



Universidad de Concepción
Dirección de Postgrado
Facultad de Ciencias Biológicas
Programa de Doctorado en Ciencias Mención Microbiología

**DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD
INMUNOMODULADORA DE *Lactobacillus fermentum*
UCO-979C Y SU EFECTO EN LA INFECCIÓN POR
*Helicobacter pylori***

POR

VALERIA CATALINA GARCÍA CASTILLO

Tesis presentada a:
Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción
Para optar al Grado de:
Doctor en Ciencias, Mención Microbiología

Profesor Guía: Apolinaria García Cancino
Profesor Co-Guía: Julio Villena

CONCEPCIÓN-CHILE
Enero 2021

Esta tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad de Concepción.

Profesores integrantes Comisión Evaluadora:

Dra. Apolinaria García Cancino

Profesor Guía de Tesis
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



Dr. Julio Villena

Profesor Co-Guía de Tesis
Centro de Referencia para Lactobacilos CERELA
CONICET- Argentina

Dr. Angel Oñate Contreras

Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Homero Urrutia Briones

Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción

Dr. Martín Gotteland

Profesor Evaluador Externo
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Dr. Victor Campos A.

Director Programa Doctorado
Facultad de Ciencias Biológicas
Universidad de Concepción



Tesis financiada por

INNOVA Chile- Corfo: “Desarrollo de un producto probiótico no lácteo para la prevención de patologías asociadas a *Helicobacter pylori*”, código 14IDL2-29744

CONICYT-PCHA/ Doctorado Nacional 2015-2115060

ANPCyT–FONCyT (Argentina): PICT-2013-3219 and PICT-2016-0410

**JSPS Core-to-Core Program Advanced Research Networks (Japón):
"Establishment of international agricultural immunology research-core for a quantum improvement in food safety".**

AGRADECIMIENTOS

Difícil resumir, un agradecimiento para todas las personas que contribuyeron en este proceso. En primer lugar a Dios, sin el nada sería posible. A mi familia, incansable compañía en este largo camino de jornadas en el laboratorio, fines de semana de trabajo, separación durante las pasantías doctorales, celebración con cada una de las publicaciones aceptadas, etc. A mi paciente y confidente esposo, quien me motivó desde el inicio y nunca permitió que me rindiera, sin duda mi mayor soporte en este largo proceso; a mi madre, que siempre encendía una velita para cada uno de mis propósitos; a mi padre que desde lejos siempre ha sido orgulloso de su hija y a mi pequeña Victoria, quien fue paciente durante el proceso de escritura del manuscrito (creo que aprendió conmigo desde la barriguita). Pudo haber concluido antes este proceso, pero la maternidad cambió mi panorama y aunque no fue fácil escribir en medio de la crianza, siento que ha sido un logro de toda la familia.

Agradezco a la profesora Apolinaria García por abrir las puertas de su laboratorio a una extranjera que llevaba años fuera de las aulas, gracias por creer en mí y gracias por comprender nuestras necesidades como estudiantes. Sin duda tuve la oportunidad de conocer buenas personas en el laboratorio de patogenicidad bacteriana los cuales considero buenos compañeros, buenos amigos (María José, Mario, Alejandra, Sixta, Romina, Jonathan, Eileen, Enrique, Ana María). Gracias a Cristian y a Olga por su apoyo logístico en el laboratorio y a los auxiliares del programa de Microbiología por apoyarnos en nuestra labor.

Al Dr. Julio Villena, gracias por su orientación, por su paciencia y ante todo por su apoyo como co-tutor y como persona, gracias por permitirme trabajar en colaboración con CERELA y con la Universidad de Tohoku, por su confianza y sus enseñanzas. A los becarios de CERELA Patricia Clua, Leonardo Albarracin, Guillermo Marcial que colaboraron en la realización de este estudio, además de ser un apoyo durante mi estancia y la elaboración de los manuscritos.

Al Dr. Haruki Kitazawa, quien me adoptó en su familia de “Happy Science”, me hizo sentir en casa aunque estaba al otro lado del mundo; gracias por confiar en mí, por el respaldo del Food and Feed immunology group en la realización de parte de mis experimentos y la publicación de los resultados. Agradecimientos para Yuhka, Nana, Mizuno, Zhou, Indoh, Takagi, Komatsu, Manami, quienes en ocasiones tuvieron que ir a trabajar para que yo pudiera ingresar al laboratorio, me enseñaron el flujo de trabajo en el laboratorio y fueron los mejores colaboradores en mi

estancia en Japón.

Gracias al laboratorio de Bioquímica clínica de la facultad de Farmacia, en especial al Dr. Felipe Zuñiga y la Dra Valeska Ormazabal, quienes también permitieron el acceso a sus laboratorios y facilitaron algunas líneas celulares para este trabajo; a Pedro, Bárbara siempre dispuestos a colaborar.

Agradezco al Dr. Homero Urrutia quien siempre tuvo espacio para conversaciones sobre la vida y permitió el acceso a equipos de su laboratorio para la realización de esta tesis.

Agradezco al Dr. Oñate, quien me recibió como director de programa y permitió todas las gestiones para iniciar mis estudios con beca del programa, sin ello probablemente no hubiese podido continuar. Además, gracias por exigirme y guiarme a entender un poco más de la inmunología.

Agradezco al Dr Victor Campos por siempre estar atento como director de programa y colaborar en la obtención de becas, apoyo a eventos y extensión. Por supuesto no sería posible sin la gestión de las secretarías de postgrado Margareth y Paula para quienes también muchos agradecimientos.

Agradecimientos incansables a la beca de Doctorado Nacional 2015-2115060, CONICYT. Sin este apoyo económico no hubiese sido posible, permanecer en el doctorado, realizar pasantías, participar en eventos científicos, adquirir insumos para la tesis.

Gracias a la JSPS, core to core program por su respaldo durante la realización de mi pasantía en la Universidad de Tohoku.

Gracias a mis amistades, Carolina, Nadia, Carla, Yudy; siempre atentas de mi evolución, siempre ofreciendo los mejores deseos y el apoyo emocional necesario para completar esta etapa.

A todos mi mayor gratitud.



TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	X
ÍNDICE DE TABLAS	XIII
LISTA DE ABREVIATURAS	XIV
RESUMEN	XVII
ABSTRACT.....	XX
CAPITULO I	XXII
INTRODUCCIÓN	XXII
I. I PROBIOTICOS.....	2
I.II INMUNOMODULACION POR CEPAS PROBIÓTICAS.....	6
I.II.I Sistema inmune.....	6
I.II.II Componentes Microbianos.....	10
I.II.III Microorganismos con actividad inmunomoduladora.....	12
CAPITULO II	21
I.II <i>Helicobacter pylori</i> : ASPECTOS GENERALES.....	22
II.II PATOGÉNESIS Y RESPUESTA INMUNE FRENTE A <i>H. pylori</i>	24
II.III TRATAMIENTO	30
II.III.I PROBIÓTICOS EN LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i>	32
II.III.I.I <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C: PROBIÓTICO CON ACTIVIDAD EN LA INFECCIÓN POR <i>H. pylori</i>	36
CAPITULO III	39
HIPOTESIS, OBJETIVO GENERAL Y OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
CAPITULO IV	41
<i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C BENEFICIALLY MODULATES THE INNATE IMMUNE RESPONSE TRIGGERED BY <i>HELICOBACTER PYLORI</i> INFECTION <i>IN VITRO</i>	41
ABSTRACT.....	42
INTRODUCTION	43
MATERIALS AND METHODS.....	44
RESULTS	46
DISCUSSION	57

REFERENCES	64
CAPITULO V	68
THE EXOPOLYSACCHARIDE OF <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C IS PARTIALLY INVOLVED IN ITS IMMUNOMODULATORY EFFECT AND ITS ABILITY TO IMPROVE THE RESISTANCE AGAINST <i>Helicobacter pylori</i> INFECTION.....	68
ABSTRACT.....	69
INTRODUCTION	70
MATERIALS AND METHODS.....	71
RESULTS	76
DISCUSSION	91
REFERENCES	98
CAPITULO VI	103
EVALUATION OF THE IMMUNOMODULATORY ACTIVITIES OF THE PROBIOTIC STRAIN <i>Lactobacillus fermentum</i> UCO-979C.....	103
ABSTRACT.....	104
INTRODUCTION	105
MATERIALS AND METHODS.....	106
RESULTS	111
DISCUSSION	125
REFERENCES	133
DISCUSIÓN GENERAL.....	137
CONCLUSIONES	187
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	190
SOBRE EL AUTOR	219
I. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN	219
II. GENOME ANNOUNCEMENTS.....	221
III. ARTICULO DE REVISIÓN	221
IV. CAPITULO DE LIBRO	221
V. SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION	221
VI. PARTICIPACIÓN EN EVENTOS	222

ÍNDICE DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura 1. Comunicación en el sistema inmune de mucosas

Figura 2. Subtipos de células T colaboradoras

Figura 3. Resumen de la evidencia recopilada en la literatura sobre la actividad de bacterias probióticas sobre diferentes componentes del sistema inmune. **A.** Sistema Inmune en Mucosas. **B.** Sistema inmune sistémico.

Figura 4. Esquema de la respuesta inmune frente a *H. pylori*

CAPITULO IV

Figure 1. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on viability and cytotoxicity of human gastric epithelial cells (AGS cells).

Figure 2. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on cytokine production of human Gastric epithelial cells (AGS cells).

Figure 3. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on viability and cytotoxicity of human macrophages (THP-1 cells).

Figure 4. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on cytokine production of human macrophages (THP-1 cells).

Figure 5. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric epithelial cells (AGS cells).

Figure 6. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on viability and cytotoxicity of human gastric epithelial cells (AGS cells) after the challenge with *Helicobacter pylori*.

Figure 7. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on cytokine production of human gastric epithelial cells (AGS cells) after the challenge with *Helicobacter pylori*.

Figure 8. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on viability and cytotoxicity of human macrophages (THP-1 cells) after the challenge with *Helicobacter pylori* or LPS.

Figure 9. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on cytokine production of human macrophages (THP-1 cells) after the challenge with *Helicobacter pylori* or LPS.

CAPITULO V

Figure 1. Effect of viable *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 on gastric colonization of *H. pylori* SS1.

Figure 2. Effect of viable *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 in the gastric inflammatory response of competent adult mice infected with *H. pylori* SS1.

Figure 3. Effect of viable *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 on gastric cytokines and chemokines in *H. pylori* SS1-infected mice.

Figure 4. Effect of viable *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 on serum cytokines in adult immunocompetent mice infected with *H. pylori* SS1.

Figure 5. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C EPS pre-incubation on *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric epithelial cells (AGS cells) challenged with *H. pylori*.

Figure 6. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS on cytokine and chemokine production of human gastric epithelial cells (AGS cells).

Figure 7. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS on cytokine and chemokine production of human macrophages (THP-1 cells).

Figure 8. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS on the cytokine and chemokine production of human gastric epithelial cells (AGS cells) after *Helicobacter pylori* challenge.

Figure 9. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS on cytokine and chemokine production of human macrophages (THP-1 cells) after *Helicobacter pylori* challenge.

Figure 10. Effect of *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS on gastric colonization of *H. pylori* SS1.

Figure 11. Effect of *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS on gastric cytokines and chemokines in adult immunocompetent mice infected with *H. pylori* SS1.

Figure 12. Effect of *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS on serum cytokines and chemokines in adult immunocompetent mice infected with *H. pylori* SS1.

DISCUSIÓN

Figura 1. Respuesta inmune frente a la infección por *H. pylori* en células AGS (a). Efecto de *L. fermentum* UCO-979C viable (b), exopolisacárido (c), en la infección por *H. pylori* en células AGS.

Figura 2. Respuesta inmune frente a la infección por *H. pylori* en macrófagos THP-1 (a). Efecto de *L. fermentum* UCO-979C viable (b), exopolisacárido (c), en la infección por *H. pylori* en macrófagos THP-1.

Figura 3. Respuesta inmune frente a *H. pylori*. Efecto de *L. fermentum* UCO-979C viable (b), exopolisacárido (c) en la respuesta inmune local y sistémica en la infección por *H. pylori*.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Factores de virulencia relacionados con la patogenicidad mediada por *H. pylori*.

Tabla 2. Resumen evidencia de la actividad inmunomoduladora de cepas probióticas sobre *H. pylori*.



LISTA DE ABREVIATURAS

<i>A20</i>	<i>TNF Alpha Induced Protein 3</i>
<i>AGS</i>	<i>Human gastric adenocarcinoma epithelial cells</i>
<i>AP-1</i>	<i>Activator protein 1</i>
<i>ASIR</i>	<i>Age Standardized Incidence Rate</i>
<i>ATCC</i>	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>BabA</i>	<i>Blood Group Antigen-Binding Adhesin</i>
<i>BAL</i>	<i>Bacterias ácido lácticas</i>
<i>Bcl3</i>	<i>B-cell lymphoma 3-encoded protein</i>
<i>BHI</i>	<i>Brain Heart Infusion</i>
<i>BSA</i>	<i>Bovine serum albumin</i>
<i>C1R</i>	<i>Complement component 1R</i>
<i>C1S</i>	<i>Complement component 1S</i>
<i>C3</i>	<i>Complement component 3</i>
<i>CagA</i>	<i>Cytotoxin-associated gene A</i>
<i>CCL8</i>	<i>Chemokine (C-C motif) ligand 8</i>
<i>cDNA</i>	<i>Complementary deoxyribonucleic acid</i>
<i>CEACAM</i>	<i>Carcinoembryonic antigen-related adhesion molecules</i>
<i>CFB</i>	<i>Complement factor B</i>
<i>COX2</i>	<i>Ciclooxigenasa 2</i>
<i>CPA</i>	<i>Célula presentadora de antígenos</i>
<i>CXCL10</i>	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 10</i>
<i>CXCL11</i>	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 11</i>
<i>CXCL5</i>	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 5</i>
<i>CXCL9</i>	<i>Chemokine (C-X-C motif) ligand 9</i>
<i>DC</i>	<i>Dendritic cells/Células dendríticas</i>
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's modified Eagles Medium</i>
<i>E2F1</i>	<i>E2F transcription factor 1</i>
<i>ELISA</i>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
<i>ETEC</i>	<i>Enterotoxigenic Escherichia coli</i>
<i>F3</i>	<i>Coagulation Factor 3</i>
<i>FAO</i>	<i>Food and Agriculture Organization</i>
<i>FBS</i>	<i>Fetal bovine serum</i>
<i>FCS</i>	<i>Fetal calf serum</i>
<i>GALT</i>	<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>
<i>gDNA</i>	<i>Genomic deoxyribonucleic acid</i>
<i>GRAS</i>	<i>Generally Regarded as Safe</i>
<i>HIF-α</i>	<i>hypoxia-inducible factor-1α inhibitor</i>
<i>HopQ</i>	<i>Helicobacter Pylori Outer Membrane Protein</i>
<i>HrtA</i>	<i>High-Temperature Requirement Protein</i>
<i>IARC</i>	<i>International Agency for Research on Cancer</i>

<i>IBD</i>	<i>Inflammatory bowel disease/enfermedad inflamatoria intestinal</i>
<i>IEC</i>	<i>Intestinal epithelial cell</i>
<i>IFN-γ</i>	<i>Interferon gamma,</i>
<i>sIgA</i>	<i>Secretory Immunoglobulin</i>
<i>ILC1</i>	<i>Innate lymphoid cell type 1</i>
<i>ILC2</i>	<i>Innate lymphoid cell type 2</i>
<i>IRAK-M</i>	<i>Interleukin-1 receptor-associated kinase 3</i>
<i>IRF-3</i>	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
<i>IRF-7</i>	<i>Interferon regulatory factor 7</i>
<i>ISAPP</i>	<i>International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics</i>
<i>LDH</i>	<i>Lactate dehydrogenase</i>
<i>Le^x</i>	<i>Lewis antigen x</i>
<i>LPS</i>	<i>Lipopolysaccharide</i>
<i>MAMPs</i>	<i>Microbial Associated Molecular Patterns</i>
<i>MAPK</i>	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
<i>MCP-1</i>	<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>
<i>MHC</i>	<i>Major histocompatibility complex</i>
<i>MKP-1</i>	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
<i>mRNA</i>	<i>Messenger ribonucleic acid</i>
<i>MRS</i>	<i>Mann-Rogosa Sharpe</i>
<i>MTT</i>	<i>Bromide reduction assay of 3 (4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-diphenyltetrazole</i>
<i>NALT</i>	<i>Nasal Associated Lymphoid Tissue</i>
<i>NBT</i>	<i>Nitro blue tetrazolium test</i>
<i>NF-κB</i>	<i>Nuclear factor κB</i>
<i>NK</i>	<i>Natural Killer</i>
<i>NLM</i>	<i>nódulos linfáticos mesentéricos</i>
<i>NO</i>	<i>Nitric oxide</i>
<i>NOD</i>	<i>Nucleotide-binding-oligomerization domain</i>
<i>OipA</i>	<i>Outer Inflammatory Protein</i>
<i>OMS</i>	<i>Organización Mundial de Salud</i>
<i>PAMPs</i>	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
<i>PBS</i>	<i>Phosphate buffered saline</i>
<i>PE</i>	<i>Phycoerythrin</i>
<i>PerCP</i>	<i>Peridinin Chlorophyll Protein Complex</i>
<i>PIE</i>	<i>Porcine intestinal epithelial cells</i>
<i>PMA</i>	<i>Phorbol 12-Myristate 13-Acetate</i>
<i>PRRs</i>	<i>Pattern recognition Receptors</i>
<i>qPCR</i>	<i>Real time polimerase chain reaction</i>
<i>QPS</i>	<i>Qualified Presumption of Safety</i>
<i>ROS</i>	<i>Reactive oxigen species</i>
<i>RPMI-1640</i>	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
<i>SabA</i>	<i>Sialic Acid-Binding Adhesin</i>

<i>SD</i>	<i>Standard Deviation</i>
<i>SIGIRR</i>	<i>Single Ig IL-1-related receptor</i>
<i>T4SS</i>	<i>Type IV secretion system</i>
<i>TCR</i>	<i>T cells receptor</i>
<i>TGF-β</i>	<i>Transforming growth factor beta</i>
<i>Th1</i>	<i>T helper 1</i>
<i>Th2</i>	<i>T helper 2</i>
<i>THP-1</i>	<i>Human monocytic leukemia cells</i>
<i>TLRs</i>	<i>Toll like receptors</i>
<i>TNF-α</i>	<i>Tumor necrosis factor</i>
<i>Tregs</i>	<i>Regulatory T cells</i>
<i>VacA</i>	<i>Vacuolating cytotoxin A</i>



RESUMEN

Lactobacillus fermentum UCO-979C, una cepa originalmente aislada de mucosa gástrica humana, posee propiedades probióticas y actividad inhibitoria sobre *H. pylori*. Dentro de sus características se ha demostrado que sobrevive a pH 3 y a concentraciones fisiológicas de sales biliares, produce peróxido de hidrógeno y tiene altas propiedades de hidrofobicidad. Además, se adhiere eficientemente a las células epiteliales gástricas (células AGS), en las cuales la bacteria forma biopelículas e inhibe fuertemente la adhesión, el crecimiento y la actividad de la ureasa del patógeno *H. pylori*. La cepa UCO-979C demostró también la capacidad de reducir significativamente la producción de IL-8 en células AGS. Estas observaciones condujeron al objetivo principal de este trabajo de tesis que se enfocó en realizar estudios inmunológicos detallados, para evaluar la capacidad de *L. fermentum* UCO-979C de modular la respuesta inmune mucosa (gástrica e intestinal) y sistémica.

