragias. En la Fig. 7 se puede observar el grado de colitis producido por la exposición con DSS en ratones Balb/c durante un periodo de siete días, en donde se considera como un índice de 0 a animales saludables y un índice de 4 para la máxima actividad de colitis, se puede notar en la gráfica que los animales empezaron a desarrollar los síntomas de colitis a partir del cuarto día de exposición con DSS con un índice de actividad mayor a 0.5, sin embargo alcanzó la máxima actividad de colitis al séptimo día con un índice de actividad de 4, con todo lo anterior, el inicio de las manifestaciones de la colitis ulcerosa se pudo corroborar con el estudio realizado por Britta S y cols. quienes también indujeron la colitis ulcerosa con la administración de 3.5 % de DSS en ratones BALB/c.<sup>ci</sup>



**Fig. 7 Efecto de la administración de 3.5% (p/v) de DSS en ratones BALB/c sobre el índice de la actividad de la enfermedad. Se considera como un índice de 0 a animales saludables y un índice de 4 para la máxima actividad de colitis. \*p<0.05 al compararse con el grupo control.**

Los cambios histológicos del tejido de colón en los modelos de colitis ulcerosa aguda inducida con DSS se caracterizan por una inflamación superficial, principalmente afectando la mucosa pero puede extenderse a la submucosa y la muscularis de la mucosa. Además existe una pérdida de las células caliciformes, distorsión de las criptas y abscesos, también es acompañado de una infiltración de células inflamatorias en la mucosa y submucosa con neutrófilos, macrófagos y células de plasma. Las características histológicas iniciales son pérdida de las criptas, seguido del acortamiento de las mismas, ocurriendo alrededor del día 2 o 3 de la exposición con DSS. <sup>clii</sup>

#### **Evaluación del efecto de *P. pentosaceus* administrado a diferentes dosis en un modelo *in vivo* de colitis aguda**

Para este estudio se decidió evaluar el efecto del tratamiento de *P. pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs). Para ello se administró el DSS a partir del día cero y *P. pentosaceus* a partir del día 2. A los ratones expuestos a Dextran sulfato de sodio desarrollaron los síntomas de una colitis aguda con presencia de diarrea, sangrado rectal, debilitamiento y pérdida de peso. A partir del cuarto día de la inducción del daño con DSS todos los grupos demostraron un incremento significativo en el índice de la actividad de la enfermedad comparado con el grupo control sano ( $p < 0.05$ ) (Fig 8). Los resultados indicaron que no hubo una diferencia significativa en el IAE en el



grupo de DSS+ *P. pentosaceus*  $1 \times 10^7$ . Sin embargo, se observa que en los grupos DSS+*P.pentosaceus*  $1 \times 10^8$  y DSS+*P.pentosaceus*  $1 \times 10^9$  solo presentaron un menor índice de la actividad de la enfermedad en los días 5 y 6 del estudio comparado con en el grupo DSS ( $p < 0.05$ ). Con lo que respecta a el índice de actividad de la enfermedad en los grupos de DSS+*P.pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  y DSS+ PRE TX *P.pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  fue significativamente menor comparado con el grupo DSS ( $1.94 \pm 0.93$  vs  $3.54 \pm 0.61$ ,  $p < 0.05$ ) a partir del sexto día del estudio.

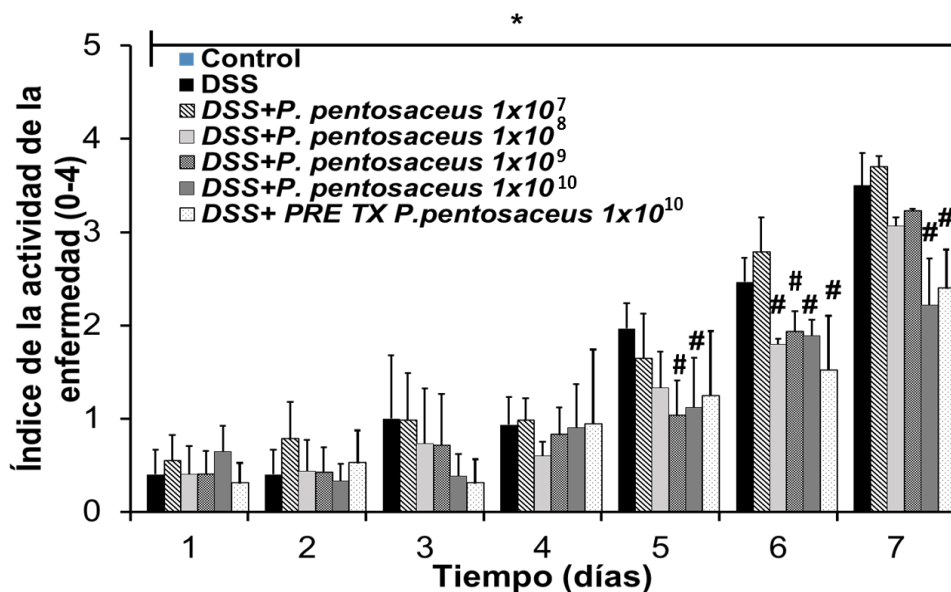


Fig. 8 Efecto de *P. pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre el índice de la actividad de la enfermedad en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c; el tratamiento con *P. pentosaceus* fue administrado al segundo día de la inducción de la colitis con DSS. Los datos son expresados con la media  $\pm$  error estándar de la media. \* ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo control; # ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo DSS. (n=6).

Esta disminución en el IAE fue debido a una reducción en el índice de diarreas en el grupo de DSS+ *P. pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  comparado con el grupo DSS ( $1.53 \pm 0.35$  vs. 3.73),  $p < 0.05$ ; Fig. 9 y una disminución en el índice de sangrado fecal empezando a partir del quinto día del estudio comparando con el grupo DSS ( $1.25 \pm 0.39$  vs 3.85; Fig. 10 Sin embargo, se observó una menor pérdida de peso con un 34.1% menor de índice de peso en el grupo de DSS+Pre Tx *P.pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  comparado con el grupo DSS ( $p < 0.05$ ); Fig. 11.

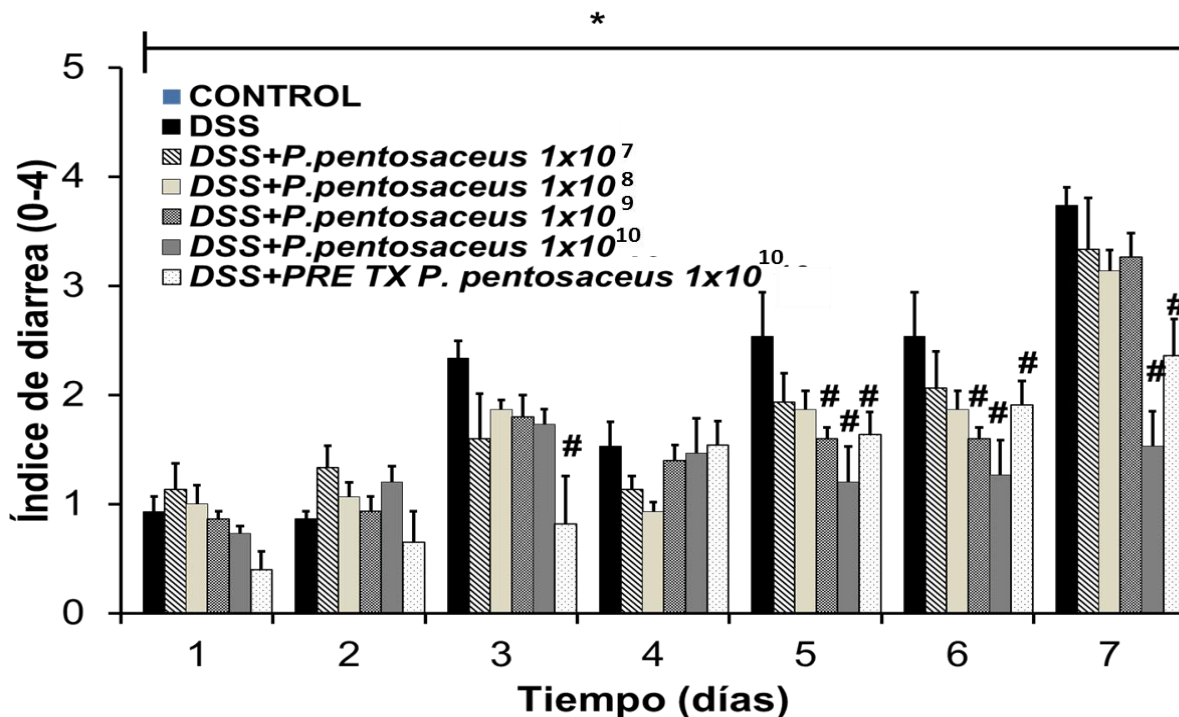


Fig 9. Efecto de *P. pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre el índice de diarreas en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c; el tratamiento con *P. pentosaceus* fue administrado al segundo día de la inducción de la colitis con DSS. Los datos son expresados con la media  $\pm$  error estándar de la media. \* ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo control; # ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo DSS. (n=6).

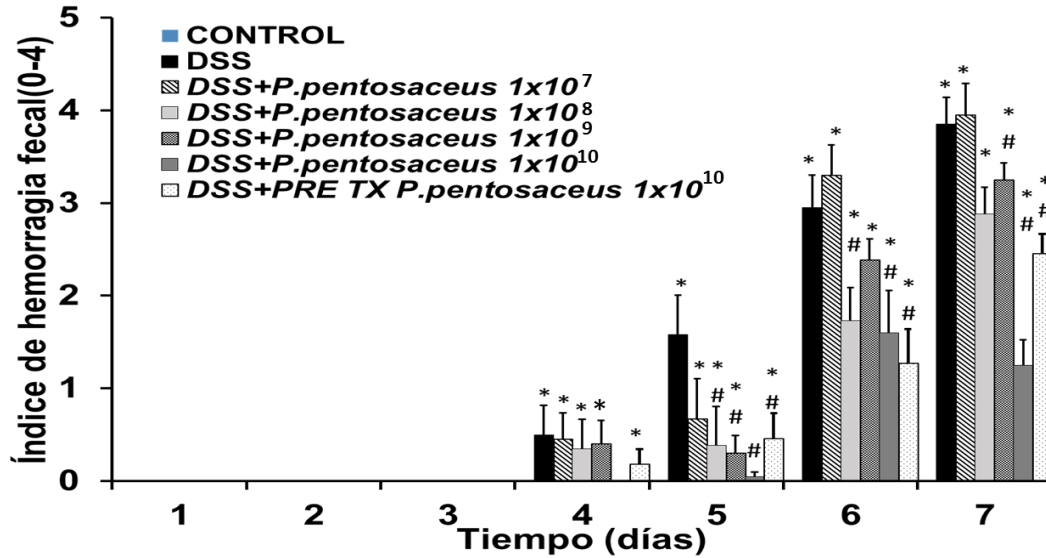


Fig. 10 Efecto de *P. pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre el índice de hemorragia fecal en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c; el tratamiento con *P. pentosaceus* fue administrado al segundo día de la inducción de la colitis con DSS. Los datos son expresados con la media  $\pm$  error estándar de la media. \* ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo control; # ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo DSS. (n=6).

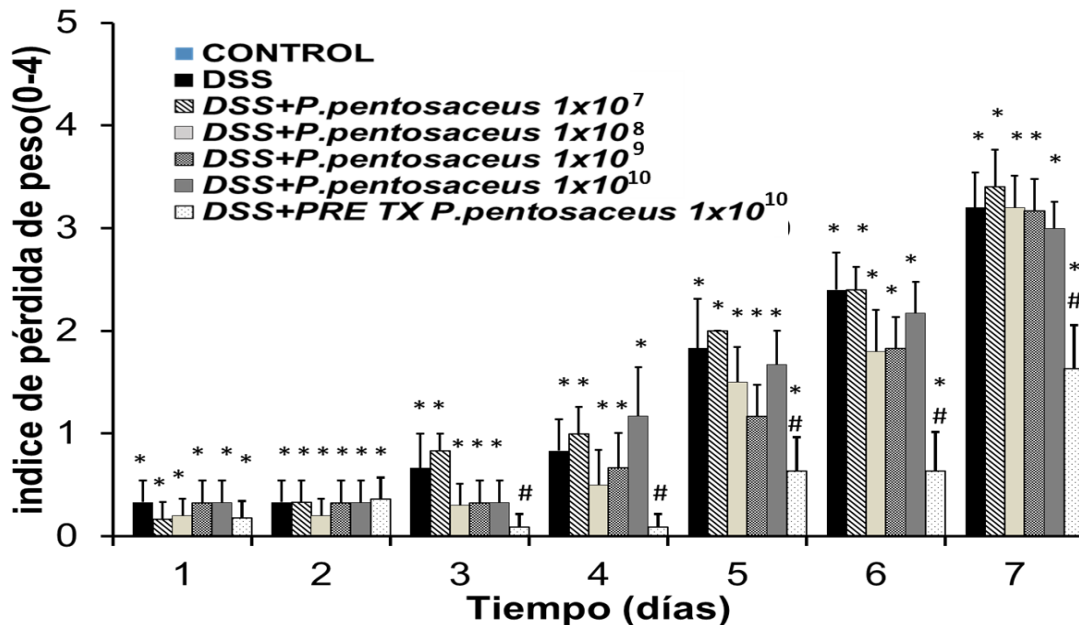


Fig 11. Efecto de *P. pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre el índice de pérdida de peso en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c; el tratamiento con *P. pentosaceus* fue administrado al segundo día de la inducción de la colitis con DSS. Los datos son expresados con la media  $\pm$  error estándar de la media. \* ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo control; # ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo DSS. (n=6).

El modelo de colitis inducido con DSS está caracterizado también con una disminución de la longitud del colon en los animales dañados <sup>22</sup>. Todos los grupos demostraron una reducción de la longitud del colon durante con la inducción del daño con DSS comparado con el grupo control ( $p < 0.05$ ). Sin embargo el grupo de DSS+*P. pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  y el grupo DSS+ PRE Tx *P. pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  presentaron un 21.33% y 13.53 % respectivamente menor de acortamiento comparado con el grupo de DSS. ( $8.81 \pm 0.38$  y  $8.27 \pm 0.26$  cm vs  $7.26 \pm 0.28$  cm,  $p < 0.05$ ; Fig. 12)

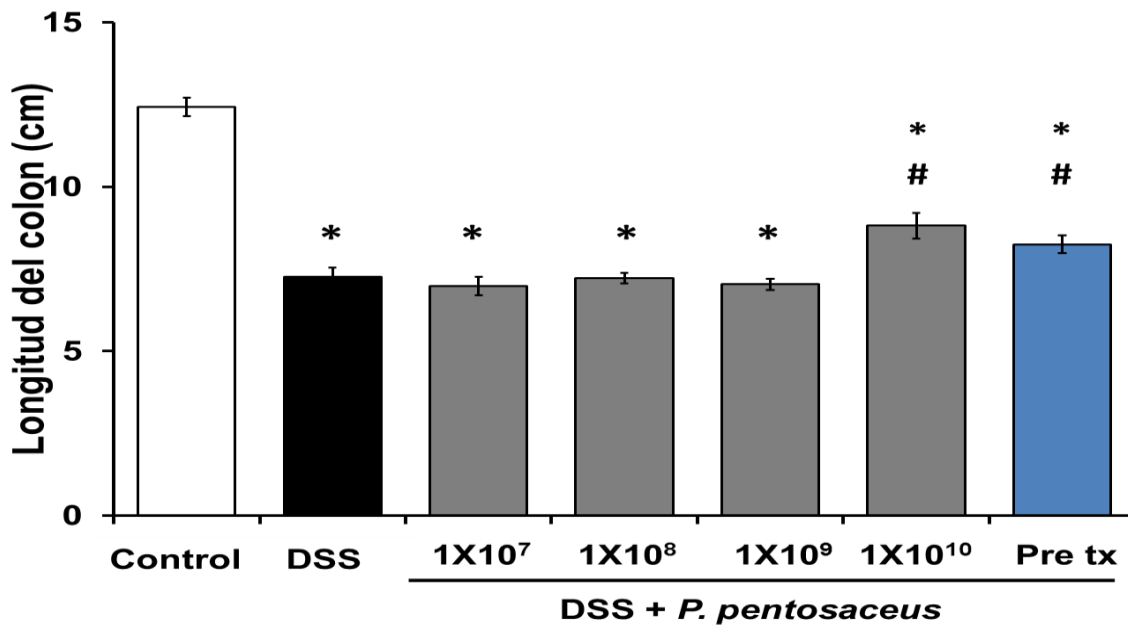


Fig. 12 Efecto de *P. pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre la longitud del colon en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c; el tratamiento con *P. pentosaceus* fue administrado al segundo día de la inducción de la colitis con DSS. Los datos son expresados con la media  $\pm$  error estándar de la media. \* ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo control; # ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo DSS. (n=6).

### **Efecto de *P. pentosaceus* sobre la estructura microscópica del colon en un modelo de colitis**

Una vez que observamos que el tratamiento con *P. pentosaceus* retrasó algunos de los síntomas de la colitis ulcerosa, nosotros nos preguntamos si también afecta la morforlogía microscópica del colon (Fig. 13). Los ratones en el grupo control mostraron una disposición ordenada y normal de la estructura celular del tejido colónico, sin perturbaciones en el número de células caliciformes ni en la integridad de la mucosa. En contraste, el grupo DSS presentó cambios histológicos en el tejido del colon, mostrando una inflamación superficial que afecta principalmente a la mucosa, así como una pérdida de células caliciformes; distorsión de las criptas seguido de un acortamiento de las mismas e infiltración de células inflamatorias en la mucosa y submucosa. *P. pentosaceus* a las dosis  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs demostró una pérdida de la arquitectura de las criptas y de las células caliciformes en la mucosa acompañado por un infiltrado celular, sin embargo, en comparación con el grupo DSS, el tratamiento a las dosis mencionadas se observó que el daño únicamente se extendió al área de la mucosa y muscularis mucosae, observándose un menor tamaño de espesor de la capa submucosa.