De esta forma, se evaluó la habilidad de *L. fermentum* UCO-979C para modular la respuesta inmune en células AGS y THP-1, en el contexto de la infección por *H. pylori*, considerando el análisis de citoquinas y quimioquinas (TNF- α , IL-1 β , IL-6, TGF- β , IL-8, MCP-1 en células epiteliales gástricas y TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-12p40 e IFN- γ en macrófagos activados). Se observó que la cepa protege a las células AGS del daño inflamatorio producto de la infección. Se demostró una disminución en la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias y un aumento en las citoquinas inmunoreguladoras, lo que sugiere un efecto anti-inflamatorio. Posteriormente, se procedió a confirmar *in vivo* estos hallazgos, en un modelo murino de infección por *H. pylori*. Ratones albinos suizos recibieron un tratamiento profiláctico de corta duración (2 días) y se evaluó el efecto en la colonización temprana por el patógeno gástrico y en las citoquinas séricas y gástricas. Los ratones tratados con UCO-979C mostraron recuentos de *H. pylori* y actividad ureasa más bajos, respecto a los controles infectados. El estudio histológico demostró que *L. fermentum* UCO-979C redujo el daño al tejido gástrico e infiltración de células inflamatorias. Por otra parte, ratones que

recibieron la cepa probiótica, presentaron niveles significativamente más bajos de TNF- α , IL-8 y MCP-1 gástricos y séricos, y valores más altos de IFN- γ e IL-10 que los ratones de control.

L. fermentum UCO-979C tiene una importante habilidad para producir de exopolisacárido (EPS). Considerando las reconocidas propiedades anti-inflamatorias descritas en la literatura para los EPS derivados de BAL, se extrajo el EPS de la cepa UCO- 979C y se evaluó su efecto en células AGS, THP-1 y ratones albinos suizos desafiados con *H. pylori*. Al igual que lo observado en los estudios *in vitro*, donde se emplearon bacterias viables, el pretratamiento con EPS extraído de UCO-979C, disminuyó significativamente citoquinas y quimioquinas proinflamatorias en células AGS y THP-1 desafiadas con *H. pylori*. Además, redujo los niveles de IL-8, TNF- α y aumentó los niveles de IL-10 en la mucosa gástrica de ratones infectados con *H. pylori*; sin embargo, a diferencia de UCO-979C viable, el EPS no tuvo un efecto significativo sobre IFN- γ . Los resultados permiten explicar parcialmente la actividad de la cepa, sin embargo, se plantea que debe existir un mecanismo adicional en la bacteria que participe en la actividad inmunomoduladora.

Para caracterizar la actividad inmunomoduladora de la cepa UCO-979C a nivel intestinal, se realizaron estudios en células epiteliales intestinales porcinas (células PIE) desafiadas con *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC). *L. fermentum* UCO-979C demostró un efecto estimulante/anti-inflamatorio mixto ya que fue capaz de disminuir la expresión de factores inflamatorios como *CXCL8*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *C1S*, y *C3* y aumentar la expresión de *IL-6*, *CCL8*, *C1R* y *CFB*. En virtud de estos resultados, se procedió a evaluar en un modelo murino (ratones albinos Balb/c) el efecto de un tratamiento probiótico de corta duración (2 días). Se observó que la cepa estimula los macrófagos peritoneales y aumenta el número de células T CD4⁺ en placas de Peyer, reduce el número de células B inmaduras en las placas de Peyer y aumenta el nivel de IgA intestinal. Además, aumenta los niveles intestinales y séricos de IFN- γ e IL-10 mientras que disminuye TNF- α en ratones desafiados con lipopolisacárido. Estos

hallazgos constituyen la primera demostración del efecto inmunomodulador de la cepa a nivel intestinal e indican su capacidad para regular beneficiosamente la respuesta inmune contra patógenos Gram negativos.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo sugieren que *L. fermentum* UCO-979C puede ser empleado como un eficiente probiótico inmunomodulador o inmunobiótico para modular favorablemente la respuesta inmune innata mucosa y sistémica y proteger contra enfermedades producidas por patógenos gastrointestinales.



ABSTRACT

Lactobacillus fermentum UCO-979C, isolated from a gastric biopsy, is a probiotic strain that exerts inhibitory activity against *Helicobacter pylori*. Among its properties it has been shown that survives in environments with pH of 3, physiological concentration of bile salts, produces hydrogen peroxide and exhibits high hydrophobicity properties. Furthermore, it adheres to gastric epithelial cells and colorectal carcinoma cells, forming biofilms, and reducing *H. pylori* adhesion and urease activity. Furthermore, UCO-979C had shown to significantly reduce IL-8 production in AGS cells. These observations encouraged more detailed immunological studies to evaluate the ability of the UCO-979C strain to modulate the immune response and its mechanisms of action.

Thus, the ability of *L. fermentum* UCO-979C to modulate the immune response in AGS and THP-1 cells was evaluated in the context of *H. pylori* infection. Several cytokines and chemokines were evaluated: TNF- α , IL-1 β , IL-6, TGF- β , IL-8, MCP-1 in gastric epithelial cells and TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-12p40 and IFN- γ in activated macrophages. *L. fermentum* UCO-979C diminished the inflammatory damage caused by infection. A decrease in pro-inflammatory cytokines and chemokines production and an increase in immunoregulatory cytokines were demonstrated, suggesting an anti-inflammatory effect. Then, these findings were confirmed *in vivo* in a murine model of *H. pylori* infection. A short-term prophylactic treatment (2 days) was administered to mice, the effect on early colonization by the gastric pathogen and on serum and gastric cytokines was evaluated. Mice treated with UCO-979C showed lower counts of *H. pylori* and urease activity, compared to the infected controls; the histological study demonstrated reduced damage to gastric tissue and less infiltration of inflammatory cells. On the other hand, treated mice showed significantly lower levels of gastric and serum TNF- α , IL-8 and MCP-1, and higher values of IFN- γ and IL-10 than control mice.

L. fermentum UCO-979C produces important amounts of exopolysaccharide (EPS). Considering the recognized anti-inflammatory properties described in the literature for EPS, this molecule was extracted and its effect was evaluated in AGS, THP-1 cells and mice challenged with *H. pylori*. As observed on *in vitro* studies where viable bacteria were used, the pretreatment with EPS UCO-979C significantly decreased pro-inflammatory cytokines and chemokines in AGS and THP-1 cells challenged with *H. pylori*. Furthermore, the treatment reduced the levels of IL-8, TNF- α and increased the levels of IL-10 in the gastric mucosa of mice infected with *H. pylori*. However, in contrast with viable UCO-979C, EPS did not exert a significant effect on IFN- γ levels. The results partially explain the activity of the strain; however, it is suggested that there must be additional molecule(s) in the bacterium that participates in the immunomodulatory activity.

In order to characterize UCO-979C immunomodulatory activity on intestinal mucosa, porcine intestinal epithelial cells (PIE) were challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *L. fermentum* UCO-979C exhibits a mixed stimulant/anti-inflammatory effect as it decreases the expression of inflammatory factors such as CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, C1S, and C3 and increases the expression of IL-6, CCL8, C1R and CFB, through the negative regulation of TLR4. Considering this results, the effect of a short-term probiotic treatment (2 days) was evaluated in a murine model (Balb/c mice). *L. fermentum* UCO-979C stimulated peritoneal macrophages and increased the number of CD4 + T cells in Peyer's patches, reduced the number of immature B cells in Peyer patches, and increased the level of intestinal IgA. In addition, it enhanced intestinal and serum IFN- γ and IL-10 and diminished TNF- α after LPS challenge. These findings confirm the immunomodulatory effect of the strain, beneficially regulating the immune response in infection models with Gram negative bacteria.

Overall, the present research suggests *L. fermentum* UCO-979C potential use as an immunobiotic to modulate the immune response in different inflammatory diseases.



CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

El huésped mantiene una estrecha relación con su microbioma (bacterias, virus y otros eucariotas) considerándose como un metaorganismo ¹. Como ejemplo, el tracto gastro-intestinal del ser humano y de otros mamíferos, uno de los más altamente colonizados, alberga más de 1000 especies, alcanza una población aproximada de 10^{14} microorganismos, esto es, 10 veces más que el número de células somáticas y germinales del huésped ²⁻⁴. Los microorganismos que colonizan como comensales el cuerpo humano, colectivamente conocidos como microbiota ⁵ cumplen tantas funciones, que pueden ser considerados en conjunto como un órgano esencial ⁶⁻⁸. La microbiota participa en la digestión de nutrientes, en la síntesis de vitaminas, en protección frente a patógenos y en maduración y mantenimiento del sistema inmune ^{1,4,9}.

La microbiota es necesaria para mantener la fisiología del huésped, la pérdida de equilibrio en esta relación homeostática (disbiosis) se ha relacionado con varias enfermedades como diabetes, cáncer, obesidad, inflamación crónica, ansiedad y depresión ^{1,10}. El microbioma es una potencial fuente de productos que pueden tener un importante impacto en la salud del huésped ^{11,12}, así, el concepto de microbiota normal y sus efectos benéficos ha permitido el surgimiento de la terapia probiótica basada en la capacidad de determinados microorganismos seleccionados para conferir un efecto beneficioso en la salud luego de su administración ¹³. Estudios clínicos en pacientes con patologías hepáticas ¹⁴, enfermedad inflamatoria intestinal ¹⁵, síndrome del intestino irritable ¹⁶ y diarrea asociada a antibióticos ¹⁷ han demostrado que el restablecimiento de la composición de la microbiota intestinal mediante el uso de probióticos ha permitido mejorar el estado de salud y prevenir complicaciones en los pacientes que los consumen ^{18,19}.

I. I PROBIÓTICOS

Desde el neolítico se describe la obtención de alimentos fermentados, los egipcios producían leches fermentadas y otros derivados lácteos ²⁰. También existen registros de la China antigua y el empleo de heces humanas para el tratamiento de infecciones o el envenenamiento por alimentos ²¹. Sin embargo, el interés y entendimiento sobre los posibles efectos benéficos relacionados con estos productos salió a la luz a principios del siglo 20 con las observaciones de Elie Metchnikoff, quien sugirió que el consumo regular de productos lácteos fermentados con bacterias ácido lácticas (BAL), se asociaban con la salud y longevidad en campesinos Búlgaros ^{19,22,23}. Tras la investigación de Tissier sobre la importancia de las bifidobacterias en el intestino de infantes y el descubrimiento del bacilo búlgaro de Grigorov, Metchnikoff propuso la posibilidad de modular la microbiota intestinal empleando microorganismos benéficos ^{20,24}. El concepto tradicional de probióticos se basó en las observaciones de Metchnikoff y la definición de Probióticos ha evolucionado con los años ¹⁹. La palabra probiótico deriva del griego ‘o’ (pro) and ‘ooc’ (biotico) que significa: para la vida ²⁵. En 1965, Lilly y Stillwell se refieren a sustancias producidas por bacterias que promueven el crecimiento de otras bacterias. En 1989, Fuller definió probiótico como “un suplemento alimenticio vivo con efectos benéficos sobre un huésped animal al mejorar el equilibrio microbiano intestinal” ^{20,26}. Un panel de expertos comisionado por la FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) y la OMS (Organización Mundial de Salud) definieron los probióticos como “microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped” ^{23,27}. La “International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics” (ISAPP) publicó en 2014 un consenso que ésta definición aún era relevante (con mínimas revisiones gramaticales) y estableció lineamientos que definen el apropiado uso y los alcances del al concepto probiótico de acuerdo a los avances de la última década ²⁸.

Hoy en día, gracias a los avances en el conocimiento de la microbiota intestinal y su impacto en la salud humana, los probióticos se consideran una herramienta para

reestablecer el balance del ecosistema intestinal y promover la salud ¹⁹. A la fecha, un gran número de productos probióticos se encuentra disponible con relevantes aplicaciones en el área de alimentos, bebidas, agricultura, salud humana y animal ¹². Si bien, la investigación en probióticos principalmente se ha dedicado a aplicaciones en el tracto gastrointestinal, los avances en la ciencia de los probióticos han permitido su aplicación en otras mucosas tales como el tracto respiratorio o vaginal ²⁰. Estudios en humanos y modelos animales han demostrado el efecto de los probióticos en varias enfermedades: moderan la diarrea, alivian la intolerancia a la lactosa, presentan actividad antimicrobiana, reducen los síntomas del intestino irritable y previenen la enfermedad inflamatoria intestinal ²⁹. Algunos efectos sobre la salud están bien documentados mientras que otros requieren mayores estudios para demostrar su relación con un beneficio ³⁰. Entre otros beneficios se pueden mencionar: supresión de las alergias, control de los niveles de colesterol, modulación de la función inmune local (intestinal) y en mucosas distantes, reducción del cólico en lactantes, prevención de la dermatitis atópica y la hipersensibilidad alimentaria, prevención del cáncer de colon, coadyuvantes en el tratamiento de desórdenes metabólicos como obesidad, diabetes tipo 2, hígado graso no alcohólico ³¹⁻³⁴.

Los probióticos han sido tradicionalmente aislados de productos fermentados, el intestino, heces y leche materna ^{19,35}. Se han catalogado al nivel de cepa como GRAS (Generally Regarded as Safe) por la FDA o QPS (Qualified Presumption of Safety) por la European Food Safety Authority (EFSA) al ser productos con un historial y una seguridad comprobadas ^{19,36}. La mayoría microorganismos a los que se les atribuyen propiedades probióticas pertenecen a los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque *Bacillus*, *Enterococcus*, *Saccharomyces* y unas pocas cepas de *Escherichia coli* también han demostrado efectos benéficos ^{22,37,38}. Más recientemente, una nueva generación de microorganismos como *Prevotella copri*, *Christensenella minuta*, *Parabacteroides goldsteinii*, *Akkermansia muciniphila*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Faecalibacterium prausnitzii*, y *Bacteroides fragilis* han sido estudiados por los beneficios que confieren a la salud humana y animal ³⁸⁻⁴⁰.

Lactobacillus es un género que comprende más de 200 especies; colonizan alimentos fermentados, participan en la descomposición de alimentos, se encuentran en reducidos números en la superficie de plantas (no como simbioses, sino como epifitos) y son parte de la microbiota de animales invertebrados y vertebrados incluyendo el hombre ^{41,42}. Son bacterias Gram positivas anaeróbicas facultativas o microaerófilas, catalasa negativa, no esporuladas y con forma bacilar, que producen ácido láctico como el principal metabolito final de la fermentación de carbohidratos. Generalmente se caracterizan por un genoma con bajo contenido GC (guanina y citosina) ^{42,43}. El género *Lactobacillus* incluye gran cantidad de especies GRAS ⁴² y debido a su amplio uso en alimentos, biotecnología y aplicaciones terapéuticas, tienen una sustancial importancia económica ⁴¹. Sólo en raros casos se han reportado infecciones presumiblemente causadas por *Lactobacillus* probióticos en pacientes inmunocomprometidos o pacientes con severas enfermedades de base ^{36,44,45}.

Los probióticos ejercen sus efectos benéficos mediante varios mecanismos de acción, que se pueden resumir en tres categorías, a veces superpuestas ^{37,44}:

a) Interacciones microorganismo-microorganismo: Los probióticos pueden impedir o disminuir la colonización por microorganismos patógenos al generar un microambiente hostil mediante competencia por nutrientes y/o sitios de adhesión, producción de metabolitos selectivos, moléculas de comunicación célula-célula (Tipo Quorum Sensing) y de compuestos con actividad antimicrobiana como ácido láctico, ácidos orgánicos, bacteriocinas y H₂O₂ ^{29,44}. Este efecto es de gran importancia en la prevención y terapia de infecciones así como en el restablecimiento del equilibrio de la microbiota intestinal ⁴⁶.

b) Mejora en la función de la barrera epitelial: Se sugieren mecanismos como la inducción de secreción de mucina y péptidos antimicrobianos, prevención de la apoptosis de células epiteliales ⁴⁷, aumento en la expresión de genes involucrados con la formación de uniones estrechas ²⁹, inducción de proteínas citoprotectoras (como proteínas de shock térmico) ⁴⁴.

c) Modulación de la respuesta inmune: Las bacterias probióticas pueden interactuar con células del huésped (células epiteliales, células dendríticas, monocitos, macrófagos y linfocitos) mediante moléculas de superficie o metabolitos ⁴⁸ ejerciendo un efecto modulador sobre componentes de la respuesta inmune innata y adaptativa ²⁹. Se ha descrito que pueden influenciar mecanismos innatos como la fagocitosis y la actividad de células Natural Killer (células NK), así como adaptativos tales como la producción de IgA, la proliferación y apoptosis de linfocitos, y la generación de inmunidad mediada por células ⁴⁹. La actividad probiótica puede ocurrir en tres niveles: 1) efecto a nivel de la mucosa intestinal, mediante interacción con la microbiota intestinal, células epiteliales y células inmunes; 2) función a nivel sistémico a través de su influencia en la actividad de células de la sangre y médula ósea y 3) efecto en tejidos mucosos distantes a través de la modulación del sistema inmune común de mucosas ⁵⁰.

Se postulan otros mecanismos de acción probiótica como la unión a toxinas y a carcinógenos previniendo su absorción ^{31,45}, actividad antioxidante ²², síntesis de micronutrientes esenciales como vitaminas, aminoácidos y enzimas ²², producción de ácidos grasos de cadena corta, interacción con el eje cerebro intestino mediante la regulación de funciones endocrinas y neurológicas ³⁴.

Existen mecanismos de acción que se encuentran presentes en la mayor parte de cepas probióticas, como es el caso de producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFA), exclusión competitiva de patógenos, síntesis de vitaminas, fortalecimiento de la barrera intestinal, metabolismo de las sales biliares, entre otros; mientras que algunos mecanismos están presentes en solo unas pocas cepas, como es el caso de los efectos en la respuesta inmune ^{28,51}. Es claro que no todas las cepas probióticas funcionan de la misma manera, la actividad cepa específica es un principio fundamental en el concepto de probióticos ⁵¹. No debe generalizarse el beneficio de un probiótico sin los análisis y la evidencia ya que los efectos de una cepa no necesariamente están presentes en otra cepa aunque sean de la misma especie ^{21,37,52}.

I.II INMUNOMODULACIÓN POR CEPAS PROBIÓTICAS

La modulación de la inmunidad del huésped es uno de los principales beneficios atribuidos al consumo de probióticos ⁵³. En 2003, Clancy propuso el término **inmunobiótico** para definir aquellos microorganismos que promueven la salud a través de la modulación del sistema inmune en mucosas para diferenciarlos de aquellos con efectos estrictamente microbiológicos ⁵². El impacto de las BAL en el sistema inmune, ha sido objeto de estudio en la última década ^{46,54}. Numerosas investigaciones en diferentes patologías inflamatorias, autoinmunes y alérgicas ofrecen evidencia de la interacción probióticos- sistema inmune en modelos animales y humanos ⁵⁴⁻⁵⁶. La evidencia sugiere que los probióticos ayudan a mantener el control eficiente del sistema inmune, modulando diferencialmente las respuestas inmunes celular y humoral. Cabe destacar que la actividad inmunomoduladora es cepa específica y depende de la pato fisiología de la enfermedad ⁵⁴. La comunicación entre los inmunobióticos y las células del huésped es posible gracias a complejas interacciones moleculares entre componentes de ambas partes ^{35,53,57,58}.

I.II.I Sistema inmune

Los mecanismos de defensa llevados a cabo por el sistema inmune para proteger al organismo contra infecciones pueden dividirse en la respuesta inmune innata y la respuesta inmune adaptativa. La primera reacciona de manera rápida, mientras que la segunda tarda más pero su respuesta es más específica, generando una memoria inmunológica. La inmunidad innata esta mediada por poblaciones celulares como las células fagocíticas (neutrófilos, monocitos y macrófagos), células NK y células linfoides innatas, así como otros componentes humorales como las defensinas y el sistema de complemento ^{59,60}. La inmunidad adaptativa está mediada por diferentes poblaciones de células T y B, que expresan en su superficie receptores de antígenos altamente específicos ⁶¹. Las células dendríticas (DC), macrófagos y monocitos se encuentran en la interfase entre la inmunidad innata y adquirida ya que actúan como células presentadoras de antígenos (CPA) ⁶⁰.

El sistema inmune innato responde a estructuras comunes denominadas patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs: *Microbial Associated Molecular Patterns*) tales como el peptidoglicano o los lipopolisacáridos. Estas moléculas altamente conservadas en los microorganismos son reconocidas por receptores de reconocimiento de patrones (PRRs: *Pattern Recognition Receptors*). Entre los PRRs más estudiados se encuentran los receptores tipo Toll (TLRs: *Toll like receptors*), proteínas transmembranales presentes en células inmunes como las células dendríticas, macrófagos, células B y células NK y no inmunes como las células epiteliales, fibroblastos y células endoteliales^{34,62}. Otros PRRs incluyen los receptores tipo NOD (NOD: *nucleotide-binding-oligomerization domain*), que protegen el espacio citoplasmático, los receptores de lectina tipo C, pseudohelicinas inducidas por ácido retinoico y factor activante de la enzima convertora de interleuquina 1³⁴. La unión de los PRRs con sus respectivos ligandos pone en marcha vías que culminan con la activación de distintos factores de transcripción como el factor nuclear kappa B (NF-κB: *Nuclear factor kB*), AP-1 (*Activator protein 1*), IRF-3 (*Interferon regulatory factor 3*), IRF-7 (*Interferon regulatory factor 7*), relacionados con la expresión de genes que codifican para citoquinas pro-inflamatorias, citoquinas antivirales, quimioquinas, moléculas de adhesión endotelial, y moléculas co-estimuladoras entre otras. La variabilidad de ligandos y la unión a sus respectivos PRRs ofrece diversas respuestas celulares^{25,29,63}.

Los probióticos pueden interactuar con diferentes células en la mucosa intestinal: células epiteliales como los enterocitos, células caliciformes y/o células entero-endocrinas. Estas células juegan un rol fundamental en el control de la inmunidad innata local y de la respuesta sistémica al ejercer su efecto en células inmunes como células dendríticas, macrófagos y linfocitos intraepiteliales^{25,60}. Por otra parte, los probióticos también pueden interactuar con el sistema inmune adaptativo del tracto intestinal a través de los tejidos linfoides asociados a intestino (GALT: *Gut Associated Lymphoid Tissue*)²⁵. Se ha postulado que la acción probiótica puede tener lugar en la mucosa intestinal, pero también puede ocurrir en sitios anatómicos distantes como bronquios, glándulas mamarias y tracto urogenital⁶⁴. Esto es posible debido a que el sistema inmune común en mucosas

se encuentra interconectado, lo que le permite proteger vastas áreas de superficie⁶⁵⁻⁶⁹. La migración de células inmunes desde los sitios inductores a los sitios efectores a través del sistema linfático es la clave de la respuesta en mucosas distantes (**Figura 1**)⁶⁹.

Los sitios inductores incluyen el GALT, el tejido linfoide asociado a nasofaringe (NALT: *Nasal Associated Lymphoid Tissue*) así como otros sitios linfoides menos caracterizados; colectivamente estos comprenden el tejido linfoide asociado a mucosa (MALT). En el intestino, las placas de Peyer y los nódulos linfáticos mesentéricos (NLM) componen el GALT; los antígenos en la luz intestinal pueden ser “muestreados” por células M o por células dendríticas. Las células dendríticas gatillan respuestas específicas en las células B y T en las placas de Peyer y NLM⁷⁰. La expresión de receptores específicos en los linfocitos y las quimioquinas permiten guiar el ingreso de las células inmunes a sitios efectores como la lámina propia, el tracto respiratorio, reproductor, así como también tejidos glandulares secretores como las glándulas mamarias, salivales y lagrimales⁶⁹.

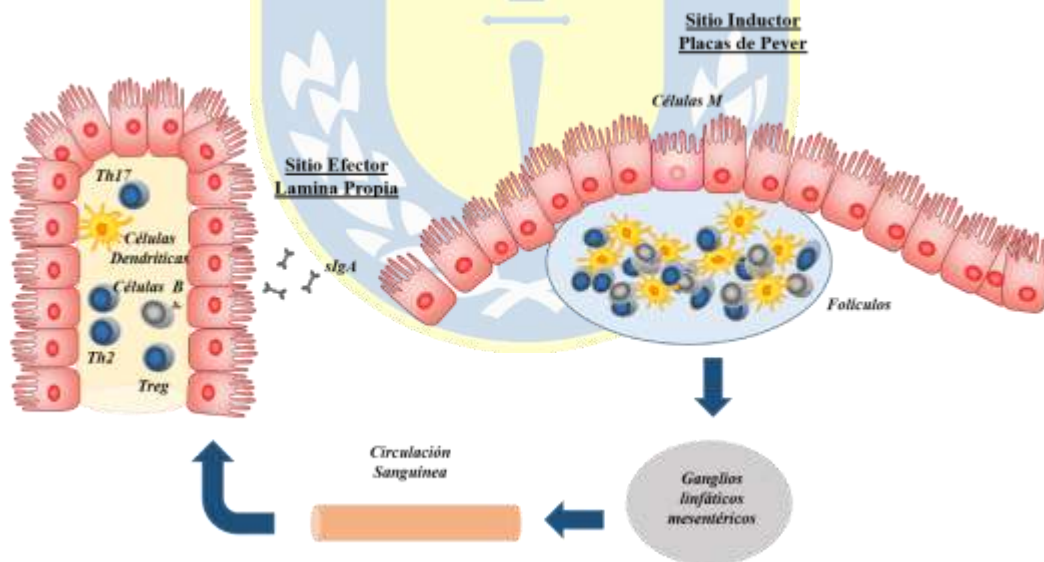


Figura 1. Comunicación en el sistema inmune de mucosas. Reconocimiento del antígeno en los sitios inductores y respuesta en los sitios inductores. Ruta de las células diferenciadas hacia los sitios efectores. Modificado de: McGhee, Jerry R. and Kohtaro Fujihashi. 2012. *PLoS Biology* 10(9) p3.

La interacción del receptor de las células T (TCR) con péptidos presentados por el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC: *Major histocompatibility complex*) en las células dendríticas activa y diferencia las células T. Las células T CD4⁺ interactúan con péptidos presentados por el MHC-II y las células T CD8⁺ reconocen péptidos intracelulares presentados por MHC-I. Bajo influencia del ambiente local de citoquinas y señales co-estimuladoras desde las células presentadoras de antígeno, las células T CD4 pueden diferenciarse en: células T colaboradoras 1 (Th1), T colaboradoras 2 (Th2), T colaboradoras 17 (Th17), T colaboradoras foliculares (TFH) y células T reguladoras (Tregs)⁷⁰, las cuales pueden distinguirse en base a la producción de citoquinas características (**Figura 2**). Las células presentadoras de antígeno producen IL-12 en respuesta a microorganismos, ésta y el IFN- γ producido por las células NK y las células linfoides innatas de tipo 1 (ILC1) induce diferenciación hacia células Th1. Las células Th1 expresan receptoras de quimioquinas y mediante la síntesis de IFN- γ activa macrófagos e induce a las células B a producir anticuerpos opsonizantes.

Otras células como las células NK, mastocitos y células linfoides innatas tipo 2 (ILC2) en respuesta a parásitos, alérgenos producen IL-4 que induce a la diferenciación hacia células Th2, las células epiteliales también secretan citoquinas que facilitan la diferenciación a Th2. Las células Th2 producen IL-4, 5, 6, 9,10 y 14 lo que regula la biosíntesis de inmunoglobulina A secretora (IgAs). Las células epiteliales y macrófagos entre otras células producen TGF- β , IL-6 y IL-23 que permiten la diferenciación hacia Th17; las citoquinas producidas por las células Th17 (IL-17 A e IL-23) contribuyen a la respuesta frente a bacterias comensales e infecciones por hongos. Las células T foliculares contribuyen a la formación de los centros foliculares y al desarrollo de anticuerpos de alta afinidad mientras que la diferenciación hacia células Treg está relacionada con la inducción de la tolerancia en mucosas. La diferenciación de células T CD8 en linfocitos T citotóxicos esta mediado por IL-2, IL-12, IL-15 e IL-21 ⁶⁹⁻⁷¹.

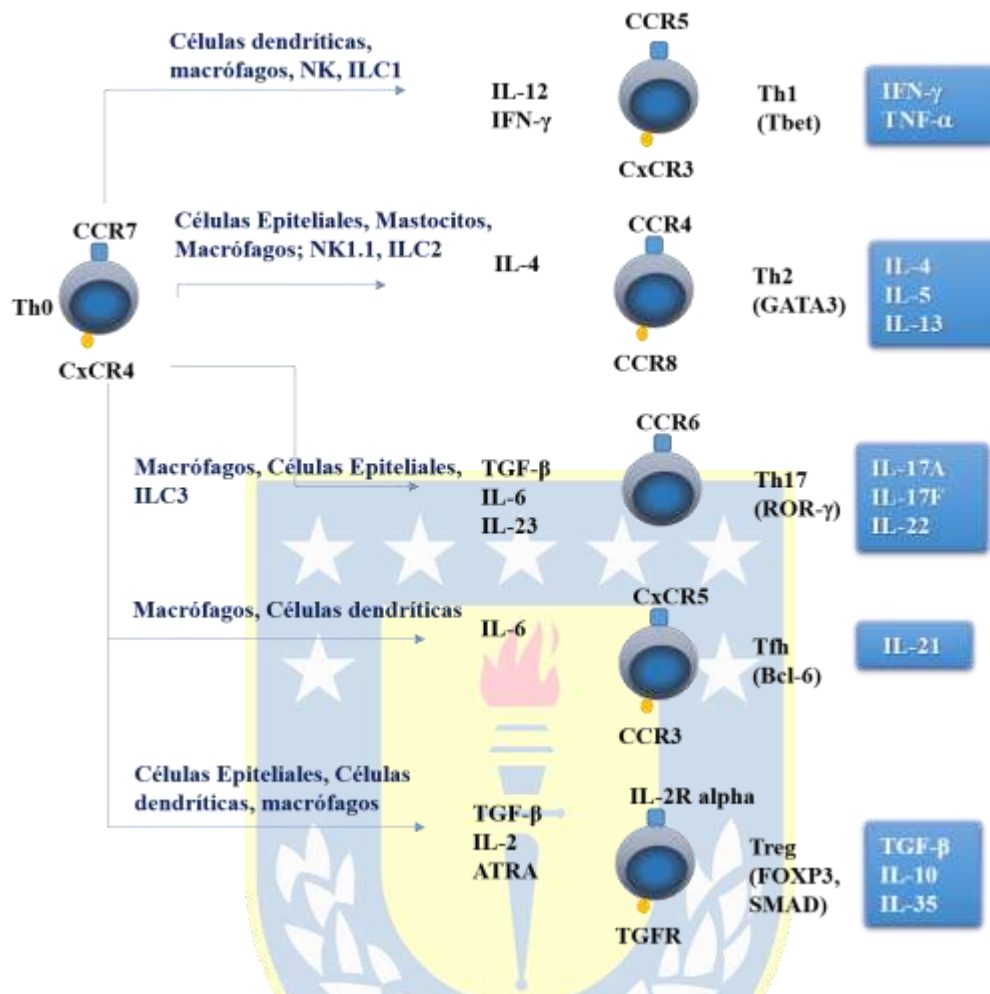


Figura 2. Subtipos de células T colaboradoras: Células y citoquinas involucradas en la diferenciación y actividad de las células efectoras. Modificado de: Boyaka, Prosper N. & Kohtaro Fujihashi. 2019. *Clinical Immunology: Principles and Practice: Fifth Edition*. p. 292.

I.II.II Componentes Microbianos

Se considera que una importante proporción de las moléculas efectoras de los probióticos residen en su envoltura celular, las estructuras más expuestas a la interacción con células del huésped ²⁵. Como se mencionó anteriormente, los probióticos más ampliamente comercializados y estudiados corresponden a bacterias Gram positivas. La membrana citoplasmática de las bacterias Gram positivas está recubierta por una gruesa

pared compuesta por múltiples capas de peptidoglicano, lipoproteínas, ácidos teicoicos y en algunos casos polisacáridos capsulares y exopolisacáridos. Estas moléculas comprenden MAMPs que son reconocidos por PRRs expresados en células del huésped ⁷². También los fragmentos de ADN no metilados que contienen motivos CpG ⁷³, moléculas proteicas extracelulares o asociadas a la superficie, lipoproteínas ^{39,74} y metabolitos ⁷⁵ pueden ser reconocidos por los PRRs.

Las propiedades bioquímicas y estructurales de estos componentes juegan un rol en el efecto de un determinado probiótico ²⁵. Se ha demostrado contundentemente que las propiedades inmunomoduladoras e inmunoadyuvantes son dependientes de la cepa y la dosis administrada ^{31,65,76,77}. Si bien, los MAMPs poseen una estructura conservada, los diferentes microorganismos pueden mostrar sutiles variaciones estructurales en estas moléculas que pueden significar que una macromolécula actúe como agonista para un PRR mientras que una molécula similar en otra cepa actúa como antagonista del mismo PRR ⁷⁴. La especificidad de las cepas de *Lactobacillus* está indudablemente vinculada a la variabilidad y complejidad bioquímica de ligandos y MAMPs, como se ha observado con los niveles de sustitución de los ácidos teicoicos y lipoteicoicos (D-alanil y glicosil), la composición variable de polialcoholes (alditol) del ácido teicóico unido a la pared, los niveles de N-deacetilación, N-glicosilación y O-acetilación del peptidoglicano ^{25,72}.

Por otra parte, es reconocido que algunas cepas de *Lactobacillus* tienen la propiedad de formar biopelículas *in vitro* e *in vivo* ⁷⁸ y que en general las bacterias adquieren un fenotipo diferencial durante la formación de biopelículas ^{43,79}. En ese sentido, estudios han demostrado que los sobrenadantes de algunas cepas de *Lactobacillus* cultivados formando biopelículas tienen una actividad anti-inflamatoria *in vitro* mayor que los sobrenadantes derivados de las mismas cepas cultivadas en forma planctónica ⁴³. Se ha descrito que el exopolisacárido, principal componente de matriz de las biopelículas, tiene una importante actividad inmunomoduladora y se cree su variabilidad estructural (homo/heteropolimérica) determina las respuestas observadas entre diferentes microorganismos ⁸⁰.