*P. pentosaceus*

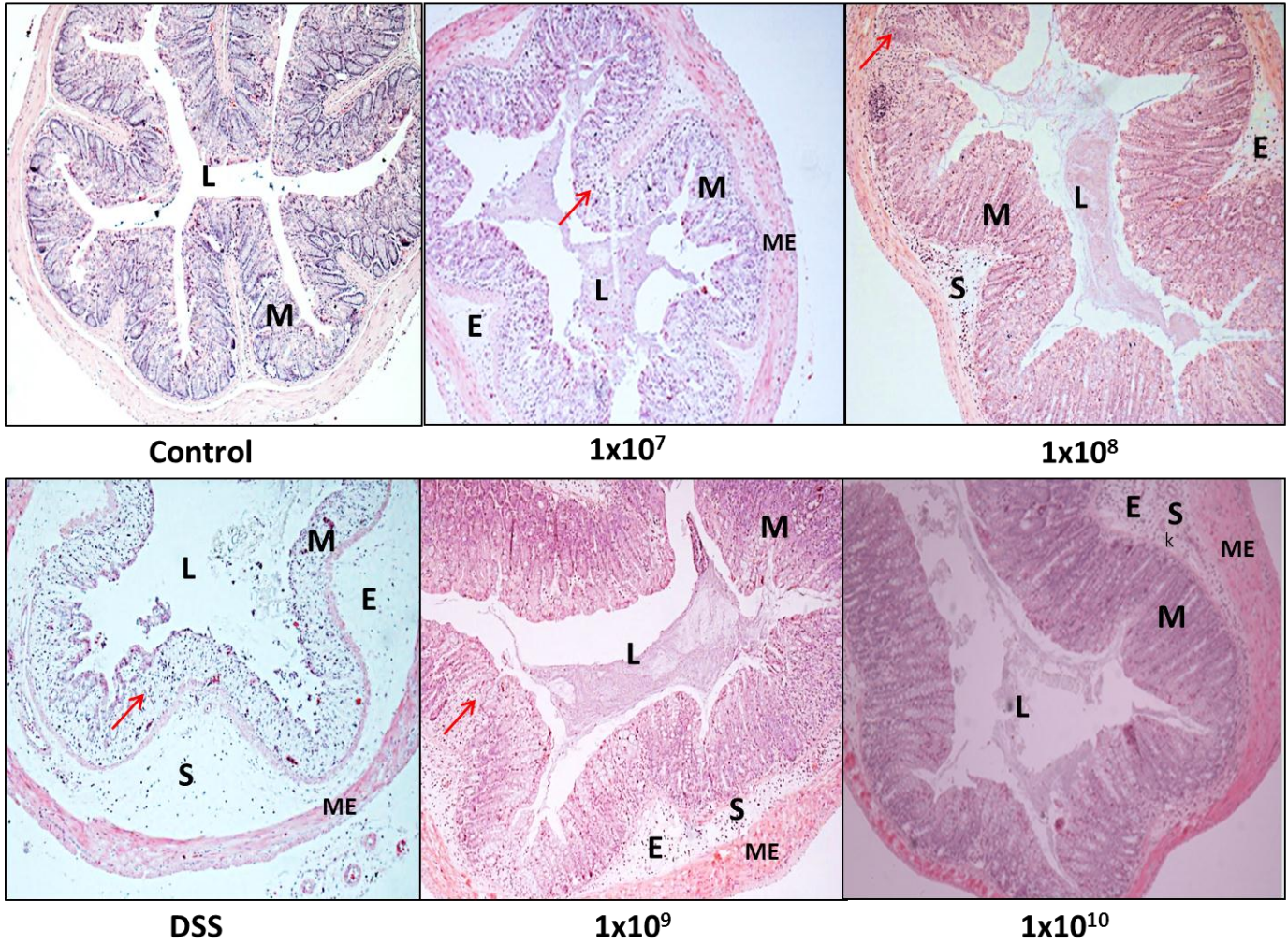
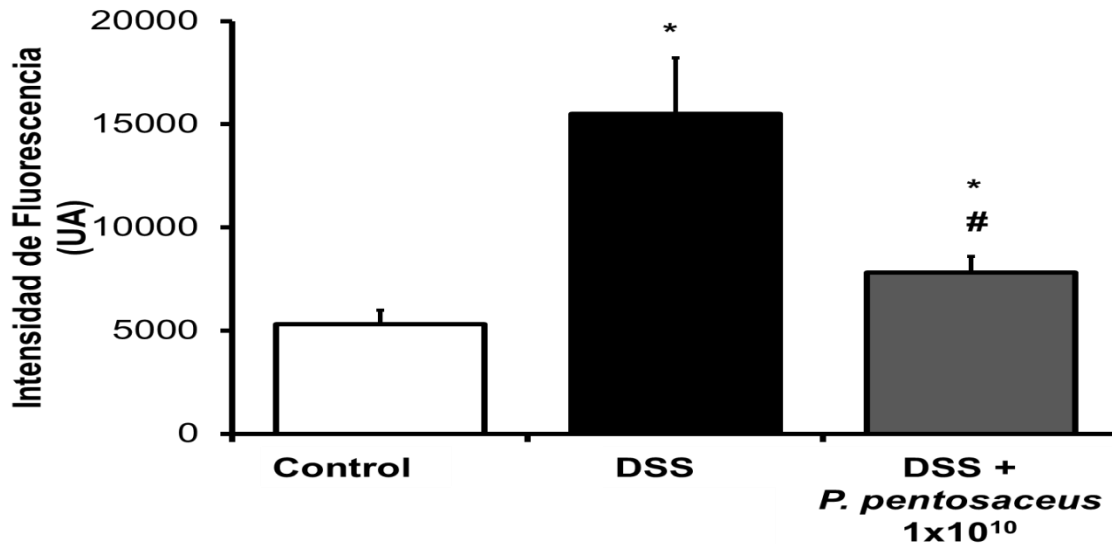


Fig. 13 Efecto de diferentes dosis de *P. pentosaceus* ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre la morfología microscópica del colon de ratones BALB/c con colitis inducida con DSS. El tratamiento con *P. pentosaceus* fue administrado en el segundo día de la inducción de la colitis. M. Capa Mucosa. ME. Capa muscular externa; L. Lumen; S. Submucosa; E. Edema; Flecha roja: pérdida de la arquitectura de las Criptas de Lieberkühn. (Aumento 10x)

### **Efecto de *P. pentosaceus* sobre la permeabilidad intestinal al FITC-dextran**

Nosotros analizamos la permeabilidad intestinal a FITC-dextran, dextrán marcado con fluoresceína, en ratones con colitis y a los cuales fueron tratados con *P. pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC. El grupo de DSS demostró un incremento en los niveles de FITC-dextran en plasma 4 horas después de la administración de FITC-dextran comparado con el grupo control, lo que nos indica la disrupción de la barrera intestinal inducida por el DSS. Se puede observar que los niveles en suero de FITC-dextran en el grupo de DSS+ *P. pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  fueron 50.37% menores comparado con el grupo DSS ( $p < 0.05$ ) (Fig. 14). Por lo tanto, *P. pentosaceus* a esta dosis disminuyó la permeabilidad intestinal causada por DSS.



**Fig. 14. Efecto de *P. pentosaceus* (dosis  $1 \times 10^{10}$  UFC) sobre la permeabilidad intestinal en la colitis inducida con DSS en Ratones BALB/c. Los niveles de intensidad de fluorescencia en suero del dextrán- isotiocianato de fluoresceína (FD-4) fueron medidos 4 horas después de la administración oral de FD-4 en los animales de cada grupo. Los datos son expresados con la media  $\pm$  error estándar de la media. \* ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo control; # ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo DSS. (n=7).**

### **Efecto de *P. pentosaceus* sobre la expresión y distribución de las proteínas de uniones estrechas (occludina y Claudina-2) en un modelo *in vivo* de colitis aguda**

Las proteínas de uniones estrechas, las principales barreras físicas contra una gran variedad de patógenos, actúan como un mecanismo principal para regular la permeabilidad paracelular y mantener la homeostasis en el tracto gastrointestinal. En este estudio nosotros observamos el efecto de *P. pentosaceus* sobre la distribución de las uniones estrechas Claudina 2 y Ocludina por medio de inmunohistoquímica. En la Fig.15 se observa la distribución las proteínas Ocludina (a) y Claudina-2 (b) en muestras de histológicas de colon. La Ocludina en el grupo control fue apropiadamente localizada en la región apical tanto en la superficie como en las criptas entre el contacto célula-célula, consistente con su distribución normal. En el colon de ratones del grupo DSS, se observó una pérdida de su distribución, que se caracterizó por discontinuidades en la tinción y una reducción de la intensidad de la tinción, que en algunos lugares condujo a una pérdida completa de la tinción. Interesantemente, simultáneamente con la administración de *P. pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  se observó una menor pérdida de la distribución de Ocludina, además se puede notar una mayor intensidad de tinción en la región apical de la mucosa intestinal comparada con el grupo de DSS.

Con lo que respecta a la proteína de unión estrecha Claudina-2, la cual es una de las 27 claudinas que regulan la función de barrera, forma un canal paracelular para pequeños cationes y agua. En enfermedades como colitis ulcerosa se ha demostrado una sobreexpresión en el colon que contribuye a la diarrea a través de un mecanismo de flujo de fuga. Debido a su importancia en la colitis ulcerosa nosotros decidimos investigar el efecto de *P. pentosaceus* sobre la distribución y organización de esta proteína. Se puede observar en el grupo de DSS que hubo un incremento de la distribución de Claudina-2 que se aprecia desde la zona basolateral a la zona apical de la mucosa intestinal Figura b, sin embargo el tratamiento con *P. pentosaceus* ayudó a prevenir la distribución de Claudina-2 en las histologías de colon, observándose zonas con una menor tinción.



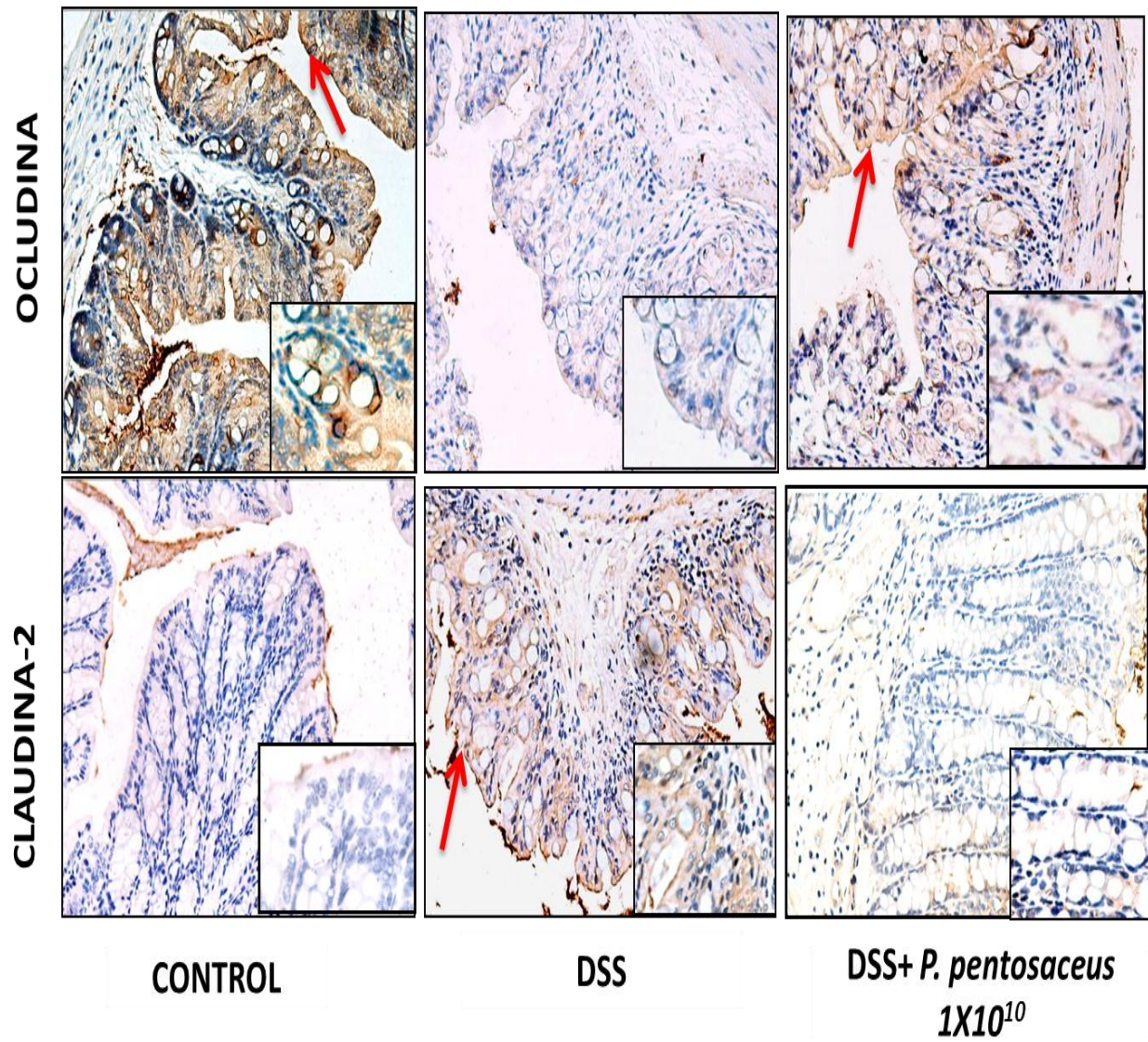


Fig. 15 Efecto de *P. pentosaceus* sobre la inmunohistoquímica de las proteínas ocludina y claudina-2 en un modelo *in vivo* de colitis aguda. Las imágenes son representativas de 4 animales de cada grupo. Amplificación 20x y 40x.

### **Efecto de *P. pentosaceus* sobre los niveles séricos de citocinas TNF, IL-6, IL-4 e IL-10, en un modelo *in vivo* de colitis aguda.**

Las citocinas son los principales mediadores de la respuesta innata y adaptativa inmune en la inflamación de la mucosa. El modelo de colitis inducida con DSS es un modelo bien establecido de inflamación de las mucosas que se ha utilizado por dos décadas para el estudio de la colitis ulcerosa; se ha demostrado en este modelo de colitis aguda inducida con DSS un perfil citotóxico y quimiotáctico con niveles elevados de las citocinas IL-6 y TNF. En el presente estudio, como era de esperarse los niveles de estas citocinas en suero fueron significativamente altos en el grupo de DSS comparadas con el grupo control. Nosotros encontramos en el grupo DSS un incremento de los niveles de TNF de unas 2.48 veces comparado con el grupo control ( $p < 0.05$ ). En los animales con colitis que fueron tratados con *P. pentosaceus* a las dosis de  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  se observó una reducción de los niveles séricos de TNF un 57%, 48%, 29% y 18% respectivamente, comparado con el grupo de DSS ( $p < 0.05$ ), de igual manera el tratamiento preventivo con *P. pentosaceus* dosis  $1 \times 10^{10}$  demostró una reducción de un 40% comparado con el grupo DSS ( $p < 0.05$ ) (Fig. 16).

La citocina IL-6 es una de las citocinas centrales en la Colitis ulcerosa que contribuye al aumento de la supervivencia y a la resistencia de apoptosis en la lámina propia en el sitio inflamado, también contribuye a que las células T CD4 pueden acumularse en la lámina propia llevando a la perpetuación de la inflamación. Debido a su importancia en la colitis ulcerosa se utilizó como un parámetro para evaluar el proceso inflamatorio; se observó en este estudio que los niveles séricos de IL-6 se incrementaron 1.76 veces en el grupo de DSS comparado con el grupo control ( $p < 0.05$ ). El efecto antiinflamatorio ejercido con el tratamiento a las diferentes dosis se asoció con un descenso de un 57.5%, 58.2%, 55.5% y 60.8% respectivamente ( $p < 0.05$  vs. DSS Fig.17 ) y en el grupo DSS+ pre-tratamiento con *P. pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  la disminución de los niveles de IL-6 alcanzó un 64.9% con respecto al grupo DSS ( $p < 0.05$ ).

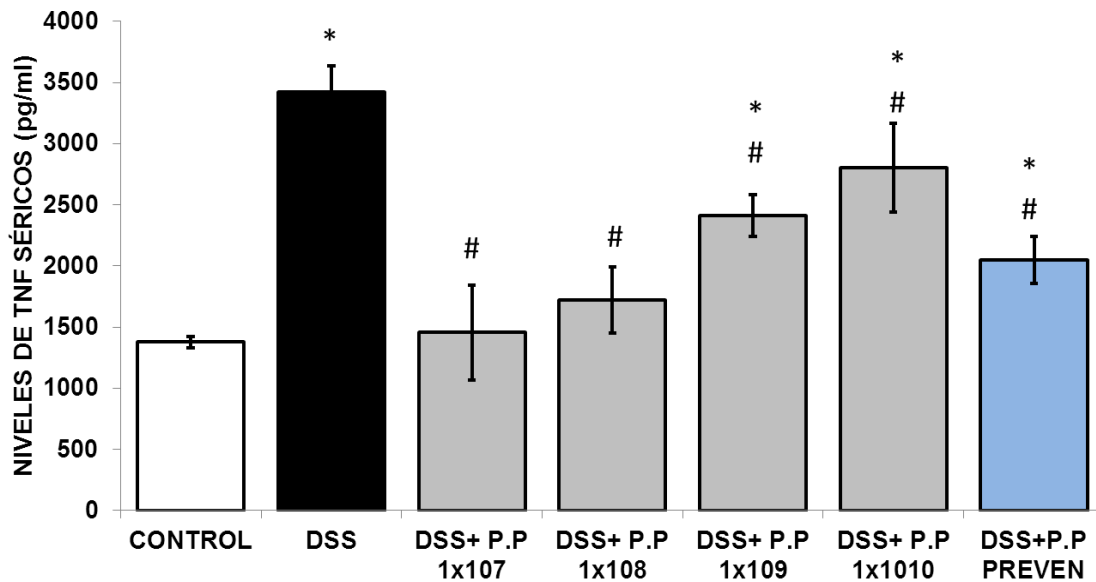


Fig 16. Efecto de *P. pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre los niveles de TNF séricos en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c; el tratamiento con *P. pentosaceus* fue administrado al segundo día de la inducción de la colitis con DSS. Los datos son expresados con la media  $\pm$  error estándar de la media. \* ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo control; # ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo DSS. (n=6).