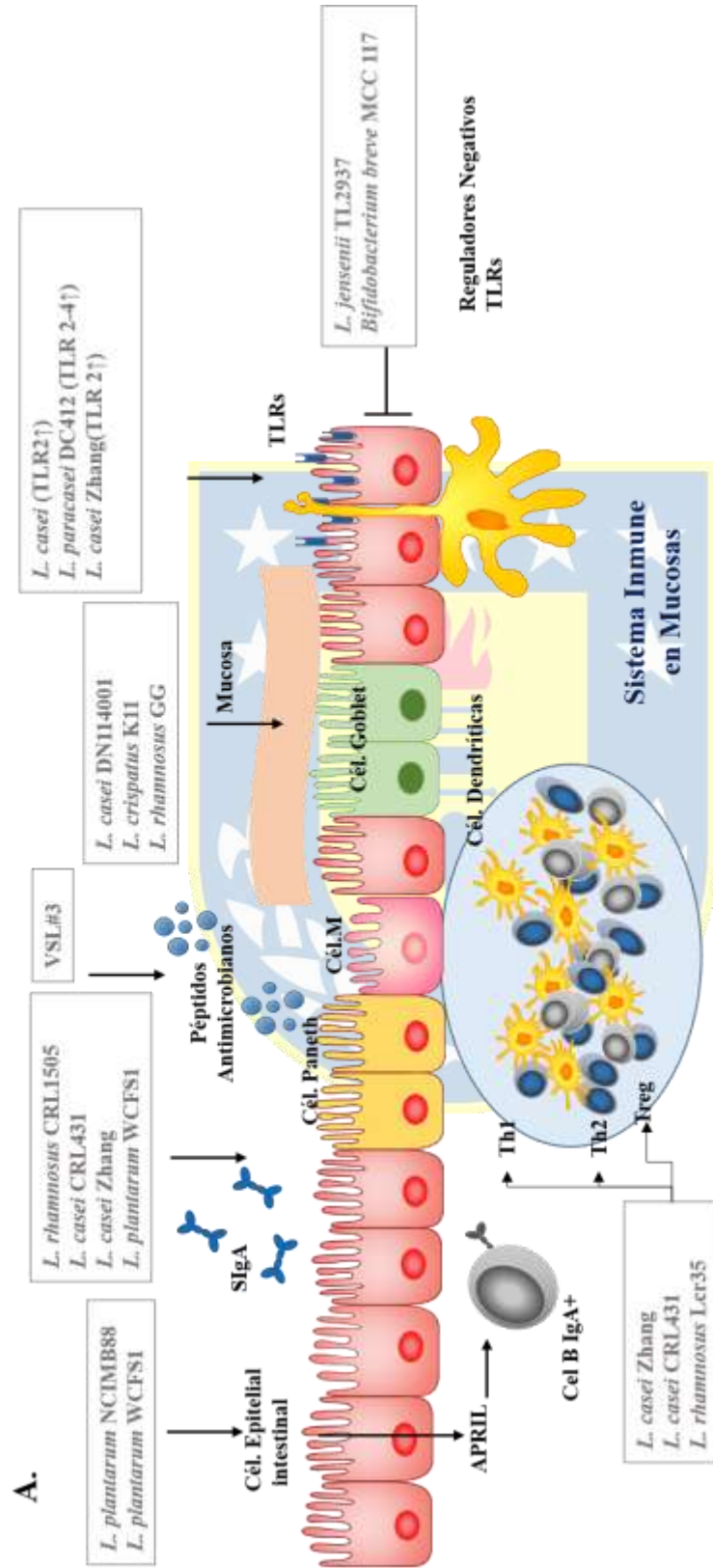
El efecto inmunomodulador que posee una determinada cepa inmunobiótica depende de las diferentes interacciones que produce con las células inmunes y no inmunes, así como de las interacciones de dichas células entre sí a través de la secreción de citoquinas y quimioquinas, cambios en la expresión de moléculas de adhesión y moléculas co-estimuladoras ^{63,73,81}. Las diferentes combinaciones de MAMPs expresados por distintos tipos de bacterias (sus atributos y su cantidad), son reconocidas por los PRRs en el huésped dando lugar a diferentes respuestas. Esta comunicación no tiene un solo sentido, sino que involucra complejas interacciones entre moléculas microbianas, receptores del huésped y moléculas adaptadoras ⁸².

Actualmente existen disponibles numerosas herramientas “ómicas” y secuencias completas de genomas de cepas probióticas, que han permitido comparaciones funcionales que ofrecen un acercamiento a identificar las moléculas efectoras involucradas en la comunicación con el sistema inmune del huésped que están detrás de los efectos de una determinada cepa ²⁵. Ésta caracterización resulta relevante considerando que la identificación y caracterización del componente que modifica benéficamente la respuesta inmune es importante para su aplicación racional como producto ⁴⁶.

I.II.III Microorganismos con actividad inmunomoduladora

Las bacterias probióticas pueden modular al sistema inmunológico del huésped tanto en condiciones homeostáticas como inmunopatológicas a través de efectos directos o indirectos en rutas de señalización, actuando tanto como inmunosupresores o activadores ⁶⁰. Estos efectos se han evidenciado por una gran cantidad de estudios *in vitro* e *in vivo* (**Figura 3**) y la actividad es cepa y dosis específica ⁸³.

Se ha descrito que bacterias probióticas pueden aumentar la secreción de IgA y el número de células productoras de IgA, ayudando a mantener la inmunidad humoral intestinal al limitar el acceso de patógenos al epitelio y mantener la simbiosis con los microorganismos presentes en el intestino ^{23,49,84}.



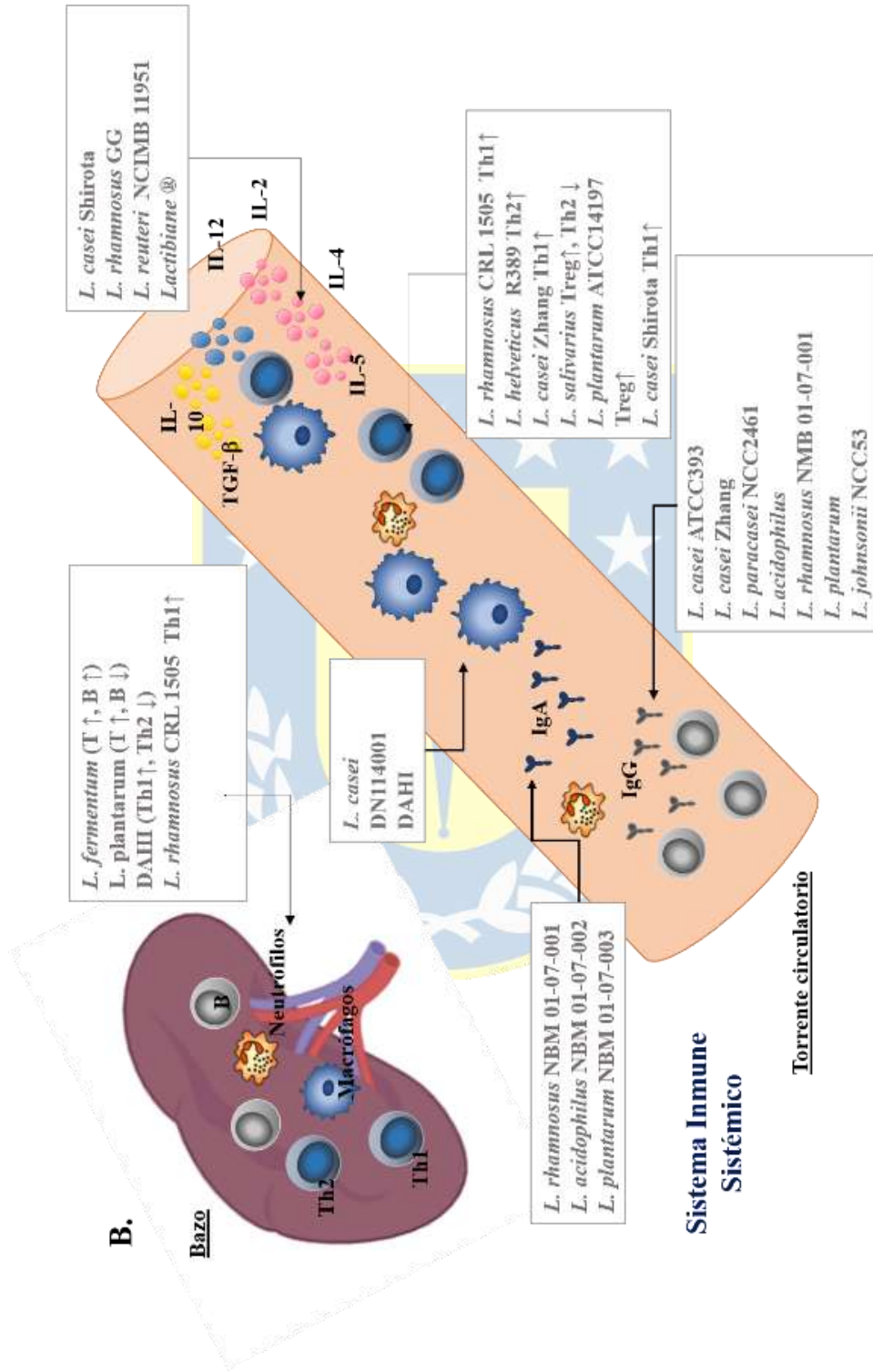


Figura 3. Resumen de la evidencia recopilada en la literatura sobre la actividad de bacterias probióticas sobre diferentes componentes del sistema inmune. A. Sistema Inmune en Mucosas. B. Sistema inmune sistémico. Modificado de: Kengang TS, et al. 2014. *J Appl Microbiol.* 117. p 305.

Se ha observado también que algunas cepas probióticas aumentan la actividad en fagocitos mononucleares y polimorfonucleares, el estallido respiratorio y la expresión de receptores, favoreciendo el posterior reclutamiento de células inmunocompetentes y la generación de la respuesta inflamatoria ^{49,85}. Los microorganismos probióticos pueden además regular el número, la actividad citotóxica y la producción de citoquinas de las células NK, ayudando a preparar al sistema inmune para combatir virus, bacterias intracelulares y tumores. Las células NK tienen una importante comunicación con las células dendríticas y esta interacción puede modular la respuesta inmune adaptativa. De esta forma la exposición a ciertas bacterias probióticas puede desempeñar un papel benéfico en la polarización hacia una respuesta Th1 ^{49,86,87}. Las bacterias probióticas pueden estimular el sistema inmune mediante la inducción de interferones tipo I, tanto en células inmunes como no inmunes, influenciando la respuesta antiviral ⁸⁴.

El efecto más estudiado de la modulación del sistema inmune por bacterias probióticas es la secreción de citoquinas incluyendo interleuquinas, factor de necrosis tumoral, interferones, factores de crecimiento y quimioquinas en células inmunes (linfocitos, granulocitos, macrófagos, mastocitos y células dendríticas) y en células epiteliales, los cuales regularán posteriormente las respuestas inmunes innata y adaptativa ⁸⁸. Las células dendríticas y las células epiteliales son las más descritas en la literatura sobre probióticos inmunomoduladores; ya que éstas células son las que están en mayor contacto con los microorganismos intestinales y sus metabolitos ⁸⁹.

Los probióticos y las especies comensales pueden interactuar con las células epiteliales intestinales de varias formas: aumentando las uniones estrechas y la producción de mucina por parte de las células caliciformes, la producción de péptidos antimicrobianos (defensinas y catelicidinas) por parte de las células Paneth, la producción de proteínas del

shock térmico, modulando las citoquinas pro-inflamatorias e inmunoreguladoras e interfiriendo con la patogénesis ^{60,90,91}. Una respuesta inflamatoria excesiva frente a un patógeno microbiano puede afectar la barrera epitelial, y se ha visto que microorganismos probióticos han demostrado reducir la expresión de algunas citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias a la vez que pueden aumentar la expresión de otras. Este efecto se correlaciona con una respuesta inmunológica que es capaz de eliminar eficientemente al patógeno del tejido infectado mientras que reduce el daño local producido por la respuesta inflamatoria ^{89,91}. La vía del NF- κ B regula la transcripción de varios genes incluyendo la citoquina pro-inflamatoria TNF- α y la quimioquina IL-8. Ciertos probióticos modulan diferencialmente las respuestas de las células epiteliales mediante la activación o supresión de rutas de señalización como la de NF- κ B ^{60,83}. En la mucosa intestinal los probióticos pueden disminuir el estrés oxidativo al afectar la producción de citoquinas, disminuyendo IL-1 o TNF- α . También pueden aumentar los niveles de glutatión, bloquear la producción de superóxido y radicales hidroxilo y disminuir los niveles de pro-oxidantes ^{88,92}.

Por otra parte, las células dendríticas en el intestino reconocen MAMPs en las bacterias probióticas. Este reconocimiento induce la maduración de dichas células la cual está caracterizada por la expresión de moléculas co-estimuladoras y secreción de citoquinas las que contribuyen a la activación de las células T. De hecho, las señales producidas por las células dendríticas determinarán la polarización de las células T hacia respuestas Th1, Th2, Th17 o Treg ^{93,94}, dirigiendo la respuestas inmunológicas hacia respuestas pro- o anti-inflamatorias ^{44,77}. Algunos estudios sugieren ciertos grupos de bacterias probióticas modulan el tipo de perfil de citoquinas; así, las bifidobacterias en general se consideran buenos inductores de IL-10 pero pobres inductores de IL-12 mientras que los lactobacilos tienden a inducir respuestas pro-inflamatorias y son débiles inductores de IL-10. Deber recalcar; sin embargo, que existe un fuerte impacto de la especificidad de la cepa en ésta actividad ⁹⁵. El metabolismo de la vitamina A, la inducción de heme-oxigenasa-1 y la producción de ácidos grasos de cadena corta han demostrado tener un efecto inmunomodulador asociado a la maduración de las células dendríticas

intestinales. En este sentido, se ha reportado que algunos microorganismos probióticos pueden ejercer sus efectos inmunomoduladores a través de su acción sobre estos mecanismos fisiológicos ⁹¹. La microbiota intestinal tiene un importante efecto sobre el sistema inmune, por lo tanto, cuando hay una pérdida de la homeostásis intestinal (disbiosis), el predominio microorganismos con actividad pro-inflamatoria pueden favorecer el desarrollo de enfermedades, como la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). Ciertas bacterias probióticas pueden tener un efecto positivo en estas patologías, al restablecer el equilibrio en la comunidad microbiana y reducir la inflamación ^{83,96}. Además, las bacterias probióticas pueden influenciar la activación de las células dendríticas al modular las poblaciones bacterianas en el intestino ⁸⁹. Como ejemplo de ello se puede mencionar la capacidad de una cepa de *L. plantarum*, aislada de kéfir, para modular la población de bacterias filamentosas segmentadas en el intestino de ratones inmunocomprometidos conduciendo a cambios en la activación de células Th17 ⁹⁷.

Se ha descrito que bacterias probióticas afectan los niveles de expresión de los TLR en diferentes células. La activación de los TLR conduce a una regulación positiva de mediadores pro-inflamatorios que facilitan la defensa inmunitaria del huésped ⁸⁶. Por otra parte, algunas cepas probióticas ejercen efectos sobre los reguladores negativos de los TLRs, mecanismo necesario para evitar una exagerada respuesta pro-inflamatoria. De este modo, algunos probióticos ejercen un efecto regulador en el contexto de infecciones entéricas e inflamación en la mucosa, ayudando a preservar la integridad estructural y funcional de los tejidos afectados ^{23,83}.

Se postula que los probióticos ejercen efecto en la respuesta inmune a través de las células presentadoras de antígeno en las mucosas. Las CPA estimuladas migran a los ganglios linfáticos mesentéricos para diferenciar las células T CD4+ vírgenes en las correspondientes subpoblaciones de acuerdo al patrón de citoquinas. Las citoquinas y las células T se dirigen a la circulación sanguínea y migran al hígado y el bazo para regular la respuesta inmune sistémica ⁶⁰. Se ha descrito que algunos probióticos pueden modular los niveles de inmunoglobulinas y citoquinas en suero, las células en sangre y la

estimulación de los linfocitos en el bazo ²³. Las células inmunes en el bazo también se ven influenciadas por la variación en la producción de citoquinas y estimulación de poblaciones específicas de linfocitos ²³.

Se han observado cambios en los niveles de IgG en animales a los cuales se administraron diferentes cepas probióticas, y también se han descrito efectos en los subtipos de anticuerpos. Por ejemplo, *L. johnsonii* NCC 533 inclina la respuesta hacia mayor proporción de IgG1 un isotipo asociado con la inducción de IL-4 por parte de las células B y una respuesta predominantemente Th2; mientras que *L. paracasei* NCC 2461 induce una mayor proporción de IgG2a que está asociada a una respuesta predominantemente de tipo Th1 ^{23,98,99}. Los probióticos también pueden aumentar el número de células B IgG+ de memoria en respuesta a ciertas vacunas, como se ha observado con *Bifidobacterium longum* bv. *infantis* CCUG 52486 en la vacunación contra la influenza ⁸⁹.

Ciertos probióticos producen un aumento en el número de células Treg. Por ejemplo, *B. infantis* 35624 en adultos sanos aumentó los niveles de linfocitos Foxp3+ en sangre periférica, en pacientes con psoriasis, síndrome de fatiga crónica o pacientes con colitis ulcerativa. Este efecto se asoció a disminuciones en los biomarcadores pro-inflamatorios como la proteína C reactiva ^{89,91}.

Considerando que los microorganismos probióticos pueden modular la actividad de muchas células del sistema inmune, incluyendo el sistema innato (NK, Células dendríticas, macrófagos, células epiteliales y granulocitos) y adaptativo (Th1, Th2, Th17, Treg, Tc y células B), los probióticos pueden modular el sistema inmune en el contexto de respuestas frente a patógenos intracelulares o extracelulares ⁹⁰. Los inmunobióticos han demostrado ser capaces de aumentar la resistencia contra las infecciones virales y bacterianas, mediante la modulación de la inmunidad innata y adaptativa en humanos, ratones y animales de importancia para la agricultura como bovinos y porcinos ⁴⁶. Varios informes han demostrado que algunas cepas mejoran la protección contra las infecciones entéricas y acortan la duración de diarreas, reduciendo el número de episodios, además de

disminuir la propagación del patógeno, normalizar la permeabilidad intestinal y aumentar la producción de anticuerpos específicos ^{100,101}. Se han estudiado cepas inmunobióticas capaces de generar protección contra patógenos virales mediante la modulación diferencial de las respuestas inmunitarias antivirales en humanos, cerdos y bovinos ^{68,102}. Se ha postulado que los inmunobióticos podrían usarse en la alimentación del ganado para mejorar su salud y producir animales seguros ^{103,104}. Así, la cepa *L. jensenii* TL2937 al ser administrada a cerdos fortalece su sistema inmune y aumenta su velocidad de crecimiento y productividad ^{105,106}. Estudios transcriptómicos de *L. jensenii* TL2937 en células epiteliales porcinas (células PIE) ofrecieron una visión amplia de los patrones de expresión de genes relacionados con el sistema inmune implicados en la respuesta de las células epiteliales intestinales a la activación del TLR4 ¹⁰⁷. La cepa *L. rhamnosus* CRL1505 demostró modular la respuesta inmune en el intestino y en mucosas distantes al tracto gastrointestinal ⁷⁶. *L. rhamnosus* CRL1505 estimula la respuesta inmune innata y adaptativa en el intestino y confiere resistencia a la infección por *Salmonella typhimurium* en ratones inmunocompetentes ¹⁰⁸, desnutridos inmunocomprometidos ⁶⁵ y en modelo murino mejoran la respuesta inmunocoagulativa en infecciones respiratorias en huéspedes malnutridos ¹⁰⁹. *L. rhamnosus* CRL1505 mejoró la inmunidad en mucosas y redujo la incidencia y gravedad de las infecciones intestinales y respiratorias en niños, permitiendo el desarrollo de una bebida láctea para un programa de alimentación social en el Norte de Argentina para prevenir las infecciones digestivas y respiratorias de niños en edad escolar ¹¹⁰. Estudios transcriptómicos con *L. rhamnosus* CRL1505 en células PIE permitieron identificar un grupo de genes modulados diferencialmente por esta cepa, involucrados en la mejora de la resistencia a las infecciones virales ¹¹¹. Se ha estudiado el efecto en infecciones intestinales virales producidas por Rotavirus, con una importante disminución en la severidad de los síntomas, normalizando la permeabilidad intestinal, favoreciendo una respuesta inmune antiviral ¹¹²⁻¹¹⁴. Por otra parte, se ha evaluado el efecto de cepas inmunobióticas en infecciones respiratorias por Virus Influenza y Virus Sincicial Respiratorio en infantes, individuos de edad avanzada e inmunocomprometidos con una mejora en la inmunidad antiviral, disminución de los títulos virales, aumento en la

actividad de las células NK, modulación de la respuesta inmune pro-inflamatoria e inmunocoagulativa ^{46,109,114}. Por otra parte, se ha evidenciado una disminución en la probabilidad de infecciones secundarias a infecciones respiratorias graves ¹¹⁵ y regulación de la hematopoyesis de emergencia con un incremento de la resistencia a infecciones bacterianas y virales ¹¹⁶.

El uso de inmunobióticos en el tratamiento y prevención de enfermedades alérgicas como la rinitis, asma y eczema atópico o dermatitis también han resultado exitosas ^{46,117}. En estudios animales de cáncer colorectal ¹¹⁸ y cáncer de mama ^{66,119} se ha observado una disminución en el tamaño de tumores y disminución de la metástasis regulada por el sistema inmune ¹²⁰.

A medida que avanza el estudio de los microorganismos inmunobióticos aparecen nuevos enfoques en bioterapia y pueden evaluarse nuevas estrategias de combinación de terapias en diferentes sitios blanco ⁵². Los inmunobióticos pueden considerarse candidatos para ensayos terapéuticos en enfermedades que involucran en su patogénesis funciones desreguladas de las células inmunes de mucosas, como es el caso particular de la infección por *Helicobacter pylori* en donde la respuesta inmune a la infección contribuye al desarrollo de la enfermedad y al fallo en la erradicación ^{52,121}.



I.II *Helicobacter pylori*: ASPECTOS GENERALES

Aunque desde finales del siglo XIX varios investigadores describieron la presencia de formas espirales en la mucosa gástrica, el primer aislamiento e identificación bacteriológica de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) fue realizado en 1982 por Marshall y Warren. Esto inició una nueva era en la microbiología gástrica, cambiando el paradigma que el estómago era un órgano estéril¹²²⁻¹²⁴. Las primeras observaciones experimentales, producto de la auto infección y estudios en voluntarios, demostraron que la colonización gástrica por este microorganismo conducía a inflamación de la mucosa gástrica. Así se dio lugar a un amplio campo de investigación sobre el papel de la infección crónica por este microorganismo en las patologías gastroduodenales¹²⁴.

La colonización gástrica por *H. pylori* induce gastritis en todos los individuos infectados y si no hay tratamiento, causa una infección de por vida^{124,125}. En la mayor parte de los casos la infección es asintomática^{124,126}. Sin embargo, el 10% puede desarrollar úlcera péptica, un 1% progresa a adenocarcinoma gástrico y menos del 0.1% evoluciona a linfoma de tejido linfoide asociado a mucosa (MALT)^{127,128}. Otras condiciones asociadas con la infección por *H. pylori* incluyen dispepsia, gastritis atrófica, anemia ferropénica y púrpura trombocitopénica idiopática¹²⁶. El riesgo de desarrollar estas patologías depende de factores bacterianos, ambientales y del huésped¹²⁴.

En 1994 la IARC (*International Agency for Research on Cancer*) clasificó a *H. pylori* como carcinógeno del grupo I (riesgo carcinógeno probado con datos claros y confirmados). De este modo, es el primer patógeno bacteriano reconocido formalmente como carcinógeno, designación confirmada en 2009^{123,124}. Se considera que 89% de los casos de cáncer gástrico pueden atribuirse a la infección por *H. pylori*. El cáncer gástrico es la tercera causa de muerte asociada a cáncer con un mal pronóstico de supervivencia: sólo 1 de 5 pacientes sobrevive más de 5 años después del diagnóstico^{126,129}. El adenocarcinoma gástrico es la tercera causa de muerte por neoplasias a nivel mundial¹³⁰. En Chile, es la cuarta neoplasia más frecuente (5162 nuevos casos estimados para 2018)¹³¹, representando el 9.7% de todos los cánceres. El ASIR (*Age Standardized Incidence*

Rate) cataloga a Chile como región de riesgo intermedio de desarrollar cáncer gástrico (10-20/100.000 habitantes) ¹³².

H. pylori es uno de los patógenos humanos más exitosos, colonizando cerca de la mitad de la población mundial¹²⁴. Si bien su prevalencia es ubicua, demuestra variaciones geográficas, siendo más alta en países en vía de desarrollo (más del 80%, incluyendo población juvenil) y en países industrializados es menor al 40% (con mayor prevalencia en adultos y ancianos). Se ha observado que existe una correlación inversa con el estatus socio- económico, particularmente con el nivel de higiene y las condiciones de vida en la infancia. La prevalencia es alta en África (79,1%), Latinoamérica y el Caribe (63,4%) y Asia (54,7%); mientras que es más baja en Norteamérica (37,1%) y Oceanía (24,4%). La disminución de la incidencia de la infección por *H. pylori* se asocia con mejores estándares de vida ^{124,129,133}. En Chile, la prevalencia de infección oscila entre 60% y 79%, dependiendo de la condición socio-económica, de la educación y a las condiciones sanitarias de la población estudiada ¹³⁴.

La ruta de transmisión de este patógeno aún es poco clara; se postula que la infección se adquiere durante la infancia temprana y que la madre juega un rol importante en la transmisión. El único nicho reconocido para *H. pylori* es la mucosa gástrica y se cree que la bacteria se disemina persona a persona a través de la ruta fecal-oral u oral-oral. La infección se asocia a condiciones deficientes de saneamiento, falta de suministro de agua potable y hacinamiento ^{124,135}.

H. pylori es una bacteria Gram negativa, espiral, de 2-4 μm de largo y 0,5-1 μm de ancho y tiene 3-7 flagelos polares protegidos por una vaina lipídica¹³⁶. Pertenece al orden de Epsilonproteobacterias, familia *Helicobacteriaceae*; inicialmente se consideró como una especie del género *Campylobacter* (*C. pylori*), pero análisis de la secuencia del ARNr 16S demostró que constituía un género aparte ^{123,137}. Necesita niveles de 2 a 5% de O₂, 5 a 10% de CO₂ y alta humedad ¹²⁴, tiene un crecimiento óptimo a 37°C en pH neutro. *H. pylori* es ureasa, catalasa y oxidasa positiva; características a menudo empleadas para su identificación ¹²⁴.

Por otra parte, *H. pylori* exhibe una diversidad genética entre cepas, lo que favorece la adaptación al huésped ¹²⁶. Se considera una bacteria no invasiva, la mayor parte vive libremente en la capa de mucus, algunas se adhieren a la superficie de células epiteliales y pocas invaden a las células epiteliales gástricas ¹³⁸.

II.II PATOGÉNESIS Y RESPUESTA INMUNE FRENTE A *H. pylori*

El riesgo de enfermedad está relacionado con la interacción de numerosos factores bacterianos y ambientales del huésped, muchos de los cuales influyen en la inflamación crónica y el daño a la mucosa gástrica ¹²⁶. Para establecerse y mantener la infección en un nicho único como el lumen gástrico, *H. pylori* requiere varios determinantes de patogenicidad que pueden dividirse en dos grupos: **los factores de virulencia**, que determinan la aparición de los efectos patogénicos de la bacteria (inflamación, disrupción de la mucosa y alteración de la fisiología gástrica); y **los factores de mantenimiento**, que permiten colonizar y persistir en el huésped; si bien, algunos factores pueden funcionar en las dos categorías ^{139,140}.

Los factores de virulencia incluyen los factores de colonización bacteriana BabA (*Blood Group Antigen-Binding Adhesin*), SabA (*Sialic Acid-Binding Adhesin*), OipA (*Outer Inflammatory Protein*), HopQ (*Helicobacter Pylori Outer Membrane Protein*) y los factores necesarios para la patogenicidad incluyen las proteínas efectoras como CagA, VacA, HtrA y las vesículas de membrana externa (OMV: *Outer Membrane Vesicles*) (**Tabla 1**).

Tabla 1. Factores de virulencia relacionados con la patogenicidad mediada por *H. pylori* (Modificado de Ansari et al ¹⁴¹).

Factores de virulencia	Mecanismo	Efectos
<u>Factores de virulencia para la evasión al ácido</u>		
Ureasa	Producción de NH ₃ y CO ₂	Neutraliza la acidez gástrica El NH ₃ altera las uniones estrechas, produce pérdida de la integridad celular y daños en el epitelio gástrico. El CO ₂ protege a la bacteria de la muerte por productos metabólicos como el óxido nítrico (NO) y la muerte intracelular en los fagocitos.
	Angiogenesis	Conduce a la diferenciación de las células endoteliales produciendo ROS y activando la vía lipoxigenasa, contribuyendo a la progresión a carcinogénesis gástrica. Se une a moléculas MHC-II e induce apoptosis celular.
	Activación de la vía PI3K-AKT-mTOR	Contribuye al crecimiento del tumor y diseminación metastásica jugando un importante papel en la progresión al cáncer gástrico.
Forma Bacteriana	Forma helicoidal de la bacteria	Activada por la ureasa. Aumenta la expresión de HIF- α que contribuye al desarrollo y progresión del cáncer.
Flagelos	Motilidad	Favorece que la bacteria penetre la capa de mucus y colonice el epitelio gástrico.
	Flagelina	Ayuda a la bacteria a escapar del ambiente ácido. La exposición al ácido activa la flagelina. Mayor motilidad protege la bacteria. Residuos en el dominio D0 juegan un rol en el escape del reconocimiento por TLR5.
<u>Factores de colonización epitelial</u>		
BabA	Unión al receptor Leb en las células epiteliales	Participa la adhesión bacteriana y la colonización. Aumenta la traslocación de CagA. Induce rupturas en las dobles cadenas del ADN en las células del huésped.
SabA	Unión al antígeno Lex sialilado	Participa en la adherencia y colonización.
OipA	Adherencia al epitelio gástrico	Involucrado en la adherencia a células epiteliales y daño a la mucosa. Induce la expresión de IL-8, causa apoptosis de las células del huésped. Ayuda al establecimiento de una infección crónica y supresión de la maduración de células dendríticas ¹⁴² .
HopQ	Adherencia al epitelio gástrico	Interactúa con varios miembros de la familia de CEACAM en el epitelio gástrico facilitando la translocación de CagA.

En las etapas tempranas del desarrollo/progresión del tumor, protege a los tumores del ataque celular mediante la interacción de CEACAM 1 en células inmunes, inhibiendo su actividad¹⁴³.

Factores de patogenicidad que afectan a las células epiteliales

<i>cagPAI</i>	Codifica sistema de secreción tipo 4 (TSS4)	Translocación de CagA y péptidoglicano. Inducción de la secreción de citoquinas pro-inflamatorias por monocitos y células epiteliales ¹⁴⁴ .
CagT	Actúa como proteína del complejo central en T4SS	Esencial para la translocación de CagA. Necesario para la formación del pili ¹⁴⁵ .
CagY	Se une con integrina	Modula la respuesta inmune promoviendo la persistencia. Altera funciones T4SS ¹⁴⁶ . Necesario para la formación del pili ¹⁴⁵ .
CagL	Actúa como proteína del complejo central en T4SS y se une con integrina	Ayuda en la translocación de CagA. Induce la expresión de IL-8. Estimula la activación de NF-κB en las células epiteliales gástricas, lo que conduce a la expresión de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias; activación de la señalización de MAPK, que conduce a la proliferación celular y la expresión de genes inflamatorios; interrupción de las uniones de células epiteliales ¹⁴⁴ .
CagA	Fosforilación de tirosina	Es una oncoproteína que puede inducir neoplasias malignas en mamíferos. La inyección de CagA en células epiteliales gástricas normales provoca estrés oncogénico, que induce senescencia celular prematura o apoptosis. Al inducir defectos de unión y polaridad, CagA también puede causar gastritis crónica y/o ulceración péptica debido a la desintegración estructural de la mucosa gástrica. La inflamación crónica asociada con la infección por <i>H. pylori</i> cagA+ a largo plazo causa inestabilidad genética y epigenética en la mucosa del estómago infectada ¹⁴⁷ . Produce proliferación celular. Genera elongación celular.
VacA	Vacuolización de las células epiteliales Estrés del retículo endoplasmático	Induce la producción de IL-8 por monocitos y macrófagos a través de la señalización p38 MAPK; activa los mastocitos e induce la expresión de citoquinas inflamatorias; juega un papel en el mantenimiento de la colonización ¹⁴⁴ .

		<p>Se une a CD18 en células T humanas e inhibe directamente la activación y proliferación de linfocitos B y T humanos; ejerce efectos de tolerancia en DC para estimular una respuesta Treg; inhibe la presentación de antígenos; inhibe la maduración de DC a través de efectos sobre la señalización de E2F1; induce a las células T a expresar el factor de transcripción Treg Foxp3 ¹⁴⁴.</p> <p>Interfiere con la vía de señalización de IL-2 en las células T al bloquear la movilización de Ca²⁺ y la actividad de la calcineurina fosfatasa dependiente de Ca²⁺/calmodulina. También interfiere con la presentación de antígenos mediada por MHC-II ¹⁴⁸.</p>
γ - Glutamil transpeptidasa	<p>Transpeptidación y síntesis de aminoácidos</p> <p>Vacuolización de las células epiteliales dependiente de VacA</p>	<p>Aumenta la apoptosis celular. Inhibe la proliferación celular. Detención del ciclo celular.</p> <p>Destrucción de las células epiteliales. Induce la activación de NF-κB, la producción de IL-8 y ROS por las células epiteliales gástricas; estimula una respuesta Th17. Por otra parte demuestra una potente actividad supresora de células T; induce a las células T a expresar el factor de transcripción Treg Foxp3; regula al alza la expresión de ciclooxigenasa 2 (COX2) en las células T que modula la respuesta Th1 ¹⁴⁴.</p>
HrtA	Actúa como proteasa	Degrada proteínas defectuosas. Permite la inyección de CagA. Escinde las proteínas de unión estrecha.
Vesículas de membrana externa	Internalización dependiente e independiente de clatrina	Protege al patógeno de los efectos de las especies reactivas de oxígeno. Daña las funciones celulares. Inducen la función de las células dendríticas.

La infección por *H. pylori* produce una robusta respuesta innata y adaptativa, sin embargo, es ineficaz ya que la bacteria persiste y la inflamación continúa por décadas ¹⁴⁹. Los factores de virulencia de *H. pylori* son elementos cruciales en la patogénesis y la tolerancia inmune ¹⁵⁰.

Los PRRs expresados por las células epiteliales, macrófagos y células dendríticas reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs: *Pathogen-associated molecular patterns*) como el lipopolisacárido, flagelina y pépidos de la pared bacteriana, activando la expresión de genes relacionados con la inflamación (**Figura 1**). *H. pylori* tiene varios mecanismos para la inducción de citoquinas pro inflamatorias ^{151,152}. El epitelio tiene la habilidad de producir citoquinas que gatillan el reclutamiento de células

inflamatorias a la lámina propia gástrica, la producción de IL-8 en respuesta a la infección por *H. pylori* es una de las primeras respuestas epiteliales¹⁵¹. El contacto del patógeno con monocitos y otras CPA conduce a la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-8¹⁴⁸. IL-8 recluta neutrófilos a la mucosa gástrica, que contribuyen al daño epitelial. Los macrófagos también contribuyen al daño epitelial al producir óxido nítrico en respuesta a la ureasa, conduciendo a producción de mediadores de la inflamación.

La mucosa gástrica infectada es infiltrada por neutrófilos y monocitos así como células de la inmunidad adaptativa como los linfocitos¹⁵³. La activación de las DC gástricas por *H. pylori* conduce a las células T CD4+ vírgenes a la diferenciación Th1 mediante la producción de IL-12 y permite que estas células secreten citoquinas tales como IL-1, IL-6, TNF- α e IFN- γ . La respuesta inicial de Th1 tiene como objetivo erradicar la infección por *H. pylori*. Sin embargo, en algunos individuos las citoquinas productoras de células Th1 mantienen la inflamación de la mucosa y contribuyen al desarrollo de la inmunopatología preneoplásica gástrica asociada a la infección que se manifiesta histológicamente como gastritis atrófica, hiperplasia epitelial y metaplasia intestinal¹⁵⁴. Las células Th17 también contribuyen a la defensa de la mucosa del huésped al funcionar como mediadores de la inflamación asociada con la producción de IL-17, IL-8 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), que se utilizan para atraer granulocitos¹⁵⁴. Se sabe que la infección por *H. pylori* suprime las respuestas inmunitarias del huésped, se plantea que la supresión es causada por una reprogramación eficaz de DC hacia un fenotipo promotor de tolerancia a través de IL-1 β e IL-18. Estas células DC tienen la capacidad de inducir la producción de células Treg a través de la expresión mucosa del factor de crecimiento transformante beta 1 (TGF- β 1) e IL-10. *H. pylori* promueve la expresión de IL-10 inhibiendo la maduración de las DC e induciendo a las mismas a tener un fenotipo tolerogénico que puede suprimir la proliferación de células T efectoras CD4⁺ y CD8⁺. El resultado funcional es la supresión de la inmunidad Th17 y Th1 específica de *H. pylori* y la colonización crónica del estómago¹⁵⁴.