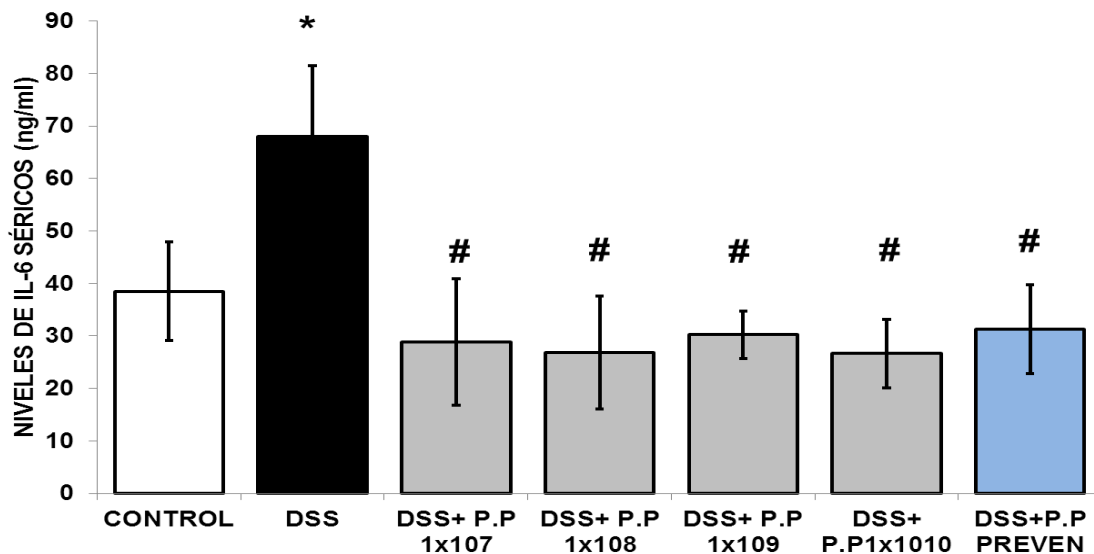
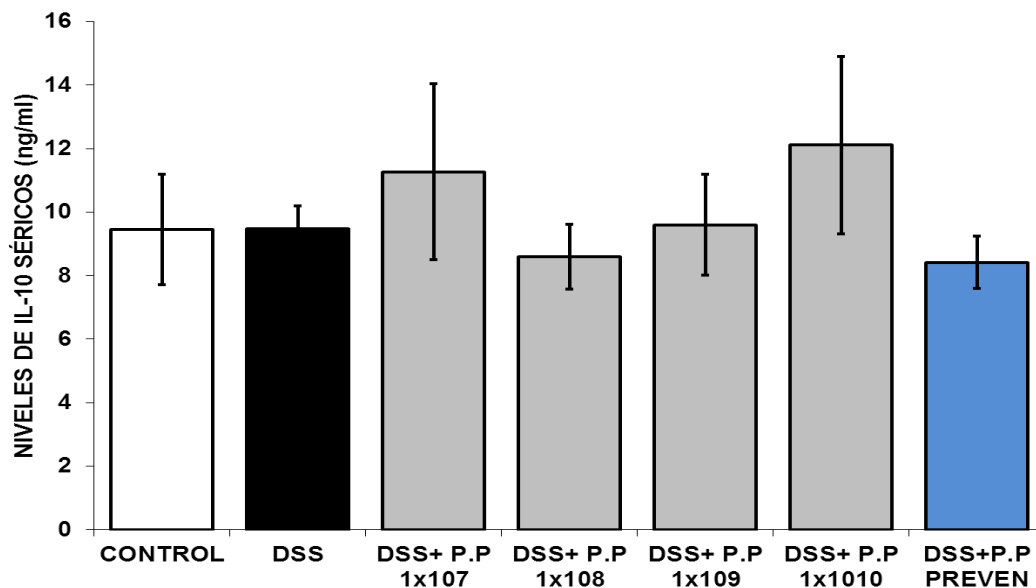
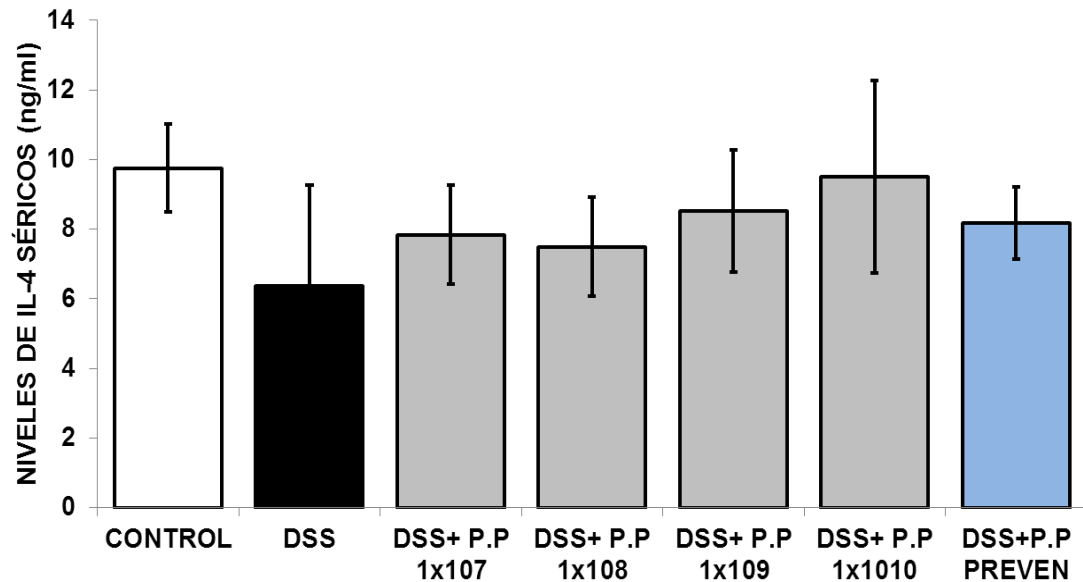


Fig 17. Efecto de *P. pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  and  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre los niveles de IL-6 séricos en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c; el tratamiento con *P. pentosaceus* fue administrado al segundo día de la inducción de la colitis con DSS. Los datos son expresados con la media  $\pm$  error estándar de la media. \* ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo control; # ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo DSS. (n=6).

A pesar de los mecanismos pro-inflamatorios observados en la colitis ulcerosa, existen mecanismos compensatorios como es el caso de los ejercidos por la citocina IL-10. Ésta es una citocina regulatoria la cual inhibe tanto la presentación de antígenos y la subsecuente liberación de citocinas proinflamatorias por lo que se ha propuesto como una terapia biológica antiinflamatoria en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal crónica. Se ha demostrado la función inmunomoduladora de algunas bacterias con potencial probiótico que se caracterizan inducir la producción de IL-10 en modelos *in vitro* e *in vivo*. Es por ello que nos preguntamos si el tratamiento y pre-tratamiento con *P.pentosaceus* es capaz de modificar los niveles séricos en un modelo de colitis aguda. De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que los niveles séricos de IL-10 e IL-4 no se vieron modificados en el grupo de DSS comparado con el grupo control, de igual manera el tratamiento con *P. pentosaceus* a las diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$ ) y el pre-tratamiento no mostraron un cambio en los niveles de esta citocina anti-inflamatoria (Fig.18) y (Fig. 19).



**Fig. 18 Efecto de *P. pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre los niveles de IL-10 séricos en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c; el tratamiento con *P. pentosaceus* fue administrado al segundo día de la inducción de la colitis con DSS. Los datos son expresados con la media  $\pm$  error estándar de la media. \* ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo control; # ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo DSS. (n=6).**



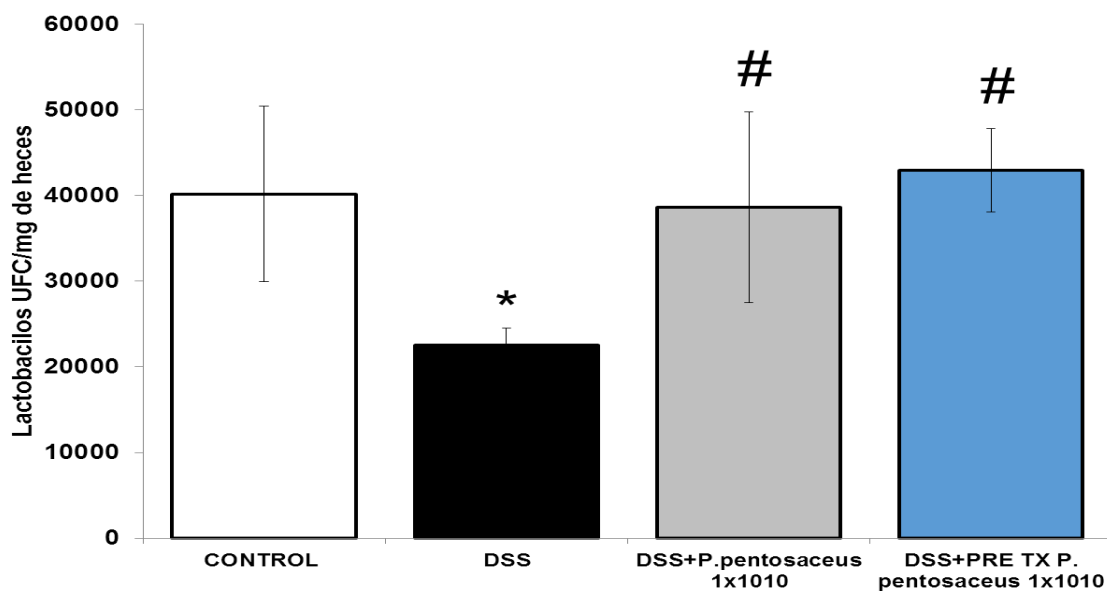
**Fig 19. Efecto de *P. pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre los niveles de IL-4 séricos en la colitis inducida con DSS en ratones BALB/c; el tratamiento con *P. pentosaceus* fue administrado al segundo día de la inducción de la colitis con DSS. Los datos son expresados con la media  $\pm$  error estándar de la media. \* ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo control; # ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo DSS. (n=6).**

### **Modulación de la microbiota intestinal**

Una vez comprobado el efecto benéfico del tratamiento y pre tratamiento de *P. pentosaceus* en la sintomatología de la colitis ulcerosa así como en la disminución de la permeabilidad intestinal nos planteamos estudiar si la administración de *P. pentosaceus* podía tener como resultado una modulación en la microbiota presente en el intestino de los animales con colitis aguda inducida con DSS. En este sentido, lactobacilos y coliformes son dos géneros de bacterias que se ven modificados en pacientes con colitis ulcerosa y en modelos *in vivo*. Para estudiar su presencia en el ambiente luminal intestinal se sembraron diluciones de contenidos fecales en medios de cultivo específicos para el crecimiento de lactobacilos y coliformes.

Así, el recuento de colonias en estos medios de cultivo específicos sembrados con muestras obtenidas de ratones del grupo Control, pone en manifiesto una mayor presencia de lactobacilos que en los animales del grupo de DSS (Fig.20).

En el grupo DSS+PRE TX *P. pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  no se alteraron los niveles de lactobacilos a pesar de que de indujo la colitis con DSS, este mismo comportamiento se observa en el grupo DSS+*P. pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  comparado con el grupo control. Sin embargo en este último grupo se observa una mayor presencia de lactobacilos estadísticamente significativa comparada con el grupo DSS ( $p < 0.05$ ).



**Fig 20.** Efecto de pre-tratamiento y el tratamiento de *P. pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre los cantidad de lactobacilos en muestras fecales de ratones BALB/c con colitis inducida con DSS; El pre-tratamiento con *P. pentosaceus* fue administrado 7 días antes y durante la inducción de la colitis, el tratamiento con *P. pentosaceus* fue administrado al segundo día de la inducción de la colitis con DSS. Los datos son expresados con la media  $\pm$  error estándar de la media. \* ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo control; # ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo DSS. (n=6).

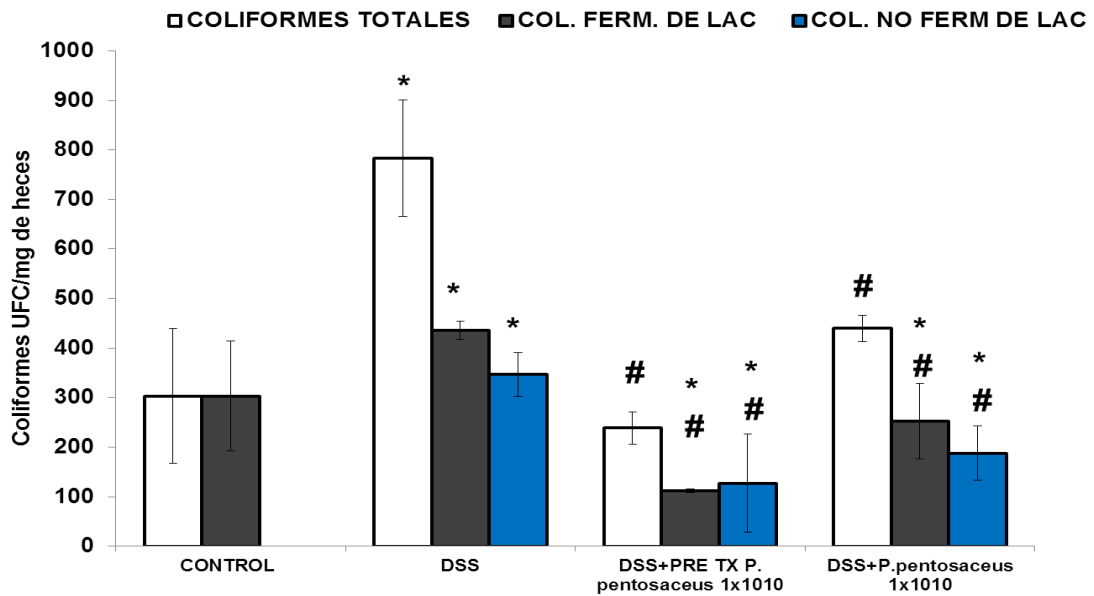


Fig 21. Efecto de pre-tratamiento y el tratamiento de *P. pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFCs) sobre los cantidad de coliformes en muestras fecales de ratones BALB/c con colitis inducida con DSS; El pre-tratamiento con *P. pentosaceus* fue administrado 7 días antes y durante la inducción de la colitis, el tratamiento con *P. pentosaceus* fue administrado al segundo día de la inducción de la colitis con DSS. Los datos son expresados con la media  $\pm$  error estándar de la media. \* ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo control; # ( $p < 0.05$ ) al compararse con el grupo DSS. (n=6).

#### XIV. DISCUSIÓN

En este estudio evaluamos el efecto de una especie bacteriana como un candidato potencial a usarse como probiótico para reducir la severidad de la colitis inducida con DSS, en un modelo con ratones.

Los principales síntomas de la colitis inducida con DSS son la diarrea, sangrado rectal y pérdida de peso. La inflamación también implica lesiones graves a lo largo de la mucosa, alteración de la estructura epitelial, extensa infiltración de neutrófilos y linfocitos en la mucosa y submucosa y la pérdida de criptas.

Los probióticos han demostrado tener efectos terapéuticos y profilácticos en varios modelos experimentales de colitis.<sup>cliii,clivyclv</sup> De acuerdo a estos estudios, la administración de bacterias probióticas pueden mejorar la sintomatología y patología en animales; las especies más frecuentemente utilizadas son *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*. Las mezclas de especies bacterianas, como el probiótico VSL# 3, han también sido utilizadas con el mismo propósito.<sup>clvi</sup> A pesar de que no se ha asociado directamente a un microorganismo específico con la colitis ulcerosa, se ha encontrado una disbiosis en pacientes y en modelos *in vivo* con colitis. Específicamente, estudios en pacientes han demostrado un decremento en los géneros de *Lactobacillus* y *Pediococcus*.<sup>clvii</sup>

El efecto probiótico de ciertas cepas de *P. pentosaceus* ha demostrado efectos inmunomodulatorios.<sup>clviii,clixyclx</sup> Sin embargo estos no han sido evaluados en el modelo de colitis aguda inducida con DSS, el cual aborda este estudio.

Se han hecho estudios de toxicidad aguda, sub-crónica y crónica de ciertos probióticos actualmente utilizados y no se han encontrado efectos adversos. Estos incluyen altas dosis administradas por vía oral y por largos periodos de tiempo<sup>clxi, clxii y clxiii</sup>.

Dado que no todos los probióticos tienen las mismas características terapéuticas, nosotros decidimos evaluar el efecto de diferentes dosis orales de *P. pentosaceus* ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^{10}$  UFCs). Como era de esperar, la administración de la bacteria no modificó el peso corporal, la consistencia de las heces ni la estructura microscópica del colon, así que nosotros concluimos que *P. pentosaceus* es seguro a estas concentraciones y puede ser utilizado como posible tratamiento en un modelo de colitis

clxiv



Uno de los aspectos a considerar respecto al estudio de los probióticos es la dosis a la cual debe ser evaluada. Ha sido reportado que el efecto de un microorganismo puede variar dependiendo de ésta. Por ejemplo, la administración de diferentes dosis de *Lactobacillus acidophilus* ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  y  $10^8$  UFC/10g) en un modelo murino de colitis aguda inducido con DSS decremento el índice de actividad de la enfermedad, protegió contra la pérdida de peso y acortamiento del colon. Sin embargo, la dosis con el mayor efecto en este modelo fue a de  $1 \times 10^6$  UFCs/10 g <sup>clxv</sup>.