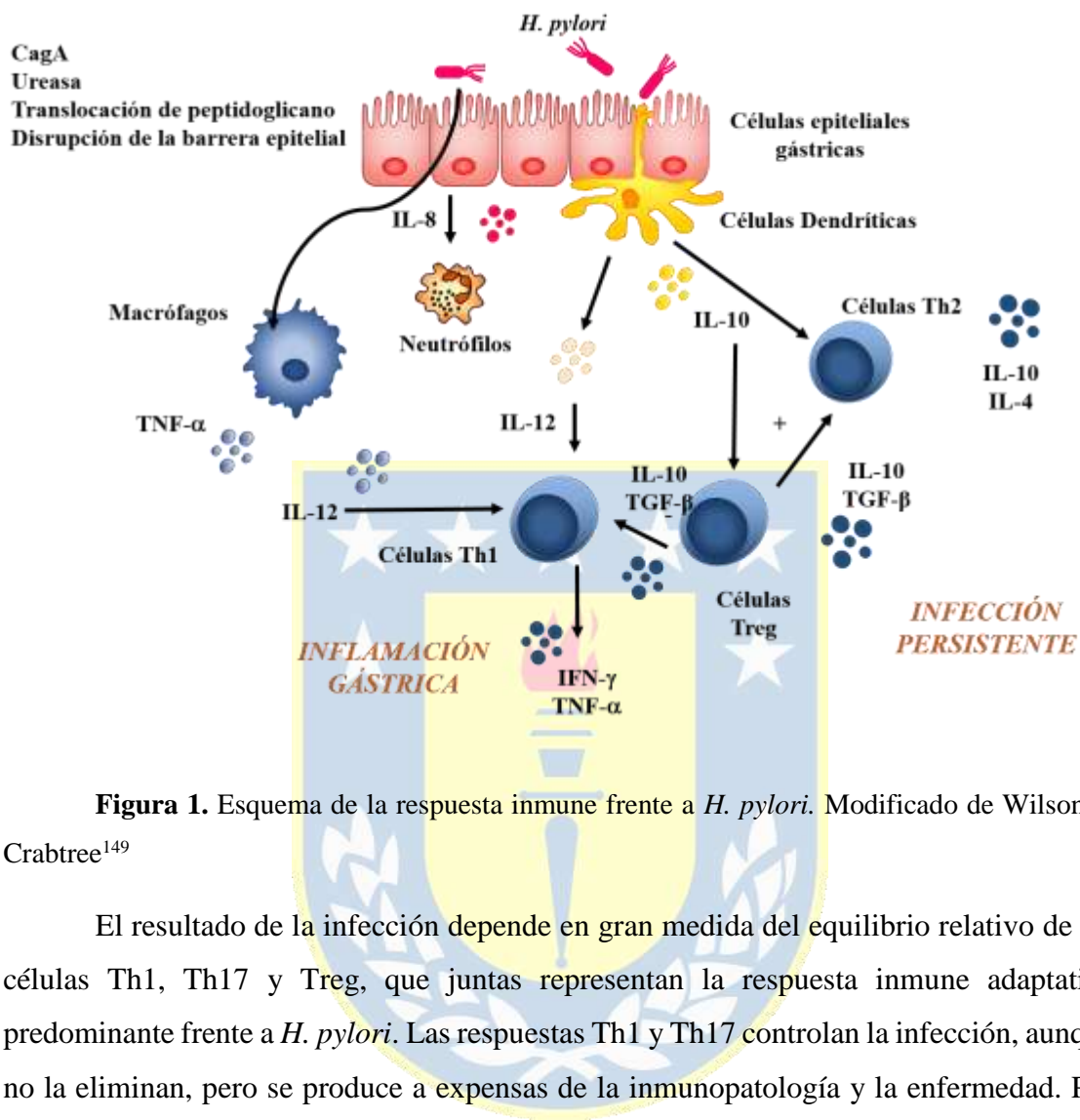


Figura 1. Esquema de la respuesta inmune frente a *H. pylori*. Modificado de Wilson & Crabtree¹⁴⁹

El resultado de la infección depende en gran medida del equilibrio relativo de las células Th1, Th17 y Treg, que juntas representan la respuesta inmune adaptativa predominante frente a *H. pylori*. Las respuestas Th1 y Th17 controlan la infección, aunque no la eliminan, pero se produce a expensas de la inmunopatología y la enfermedad. Por otro lado, una respuesta Treg induce tolerancia y probablemente también sea responsable de los efectos protectores de *H. pylori* contra el asma y algunas otras enfermedades inflamatorias¹⁵⁵

H. pylori evade las respuestas inmunitarias del huésped mediante diferentes mecanismos, como la inducción de la apoptosis de los macrófagos en asociación con alteraciones en la vía mitocondrial¹⁴⁸. *H. pylori* ha modificado algunos PAMPs, como es el caso del LPS tetra acetilado que es pobremente reconocido por TLR4 y la flagelina FlaA que se une de manera poco eficiente a TLR5¹⁵¹, conduciendo a una débil activación

de los PRRs. Respecto al LPS, la cadena polisacárida del antígeno O puede ser fucosilado e imitar a los antígenos del grupo sanguíneo Lewis (Le^x , Le^y , Le^a , Le^b), este mimetismo contribuye a la evasión inmune. Así mismo, la variación de fase del LPS contribuye a la heterogeneidad de la población y permite la adaptación del microorganismo a las condiciones de la mucosa gástrica ¹²⁰. Además, el LPS de *H. pylori* tiene baja afinidad a la proteína de unión a LPS, por lo que tiene menor capacidad de transferencia al CD14 presente en los macrófagos y monocitos ¹⁵³. Por otra parte, la bacteria produce una arginasa que compite con la óxido nítrico sintasa (NOs) por la L-arginina, convirtiéndola en urea y L-ornitina en lugar de NO, al prevenir la producción de NO puede escapar del sistema inmunológico ¹⁵³.

Comprender los mecanismos de colonización, los factores de persistencia y virulencia de la bacteria, así como las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas del huésped, son de vital importancia para el desarrollo de nuevas estrategias para prevenir el desarrollo de la enfermedad gastroduodenal inducida por *H. pylori* ¹⁵⁶.

II.III TRATAMIENTO

La infección por *H. pylori* sigue siendo un problema de salud pública a nivel mundial. La evidencia demuestra que la erradicación del microorganismo conduce a la resolución de las enfermedades asociadas (con evidencia en gastritis crónica, úlcera péptica y linfoma MALT) y se ha asociado con una disminución de la incidencia del cáncer gástrico ^{122,129,157,158}. El patógeno es sensible a una variedad de antibióticos *in vitro*; sin embargo, ningún antimicrobiano ha resultado eficaz para su erradicación cuando se administra como monoterapia ya que la eficiencia de la terapia antimicrobiana se ve afectada por las condiciones de la mucosa gástrica ^{126,159}. La terapia estándar recomendada por varios consensos y guías clínicas consiste en una triple terapia que incluye dos antibióticos (normalmente claritromicina y amoxicilina o metronidazol) y un inhibidor de la bomba de protones por 14 días ¹²⁶. Las limitaciones del tratamiento antimicrobiano incluyen la selección de cepas resistentes, la aparición de efectos adversos, el riesgo de re-infección, el alto costo de la terapia y la poca adherencia al tratamiento ^{122,140,160,161}. La

OMS, incluyó a *H. pylori* resistente a la claritromicina en el listado de patógenos prioritarios (Prioridad 2: Alta) objeto de nuevas estrategias de investigación y desarrollo para su tratamiento ¹⁶².

Las tasas de erradicación dependen en gran parte de la prevalencia de resistencia antimicrobiana, la cual varía ampliamente en todo el mundo y está relacionada con el consumo de estos medicamentos en cada región. Por lo tanto, la estrategia apropiada para cada país puede ser variable ^{126,129}. Por ello, las directrices se han modificado en Canadá, Estados Unidos, Europa, China y Latinoamérica; todas destacan la importancia de considerar la prevalencia local de resistencia a los antibióticos al elegir un régimen de tratamiento adecuado. Debe evitarse la terapia triple de primera línea basada en claritromicina en áreas en las que la prevalencia de infecciones resistentes a la claritromicina es mayor al 15% y se recomienda la terapia cuádruple de bismuto o las terapias concomitantes cuádruples sin bismuto ¹⁶³. Latinoamérica presenta altos porcentajes de resistencia antimicrobiana a fármacos de primera línea como claritromicina y metronidazol; en Chile, se reporta una tasa promedio de resistencia a claritromicina y metronidazol de 9 y 31%, respectivamente ¹⁶⁴.

Por otra parte, estudios han demostrado que la falla terapéutica no puede explicarse completamente por el no cumplimiento o por la resistencia a los antimicrobianos ¹⁶⁵; y apuntan a que una respuesta inmune específica establecida puede tener un rol en la erradicación exitosa de la infección ¹⁶⁶.

Debido a la disminución de la eficiencia de la terapia antimicrobiana, se han investigado estrategias alternativas que incluyen principios activos de plantas, miel y propóleos, probióticos, péptidos, polisacáridos y fototerapia. Aunque ninguno de ellos ha mostrado capacidad para inducir una completa erradicación del patógeno, en diferente grado, han contribuido a la disminución en las densidades de colonización, favorecen la gastro-protección, modulan la respuesta inmune y reducen los efectos adversos de la terapia convencional ^{159,160,167}; esto puede significar evitar la evolución hacia las formas más graves de la infección ¹²⁴.

Resulta lógico pensar que la vacunación podría ser una estrategia apropiada para el control de esta infección. Se han evaluado formulaciones con lisados celulares, vesículas de membrana externa, antígenos purificados (ureasa, catalasa, NapA, VacA, CagA, proteínas del shock térmico), vacunas de ADN, empleando diferentes vías de administración y adyuvantes; sin embargo, a pesar de más de 30 años de investigaciones, los resultados no han sido completamente exitosos¹²⁶. Se postula que la vacunación efectiva depende de la inducción de una respuesta inmune humoral y de células Th2, mientras que la inducción de una respuesta Th1 favorece la inflamación ¹²⁴.

La infección entérica por helmintos ha demostrado modular el sistema inmune del huésped disminuyendo el daño gástrico inducido por *H. pylori*. Esto podría sugerir que la administración de agentes inmunomoduladores podría ser una estrategia prometedora para el manejo de la enfermedad ¹²⁴.

II.III.I PROBIÓTICOS EN LA INFECCIÓN POR *H. pylori*

Se ha demostrado que los probióticos previenen la infección por bacterias patógenas gracias a diversos mecanismos, dentro de ellos, la modulación del sistema inmune del huésped, así como la competencia directa con el patógeno ¹²⁴. El interés en los probióticos en la infección por *H. pylori* ha aumentado ya que representa una opción a bajo costo que se puede implementar a gran escala ¹⁶⁰. De hecho, el consenso de Maastrich indica que ciertos probióticos demuestran efectos prometedores como adyuvantes en el tratamiento disminuyendo los efectos colaterales. Este efecto es cepa específico, por lo que debe existir eficacia clínica demostrada ^{168,169}.

La evidencia actual respalda el rol de los probióticos en el aumento de las tasas de erradicación, de los efectos adversos relacionados a la terapia antimicrobiana y la mejora de los hallazgos histopatológicos en la mucosa gástrica ^{170,171}. Los mecanismos de acción de los probióticos en el contexto de la infección por *H. pylori* incluyen competencia por nutrientes, actividad bactericida a través de la producción de bacteriocinas o ácidos orgánicos, inhibición de la adhesión a las células epiteliales, efecto sobre la expresión y

funcionalidad de factores de virulencia, estabilización de la función de barrera gástrica y disminución de la inflamación en la mucosa gástrica. Es reconocido que algunas cepas probióticas contribuyen a la curación de la mucosa gástrica gracias a sus propiedades antioxidantes y anti inflamatorias. Algunos ejemplos de cepas probióticas útiles para combatir a este patógeno gástrico incluyen *L. johnsonii* NCC 533, *L. casei* Shirota, *L. acidophilus* LB, *L. johnsonii* MH-68, *L. salivarius* ssp. salicinius AP-32 ¹⁷²⁻¹⁷⁵.

La regulación de los niveles de citoquinas anti-inflamatorias tendría un efecto en la inflamación, con un efecto favorable en la mucosa gástrica a través de la inmunomodulación local o sistémica. Se postula que los probióticos podrían contribuir a polarizar la respuesta inmune hacia una respuesta tipo Th2, asociada con la producción de IL-4 o IL-10 lo que podría contribuir a disminuir la inflamación producto de la respuesta natural frente a *H. pylori*, caracterizada originalmente por una células T CD4+ que expresan principalmente un fenotipo Th1 ^{170,176}.

En la **Tabla 2**, se enumeran los estudios *in vitro* y en modelos animales más relevantes en los que se evalúa el efecto de diferentes cepas probióticas en la respuesta inflamatoria asociada a la infección por *H. pylori*. La microbiota intestinal es una importante fuente de probióticos para el uso humano, en ese contexto, lactobacilos de origen gástrico pueden ser candidatos para el uso en la infección por *H. pylori* si bien muchos estudios que evidencian una disminución en la producción de IL-8 *in vitro* e *in vivo* se han evaluado en cepas que no son de origen gástrico ^{177,178}.

Tabla 2. Resumen evidencia de la actividad inmunomoduladora de cepas probióticas sobre *H. pylori*.

Cepa Probiótica	Modelo	Hallazgos
<i>L. casei</i> L26, <i>B. lactis</i> B94 ¹⁵⁸	Ratones C57BL/6 Infección por <i>H. pylori</i> SS1	↓ Infiltración gástrica por neutrófilos. ↓ Secreción IL-1 β . ↑ Secreción IL-10. <i>B. lactis</i> B94 ↑IL-12/23p40 ; ↓ anti <i>H. pylori</i> IgG. No hay diferencia significativa en la colonización por <i>H. pylori</i> .
<i>L. johnsonii</i> La1 ¹²⁷	Ratones C57BL/6 Infección por <i>H. pylori</i> SS1	↓ infiltración de linfocitos y neutrófilos ↓ Niveles de en mucosa gástrica MIP-2 y KC. No hay efecto inhibitorio en la infección por <i>H. pylori</i> . ↓ Títulos IgG anti <i>H. pylori</i> .
Sobrenadante neutralizado de <i>L. johnsonii</i> La1	Células AGS	↓ Secreción de IL-8 <i>in vitro</i> en células AGS.
BIFICO: ¹⁷⁹ <i>E. faecalis</i> , <i>B. longum</i> y <i>L. acidophilus</i>	Ratones C57BL/6 Infección por <i>H. pylori</i> SS1	No tiene efecto sobre la colonización por <i>H. pylori</i> en el estómago del ratón. Mejora en la gastritis inducida por <i>H. pylori</i> ↓ Expresión de TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-6, G-CSF y MIP-2. ↓ En la sobreexpresión de TLR2, TLR4 y MyD88 inducidos por <i>H. pylori</i> .
	Células GES-1 (Gastric epithelial cells)	↓ La respuesta inflamatoria producto de la infección por <i>H. pylori</i> vía NF- κ B y señalización MAPK en GES-1.
<i>L. salivarius</i> B101, <i>L. rhamnosus</i> B103, <i>L. plantarum</i> XB7	Células AGS Infección por <i>H. pylori</i> 43504	Sobrenadantes libres de células (SLC) obtenidos a partir de cultivos de <i>Lactobacillus</i>

<p><i>L. plantarum</i> XB7¹⁷⁸</p>	<p>Ratas Sprague– Dawley Infección por <i>H. pylori</i> 43504</p>	<p>↓ la producción de IL-8 en células AGS y la expresión de ARNm inducido por la infección por <i>H. pylori</i>. ↓ la activación de NF-κB en células AGS.</p> <p>La cepa <i>L. plantarum</i> -XB7 retrasa la detección y colonización de <i>H. pylori</i> en el estómago de las ratas, atenúa la inflamación gástrica y mejora los hallazgos histopatológicos. <i>L. plantarum</i> XB7 ↓ TNF-α y CINC-1 en suero y CINC-1 en la mucosa gástrica.</p>
<p><i>L. acidophilus</i> TYCA08, <i>L. acidophilus</i> TYCA15, <i>L. johnsonii</i> MH-68, y <i>L. salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i> AP-32</p>	<p>Ratones Balb/c Infección por <i>H. pylori</i> BCRC 17023</p> <p>Células AGS</p>	<p><i>L. johnsonii</i> MH-68 y <i>L. salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i> AP-32 ↓ colonización de la mucosa gástrica por <i>H. pylori</i>. ↓ Secreción IL-8. ↓ Disminución de la infiltración linfocitaria.</p> <p><i>L. salivarius</i> subsp. <i>salicinius</i> AP-32 ↓ Secreción IL-8, condujo a secreción de IL-10.</p>
<p><i>Lactobacillus</i> spp. aislados de biopsias gástricas de pacientes dispépticos¹⁷⁷</p>	<p>Células AGS Infección por <i>H. pylori</i> 43504</p> <p>Células monocitoides THP-1 estimuladas con LPS <i>E. coli</i></p>	<p>SLC obtenido de <i>L. casei</i>, <i>L. plantarum</i>, <i>L. rhamnosus</i>, <i>L. salivarius</i> ↓ secreción de IL-8. No se observaron efectos antagónicos en el crecimiento de <i>H. pylori</i>.</p> <p>Inhibición en la producción de TNF-α en células monocitoides THP-1 estimuladas con LPS.</p>
<p><i>L. bulgaricus</i>¹⁸⁰</p>	<p>Células SGC-7901 tratadas con LPS de <i>H. pylori</i> SS1</p>	<p>↓ Expresión TLR4, inhibición de la fosforilación de TAK1 y p38 MAPK, ↓ activación de NF-κB. ↓ secreción IL-8 .</p>
<p><i>L. salivarius</i> UCC118¹⁸¹</p>	<p>Células AGS infectadas con <i>H.</i></p>	<p>↓ Secreción de IL-8 inducida por <i>H. pylori</i>. ↑ Secreción de CCL20 CXCL10 en respuesta a la infección por <i>H. pylori</i>.</p>

	<i>pylori</i> cepa CCUG 17874	Modulación de citoquinas era independiente a la producción de bacteriocina y capacidad de adhesión.
<i>Lactobacillus gasseri</i> OLL2716 ¹⁸²	Células MKN-45 infectadas con <i>H. pylori</i> cepas 192, 42, 273, WT, 130	↓ Expresión ARNm IL-8 en el co-cultivo.
	Estudio doble ciego en humanos infectados por <i>H. pylori</i>	↓ secreción de IL-8 determinado en biopsias gástricas

II.III.I.I *Lactobacillus fermentum* UCO-979C: PROBIÓTICO CON ACTIVIDAD EN LA INFECCIÓN POR *H. pylori*.

En el laboratorio de Patogenicidad Bacteriana (Universidad de Concepción-Chile) se aislaron y caracterizaron cepas de *Lactobacillus* obtenidos a partir de estómago humano y se seleccionaron aquellas con propiedades probióticas y actividad anti-*H. pylori*. Los cultivos se obtuvieron a partir de 427 biopsias gástricas. Las colonias fueron sometidas a pruebas fenotípicas y genotípicas para identificar las especies de *Lactobacillus*. Un total de 109 cepas identificadas como *Lactobacillus* se caracterizaron por pruebas funcionales y de inocuidad ^{183,184}. Entre estos aislamientos se encontró una cepa con buenos atributos probióticos y fuerte actividad inhibitoria contra *H. pylori*, denominada UCO-979C.

La cepa UCO-979C se aisló en agar MRS y se identificó como *Lactobacillus* spp. en función de su tinción de Gram positiva y el fenotipo oxidasa y catalasa ambos negativos. La cepa UCO-979C se confirmó como *Lactobacillus* después de la amplificación de la región intergénica de los genes 16S-23S, UCO-979C se identificó como perteneciente a uno de dos grupos definidos arbitrarios por PCR. Mediante API 50 CHL kit V5.2 la cepa UCO-979C fue identificada como *Lactobacillus fermentum* (95,0%) lo cual se confirmó mediante secuenciación completa del genoma depositado en DDBJ/EMBL/GenBank bajo el número de acceso LJWZ00000000 ¹⁸⁵. Esta cepa se depositó en el banco de cepas bacterianas internacionales BCCM/LMG. A continuación,

se describe el *draft genome* de la cepa, destacando sus características específicas¹⁸⁵. El tamaño del genoma (2.1-2.33 Mb) y el contenido GC (51.9%), guarda correlación con datos publicados para *L. fermentum*. Tres contigs revelan similitudes con plásmidos en otros *Lactobacillus*, lo que sugiere la presencia de al menos un plásmido en la cepa UCO-979C. Las secuencias de genoma más cercanas son las cepas *L. fermentum* NB-22 y *L. fermentum* 3872. Genes que codifican para proteínas de unión al colágeno CBP, muestran gran nivel de similitud en la secuencia de aminoácidos con la CBP de *L. casei*. También es homóloga a la CBP de *L. fermentum* 3872. Un gen que codifica para una proteína de unión a la fibronectina A es idéntico a la de *L. fermentum* NB-22, se encontraron varios genes idénticos o altamente similares a los de NB-22¹⁸⁵.

Se evaluaron varias propiedades fisiológicas de *L. fermentum* UCO-979C relacionadas con su potencial probiótico¹⁸⁶. *L. fermentum* UCO-979C sobrevive a pH 3 y la prueba de tolerancia a la bilis indicó es resistente a 2.0% de sales biliares. *L. fermentum* UCO-979C mostró alta hidrofobicidad y agregación en solución salina, lo que indica que esta cepa podría tener una mayor capacidad de adherencia celular. De hecho, *L. fermentum* UCO-979C fue altamente adherente en el ensayo de vidrio y a células Caco-2 en cultivo, de manera similar a otras cepas probióticas reconocidas como *L. rhamnosus* GG y *L. johnsonii* La1¹⁸⁶. *L. fermentum* UCO-979C tiene la habilidad de formar biopelículas y sintetizar exopolisacárido en superficie abiótica y modelos celulares (AGS y Caco-2)¹⁸⁷ y se adhiere a la mucosa gástrica (antro y cuerpo) de gerbos de Mongolia, permaneciendo viable hasta 14 días¹⁸⁶. Posee además buenas características de inocuidad: un alto perfil de susceptibilidad a los antibióticos, sintetiza bajos niveles de aminas biogénicas (en particular, no produce histamina)¹⁸⁶, y carece de plásmidos en el rango de 5 a 200 kb (datos no publicados).

L. fermentum UCO-979C produce ácido láctico (3,149 mg /ml) y de acuerdo con los criterios de Felten *et al.*¹⁸⁸ produce +++ de H₂O₂¹⁸⁶. El pH y la tasa de crecimiento tienen un importante efecto en la actividad metabólica de *L. fermentum* UCO-979C; a pesar de las diferencias metabólicas observadas a pH 6 (pH fisiológico del epitelio

gástrico) y 7 (pH intestinal), la cepa puede crecer y desarrollarse exitosamente en ambas condiciones siendo posible cuantificar moléculas asociadas con su actividad probiótica como ácidos orgánicos y exopolisacáridos. Al respecto, la cepa demostró la habilidad de producir altas cantidades de exopolisacáridos continuamente a altas tasas de dilución, comparado con otras bacterias lácticas (cerca de un 1 g/L) ¹⁸⁹. La variante aclimatada de esta cepa resultó resistente a pH 2,6 por 48 horas donde demostró importante producción de exopolisacárido ($690 \pm 0,03$ mg/L) comparado con la variante nativa ($450 \pm 0,12$ mg/L) ¹⁹⁰.

L. fermentum UCO-979C inhibe el crecimiento y la actividad ureasa de cepas de *H. pylori* (ATCC 43504, J99 y G27). También se ha demostrado que disminuye la secreción de IL-8 por parte de células AGS infectadas con *H. pylori* ¹⁸⁶. La cepa tiene la habilidad de inhibir la adhesión de *H. pylori* en modelos celulares (AGS y Caco-2) hasta en un 83,1% ¹⁸⁷.

Considerando los antecedentes previamente mencionados de la cepa *L. fermentum* UCO-979C y que la inflamación crónica es un blanco útil para reducir las complicaciones producto de la infección por *H. pylori*; se propone determinar si esta cepa cuenta dentro de sus mecanismos de acción con actividad moduladora sobre la respuesta inmune. Teniendo en cuenta las complejidades de las interacciones celulares *in vivo*, es necesario complementar estos estudios mediante la evaluación del efecto de *L. fermentum* UCO-979C en modelos celulares y su efecto sobre la infección por *H. pylori* en un modelo animal. Los resultados de esta tesis pretenden definir a la cepa *L. fermentum* UCO-979C como inmunobiótico y significarán un importante avance en el conocimiento de los mecanismos involucrados su efecto protector contra *H. pylori*. Por otra parte, permitirá orientar la investigación hacia los mecanismos celulares y moleculares involucrados en el potencial efecto inmunomodulador de esta cepa. El proyecto brindará además las bases para el desarrollo de nuevo(s) alimento(s) funcional(es) con esta potencial cepa inmunobiótica, que podrán ser empleados en terapias de prevención y recuperación de pacientes infectados con *H. pylori*.



CAPÍTULO III
HIPÓTESIS, OBJETIVO
GENERAL Y OBJETIVOS
ESPECÍFICOS

HIPÓTESIS

Teniendo en consideración los antecedentes presentados se plantean las siguientes hipótesis de trabajo:

- **H1:** *L. fermentum* UCO-979C modula beneficiosamente la respuesta inmune innata en la infección por *H. pylori*.
- **H2:** El exopolisacárido de *L. fermentum* UCO-979C tiene un efecto beneficioso en la infección por *H. pylori*.
- **H3:** *L. fermentum* UCO-979C, posee actividad inmunomoduladora evidenciable en modelos *in vitro* e *in vivo*.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de *L. fermentum* UCO-979C para modular la respuesta inmune y su efecto en la infección por *H. pylori*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Determinar el efecto inmunomodulador de *L. fermentum* UCO-979C en la infección por *H. pylori* en células epiteliales gástricas, macrófagos activados.
2. Determinar el efecto de la administración oral profiláctica de *L. fermentum* UCO-979C sobre la respuesta inmune y el daño de la mucosa gástrica posterior a la infección por *H. pylori* en el modelo animal ratón.
3. Determinar si el exopolisacárido de *L. fermentum* UCO-979C está involucrado en su actividad anti-*H. pylori*.
4. Determinar el efecto de *L. fermentum* UCO-979C sobre la expresión de mediadores inmunológicos en células epiteliales intestinales porcinas.
5. Determinar el efecto de *L. fermentum* UCO-979C en la inmunidad intestinal y sistémica en un modelo murino.



CAPÍTULO IV

Lactobacillus fermentum UCO-979C
**BENEFICIALLY MODULATES THE INNATE
IMMUNE RESPONSE TRIGGERED BY
HELICOBACTER PYLORI INFECTION *IN VITRO*.**

Garcia-Castillo, V., Zelaya, H., Ilabaca, A., Espinoza-Monje, M., Komatsu, R., Albarracin, L., Kitazawa, H., Garcia-Cancino, A., Villena, J.

Manuscrito publicado: *Benef. Microbes* (2018). 9, 829-841.
<https://doi.org/10.3920/BM2018.0019>

ABSTRACT

Helicobacter pylori infection is associated with important gastric pathologies. An aggressive pro-inflammatory immune response is generated in the gastric tissue infected with *H. pylori*, resulting in gastritis and a series of morphological changes that increase the susceptibility to cancer development. Probiotics could present an alternative solution to prevent or decrease *H. pylori* infection. Among them, the use of immunomodulatory lactic acid bacteria represents a promising option to reduce the severity of chronic inflammatory-mediated tissue damage and to improve protective immunity against *H. pylori*. We previously isolated *Lactobacillus fermentum* UCO-979C from human gastric tissue and demonstrated its capacity to reduce adhesion of *H. pylori* to human gastric epithelial cells (AGS cells). In this work, the ability of *L. fermentum* UCO-979C to modulate immune response in AGS cells and PMA phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)-differentiated THP-1 (human monocytic leukemia) macrophages in response to *H. pylori* infection was evaluated. We demonstrated that the UCO-979C strain is able to differentially modulate the cytokine response of gastric epithelial cells and macrophages after *H. pylori* infection. Of note, *L. fermentum* UCO-979C was able to significantly reduce the production of inflammatory cytokines and chemokines in AGS and THP-1 cells as well as increase the levels of immunoregulatory cytokines, indicating a remarkable anti-inflammatory effect. These findings strongly support the probiotic potential of *L. fermentum* UCO-979C and provide evidence of its beneficial effects against the inflammatory damage induced by *H. pylori* infection. Although our findings should be proven in appropriate experiments *in vivo*, in both *H. pylori* infection animal models and human trials, the results of the present work provide a scientific rationale for the use of *L. fermentum* UCO-979C to prevent or reduce *H. pylori* -induced gastric inflammation in humans.

Keywords: *Helicobacter pylori*, gastric inflammation, macrophages, gastric epithelial cells, *Lactobacillus fermentum* UCO-979C

INTRODUCTION

Helicobacter pylori infection cause an aggressive pro-inflammatory immune response in the gastric tissue resulting in gastritis and a series of morphological changes that increase the susceptibility to cancer development ¹. This gastric pathogen induces the production of pro-inflammatory cytokines and chemokines such as interleukin IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-23 and tumor necrosis factor (TNF- α) resulting in gastric inflammation characterized by the infiltration of plasma cells, lymphocytes, neutrophils, and monocytes within gastric tissue ². In mice and human studies, the gastric mucosa of *H. pylori* -infected subjects show upregulated nuclear factor kB (NF-kB) pathway and T-helper 1 (Th1) type cytokine responses, which may disturb the integrity of the gut epithelial barrier ^{3,4}. Given the importance of inflammation in host disease, modulation of innate immunity in the gastric mucosa is an attractive target for improving resistance against *H. pylori* infections and reducing severity of the disease ^{2,4}.

Probiotics could present a low-cost, large-scale alternative solution to prevent or decrease the colonization of *H. pylori*. In fact, several works have demonstrated that probiotics are effective as adjunct treatment in *H. pylori* infections or in prophylaxis ⁵⁻¹⁰. However, deeper studies are necessary to fully understand the mechanisms of action involved in their beneficial effects. In this regard, we have performed a detailed characterization of the potential probiotic properties and the anti-*H. pylori* activity of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a lactic acid bacterium isolated from human stomach. We demonstrated that the UCO-979C strain is able to tolerate acid and bile salts; produces hydrogen peroxide; and has high hydrophobicity properties ¹¹. In addition, we observed that this strain is able to efficiently adhere to gastric mucosa as demonstrated by *in vitro* (gastric adenocarcinoma human cells (AGS) cells) and *in vivo* (Mongolian Gerbils) experiments. Moreover, we found that *L. fermentum* UCO-979C strongly inhibited the adhesion, growth and urease activity of *H. pylori* ¹¹.

Preliminary studies in AGS cells also showed that *L. fermentum* UCO-979C significantly reduced *H. pylori* -induced IL-8 production¹¹. However, no deeper

immunological studies were performed with this strain. Therefore, the aim of this work was to analyze whether *L. fermentum* UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *H. pylori* infection in human gastric epithelial cells and macrophages.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Bacterial strains were obtained from the Bacterial Pathogenicity Laboratory culture collection at University of Concepción, Chile. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C was isolated and characterized in previous works^{11,12}. *L. fermentum* UCO-979C was cultured in Mann-Rogosa Sharpe broth (MRS Difco) at 37°C for 24 hours, followed by culturing on MRS agar under same conditions. Isolated colonies were suspended in phosphate buffered saline (PBS) and adjusted to concentrations to test in cell cultures (10^5 , 10^6 or 10^7 cells/ml).

Commercially available *Helicobacter pylori* ATCC 43504 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) was cultured in Columbia blood agar base (Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with 5% horse blood and selective supplement DENT (Oxoid) in a microaerobic atmosphere (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂) at 37°C for 72 hours. Bacterial colonies were suspended in PBS enriched with 5% of horse serum (GE Healthcare). Final concentration of 10^7 cells/ml was used for cells infection.

Cell lines

AGS (*human gastric adenocarcinoma epithelial cells*) were provided by the Bacterial Pathogenicity Laboratory, Department of Microbiology, and stored at -80° C. Propagation was carried out according to the thawing, propagation and freezing ATCC CRL-1739 protocol for AGS cells. Cells were cultured in DMEM (*Dulbecco's modified Eagles Medium*-Gibco) medium supplemented with 10% v/v of inactivated fetal bovine serum (FBS) (Biological Industries), 100 U/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin (Corning). Cells were seeded in flat bottom 24-well polystyrene

microplates in a 5% CO₂ atmosphere at a density of 1x10⁵ cells/ml until a confluence of 80-90%.

THP-1 (*human monocytic leukemia*) cell line was provided by the Department of Clinical Biochemistry and Immunology, University of Concepcion. For propagation the thawing, propagation and freezing ATCC TIB-202 protocol for THP-1 cells was used. Briefly, cells were maintained in RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) medium (Gibco) supplemented with 10% v/v of inactivated fetal bovine serum (SFB) (Biological Industries), 100 U/ml of penicillin, and 100 µg/ml of streptomycin (Corning). Media was replenished every 3 days in order to maintain the cell concentration in 1x10⁶ cells/ml. Then, 1x10⁵ THP-1 cells/ml were seeded in 24-well plates and incubated with 200 nM of PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) for 24 hours, to induce the differentiation of monocytes into macrophages for immunomodulation assays.

***Helicobacter pylori* adhesion to AGS cells**

In order to evaluate the effect of *L. fermentum* UCO-979C on the adhesion of *H. pylori* 43504, preincubation and coinubation experiments were performed with different doses of the strain (10⁵, 10⁶ or 10⁷ CFU/ml). In preincubation experiments AGS cells were stimulated with *L. fermentum* UCO-979C during 24 hours before the challenge with *H. pylori*, while in coinubation assays lactobacilli and *H. pylori* were administered simultaneously. For both conditions, AGS cells were challenged with 10⁷ CFU of *H. pylori* per ml for 24 hours. After the incubation period, the cells were washed, trypsinized, and serial dilutions were made in PBS to determine *H. pylori* cell counts. Ten µl of each bacterial cell suspension were seeded in triplicate on Columbia agar plates. Infected AGS cells without lactobacilli treatment were considered as 100% adhesion.

AGS and THP-1 cells viability and cytotoxicity

The cytotoxic effect of the different treatments on AGS and THP-1 cells was evaluated by the determination of LDH in the culture medium using the Wiener reagents and procedures (Wiener Lab, Buenos Aires, Argentina). In addition, cells viability was evaluated with the Bromide reduction assay of 3 (4,5-dimethyl-2-thiazoyl)-2,5-

diphenyltetrazole (MTT) ROCHE Cell Proliferation Kit I (MTT) following the manufacturer's instructions.

Cytokine profiles

In order to evaluate the immunomodulatory effect of *L. fermentum* UCO-979C the production of cytokines and chemokines was determined in AGS and THP-1 cells. The levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, TGF- β , IL-8, and MCP-1 (pg/ml) were determined in the supernatant AGS. The levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-12p40 and IFN- γ (pg/ml) were determined were in THP-1 macrophages after *H. pylori* infection or LPS (1,000 ng/ml; from *Escherichia coli* O55:B5 prepared by phenol extraction followed by gel-filtration chromatography; Sigma, St. Louis, MO) challenge¹³. Cytokines and chemokines levels were measured with commercial enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits following the manufacturer's recommendations (DuoSet R&D Systems). Tests were performed in triplicate. The values reported correspond to the average of the determinations the standard deviation.