De ahí la importancia de evaluar el efecto de *P. pentosaceus* en diferentes dosis en un modelo de colitis ulcerosa inducida con DSS.

Nuestro estudio demostró que el efecto de *P. pentosaceus* es dosis dependiente. A la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFCs fue capaz de reducir el índice de actividad de la enfermedad, retrasando la aparición de diarreas y hemorragias. Las dosis bajas de *P. pentosaceus* no tuvieron efectos clínicos visibles. También la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFCs ayudo a prevenir el acortamiento del colon asociado con la administración de DSS, decremento la permeabilidad intestinal al FITC-dextran y estructuralmente mejoró la arquitectura microscópica del colon. A pesar de que el tratamiento con *P. pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  tuvo efectos benéficos en animales con colitis inducida con DSS, sólo se observaron cambios en el peso de los animales administrados preventivamente DSS+Pre-Tx *P. pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$ . Otros estudios, como el de Izumi y colaboradoras, han obtenido resultados similares con la administración de *Bifidobacterium* 7). Futuros estudios se deben realizar para cuantificar el consumo de comida para saber si está siendo modificada, esto nos podría indicar un posible efecto metabólico. Además se podría considerar evaluar el efecto de dosis más altas de *P. pentosaceus* para identificar si *P. pentosaceus* es capaz de disminuir la actividad de la colitis así como alteraciones anatomopatológicas.

El modelo de colitis inducido con DSS es el más utilizado para estudios *in vivo* y nos permite evaluar varios aspectos de la integridad de la barrera de la mucosa así como su función<sup>134</sup>. Microscópicamente se observó que el tratamiento con *P. pentosaceus* no restauró completamente la arquitectura del colon distal, sin embargo, se observaron zonas del epitelio que conservaban la distribución de las criptas de Libinkür bien definidas sobre todo en las dosis de  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$   $1 \times 10^{10}$

Nos preguntamos cual es el mecanismo de acción podría ejercer *P. pentosaceus*, ya que los probióticos han demostrado varios de ellos. Primero ellos actúan como una barrera por una inhibición competitiva, la cual previene que otras bacterias patógenas alcancen la lámina propia y estimulen el sistema inmune de la mucosa. Segundo, incrementan la producción del moco aumentando su espesor, lo cual protege contra bacterias invasoras, también los probióticos pueden alterar la consistencia del moco, cambiando los patrones de adhesión bacteriana y tercero, los probióticos modulan la respuesta de sistema inmune ejerciendo un efecto anti-inflamatorio, así como estimulando la secreción de inmunoglobulinas como IgA<sup>114</sup>.

Estudios en pacientes con colitis ulcerosa y en modelos experimentales de colitis se ha demostrado un incremento de la permeabilidad debido a la disminución de la expresión y distribución de las proteínas de uniones estrechas como ZO-1 y ocludina<sup>122</sup>. Una vez que observamos que *P. pentosaceus* mejoró los síntomas de la colitis a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFCs, nosotros decidimos evaluar el efecto en la función de barrera epitelial, en donde se pudo observar una disminución en la permeabilidad de FITC-dextran en el modelo de colitis inducido con DSS. Esto nos indica que *P. pentosaceus* está incrementando la función de barrera. En un modelo murino de colitis inducida con DSS, la administración del probiótico VSL#3 mejoró la función de barrera porque disminuyó la permeabilidad intestinal debido a que incremento la expresión de las proteínas de uniones estrechas además de que previno la apoptosis<sup>122</sup>. El probiótico VSL#3 consiste de un conjunto de 8 cepas que actuaron sinérgicamente para ejercer un efecto en la protección de la función de barrera, Nuestro probiótico *P. pentosaceus* fue capaz de modificar esta función, demostrando un efecto similar disminuyendo la permeabilidad al FITC/dextrán.

Se ha identificado que ciertas cepas de *P. pentosaceus* tienen efectos inmunomoduladores en diferentes modelos *in vivo*; tal es el caso de la cepa *P. pentosaceus* OZF la cual mostró un efecto anti inflamatorio en un modelo de colitis inducido con TNBS en ratas, debido a que disminuyó los niveles séricos de IL-6 e IL-1 $\beta$ <sup>clxvi</sup>. Interesantemente la administración oral de una cepa de *P. pentosaceus* Sn26 aislada de un fermento de pepinillos japoneses retrasó la aparición de diarreas en ratones con diarrea alérgica inducida con ovoalbúmina. Éste efecto fue asociado con la disminución de los niveles de IgE y la regulación de la respuesta TH1-TH2 incrementando los niveles séricos de IL-12 e IFN- $\gamma$  y disminuyendo IL-4<sup>clxvii</sup>. De acuerdo a los resultados obtenidos en nuestro estudio, en donde se observó que *Pediococcus*

*pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC fue capaz de disminuir el índice de la actividad de la enfermedad retrasando la aparición de las diarreas y hemorragias, podríamos especular que es por algún efecto inmunomodulador, ya que en nuestro estudio se observó una disminución de los niveles séricos de IL-6 y TNF tanto en el tratamiento como el tratamiento preventivo de *P. pentosaceus*. Se ha demostrado que durante la patogénesis de la enfermedad de la colitis ulcerosa hay un incremento de la activación inmune de la mucosa lo que desencadena un incremento de los niveles de TNF, éste incrementa la permeabilidad a través de la ruta de poro ya sea por el incremento de la transcripción de la miosina cadena ligera kinasa (MLCK) o por la disminución de la actividad de la unión estrecha provocada por endocitosis de ocludina<sup>clxviii</sup>.

*P. pentosaceus* disminuyó los niveles de TNF e incrementó la expresión y distribución de ocludina en la zona apical de la mucosa intestinal por lo que podría estar involucrado en la regulación de esta vía ya que en el estudio *in vivo* se observó una disminución de la permeabilidad al FITC-dextran. Por otro lado, las citocinas IL-6, TNF e IL-13 son reguladoras de la expresión de Claudina-2 y se ha demostrado que el incremento de los niveles de estas citocinas aumentan la expresión de Claudina-2 incrementado la permeabilidad de la ruta de poro causando pérdida de la función de barrera<sup>clxix-clxx</sup>.

A pesar de que no se midieron los niveles séricos de IL-13 el tratamiento con *P. pentosaceus* disminuyó los niveles de las citocinas IL-6 y TNF por lo que esta disminución probablemente ayudó al decremento de la expresión de Claudina-2 en ratones con colitis ulcerosa.

La microbiota intestinal alterada puede causar respuestas inflamatorias intestinales. La interrupción en la microbiota da como resultado un rápido aumento de bacterias dañinas en el intestino. Además, la liberación de enterotoxina aumenta la permeabilidad de la mucosa intestinal y la producción de proteínas inmunosupresoras produce disfunción inmunitaria. Las crecientes poblaciones de bacterias dañinas invaden y dañan directamente las células epiteliales del intestino, lo que resulta en un daño a la barrera mucosa intestinal. El crecimiento excesivo de algunas bacterias afecta el metabolismo y el metabolismo energético, lo que desencadena la inflamación intestinal y el daño de la mucosa intestinal. La función de la barrera de la mucosa intestinal disminuye, la función de protección de la pared intestinal disminuye y la microbiota intestinal se trasloca, lo que daña aún más la barrera de la mucosa intestinal, causando un ciclo vicioso y agravando la respuesta inflamatoria intestinal. Los experimentos con animales han encontrado que la

colitis se puede inducir en modelos animales al alterar las bacterias intestinales. Los animales knockout para IL-10 libres de gérmenes no desarrollaron colitis lo que sugiere que la microbiota intestinal es esencial para la aparición de la CU.

Muchos estudios han demostrado que la composición y función de la microbiota intestinal en pacientes con CU están comprometidas. Algunas bacterias como Akkermansia (A.) muciniphila están disminuidas. *A. muciniphila* es uno de los miembros más abundantes de la microbiota intestinal humana, que representa entre el 1% y el 5% de los microbios intestinales humanos. Varios estudios han mostrado una relación entre la UC y *A. muciniphila*. *A. muciniphila* disminuyó en pacientes con CU, junto con la bacteria *Roseburia*<sup>clxxi</sup>. También se redujo en un modelo de ratón de colitis inducida por carragenina<sup>clxxii</sup>. Por lo tanto, *A. muciniphila* podría ser un nuevo objetivo de la UC. La microbiota anormal redujo la complejidad del ecosistema microbiano intestinal, que es una característica común de los pacientes con CU y EC. Varios patógenos microbianos están posiblemente relacionados con la inflamación intestinal y, por lo tanto, los pacientes con CU pueden albergar *Mycobacterium avium paratuberculosis*<sup>clxxiii</sup>, *Escherichia coli* invasora-adherente<sup>clxxiv</sup>, *Clostridium (C.) difficile*<sup>clxxv</sup>, especies de *Helicobacter*<sup>clxxvi</sup>, especies de *Salmonella*<sup>clxxvii</sup>, especies de *Fusobacterium*<sup>clxxviii</sup> y especies de *Listeria*<sup>clxxix</sup>. En nuestro estudio se observó un claro efecto de la inducción de colitis con DSS sobre la microbiota intestinal de los ratones, ya que se vieron disminuidos los niveles de Lactobacilos totales y se incrementaron los niveles de coliformes totales, sin embargo, tanto el tratamiento como el pre-tratamiento con *P. pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC, mantuvieron los niveles de lactobacilos y disminuyeron los niveles de coliformes totales. Se ha demostrado en otros estudios que ciertas cepas de *P. pentosaceus* secretan bacteriocinas (proteínas que inhiben el crecimiento de otros microorganismos, tal es el caso de dos cepas de *P. pentosaceus* que fueron aisladas de carne de puerco que secretaron bacteriocinas las que denominaron Pediocinas L y S con amplio espectro de acción tanto para bacterias gram (+) (*Listeria monocitogenes*) y gram (-) (*Shigella dysenteriae*, *E coli* y *Vibrio cholerae*) y formadoras de esporas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* y *Clostridium sporogenus*)<sup>clxxx</sup>. También se ha encontrado que una proteína de shock térmico de la pared celular de una cepa de *P. pentosaceus* AK-23 tiene efectos neutralizantes para LPS (lipopolisacáridos)<sup>clxxxi</sup>, algunas bacterias gram-negativas tienen LPS como *Escherichia coli* o *Salmonella spp.* que induce inflamación en el intestino. Nuestros resultados nos indicaron una disminución de los niveles de coliformes totales. El grupo de los coliformes totales incluye bacterias en forma de bacilo, gram negativos; el y está conformado por los

siguientes géneros: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*, de acuerdo a nuestros resultados la disminución de estos niveles posiblemente este relacionado al efecto de la secreción de una bacteriocina o por un componente celular de *P. pentosaceus* como una proteína de Shock térmico que será necesario investigar.

## **XV. CONCLUSIÓN GENERAL**

La administración de *P. pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC disminuyó la severidad de la colitis inducida con DSS y mejoró la función de barrera intestinal epitelial regulando las citocinas proinflamatorias y las uniones estrechas. Además de que es seguro y no causó desordenes gastrointestinales

### **Conclusiones Particulares**

La administración de *Pediococcus pentosaceus* a diferentes dosis ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^8$  y  $1 \times 10^{10}$  UFC) fue segura en los ratones BALB/c.

El tratamiento y el pre tratamiento con *P. pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC retrasó algunos de los síntomas de la colitis ulcerosa (diarreas y hemorragias), evitó el acortamiento del intestino y mejoró la morfología microscópica del colon.

El tratamiento con *P. pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC disminuyó la permeabilidad intestinal al FITC/dextrán en un modelo *in vivo* de colitis ulcerosa.

El tratamiento con *P. pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  incrementó la función de barrera intestinal epitelial, disminuyendo la expresión de Claudina-2 e incrementando la proteína de unión estrecha ocludina.

El tratamiento y el pre- tratamiento con *P. pentosaceus* a diferentes dosis administradas presentó un efecto antiinflamatorio al disminuir los niveles de las citocinas proinflamatorias (IL-6 y TNF) en un modelo *in vivo* de colitis ulcerosa.

El tratamiento y el pre-tratamiento con *P. pentosaceus* a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  reguló la microbiota intestinal manteniendo los niveles de lactobacilos y disminuyendo la cantidad de coliformes en un modelo *in vivo* de colitis ulcerosa.

## **XVI.PERSPECTIVAS**

Investigar el componente celular de *P. pentosaceus* que está ejerciendo su acción inmunomoduladora y de función de barrera intestinal en la colitis ulcerosa.

Evaluar el efecto de *P. pentosaceus* sobre diferentes especies bacterianas implicadas en la disbiosis en el modelo *in vivo* de colitis ulcerosa

Evaluar el efecto de *P. pentosaceus* sobre la expresión y distribución de MUC 2 en el modelo de *in vivo* de colitis

Evaluar el efecto de *P. pentosaceus* sobre la actividad antioxidante (Actividad de glutatión peroxidasa , glutatión reductasa en un modelo *in vivo* de colitis

Evaluar el efecto de *P. pentosaceus* sobre los niveles séricos de IL-13, INF- $\gamma$  en el modelo *in vivo* de colitis

Evaluar el efecto de *P. pentosaceus* sobre la expresión de Foxp3 mRNA, proteína ampliamente expresada en células T reguladoras en el modelo de colitis

Evaluar el efecto de *P. pentosaceus* en pacientes con colitis ulcerosa activa e inactiva a la dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC

---

## XVII. BIBLIOGRAFIA

- <sup>i</sup> Stidham RW1, Higgins PDR Colorectal Cancer in Inflammatory Bowel Disease. *Clin Colon Rectal Surg.* 2018;31(3):168-178.
- <sup>ii</sup> Dignass A, Preiss JC, Aust DE, et al. Updated German guideline on diagnosis and treatment of ulcerative colitis. *Z Gastroenterol* 2011; 49: 1276–341.
- <sup>iii</sup> Rosenstiel P, Sina C, Franke A, Schreiber S: Towards a molecular risk map—recent advances on the etiology of inflammatory bowel disease. *Semin Immunol* 2009; 21: 334–345.
- <sup>iv</sup> Daneman, R., and Rescigno, M. The gut immune barrier and the bloodbrain barrier: are they so different? *Immunity.* 2009.31, 722–735.
- <sup>v</sup> Suzuki, T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. *Cell. Mol. Life Sci.* 70, 631–659.
- <sup>vi</sup> Sasaki M1, Klapproth JM. The role of bacteria in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J Signal Transduct.* 2012;2012:704953
- <sup>vii</sup> Wehkamp J, Götz M, Herrlinger K, Steurer W, Stange EF. Inflammatory bowel disease: Crohn’s disease and ulcerative colitis. *Dtsch Arztebl Int* 2016; 113: 72–82.
- <sup>viii</sup> Mack DR. Probiotics-mixed messages. *Can Fam Physician.* 2005;51(11):1455–1464.
- <sup>ix</sup> Sun MC, Zhang FC, Yin X and et al. *Lactobacillus reuteri* F-9-35 Prevents DSS-Induced Colitis by Inhibiting Proinflammatory Gene Expression and Restoring the Gut Microbiota in Mice. *J Food Sci.* 2018;83(10):2645-2652.
- <sup>x</sup> Schneeman BO Gastrointestinal physiology and functions. *Br J Nutr;* 2013; 2002; 88 Suppl 2:S159-63.
- <sup>xi</sup> Reed KK, Wickham R. Review of the gastrointestinal tract: from macro to micro. *Semin Oncol Nurs.* 2009;25(1):3-14.
- <sup>xii</sup> Booth C, Potten C. Gut instincts: Thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 2000;105:1493-9.
- <sup>xiii</sup> Van Der Flier L, Clevers H. Stem cells, self-renewal, and differentiation in the intestinal epithelium. *Annu Rev Physiol* 2009;71:241-60.
- <sup>xiv</sup> Pott J, Hornef M. Innate immune signalling at the intestinal epithelium in homeostasis and disease. *EMBO Rep* 2012;13:684-98.



- 
- <sup>xv</sup> Pelaseyed T, Bergström JH, Gustafsson JK, and et. al.. The mucus and mucins of the goblet cells and enterocytes provide the first defense line of the gastrointestinal tract and interact with the immune system. *Immunol Rev.* 2014;260(1):8-20.
- <sup>xvi</sup> Corr S, Gahan C, Hill C. M-cells: Origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52:2-12.
- <sup>xvii</sup> Didierlaurent A, Sirard JC, Kraehenbuhl JP, et al.: How the gut senses its content. *Cell Microbiol* 2002, 4:61–72.
- <sup>xviii</sup> Corr S, Gahan C, Hill C. M-cells: Origin, morphology and role in mucosal immunity and microbial pathogenesis. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2008;52:2-12.
- <sup>xix</sup> Barnes JL. Enteral Nutrients and Gastrointestinal Physiology. *J Infus Nurs.* 2018; 41(1):35-42.
- <sup>xx</sup> Grant JP. Anatomy and physiology of the luminal gut: enteral access implications. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2006;30(1 Suppl):S41-6.
- <sup>xxi</sup> Parris A, Williams MR. human colonic crypt culture system to study regulation of stem cell-driven tissue renewal and physiological function. *Methods Mol Biol.* 2015;1212:141-61
- <sup>xxii</sup> Calderwood AH, Lasser KE, Roy HK Colon adenoma features and their impact on risk of future advanced adenomas and colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol.* 2016 15; 8(12): 826–834.
- <sup>xxiii</sup> Kiela PR, Ghishan FK. Physiology of Intestinal Absorption and Secretion. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2016;30(2):145-59. .
- <sup>xxiv</sup> Ianiro G1, Pecere S, Giorgio V, Gasbarrini A, Cammarota G. Digestive Enzyme Supplementation in Gastrointestinal Diseases *Curr Drug Metab.* 2016; 17(2): 187–193.
- <sup>xxv</sup> Wong JM, de Souza R, Kendall CW, Emam A, Jenkins DJ. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol.* 2006;40(3):235-43.
- <sup>xxvi</sup> Peterson LW, Artis D Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis *Nat Rev Immunol.* 2014;14(3):141-53.
- <sup>xxvii</sup> Brandtzaeg P The gut as communicator between environment and host: immunological consequences *Eur J Pharmacol.* 2011;668 Suppl 1:S16-32.
- <sup>xxviii</sup> Robinson K, Deng Z, Hou Y2, Zhang G Regulation of the Intestinal Barrier Function by Host Defense Peptides. *Front Vet Sci.* 2015 23;2:57.
- <sup>xxix</sup> Rhee S, Im E, Riegler M, et al. Pathophysiological role of Toll-like receptor 5 engagement by bacterial flagellin in colonic inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13610-5.
- <sup>xxx</sup> Lee J, Mo J, Katakura K, et al. Maintenance of colonic homeostasis by distinctive apical TLR9 signalling in intestinal epithelial cells. *Nat Cell Biol* 2006;8:1327-36

- 
- <sup>xxxi</sup> Yan F, Polk D. Disruption of NF-kappaB signalling by ancient microbial molecules: Novel therapies of the future? *Gut*. 2010;59:421-6.
- <sup>xxxii</sup> Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci*. 2001; 1;6:D1321-57.
- <sup>xxxiii</sup> Specian, R. D. & Neutra, M. R. Mechanisms of rapid mucus secretion in goblet cells stimulated by acetylcholine. *J. Cell Biol.* 85, 626–640 (1980).
- <sup>xxxiv</sup> Kindon, H., Pothoulakis, C., Thim, L., Lynch-Devaney, K. & Podolsky, D. K. Trefoil peptide protection of intestinal epithelial barrier function: cooperative interaction with mucin glycoprotein. *Gastroenterology*. 1995; 109, 516–523
- <sup>xxxv</sup> Jianhong Hu, Yan Shi, Chao Wang, Hanxing Wan, Dan Wu, Hongyu Wang, and Xi Peng Role of intestinal trefoil factor in protecting intestinal epithelial cells from burn-induced injury *Sci Rep*. 2018; 8: 3201.
- <sup>xxxvi</sup> Ribet D1, Cossart P How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. *Microbes Infect*. 2015;17(3):173-83.
- <sup>xxxvii</sup> Kim M, Ashida H, Ogawa M, Yoshikawa Y, Mimuro H, Sasakawa C . Bacterial interactions with the host epithelium. *Cell Host Microbe*. 2010 ; 22;8(1):20-35.
- <sup>xxxviii</sup> Blikslager AT, Moeser AJ, Gookin JL, Jones SL, Odle J. Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev*. 2007.87(2):545-64
- <sup>xxxix</sup> Kunzelmann K, Mall M. Electrolyte transport in the mammalian colon: Mechanisms and Implications for disease. *Physiol Rev*. 2002; 82:245–89.
- <sup>xl</sup> Broer S. Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev*. 2008; 88:249–86.
- <sup>xli</sup> Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. *Annu Rev Physiol*. 2006; 68:403–29.
- <sup>xlii</sup> Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(11):799-809.
- <sup>xliii</sup> Keita A, Söderholm J. The intestinal barrier and its regulation by neuroimmune factors. *Neurogastroenterol Motil*. 2010;22:718-33.
- <sup>xliv</sup> Balda M, Matter K. Tight junctions at a glance. *J Cell Sci* 2008;121:3677-82.
- <sup>xlv</sup> Schulzke J, Fromm M. Tight junctions: Molecular structure meets function. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1165:16.
- <sup>xlvi</sup> Bauer H, Stelzhammer W, Fuchs R, et al. Astrocytes and neurons express the tight junction-specific protein occludin in vitro. *Exp Cell Res* 1999;250:434-8.

- 
- <sup>xlvii</sup> Blank F, Wehrli M, Lehmann A, et al. Macrophages and dendritic cells express tight junction proteins and exchange particles in an in vitro model of the human airway wall. *Immunobiology* 2011;216:86-95.
- <sup>xlviii</sup> Rao R. Occludin phosphorylation in regulation of epithelial tight junctions. *Ann N Y Acad Sci* 2009;1165:62-8.
- <sup>xlix</sup> Dörfel M, Huber O. Modulation of tight junction structure and function by kinases and phosphatases targeting occludin. *J Biomed Biotechnol* 2012;2012:807356.
- <sup>l</sup> Hartsock A, Nelson W. Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*;2008;1778:660-9.
- <sup>li</sup> Escaffit F, Boudreau F, Beaulieu J. Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J Cell Physiol* 2005;203:15-26.
- <sup>lii</sup> Liu Y, Nusrat A, Schnell F, et al. Human junction adhesion molecule regulates tight junction resealing in epithelia. *J Cell Sci* 2000;113:2363-74.
- <sup>liii</sup> Laukoetter M, Nava P, Lee W, et al. JAM-A regulates permeability and inflammation in the intestine in vivo. *J Exp Med* 2007;204:3067-76.
- <sup>liv</sup> Ikenouchi J, Furuse M, Furuse K, et al. Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells. *J Cell Biol* 2005;171:939-45.
- <sup>lv</sup> Mariano C, Sasaki H, Brites D, et al. A look at tricellulin and its role in tight junction formation and maintenance. *Eur J Cell Biol* 2011;90:787-96.
- <sup>lvi</sup> Umeda K, Ikenouchi J, Katahira-Tayama S, et al. ZO-1 and ZO-2 independently determine where claudins are polymerized in tight junction strand formation. *Cell* 2006;126:741-54.
- <sup>lvii</sup> Ebnet K. Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochem Cell Biol.* 2008; 130:1–20.
- <sup>lviii</sup> Pokutta S, Weis WI. Structure and mechanism of cadherins and catenins in cell-cell contacts. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007; 23:237–61.
- <sup>lix</sup> Garrod D, Chidgey M. Desmosome structure, composition and function. *Biochim Biophys Acta* 2008;1778:572-87.
- <sup>lx</sup> Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology.* 2009; 136(1):65-80
- <sup>lxi</sup> Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science.* 2005; 307(5717):1915-20.

- 
- lxii Gill SR, Pop M, Deboy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, Gordon JI, Relman DA, Fraser-Liggett CM, Nelson KE. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006; 312(5778):1355-9.
- lxiii Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol*. 2016; 14(8):e1002533
- lxiv Natividad JM, Verdu EF. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacol Res*. 2013; 69(1):42-5
- lxv den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res*. 2013; 54(9):2325-40
- lxvi Bäumlér AJ, Sperandio V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*. 2016; 535(7610):85-93.
- lxvii Gensollen T, Iyer SS, Kasper DL, Blumberg RS. How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*. 2016 Apr 29; 352(6285):539-44.
- lxviii Mastromarino, P.; Capobianco, D.; Campagna, G.; Laforgia, N.; Drimaco, P.; Dileone, A.; Baldassarre, M.E. Correlation between lactoferrin and beneficial microbiota in breast milk and infant's feces. *Biometals*. 2014, 27, 1077–1086.
- lxix Salminen, S.; Gibson, G.R.; McCartney, A.L.; Isolauri, E. Influence of mode of delivery on gut microbiota composition in seven year old children. *Gut* 2004, 53, 1388–1389.
- lxx Biasucci, G.; Benenati, B.; Morelli, L.; Bessi, E.; Boehm, G. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J. Nutr*. 2008, 138, 1796S–1800S.
- lxxi Roger, L.C.; Costabile, A.; Holland, D.T.; Hoyles, L.; McCartney, A.L. Examination of faecal *Bifidobacterium* populations in breast- and formula-fed infants during the first 18 months of life. *Microbiology* 2010, 156, 3329–3341.
- lxxii Pérez AE, Artacho A, Knecht H, Ferrús ML, Friedrichs A, Ott SJ, Moya A, Latorre A, Gosálbes MJ. Differential effects of antibiotic therapy on the structure and function of human gut microbiota. *PLoS One*. 2013;8(11):e80201.
- lxxiii Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano GAD, Gasbarrini A, Mele MC What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases *Microorganisms*. 2019;7(1). pii: E14.
- lxxiv Jandhyala SM, Talukdar R, Subramanyam C, Vuyyuru H, Sasikala M, Nageshwar Reddy D. Role of the normal gut microbiota. *World J Gastroenterol*. 2015;21(29):8787–8803.
- lxxv Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D.R.; Fernandes, G.R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J.M.; et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011, 473, 174–180

- 
- <sup>lxxvi</sup> Manichanh C., Rigottier-Gois, L., Bonnaud, E., Gloux, K., Pelletier, E., Frangeul, L., Nalin, R., Jarrin, C., Chardon, P., Marteau, P., et al. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn's disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006. 55, 205–211.
- <sup>lxxvii</sup> Wang, Y., and Kasper, L.H. The role of microbiome in central nervous system disorders. *Brain Behaviour Immun*. 2013. 38, 1–12.
- <sup>lxxviii</sup> Venema K, do Carmo Probiotics and Prebiotics: Current Research and Future Trends, Caister Academic Press. 2015; pp.181-194.
- <sup>lxxix</sup> Ghosh S, Shand A, Ferguson A. Ulcerative colitis. *BMJ*. 2000;320(7242):1119–1123.
- <sup>lxxx</sup> Yamamoto-Furusho JK. Clinical epidemiology of ulcerative colitis in Mexico: a single hospital-based study in a 20-year period (1987-2006). *J Clin Gastroenterol*. 2009;43(3):221-4.
- <sup>lxxxi</sup> Danese S, Banerjee R, Cummings JF, Dotan I, Kotze PG, and et. al. Consensus recommendations for patient-centered therapy in mild-to-moderate ulcerative colitis: the i Support Therapy-Access to Rapid Treatment (iSTART) approach. *Intest Res*. 2018;16(4):522-528
- <sup>lxxxii</sup> Conrad K, Roggenbuck D, Laass MW. Diagnosis and classification of ulcerative colitis. *Autoimmun Rev*. 2014;13(4-5):463-6.
- <sup>lxxxiii</sup> Terzic J, Grivennikov S, Karin E, Karin M. Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 2010;138:2101–2114.e5.
- <sup>lxxxiv</sup> Ullman TA, Itzkowitz SH. Intestinal inflammation and cancer. *Gastroenterology*. 2011;140:1807–1816
- <sup>lxxxv</sup> Hoving JC. Targeting IL-13 as a Host-Directed Therapy Against Ulcerative Colitis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:395.
- <sup>lxxxvi</sup> Nemeth ZH, Bogdanovski DA, Barratt-Stopper P, Paglinco SR, Antonioli L, Rolandelli RH. Crohn's Disease and Ulcerative Colitis Show Unique Cytokine Profiles. *Cureus*. 2017;9(4):e1177.
- <sup>lxxxvii</sup> Mahida YR, Ceska M, Effenberger F, et al. Enhanced synthesis of neutrophil-activating peptide-1/interleukin-8 in active ulcerative colitis. *Clin Sci (Lond)* 1992;82:273-275.
- <sup>lxxxviii</sup> MacDonald TT, Murch SH. Aetiology and pathogenesis of chronic inflammatory bowel disease. *Baillieres. Clin Gastroenterol* 1994;8:1-34.
- <sup>lxxxix</sup> Pastorelli L, De Salvo C, Mercado JR, Vecchi M, Pizarro TT. Central Role of the Gut Epithelial Barrier in the Pathogenesis of Chronic Intestinal Inflammation: Lessons Learned from Animal Models and Human Genetics. *Front Immunol*. 2013 17:4-280.

- 
- <sup>xc</sup> Vivinus-Nébot M, Frin-Mathy G, Bziouche H and et al. Functional bowel symptoms in quiescent inflammatory bowel diseases: role of epithelial barrier disruption and low-grade inflammation. *Gut*. 2014;63(5):744-52.
- <sup>xc<sup>i</sup></sup> Landy J, Ronde E, English N, et al. Tight junctions in inflammatory bowel diseases and inflammatory bowel disease associated colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016;22(11):3117–3126.
- <sup>xc<sup>ii</sup></sup> Sutherland L, Macdonald JK. Oral 5-aminosalicylic acid for induction of remission in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2006;(2): CD000543
- <sup>xc<sup>iii</sup></sup> Iacucci M, de Silva S, Ghosh S. Mesalazine in inflammatory bowel disease: a trendy topic once again?. *Can J Gastroenterol*. 2010 ;24(2):127-33.
- <sup>xc<sup>iv</sup></sup> Allgayer H Review article: mechanisms of action of mesalazine in preventing colorectal carcinoma in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003;18 Suppl 2:10-4
- <sup>xc<sup>v</sup></sup> Gordon M. 5-Aminosalicylates to maintain remission in Crohn's disease: Interpreting conflicting systematic review evidence. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*. 2017; 8(2): 99–102.
- <sup>xc<sup>vi</sup></sup> Li J, Wang F, Zhang HJ, et al. Corticosteroid therapy in ulcerative colitis: Clinical response and predictors. *World J Gastroenterol*. 2015;21(10):3005–3015.
- <sup>xc<sup>vii</sup></sup> Cross RK. Safety Considerations with the Use of Corticosteroids and Biologic Therapies in Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2017;23(10):1689-1701.
- <sup>xc<sup>viii</sup></sup> Abdalla MI, Herfarth H. Budesonide for the treatment of ulcerative colitis. *Expert Opin Pharmacother*. 2016;17(11):1549-59.
- <sup>xc<sup>ix</sup></sup> Fraser AG, Orchard TR, Jewell DP. The efficacy of azathioprine for the treatment of inflammatory bowel disease: a 30 year review. *Gut* 2002;50: 485-9
- <sup>c</sup> Kandiel A, Fraser AG, Korelitz BI, Brensinger C, Lewis JD. Increased risk of lymphoma among inflammatory bowel disease patients treated with azathioprine and 6-mercaptopurine. *Gut* 2005;54: 1121-5.
- <sup>ci</sup> Fraser AG, Morton D, McGovern D, Travis S, Jewell DP. The efficacy of methotrexate for maintaining remission in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16: 693-7
- <sup>c<sup>ii</sup></sup> Hawthorne AB. Ciclosporin and refractory colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15: 239-44.
- <sup>c<sup>iii</sup></sup> Jarnerot G, Hertervig E, Friis-Liby I, Blomquist L, Karlen P, Granno C, et al. Infliximab as rescue therapy in severe to moderately severe ulcerative colitis: a randomized, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 2005;128: 1805-11

- 
- <sup>civ</sup> Evans RC, Clarke L, Heath P, Stephens S, Morris AI, Rhodes JM. Treatment of ulcerative colitis with an engineered human anti-TNFalpha antibody CDP571. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997;11(6):1031-5.
- <sup>cv</sup> Sandborn WJ, van Assche G, Reinisch W, et al. Adalimumab induces and maintains clinical remission in patients with moderate-to-severe ulcerative colitis. *Gastroenterology* 2012;142:257–65.e1–3
- <sup>cvi</sup> Rutgeerts P, Sandborn WJ, Feagan BG, Reinisch W, Olson A, Johanns J, et al. Infliximab for induction and maintenance therapy for ulcerative colitis. *N Engl J Med* 2005;353: 2462-76
- <sup>cvi</sup> Danese, S., & Angelucci, E.). New and emerging biologics in the treatment of inflammatory bowel disease: quo vadis? *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 2009; 33, S217–S227
- <sup>cvi</sup> Creed TJ, Probert CS, Norman MN, Moorghen M, Shepherd NA, Hearing SD, et al. Basiliximab for the treatment of steroidresistant ulcerative colitis: further experience in moderate and severe disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2006;23:1435-42.
- <sup>cix</sup> Edula RG, Picco MF. An evidence-based review of natalizumab therapy in the management of Crohn's disease. *Ther Clin Risk Manag.* 2009;5:935–942.
- <sup>cx</sup> Nitzan O, Elias M, Peretz A, Saliba W. Role of antibiotics for treatment of inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* 2016;22(3):1078–1087.
- <sup>cx</sup> Shen ZH, Zhu CX, Quan YS, et al. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J Gastroenterol.* 2018;24(1):5–14.
- <sup>cxii</sup> Bamias G, Nyce MR, De La Rue SA, Cominelli F; American College of Physicians; American Physiological Society. New concepts in the pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Ann Intern Med.* 2005. 20;143(12):895-904.
- <sup>cxiii</sup> Sorrentino D. Microbial dysbiosis in spouses of ulcerative colitis patients: Any clues to disease pathogenesis?. *World J Gastroenterol.* 2017;23(37):6747–6749.
- <sup>cxiv</sup> Sasaki M1, Klapproth JM. The role of bacteria in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J Signal Transduct.* 2012;2012:704953.
- <sup>cxv</sup> Fedorak RN. Probiotics in the management of ulcerative colitis. *Gastroenterol Hepatol (N Y).* 2010;6(11):688–690.
- <sup>cxvi</sup> Ozen M, Dinleyici EC. The history of probiotics: the untold story. *Benef Microbes.* 2015;6(2):159-65
- <sup>cxvii</sup> *J Clin Gastroenterol.* 2016 Nov/Dec;50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A. Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015:S116-S119. Probiotics History.

- 
- <sup>cxviii</sup> Ouwehand AC, Invernici MM, Furlaneto FAC, Messori MR Effectiveness of Multistrain Versus Single-strain Probiotics: Current Status and Recommendations for the Future. *J Clin Gastroenterol*. 2018;52 Suppl 1S35-S40
- <sup>cxix</sup> Olveir G, González E. Actualización de probióticos, prebióticos y simbióticos en nutrición clínica. *EndocrinolNutr*.2016;63(9):482-494
- <sup>cxx</sup> Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization (FAO/WHO) Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. 2002. [ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf](http://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf) (visitado 02 Marzo 2018)
- <sup>cxxi</sup> Shi LH, Balakrishnan K, Thiagarajah K, Mohd Ismail NI, Yin OS. Beneficial Properties of Probiotics. *Trop Life Sci Res*. 2016;27(2):73–90.
- <sup>cxvii</sup> Ng SC, Hart AL, Kamm MA, Stagg AJ, Knight SC. Mechanism of action of probiotics: recent advances. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:300–10.
- <sup>cxviii</sup> Dai C, Zhao DH, Jiang M VSL#3 probiotics regulate the intestinal epithelial barrier in vivo and in vitro via the p38 and ERK signaling pathways. *Int J Mol Med*. 2012;29(2):202-8.
- <sup>cxviiii</sup> Ueno N, Fujiya M, Segawa S, Nata T, Moriichi K, Tanabe H, Mizukami Y, Kobayashi N, Ito K, Kohgo Y. Heat-killed body of lactobacillus brevis SBC8803 ameliorates intestinal injury in a murine model of colitis by enhancing the intestinal barrier function. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17(11):2235-50.
- <sup>cxv</sup> Y. Mao, J.-L. Yu, Å. Ljungh, G. Molin & B. Jeppsson Intestinal Immune Response to Oral Administration of Lactobacillus reuteri R2LC, Lactobacillus plantarum DSM 9843, Pectin and Oat base on Methotrexate induced Enterocolitis in Rats, *Microbial Ecology in Health and Disease*, (1996) 9:6, 261-269.
- <sup>cxvii</sup> La Fata G, Weber P, Mohajeri MH. Probiotics and the Gut Immune System: Indirect Regulation. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2017;10(1):11–21.
- <sup>cxviii</sup> Hafez MM. Upregulation of intestinal Mucin expression by the probiotic bacterium E. coli Nissle 1917. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2012;4:67–77
- <sup>cxviiii</sup> Caballero-Franco C, Keller K, De Simone C, Chadee K. The VSL#3 probiotic formula induces mucin gene expression and secretion in colonic epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2007;292:G315–G322
- <sup>cxvix</sup> Resta-Lenert S, Barrett KE. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive Escherichia coli (EIEC). *Gut*. 2003;52(7):988-97



- 
- <sup>cxxx</sup> Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, Bruwer M. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;296(5):G1140-9
- <sup>cxxxi</sup> Rao RK, Samak G. Protection and Restitution of Gut Barrier by Probiotics: Nutritional and Clinical Implications. *Curr Nutr Food Sci*. 2013;9(2):99–107.
- <sup>cxxxii</sup> Zyrek AA, Cichon C, Helms S, Enders C, Sonnenborn U, Schmidt MA, Molecular mechanisms underlying the probiotic effects of *Escherichia coli* Nissle 1917 involve ZO-2 and PKCzeta redistribution resulting in tight junction and epithelial barrier repair. *Cell Microbiol*. 2007;9(3):804-16.
- <sup>cxxxiii</sup> Riebel WJ, Washington JA. Clinical and microbiologic characteristics of pediococci. *J Clin Microbiol*. 1990 Jun;28(6):1348-55.
- <sup>cxxxiv</sup> Cheng-Chih T, Sew-Fen L, Quan-Rong H, Lan-Chun C, and Chun-Chih H. Safety Evaluation of Multiple Strains of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus* in Wistar Rats Based on the Ames Test and a 28-Day Feeding Study. *ScientificWorldJournal*. 2014; 2014: 928652.
- <sup>cxxxv</sup> Rishikesh Shukla .Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* CRAG3: A New Isolate from Fermented Cucumber Probiotics & Antimicro. *Prot*. 2013, 10,12602-013
- <sup>cxxxvi</sup> Thirabunyanon M, Hongwittayakorn P. Probiotic lactic acid bacteria of human origin induce antiproliferation of colon cancer cells via synergic actions in adhesion to cancer cells and short-chain fatty acid bioproduction *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;169(2):511-25.
- <sup>cxxxvii</sup> Li-jung Yin and et al. Bacteriocins From *Pediococcus Pentosaceus* L And S From Pork Meat. *J. Agric. Food Chem*. 2003, 51, 1071-1076
- <sup>cxxxviii</sup> Qiaomai Xu, Silan Gu, Yunbo Chen, Jiazheng Quan, Longxian Lv, Dazhi Chen, Beiwen Zheng, Lichen Xu, and Lanjuan Li. Protective Effect of *Pediococcus pentosaceus* LI05 Against *Clostridium difficile* Infection in a Mouse Model *Front Microbiol*. 2018; 9: 2396.
- <sup>cxxxix</sup> Shi D, Lv L, Fang D, et al. Administration of *Lactobacillus salivarius* LI01 or *Pediococcus pentosaceus* LI05 prevents CCl<sub>4</sub>-induced liver cirrhosis by protecting the intestinal barrier in rats. *Sci Rep*. 2017;7(1):6927.
- <sup>cxl</sup> Dubey V, Ghosh AR, Bishayee K, Khuda-Bukhsh AR. Probiotic *Pediococcus pentosaceus* strain GS4 alleviates azoxymethane-induced toxicity in mice. *Nutr Res*. 2015;35(10):921-929.
- <sup>cxli</sup> Low D, Nguyen DD, Mizoguchi E. Animal models of ulcerative colitis and their application in drug research. *Drug Des Devel Ther*. 2013;7:1341-57.

- 
- <sup>cxlii</sup> Eichele DD, Kharbanda KK. Dextran sodium sulfate colitis murine model: An indispensable tool for advancing our understanding of inflammatory bowel diseases pathogenesis. *World J Gastroenterol*. 2017;23(33):6016–6029.
- <sup>cxliii</sup> Kiesler P, Fuss IJ, Strober W. Experimental Models of Inflammatory Bowel Diseases. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*. 2015;1(2):154–170.
- <sup>cxliv</sup> NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Publicada en el diario oficial de la federación el 22 de agosto de 2001.
- <sup>cxlv</sup> Cooper HS, Murthy SN, Shah RS, Sedergran DJ. Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis. *Laboratory Invest*. 1993;69:238–49
- <sup>cxlvi</sup> Montero C. Manual teórico práctico de técnicas inmunohistoquímicas. Universitaria portosina.1998. 36-52
- <sup>cxlvii</sup> Gupta J and Nebreda A. Analysis of Intestinal Permeability in Mice. *Bio-protocol*.2014; 4 (22):14
- <sup>cxlviii</sup> Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M.Curr Dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Protoc Immunol*. 2014. 4;104:Unit 15.25
- <sup>cxlix</sup> Yan Y, Kolachala V, Dalmaso G, Nguyen H, Laroui H, Sitaraman SV, Merlin D. Temporal and spatial analysis of clinical and molecular parameters in dextran sodium sulfate induced colitis. *PLoS ONE*. 2009; 4:e6073
- <sup>cl</sup> Wang K, Han G, Dou Y, Wang Y, Liu G, Wang R, Xiao H, Li X, Hou C, Shen B, Guo R, Li Y, Shi Y, Chen G. Opposite role of tumor necrosis factor receptors in dextran sulfate sodium-induced colitis in mice. *PLoS ONE*. 2012; 7:e52924.
- <sup>cli</sup> Siegmund B1, Rieder F, Albrich S, Wolf K, Bidlingmaier C, Firestein GS, Boyle D, Lehr HA, Loher F, Hartmann G, Endres S, Eigler A. Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001 Jan; 296(1):99-105.
- <sup>clii</sup> Solomon L, Mansor S, Mallon P, Donnelly E, Hoper M, Loughrey M, Kirk S, Gardiner K.The dextran sulphate sodium (DSS) model of colitis: an overview, *Comp Clin Pathol*. 2010, 19:235–239
- <sup>cliii</sup> Feighery LM, Smith P, O'Mahony L, Fallon PG, Brayden DJ. Effects of *Lactobacillus salivarius* 433118 on intestinal inflammation, immunity status and in vitro colon function in two mouse models of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 2008 ;53(9):2495-2506.
- <sup>cliv</sup> Chen LL, Zou YY, Lu FG, Li FJ, Lian GH. Efficacy profiles for different concentrations of *Lactobacillus acidophilus* in experimental colitis. *World J Gastroenterol*. 2013 28;19(32):5347-5356.

- 
- <sup>clv</sup> Srutkova D, Schwarzer M, Hudcovic T, Zakostelska Z, Drab V, Spanova A, Rittich B, Kozakova H, Schabussova I. *Bifidobacterium longum* CCM 7952 Promotes Epithelial Barrier Function and Prevents Acute DSS-Induced Colitis in Strictly Strain-Specific Manner. *PLoS One*. 2015 28;10(7):e0134050.
- <sup>clvi</sup> Peran L, Camuesco D, Comalada M, Bailon E, Henriksson A, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. *J Appl Microbiol* 2007; 103: 836-844.
- <sup>clvii</sup> Sasaki M, Klapproth JM. The role of bacteria in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J Signal Transduct*. 2012;2012:704953.
- <sup>clviii</sup> Jonganurakkun B, Wang Q, Xu SH, Tada Y, Minamida K, Yasokawa D, Sugi M, Hara H, Asano K. *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use. *J Biosci Bioeng*. 2008; 106(1):69-73.
- <sup>clix</sup> Shukla R, Goyal A. Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* CRAG3: A New Isolate from Fermented Cucumber. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2014; 6(1):11-21.
- <sup>clx</sup> Ozlem O, Fadime K, Fuat C, Yagci IG. Immunomodulatory function and in vivo properties of *Pediococcus pentosaceus* OZF, a promising probiotic strain *Annals of Microbiology*. 2013; 63 (4): 1311–1318.
- <sup>clxi</sup> 31. Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G, Huys G, Levy DD, Lutgendorff F, Mack D, Phothirath P, Solano-Aguilar G, Vaughan E. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes*. 2010; 1(3):164-185
- <sup>clxii</sup> Asahara T, Takahashi M, Nomoto K, Takayama H, Onoue M, Morotomi M, et al. Assessment of safety of *Lactobacillus* strains based on resistance to host innate defense mechanisms. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003; 10:169-173.
- <sup>clxiii</sup> Lara-Villoslada F, Sierra S, Diaz-Ropero MP, Olivares M, Xaus J. Safety assessment of the human milk isolated probiotic *Lactobacillus salivarius* CECT5713. *J Dairy Sci* 2007; 90:3583-3589.
- <sup>clxiv</sup> Collado MC, Grzeskowiak L, Salminen S. Probiotic strains and their combination inhibit in vitro adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Curr Microbiol* 2007; 55:260-265
- <sup>clxv</sup> Chen LL, Zou YY, Lu FG, Li FJ, Lian GH. Efficacy profiles for different concentrations of *Lactobacillus acidophilus* in experimental colitis. *World J Gastroenterol*. 2013; 19(32):5347-5356.
- <sup>clxvi</sup> Onlu, H., Sakyp, Z., Kiran, F., Onlu, H., Büyük, İ., Aras, S., & Osmanağaoğlu, Ö. (2014). The Effect of Oral Administration of *Pediococcus pentosaceus* OZF. *New Biotechnology*, 31, S151–S152.

- 
- clxvii Masuda T, Kimura M, Okada S, Yasui H. *Pediococcus pentosaceus* Sn26 inhibits IgE production and the occurrence of ovalbumin-induced allergic diarrhea in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010;74(2):329-35.
- clxviii Al-Sadi R, Guo S, Ye D, Rawat M, Ma TY. TNF- $\alpha$  Modulation of Intestinal Tight Junction Permeability Is Mediated by NIK/IKK- $\alpha$  Axis Activation of the Canonical NF- $\kappa$ B Pathway. *Am J Pathol.* 2016;186(5):1151–1165.
- clxix Suzuki T, Yoshinaga N, Tanabe S. Interleukin-6 (IL-6) regulates claudin-2 expression and tight junction permeability in intestinal epithelium. *J Biol Chem.* 2011;286(36):31263–31271.
- clxx Luettig J, Rosenthal R, Barmeyer C, Schulzke JD. Claudin-2 as a mediator of leaky gut barrier during intestinal inflammation. *Tissue Barriers.* 2015;3(1-2):e977176.
- clxxi Bajer L, Kverka M, Kostovcik M and et al. Distinct gut microbiota profiles in patients with primary sclerosing cholangitis and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2017; 23(25):4548-4558
- clxxii Shang Q, Sun W, Shan X, Jiang H, Cai C, Hao J, Li G, Yu G. Carrageenan-induced colitis is associated with decreased population of anti-inflammatory bacterium, *Akkermansia muciniphila*, in the gut microbiota of C57BL/6J mice. *Toxicol Lett.* 2017; 279():87-95
- clxxiii Autschbach F, Eisold S, Hinz U, Zinser S, Linnebacher M, Giese T, Löffler T, Büchler MW, Schmidt J High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis IS900 DNA in gut tissues from individuals with Crohn's disease. *Gut.* 2005 Jul; 54(7):944-9.
- clxxiv Palmela C, Chevarin C, Xu Z, Torres J, Sevrin G3, Hirten R1, Barnich N3, Ng SC4, Colombel JF1 Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease *Gut.* 2018 Mar;67(3):574-587.
- clxxv Reddy SS, Brandt LJ *Clostridium difficile* infection and inflammatory bowel disease. *J Clin Gastroenterol.* 2013 Sep; 47(8):666-71.
- clxxvi Thomson JM, Hansen R, Berry SH, Hope ME, Murray GI, Mukhopadhyay I, McLean MH, Shen Z, Fox JG, El-Omar E, Hold GL. Enterohepatic helicobacter in ulcerative colitis: potential pathogenic entities? *PLoS One.* 2011; 6(2):e17184
- clxxvii Gradel KO, Nielsen HL, Schønheyder HC, Ejlersen T, Kristensen B, Nielsen H. Increased short- and long-term risk of inflammatory bowel disease after salmonella or campylobacter gastroenteritis. *Gastroenterology.* 2009; 137(2):495-5
- clxxviii Ohkusa T, Okayasu I, Ogihara T, Morita K, Ogawa M, Sato N. Induction of experimental ulcerative colitis by *Fusobacterium varium* isolated from colonic mucosa of patients with ulcerative colitis. *Gut.* 2003; 52(1):79-83.

---

<sup>clxxxix</sup> Huijsdens XW, Linskens RK, Taspinar H, Meuwissen SG, Vandenbroucke-Grauls CM, Savelkoul PH. *Listeria monocytogenes* and inflammatory bowel disease: detection of *Listeria* species in intestinal mucosal biopsies by real-time PCR. *Scand J Gastroenterol.* 2003; 38(3):332-3

<sup>clxxx</sup> Yin LJ1, Wu CW, Jiang ST. Bacteriocins from *Pediococcus pentosaceus* L and S from pork meat. *J Agric Food Chem.* 2003;51(4):1071-6.

<sup>clxxxi</sup> Asami, K., Kondo, A., Suda, Y., Shimoyamada, M., & Kanauchi, M. Neutralization of Lipopolysaccharide by Heat Shock Protein in *Pediococcus pentosaceus* AK-23. *Journal of Food Science.* 2017; 82(7), 1657–1663

## **XVIII. ANEXOS**

### **Artículo Publicado**



## ***P. pentosaceus* Administration Attenuates the Severity of Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis and Improve the Intestinal Permeability**

**Lorena Torres-Aguilar<sup>1</sup>, Lourdes Rodríguez-Fragoso<sup>1</sup> and Jorge Reyes-Esparza<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup>Facultad de Farmacia, Universidad Autonoma del Estado de Morelos, Mexico.

### **Authors' contributions**

This work was carried out in collaboration between all authors. Authors LTA, LRF and JRE designed the study, performed the statistical analysis, wrote the protocol, managed literatures researches, managed the analyses of the study and wrote the first draft of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

### **Article Information**

DOI: 10.9734/MRJI/2017/33126

Editor(s):

(1) Joao Lucio Azevedo, Department of Genetics, University of Sao Paulo, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ / USP), Sao Paulo, Brazil.

Reviewers:

(1) Anyanee Burodom, Thammasat University, Thailand.  
(2) Guillermo Tellez, University of Arkansas, USA.

Complete Peer review History: <http://www.sciencedomain.org/review-history/18730>

Original Research Article

Received 31<sup>st</sup> March 2017  
Accepted 18<sup>th</sup> April 2017  
Published 21<sup>st</sup> April 2017

### **ABSTRACT**

**Aims:** To evaluate the effect of different doses of *P. pentosaceus* on colitis symptoms as well as in the intestinal barrier function in an *in vivo* model of acute ulcerative colitis induced with dextran sodium sulfate (DSS).

**Study Design:** Experimental.

**Place and Duration of Study:** Laboratory of Pharmacology, Toxicology and Immunomodulators, Facultad de Farmacia, Universidad Autonoma del Estado de Morelos, Mexico, between march 2015 and December 2015.

**Methodology:** Acute colitis was induced in BALB/c mice via the administration of 3.5% DSS in drinking water administered ad libitum for 7 days. On day 2 during the induction of colitis, four groups received different doses of *Pediococcus pentosaceus* ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ , and  $1 \times 10^{10}$  Colony Forming Units (CFUs)) via gastric tube once per day. We assessed the severity of colitis

\*Corresponding author: E-mail: [jareyes@uam.mx](mailto:jareyes@uam.mx);

based on disease activity index (DAI), colon length and histological damage; colonic permeability to fluorescein isothiocyanate–dextran (FITC-dextran) was measured *in vivo*.  
**Results:** Treatment with *P. pentosaceus* at doses of  $1 \times 10^{10}$  significantly reduced the DAI compared with the DSS group ( $1.94 \pm 0.93$  vs.  $3.54 \pm 0.61$ ) and decreased the diarrhea score and fecal blood score ( $1.53 \pm 0.35$  vs.  $3.73$ ). *P. pentosaceus* improved colon length ( $8.81 \pm 0.95$  cm vs.  $7.26 \pm 0.67$  cm) and decreased intestinal permeability by 49.6% compared to the DSS group.  
**Conclusion:** The administration of *P. pentosaceus* at a dosage of  $1 \times 10^{10}$  CFUs attenuates the severity of DSS-induced colitis and improves epithelial barrier function.

**Keywords:** Ulcerative colitis; *Pediococcus pentosaceus*; probiotics; barrier function; permeability.

## 1. INTRODUCTION

Ulcerative colitis (UC) is a chronic disease characterized by diffuse inflammation of the mucosa of the colon and rectum. Its classic clinical symptom is bloody diarrhea, and its clinical course is characterized by periods of remission and exacerbation, which may occur either spontaneously or in response to treatment changes or intercurrent illnesses [1]. UC worldwide occurrence has increased over the past few years, and publications show an upsurge in developing countries across Latin America, Asia and Eastern Europe [2].

Extensive research has tried to determine pathogenic mechanisms and develop efficacious therapies. Four fundamental components underlying UC pathogenesis have been identified, and these represent likely sources for the yet undefined etiological factors: environment, microbiota, immune system, and genome [3-4]. While these studies have helped define the clinical course of UC, a safe and effective treatment remains elusive.

There is abundant evidence that commensal bacteria are involved in the pathogenesis of human ulcerative colitis as well as experimental colitis [5]. Many genetically susceptible models do not develop colitis when raised in a germ-free environment. In fact, disease in most models can be attenuated or completely abolished with antibiotic treatment [6-7].

Although no microorganism is directly associated with UC, there is a link between UC and profound changes in the diversity and composition of the microbiota [8]. The fecal microbiota of inflammatory bowel disease patients show a decrease in the frequency of the phyla *Bacteroidetes* and *Firmicutes* and an increase of *Proteobacteria* and *Actinobacteria* [9].

More specifically, UC patients subjected to molecular detection methods, but not controls, showed a greater prevalence of *Campylobacter* spp., *Enterobacteriaceae*, and enterohepatic *Helicobacter*. Additionally, serologic testing identified *Fusobacterium varium* as a potential contributor to intestinal inflammation in UC. Interestingly, *in-situ* hybridization studies have shown that anti-inflammatory *Lactobacillus* spp. and *Pediococcus* spp. were absent in samples from subjects affected by UC [10].

Consequently, interest in the therapeutic potential of microbiota modifications has increased. Probiotics are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, can confer health benefits to the host [11] and are considered a promising alternative therapy for UC. To date, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* [12], VSL#3 (a compound probiotic preparation composed of four *Lactobacilli* strains, three *Bifidobacteria* strains, and one *Streptococcus salivarius* strain) [13], and *Escherichia coli* (*E. coli* Nissle 1917 have been applied to UC subjects both animal models and human cases and effectively resolved disease symptoms). The degree to which probiotics can successfully resolve UC varies depending on the strain, dosage and time of administration, which has led to research on new bacteria with probiotic potential.

DSS-induced colitis in rodents is characterized by epithelial disruption, resulting in luminal bacterial translocation and subsequent infiltration of neutrophils and other acute immune cells. These features recapitulate the events that lead to the acute mucosal injury of human ulcerative colitis [14].

Many strains of lactic acid bacteria (LAB) are typically regarded as safe because of their long history of use, and their status is generally recognized as safe. In addition to demonstrating

the efficacy of probiotics in improving human health, safety characteristics must be considered. *Pediococcus pentosaceus* is a crucial industrial starter culture for food fermentation, such as various meats, vegetables, and cheeses [15]. There is evidence that *P. pentosaceus* possess probiotic properties [16-18]. However, these have yet to be assessed in the DSS-induced colitis model. The aim of this study is to evaluate the effect of different doses of *P. pentosaceus* on symptoms of colitis as well as in the intestinal barrier function in an *in vivo* model of acute colitis induced with dextran sodium sulfate.

## 2. MATERIALS AND METHODS

Eight-weeks-old male BALB/c mice were purchased from Harlan Laboratories, Mexico. The mice were allowed to adapt to their environment for 1 week, and kept in an environmentally controlled room with 12 h light-dark cycle at 25±1°C. All procedures were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Veterinary Medical School at the National Autonomous University of Mexico. Experiments were conducted following the rules and principles set in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.

### 2.1 Bacterial Strain and Culturing Conditions

*Pediococcus pentosaceus* were cultured anaerobically in MRS broth at 37°C for eight hours. The bacteria were harvested by centrifugation at 4°C, 5000 g for 10 min, washed in 0.89% of saline solution, resuspended in 10% of fat-free milk and was freeze-dried and stored at 4°C prior to use.

### 2.2 Experimental Design

#### 2.2.1 *Pediococcus pentosaceus* in healthy mice

Mice were divided into five groups (n=6/group): Control, *P. pentosaceus* (1x10<sup>4</sup>), *P. pentosaceus* (1x10<sup>5</sup>), *P. pentosaceus* (1x10<sup>6</sup>), *P. pentosaceus* (1x10<sup>7</sup>). *P. pentosaceus* was administered daily at different doses for 5 days (1x10<sup>4</sup>, 1x10<sup>5</sup>, 1x10<sup>6</sup> and 1x10<sup>7</sup> CFUs). During the study, the weight, stool consistency and any hemorrhaging were measured; the microscopic morphology of the colon was monitored.

Acute colitis was induced by DSS treatment using a method previously described by others

[19]. DSS was administered in the drinking water (3.5% w/v) for 7 days (DSS, molecular weight 40 kDa; Sigma Aldrich). The mice were then randomly divided into the following control and experimental model groups (n = 6 each one): negative-treatment model DSS (administered gavage of PBS); experimental-treatment models (administered gavage of 10<sup>7</sup>, 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, or 10<sup>10</sup> CFU/100 µl of *P. pentosaceus*, respectively). In the four DSS-induced colitis groups, *P. pentosaceus* was administered in different doses (1x10<sup>7</sup>, 1x10<sup>8</sup>, 1x10<sup>9</sup> or 1x10<sup>10</sup> CFUs respectively) by oral gavage, in sterile PBS and along with DSS, from day two until day six (*P. pentosaceus* +DSS). The colitis disease activity index (DAI) was determined based on previous studies of DSS-induced colitis [20]. No weight loss was counted as 0 points, weight loss of 1 to 5% as 1 point, 5 to 10% as 2 points, 10 to 20% as 3 points, and >20% as 4 points. For stool consistency, 0 points were given for well formed pellets, 2 points for pasty and semiformal stools that did not stick to the anus, and 4 points for liquid stools that did stick to the anus. Bleeding was scored 0 points for no blood in stool, 2 points for blood in stool, and 4 points for gross bleeding. These scores were added and divided by 3, forming a total clinical score that ranged from 0.0 (healthy) to 4.0 (maximal activity of colitis).

### 2.3 Permeability Essay

Twenty-one male BALB/c mice weighing 20–22 g were divided into three groups: the Control, Colitis and Colitis+ *P. pentosaceus* groups (n = 7 each). Acute colitis was induced by administering dextran sodium sulfate (DSS; molecular weight 40 kDa) 3.5% wt/vol in drinking water ad libitum for 6 days. On day 2 during colitis induction, the mice were intragastrically gavaged with *P. pentosaceus* (doses 1x10<sup>10</sup> Colony Forming Units). On the 7th day of the study, the intestinal permeability was measured via the determination of the fluorescence intensity of FITC-dextran (molecular weight 4.0 kDa, Sigma Aldrich- FD4) in serum after 4 hours of oral administration by spectrophotofluorometry with an excitation of 485 nm and an emission wavelength of 528 nm [21].

### 2.4 Histologic Analysis

Histological examination was performed for each animal on three samples of the distal colon; the tissues were fixed and embedded in paraffin using standard procedures, and the sections (5 µm) so obtained were stained with hematoxylin and eosin. Colon tissues were examined and



imaged using a Olympus IX81 microscope equipped with an camera.

All statistical analyses were carried out with the Graphpad software suite (version 16.0). Results are expressed as mean ± SEM. If the variance was homogeneous, single-factor analysis of variance (one-way ANOVA) was used to analyze the differences between groups.

**3. RESULTS AND DISCUSSION**

Healthy mice treated with different doses of *P. pentosaceus* ( $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ , and  $1 \times 10^{10}$

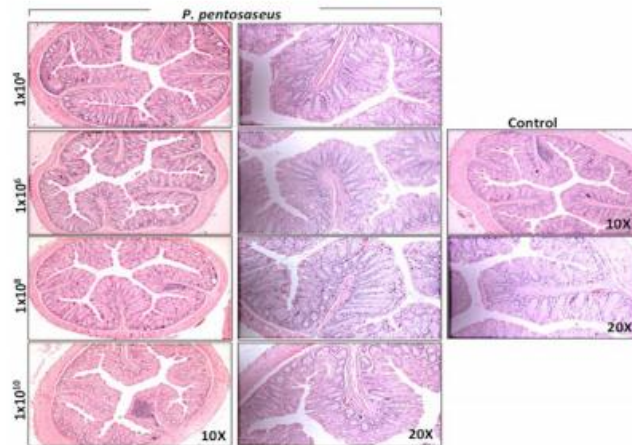
UFCs) showed no significant differences in the parameters evaluated (i.e., weight loss, colon length, changes in the consistency of feces with regards to the control group; Table 1). Similarly, no changes were identified in the colon histologies of *P. pentosaceus* pertaining to different doses. Lieberkühn crypts, goblet cells and enterocytes showed normal architecture and morphology when compared with the control group (Fig. 1).

In contrast to untreated control mice, mice exposed to DSS developed symptoms of acute colitis with diarrhea, rectal bleeding, wasting, and

**Table 1. Effects of different doses of *P. pentosaceus* treatment on weight, colon length, stool consistency and fecal blood in healthy BALB/c mice**

	<i>P. pentosaceus</i>				
	Control	$1 \times 10^4$	$1 \times 10^5$	$1 \times 10^6$	$1 \times 10^{10}$
Weight (g)	23.86 ± 0.79	23.44 ± 0.76	23.26 ± 1.14	22.92 ± 1.18	22.12 ± 0.97
Colonic length (cm)	11.28 ± 1.14	10.02 ± 0.45	10.04 ± 0.30	10.48 ± 0.30	10.36 ± 0.69
Stool consistency	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Fecal blood	0	0	0	0	0

Weight and colon length they are expressed as mean ± SEM; Stool consistency and Fecal blood data are expressed as median score (range). \* Indicates a significant difference compared to p<0.05 compared to control (n=6)



**Fig. 1. Effect of different doses of *P. pentosaceus* treatment on the histological morphology of the colon of BALB/c mice**

Representative photomicrographs stained with hematoxylin and eosin of the distal colon of five mice, each belonging to a different *P. pentosaceus* dosage group plus control group following 5-day treatment. The doses per group were  $1 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ , and  $1 \times 10^{10}$  CFUs (magnification 10x and 20x)

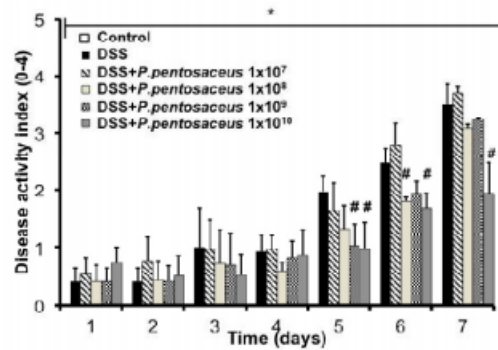
a loss of body weight. From the fourth day on, all groups exhibited a significantly higher DAI score during DSS treatment when compared to the healthy control group ( $p < 0.05$ ; Fig. 2). The results indicated no significant DAI difference in the DSS+ *P. pentosaceus*  $1 \times 10^7$ , DSS+ *P. pentosaceus*  $1 \times 10^8$ , and DSS+*P. pentosaceus*  $1 \times 10^9$  groups when compared with the DSS group. However, the DAI scores of animals in the DSS+*P. pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  group were significantly less than those of the DSS group ( $1.94 \pm 0.93$  vs.  $3.54 \pm 0.61$ ,  $p < 0.05$ ) on the last day of the study. This decrease in the DAI was due to a reduction in the diarrhea score in the DSS+*P. pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  group with respect to the DSS group ( $1.53 \pm 0.35$  vs.  $3.73$ ,  $p < 0.05$ ; Fig. 3), and a decrease in the fecal blood score starting on the 5th day of the study when compared to the DSS group ( $1.25 \pm 0.39$  vs.  $3.85$ ; Fig. 4). We observed no differences in body weight (data not shown).

The DSS-induced model of colitis is associated with a significant decrease in colon length [22]. All groups exhibited significant colon length reduction during DSS treatment when compared to the healthy control group ( $p < 0.05$ ). However, the DSS+ *P. pentosaceus*  $1 \times 10^{10}$  group had significantly improved upon colon length shortening when compared with the DSS group.

( $8.81 \pm 0.95$  cm vs.  $7.26 \pm 0.67$  cm,  $p < 0.05$ ; Fig. 5).

We analyzed the intestinal permeability to FITC-dextran, a fluorescein labelled dextran, in mice with colitis who were treated with *P. pentosaceus* at doses of  $1 \times 10^{10}$  UFC. The DSS group showed higher plasma levels of FITC-dextran 4 h after oral administration of FITC-dextran than the control group did, indicating the disruption of the intestinal barrier by DSS. At the same point, the plasma FITC-dextran levels in the *P. pentosaceus* + DSS group was lower than in the DSS group ( $p < 0.05$ ), and the level was approximately equal to that in the control group (Fig. 6). Thus, *P. pentosaceus* decreased the intestinal permeability caused by DSS.

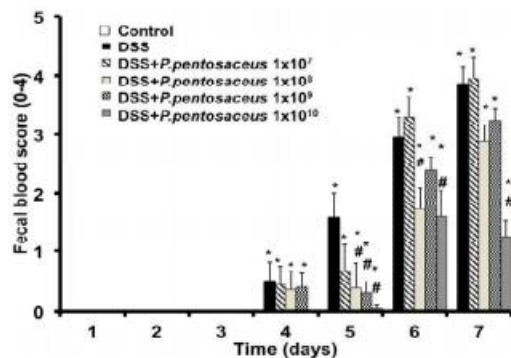
Once it was observed that treatment with *P. pentosaceus* delayed some symptoms of ulcerative colitis, we wondered whether *P. pentosaceus* affected colon morphology in an acute colitis model (Fig. 7). The mice in the control group showed a normal, orderly arrangement of the cellular structure of colonic tissue, with no perturbations in goblet cell number or mucosal integrity. In contrast, the DSS group presented changes: histological findings in colon tissue showed superficial inflammation mainly affecting the mucosa, as well as a loss of goblet cells; distortion of the crypts followed by



**Fig. 2.** Effect of different doses of *P. pentosaceus* treatment ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  and  $1 \times 10^{10}$  CFUs) on the disease activity index in DSS-induced colitis in BALB/c mice

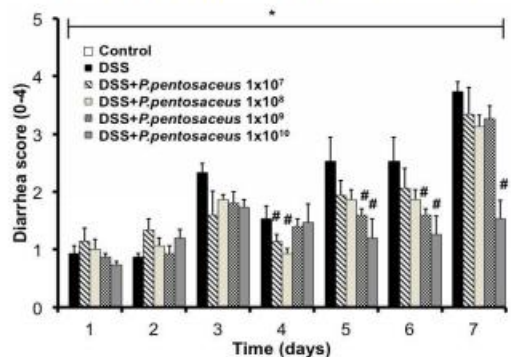
The treatment with *P. pentosaceus* was administered on second day of DSS-induced colitis. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* mean value was significantly different from that of the Control group ( $p < 0.05$ ), # mean value was significantly different from that of the DSS group ( $p < 0.05$ ) ( $n=6$ )

shortening of the same, and infiltration of inflammatory cells in the mucosa and submucosa. *P. pentosaceus* at the doses ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  and  $1 \times 10^{10}$  CFUs) showed a loss of crypt architecture and goblet cells in the mucosa accompanied by a cellular infiltrate, however, in comparison to DSS group, these groups did not show an increase in the size of the submucosa the damage only extended in the mucosal area and muscularis mucosae.



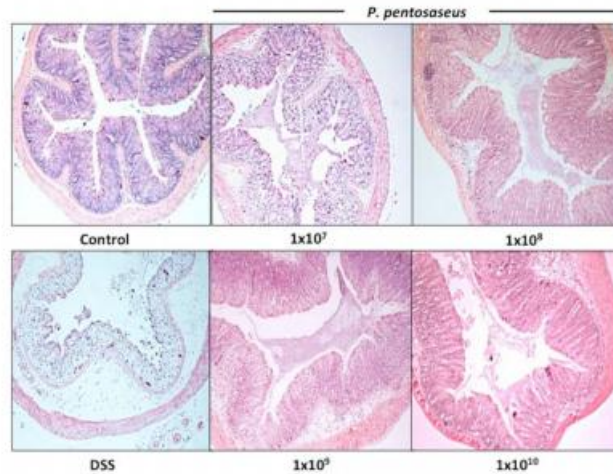
**Fig. 3.** Effect of different doses of *P. pentosaceus* ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  and  $1 \times 10^{10}$  CFUs) on the diarrhea score of DSS-induced colitis in BALB/c mice

The treatment with *P. pentosaceus* was administered on second day of DSS-induced colitis. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* mean value was significantly different from that of the Control group ( $p < 0.05$ ), # mean value was significantly different from that of the DSS group ( $p < 0.05$ ) ( $n=6$ )



**Fig. 4.** Effect of different doses of *P. pentosaceus* ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  and  $1 \times 10^{10}$  CFUs) on fecal blood in DSS-induced colitis in BALB/c mice

The treatment with *P. pentosaceus* was administered on second day of DSS-induced colitis. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \* mean value was significantly different from that of the Control group ( $p < 0.05$ ), # mean value was significantly different from that of the DSS group ( $p < 0.05$ ) ( $n=6$ )



**Fig. 7. Effect of different doses of *P. pentosaceus* ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  and  $1 \times 10^{10}$  CFUs) on the histological morphology of the colon of BALB/c mice with colitis induced-DSS**

The treatment with *P. pentosaceus* was administered on second day of DSS-induced colitis. Stained with Hematoxylin and Eosin (magnification 10x)

Several experimental models of colitis show probiotics have therapeutic and prophylactic effects [23-25]. According to these studies, the administration of probiotic bacteria can improve the symptomatology and pathology in animals; the most frequently used bacterial species are *Lactobacillus* and *Bifidobacterium*. Mixtures of bacterial strains, such as probiotic VSL # 3, have also been used for the same purpose [26]. Although no microorganism is directly associated with ulcerative colitis, dysbiosis has been found in both patients and *in vivo* models of colitis. Specifically, studies on patients have shown a decrease in the *Lactobacillus* and *Pediococcus* species [10].

The probiotic effect of certain strains of *P. pentosaceus* has demonstrated immunomodulatory effects [27-29]. However, these have not been tested on an acute DSS-induced colitis model, which this study addresses.

Acute sub-chronic and chronic toxicity studies have been performed on some currently employed probiotics and no adverse effects have

been found. This includes high oral dosages and consistent use for long periods of time [30-34]. Since not all the probiotics have the same therapeutic characteristics, we decided to evaluate the effect of different oral doses of *P. pentosaceus* ( $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  and  $1 \times 10^{10}$  UFCs). As expected, administration of the bacteria did not modify body weight, stool consistency or the microscopic structure of the colon, so we concluded *P. pentosaceus* is safe and could be employed as a possible treatment in a model of colitis.

One of the aspects to consider regarding the study of probiotics is the dose at which it is to be evaluated. It has been reported that the effect of a microorganism can vary depending on the administered dose. For example, the administration of different doses of *Lactobacillus acidophilus* ( $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  and  $10^8$  CFUs / 10g) in a murine model of DSS-induced acute colitis decreased disease activity index, protected against weight loss and the shortening of the colon. However, the dose with the greatest effect in this model was  $1 \times 10^8$  CFUs / 10 g [35].

Hence the importance of evaluating the effect of *P. pentosaceus* at different doses in a model of DSS-induced ulcerative colitis.

Our study shows that the effect of *P. pentosaceus* is dose dependent. A dose of  $1 \times 10^{10}$  CFUs was able to reduce the disease activity index, delaying the onset of diarrhea and hemorrhage; lower doses had no visible effect. Also, the dose of  $1 \times 10^{10}$  CFUs helped prevent the colon shortening associated with DSS, decreased intestinal permeability to FITC-dextran, and structurally improved the microscopic architecture of the colon. Although the  $1 \times 10^{10}$  dose of *P. pentosaceus* had beneficial effects in animals with DSS-induced colitis, it did not change the weight of these group. Other studies, such as Izumi et al, have obtained similar results following the administration of *bifidobacterium* [36]. Further studies must quantify food consumption. If this is being modified, this would indicate a possible metabolic effect.

Future studies need to increase the *P. pentosaceus* dose to identify the optimal, most effective dose in this model. The results show that *Pedococcus pentosaceus* is capable of decreasing UC activity as well as anatomopathological alterations.

The DSS-induced colitis model is the most widely used for *in vivo* studies and allows us to evaluate various aspects of mucosal barrier integrity as well as its function [22]. Microscopically it was observed that the treatment with *P. pentosaceus* partially restored the architecture of the distal colon; areas of the epithelium preserved the distribution of well-defined Lieberkühn crypts. This effect was observed in doses of  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$   $1 \times 10^{10}$ .

We wondered what the mechanism of action would be, since probiotics exert their effect via different ones. First, they act as a barrier via competitive inhibition, which prevents other pathogenic bacteria from reaching the lamina propria and stimulating the immune system of the mucosa. Second, probiotics increase the production and thickness of mucus, which protects against invasive bacteria, and probiotics can alter the consistency of mucus, thus changing the patterns of bacterial adhesion. Third, probiotics modulate the immune system by exerting an anti-inflammatory and less pro-inflammatory effect, as well as secreting protective immunoglobulins like IgA [37].

Studies on patients with ulcerative colitis and experimental models of colitis have shown an increase in intestinal permeability due to the decrease in the expression and distribution of the proteins of tight junctions like ZO-1 and Occludin. After observing *P. pentosaceus* improved the symptoms of colitis at a dosage of  $1 \times 10^{10}$  UCFs, we decided to evaluate its effect on the intestinal epithelial barrier function, where a decrease in intestinal permeability to FITC-dextran was observed in the DSS-induced model of colitis. This indicates that *P. pentosaceus* is increasing the intestinal barrier function. In a murine model of DSS-induced colitis, oral administration of VSL # 3 probiotic improved intestinal barrier function because decreased the intestinal permeability by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis [38], the probiotic VSL # 3 consists of a set of 8 strains that acted synergistically to exert the effect of intestinal epithelial barrier protection. Our probiotic *P. pentosaceus* was able to modify this function, showing a similar effect to decrease the permeability to FITC / dextran, so it is necessary to study if it has an effect on the expression and distribution of the tight junction proteins.

#### 4. CONCLUSION

In conclusion, the administration of *P. pentosaceus* at a dose of  $1 \times 10^{10}$  CFUs lessens the severity of DSS-induced colitis and improves epithelial barrier function. It is safe and does not cause gastrointestinal disorders. However, the mechanisms through which *P. pentosaceus* improves the structure and function of the intestinal barrier need to be studied in depth. We also need to address whether this strain has any immunoregulatory effect on this model.

#### ETHICAL APPROVAL

All authors hereby declare that "principles of laboratory animal care" (nih publication no. 85-23, revised 1985) were followed, as well as specific national laws where applicable. All experiments have been examined and approved by the appropriate ethics committee.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the support from Francisco Garcia Vazquez of Dept of Pathology of INP, for his assistance in histological analysis.

#### COMPETING INTERESTS

Authors have declared that no competing interests exist.

## REFERENCES

1. Kornbluth A, Sachar DB. Ulcerative colitis practice guidelines in adults: American College of Gastroenterology, Practice Parameters Committee. *Am J Gastroenterol.* 2010;105:501–523; quiz 524.  
DOI: 10.1038/ajg.2009.727
2. Da Silva BC, Lyra AC, Rocha R, Santana GO. Epidemiology, demographic characteristics and prognostic predictors of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol.* 2014;20(28):9458-67.  
DOI: 10.3748/wjg.v20.i28.9458
3. Sartor RB. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2006;3:390-407.  
DOI: 10.1038/ncpgasthep0528
4. Kaser A, Zeissig S, Blumberg RS. Inflammatory bowel disease. *Annu Rev Immunol.* 2010;28:573-62.  
DOI: 10.1146/annurev-immunol-030409-101225
5. Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2008;134(2):577-94.  
DOI: 10.1053/j.gastro.2007.11.059
6. Eckburg PB, Relman DA. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin. Infect. Dis.* 2007;44:256–262.  
DOI: 10.1086/510385
7. Ploquin JM, Nguyen DD. The microbiota and inflammatory bowel disease: Insights from animal models. *Anaerobe.* 2013; 24:102-6.  
DOI: 10.1016/j.anaerobe.2013.04.006
8. Macfarlane GT, Blackett KL, Nakayama T, Steed H, Macfarlane S. The gut microbiota in inflammatory bowel disease. *Current Pharmaceutical Design.* 2009;15(13): 1528–36.  
DOI: 10.1038/nrgastro.2012.152
9. Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci.* 2007;104(34):13780–5.  
DOI: 10.1073/pnas.0706625104
10. Sasaki M, Klapproth JM. The role of bacteria in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J Signal Transduct.* 2012;2012: 704953.  
DOI: 10.1155/2012/704953
11. Pineiro M, Stanton C. Probiotic bacteria: legislative framework requirements to evidence basis. *J Nutr.* 2007;137:850S–3S.
12. Imaoka A, Shima T, Kato K, Mizuno S, Uehara T, Matsumoto S, Setoyama H, Hara T, Umesaki Y. Anti-inflammatory activity of probiotic *Bifidobacterium*: enhancement of IL-10 production in peripheral blood mononuclear cells from ulcerative colitis patients and inhibition of IL-8 secretion in HT-29 cells. *World J Gastroenterol.* 2008;14:2511-2516.  
DOI: 10.3748/wjg.14.2511
13. Miele E, Pascarella F, Giannetti E, Quaglietta L, Baldassano RN, Staiano A. Effect of a probiotic preparation (VSL#3) on induction and maintenance of remission in children with ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol.* 2009;104(2):437-43.  
DOI: 10.1038/ajg.2008.118
14. Okayasu I, Hatakeyama S, Yamada M, Ohkusa T, Inagaki Y, Nakaya R. A novel method in the induction of reliable experimental acute and chronic ulcerative colitis in mice. *Gastroenterology.* 1990;98: 694–702.
15. Riebel WJ, Washington JA. Clinical and microbiologic characteristics of pediococci. *J Clin Microbiol.* 1990;28(6):1348-55.
16. Lv LX, Hu XJ, Qian GR, Zhang H, Lu HF, Zheng BW, Jiang L, Li LJ. Administration of *Lactobacillus salivarius* LI01 or *Pediococcus pentosaceus* LI05 improves acute liver injury induced by D-galactosamine in rats. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98(12):5619-32.  
DOI: 10.1007/s00253-014-5638-2
17. Masuda T, Kimura M, Okada S, Yasui H. *Pediococcus pentosaceus* Sn26 inhibits IgE production and the occurrence of ovalbumin-induced allergic diarrhea in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010; 74(2):329-35.  
DOI: 10.1271/bbb.90656
18. Dubey V, Ghosh AR, Bishayee K, Khuda-Bukhs AR. Probiotic *Pediococcus pentosaceus* strain GS4 alleviates azoxymethane-induced toxicity in mice. *Nutr Res.* 2015;35(10):921-9.  
DOI: 10.1016/j.nutres.2015.08.001
19. Saksena S, Goyal S, Raheja G, Singh V, Akhtar M, Nazir TM, et al. Upregulation of P-glycoprotein by probiotics in intestinal epithelial cells and in the dextran sulfate sodium model of colitis in mice. *Am J*

- Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2011; 300(6):G1115-23.  
DOI: 10.1152/ajpgi.00027.2011.
20. Siegmund B, Rieder F, Albrich S, Wolf K, Bidlingmaier C, Firestein GS, et al. Adenosine kinase inhibitor GP515 improves experimental colitis in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001;296:99-105.
  21. Gupta J, Nebreda AR. Analysis of Intestinal Permeability in mice. *Bioprotocol*, 2014;4:22.  
DOI: doi.org/10.21769/BioProtoc.1289
  22. Chassaing B, Aitken JD, Malleshappa M, Vijay-Kumar M. Dextran Sulfate Sodium (DSS)-induced colitis in mice. *Curr Protoc Immunol.* 2014;104:Unit 15.25.  
DOI: 10.1002/0471142735.im1525s104
  23. Feighery LM, Smith P, O'Mahony L, Fallon PG, Brayden DJ. Effects of *Lactobacillus salivarius* 433118 on intestinal inflammation, immunity status and *in vitro* colon function in two mouse models of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci.* 2008;53(9):2495-506.  
DOI: 10.1007/s10620-007-0157-y
  24. Chen LL, Zou YY, Lu FG, Li FJ, Lian GH. Efficacy profiles for different concentrations of *Lactobacillus acidophilus* in experimental colitis. *World J Gastroenterol.* 2013;19(32):5347-56.  
DOI: 10.3748/wjg.v19.i32.5347
  25. Srutkova D, Schwarzer M, Hudcovic T, Zakostelska Z, Drab V, Spanova A, Rittich B, Kozakova H, Schabussova I. *Bifidobacterium longum* CCM 7952 Promotes epithelial barrier function and prevents acute DSS-induced colitis in strictly strain-specific manner. *PLoS One.* 2015;10(7):e0134050.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0134050
  26. Peran L, Camuesco D, Comalada M, Bailon E, Henriksson A, Xaus J, Zarzuelo A, Galvez J. A comparative study of the preventative effects exerted by three probiotics, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus*, in the TNBS model of rat colitis. *J Appl Microbiol.* 2007;103:836-844.
  27. Jonganurakkun B, Wang Q, Xu SH, Tada Y, Minamida K, Yasokawa D, Sugi M, Hara H, Asano K. *Pediococcus pentosaceus* NB-17 for probiotic use. *J Biosci Bioeng.* 2008;106(1):69-73.  
DOI: 10.1263/jbb.106.69
  28. Shukla R, Goyal A. Probiotic Potential of *Pediococcus pentosaceus* CRAG3: A new isolate from fermented cucumber. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2014; 6(1):11-21.  
DOI: 10.1007/s12602-013-9149-8
  29. Ozlem O, Fadime K, Fuat C, Yagci IG. Immunomodulatory function and *in vivo* properties of *Pediococcus pentosaceus* OZF, a promising probiotic strain *Annals of Microbiology.* 2013;63(4):1311-1318.  
DOI: 10.1007/s13213-012-0590-9
  30. Masuda T, Kimura M, Okada S, Yasui H. *Pediococcus pentosaceus* Sn26 inhibits IgE production and the occurrence of ovalbumin-induced allergic diarrhea in mice. *Biosci Biotechnol Biochem.* 2010; 74(2):329-35.  
DOI: 10.1271/bbb.90656
  31. Sanders ME, Akkermans LM, Haller D, Hammerman C, Heimbach J, Hörmannspurger G, Huys G, Levy DD, Lutgendorff F, Mack D, Phothirath P, Solano-Aguilar G, Vaughan E. Safety assessment of probiotics for human use. *Gut Microbes.* 2010;1(3):164-85.  
DOI: 10.4161/gmic.1.3.12127
  32. Lara-Villoslada F, Sierra S, Diaz-Ropero MP, Olivares M, Xaus J. Safety assessment of the human milkisolated probiotic *Lactobacillus salivarius* CECT5713. *J Dairy Sci.* 2007;90:3583-9.  
DOI: 10.3168/jds.2006-685
  33. Asahara T, Takahashi M, Nomoto K, Takayama H, Onoue M, Morotomi M, et al. Assessment of safety of lactobacillus strains based on resistance to host innate defense mechanisms. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2003;10:169-73.  
DOI: 10.1128/CDLI.10.1.169-173.2003
  34. Solano G, Dawson H, Restrepo M, Andrews K, Vinyard B, Urban JF Jr. Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis (Bb12) in the intestine after feeding of sows and their piglets. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:6338-47.  
DOI: 10.1128/AEM.00309-08
  35. Collado MC, Grzeskowiak L, Salminen S. Probiotic strains and their combination inhibit *in vitro* adhesion of pathogens to pig intestinal mucosa. *Curr Microbiol.* 2007; 55:260-5.
  36. Izumi H, Minegishi M, Sato Y, Shimizu T, Sekine K, Takase M. *Bifidobacterium breve* alters immune function and

- ameliorates DSS-induced inflammation in weanling rats. *Pediatr Res.* 2015; 78(4):407-16.  
DOI: 10.1038/pr.2015.115
37. Marteau P, Shanahan F. Basic aspects and pharmacology of probiotics: An overview of pharmacokinetics, mechanisms of action and side-effects. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003; 17(5):725-40.  
DOI: 10.1016/S1521-6918(03)00055-6
38. Mennigen R, Nolte K, Rijcken E, Utech M, Loeffler B, Senninger N, Bruewer M. Probiotic mixture VSL#3 protects the epithelial barrier by maintaining tight junction protein expression and preventing apoptosis in a murine model of colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2009;296(5):G1140-9.  
DOI: 10.1152/ajpgi.90534.2008

© 2017 Torres-Aguilar et al.; This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

*Peer-review history:*

The peer review history for this paper can be accessed here:  
<http://sciencedomain.org/review-history/18730>





VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Lorena Julieta Torres Aguilar

Título de la tesis: Evaluación del efecto de *Pectinacarus pentavaccus* sobre la función de barrera intestinal en un modelo *in vivo* de colitis ulcerosa aguda

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Delia Vanessa López Guerrero

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

[Firma]  
Firma del miembro del jurado

03/Mayo/2019  
Fecha



VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Lorena Julieta Torres Aguilar

Título de la tesis: Evaluación del efecto de *Pentamocin* sobre la lengua de baricna ratificando en un modelo in vivo de colitis ulcerosa aguda

Grado a obtener:  
 Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Patricia González Maya  
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:  
La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

Firma del miembro del jurado

29 Abril 2019  
Fecha



VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Laura Leticia Torres Aguilar

Título de la tesis: Evaluación del efecto de Pedicularis peruviana sobre la función de barrera intestinal en un modelo in vivo de colitis ulcerosa aguda

Grado a obtener:  
 Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Judith González Chuska  
La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:  
La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

[Firma]  
Firma del miembro del jurado

23/abril/2019  
Fecha



VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Lucero Julieta Torres Aguilar

Título de la tesis: Evaluación del efecto de *Psilocybe gonzalezii* sobre la función de barrera intestinal en un modelo *in vivo* de colitis ulcerosa aguda

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Lourdes Rodríguez Triguero

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

  
Firma del miembro del jurado

29 Abril 2019  
Fecha



VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Josana Julieta Torres Aguilera

Título de la tesis: "Evaluación del efecto de *Rachococcus pentasternus* sobre la función de barrera intestinal en un modelo in vivo de colitis ulcerosa aguda"

Grado a obtener:

- Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra Verónica Rodríguez López

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

- Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

[Firma]  
Firma del miembro del jurado

29/04/2019  
Fecha



**VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: Laura Julieta Torres Aguilar

Título de la tesis: "Evaluación del efecto de *Pediococcus pentasporus* sobre la función de barrera intestinal en un modelo de colitis ulcerosa aguda"

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Vicente Madrid Marín

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): Ninguna

  
Firma del miembro del jurado

22.05.2019  
Fecha



VOTO APROBATORIO  
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA  
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM

Nombre del alumno: Lorena Julieta Torres Aguilar

Título de la tesis: Evaluación del efecto de Reducciones porcentuales sobre la función de barrera intestinal en un modelo in vivo de colitis ulcerosa aguda

Grado a obtener:

Maestría en Farmacia  
 Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Alfonso Leizaola

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

Si se aprueba tal como se presenta  
 Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo):

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

[Firma]  
Firma del miembro del jurado

29/04/19  
Fecha