Statistical analysis

For the comparison of two groups the Student's t-test was used and for the comparison of more than two groups a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed. Fisher test was used for posteriori comparisons. In all cases a level of significance of 0.05 was used.

RESULTS

***L. fermentum* UCO-979C modifies cytokine profile in AGS and THP-1 cells**

We first evaluated whether *L. fermentum* UCO-979C was able to exert any detrimental effect AGS cells. For this purpose, different concentrations of lactobacilli were used to stimulate AGS cells and 24 hours after bacterial administration, cells were collected for the determination of viability and injury by using the MTT colorimetric assay and evaluating LDH activity in supernatants. As shown in **Figure 1**, no differences were

observed between control and lactobacilli-treated AGS cells when cells viability and LDH were compared.

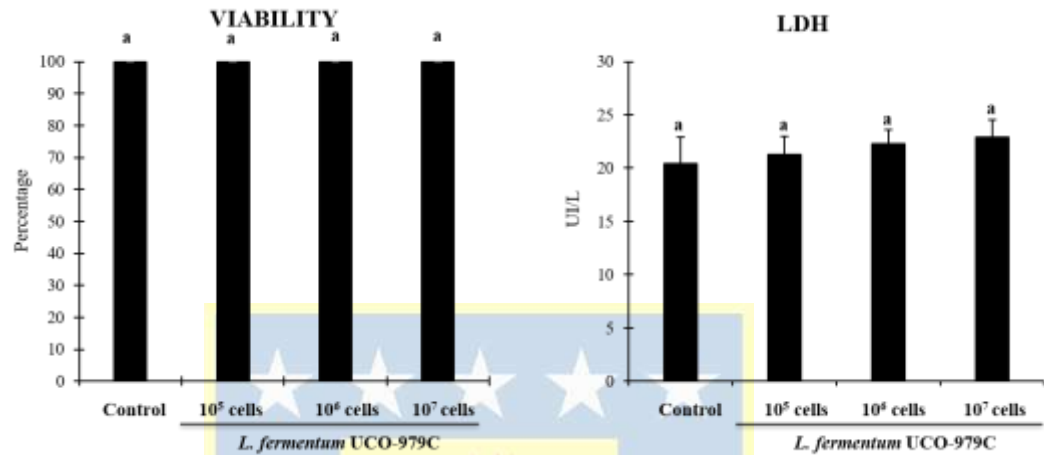


Figure 1. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on viability and cytotoxicity of human gastric epithelial cells (AGS cells). AGS cells were treated with different doses of *L. fermentum* UCO-979C. The percentage of viable cells by MTT colorimetric assay and the levels of LDH in culture supernatants were determined 24 hours after lactobacilli stimulation. The results represent data from three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. a-c Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

Then, the capacity of *L. fermentum* UCO-979C to differentially modulate the production of cytokines and chemokines was evaluated by determining the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, TGF- β , IL-8 (CXCL8) and MCP-1 (CCL2) in culture supernatants (**Figure 2**). Stimulation of AGS cells with the UCO-979C strain significantly increased the levels of the inflammatory cytokines TNF- α , IL-1 β , IL-6 with all the evaluated doses. In addition, we observed that the production of the chemokine MCP-1 by AGS cells was increased with 10⁶ or 10⁷ cells of *L. fermentum* UCO-979C. On the contrary, the levels of IL-8 were not modified with any of the doses assessed. Interestingly, the levels of the

immunomodulatory cytokine TGF- β were significantly increased in lactobacilli treated AGS cells when compared to controls (**Figure 2**).

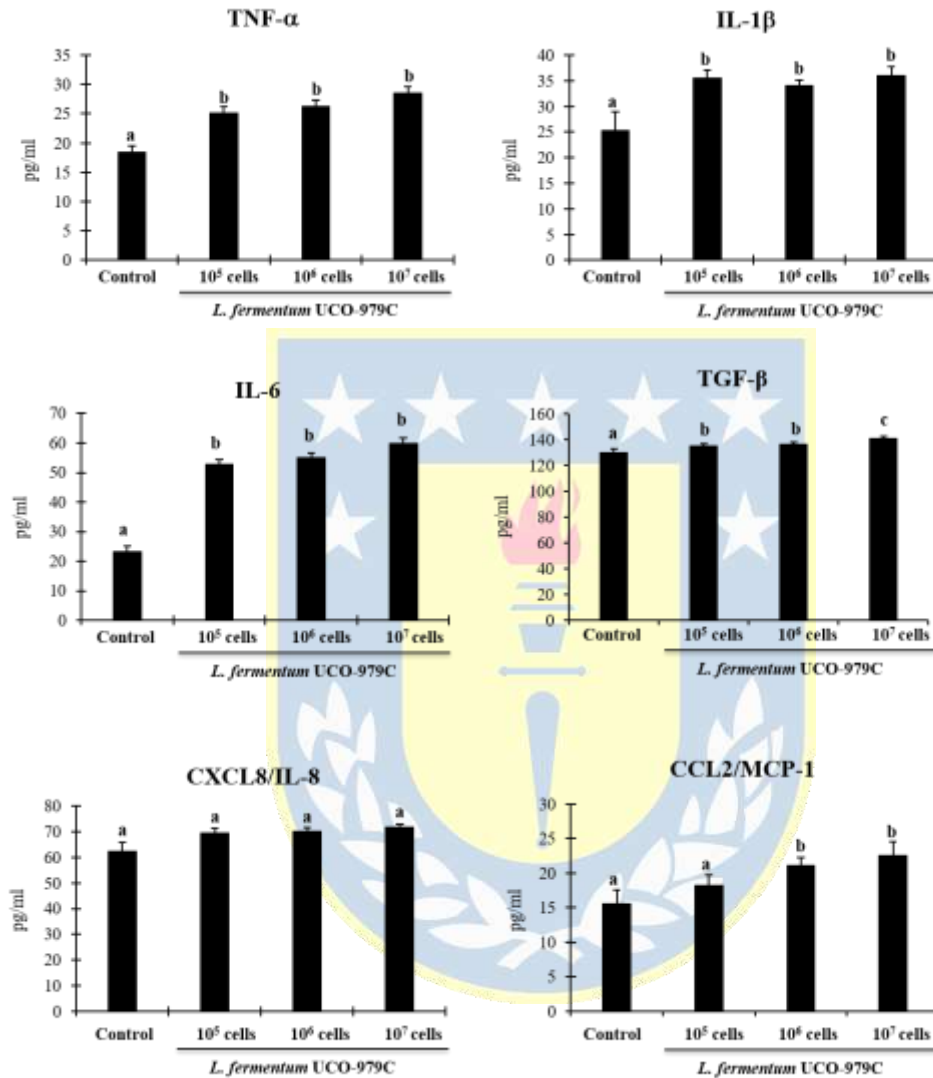


Figure 2. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on cytokine production of human gastric epithelial cells (AGS cells). AGS cells were treated with different doses of *L. fermentum* UCO-979C. The levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, TGF- β , IL-8, and MCP-1 (pg/ml) in culture supernatants were determined 24 hours after lactobacilli stimulation. The results represent data from three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. a-c Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

We next determined whether *L. fermentum* UCO-979C was able to exert immunomodulatory effects in macrophages by using the THP-1 cell line. THP-1 monocytes were differentiated into macrophages with PMA and then stimulated with lactobacilli. As shown in **Figure 3**, treatment of THP-1 macrophages slightly reduced viability of macrophages, especially with the highest dose evaluated. In line with this finding, LDH was increased in THP-1 macrophages treated with *L. fermentum* UCO-979C when compared to control cells.

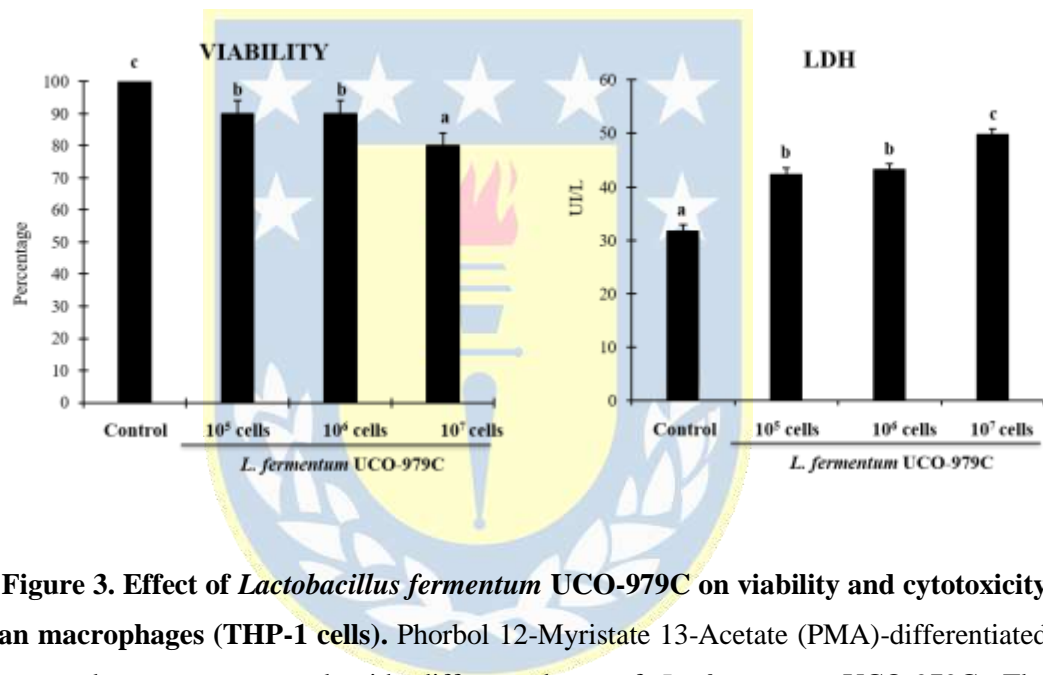


Figure 3. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on viability and cytotoxicity of human macrophages (THP-1 cells). Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)-differentiated THP-1 macrophages were treated with different doses of *L. fermentum* UCO-979C. The percentage of viable cells by MTT colorimetric assay and the levels of LDH in culture supernatants were determined 24 hours after lactobacilli stimulation. The results represent data from three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. a-cMeans with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

In order to evaluate the capacity of *L. fermentum* UCO-979C to modulate THP-1 macrophages cytokine profile, we next determined the production of several factors including inflammatory (TNF- α , IL-1 β , IL-6), Th1 (IL-12p70, IL-12p40, IFN- γ) and

immunoregulatory (IL-10) cytokines (**Figure 4**). Inflammatory cytokines as well as Th1 related factors were significantly increased in THP-1 macrophages after lactobacilli treatment, in a dose-independent manner. Interestingly, IL-10 production was also improved in macrophages after the stimulation with *L. fermentum* UCO-979C.

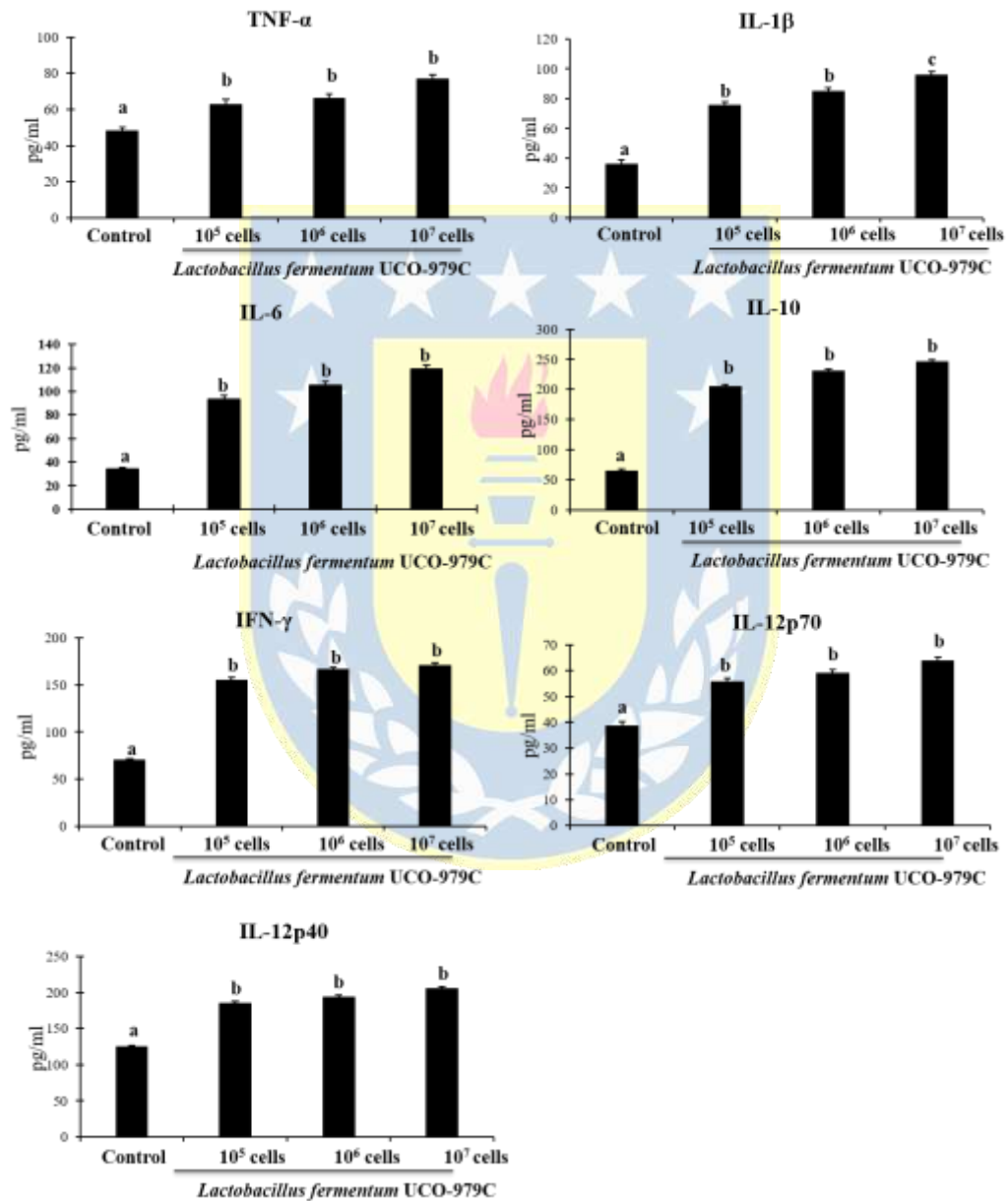


Figure 4. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on cytokine production of human macrophages (THP-1 cells). Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)-differentiated THP-1 macrophages were treated with different doses of *L. fermentum* UCO-979C. The levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-12p40 and IFN- γ (pg/ml) in culture supernatants were determined 24 hours after lactobacilli stimulation. The results represent data from three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. a-c Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

***L. fermentum* UCO-979C modifies the immune response of AGS cells against *H. pylori* infection**

The ability of *L. fermentum* UCO-979C to reduce the adhesion of *H. pylori* on AGS cells was next evaluated (**Figure 5**). Two different approaches were used. In the first one, *L. fermentum* UCO-979C was added to AGS cells before *H. pylori* challenge (preincubation experiments). In the second set of experiments, the UCO-979C strain was added to AGS cells together with *H. pylori* (coincubation experiments). In both experiments *L. fermentum* UCO-979C was able to significantly reduce the adherence of *H. pylori* to AGS cells when compared to untreated cells (**Figure 5**). Of note, inhibition of *H. pylori* adhesion was more notable when the UCO-979C strain was used before the challenge with the gastric pathogen (**Figure 5**). Therefore, pre-incubation experiments were selected for further immunological studies.

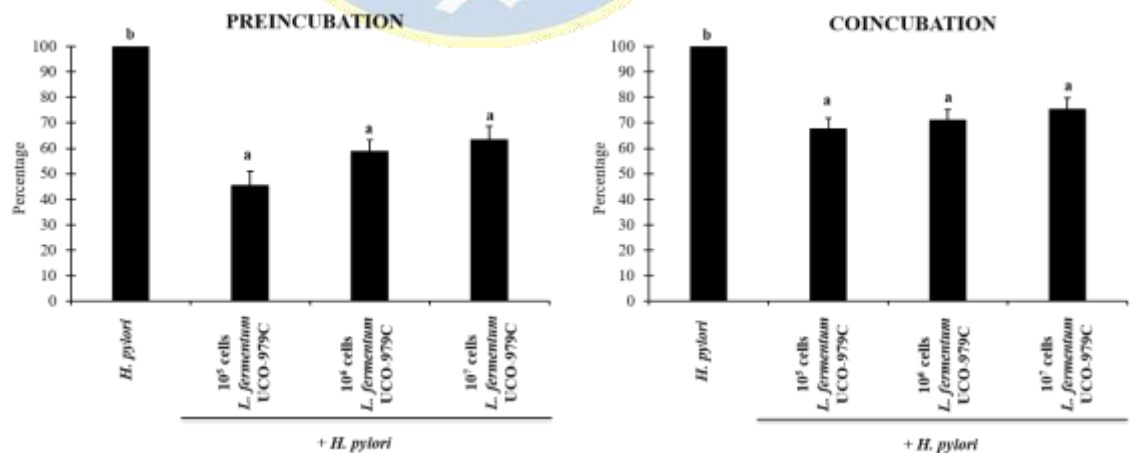


Figure 5. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric epithelial cells (AGS cells). Preincubation and coincubation experiments were performed with different doses of the probiotic strain. In preincubation experiments AGS cells were stimulated with *L. fermentum* UCO-979C during 24 hours before the challenge with *H. pylori*, while in coincubation assays lactobacilli and *H. pylori* were administered simultaneously. For both conditions, AGS cells were then challenged with *H. pylori* for 24 hours. The results represent data from three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. a-c Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

The challenge of AGS cells with *H. pylori* significantly reduced the percentage of viable cells and increased the levels of LDH suggesting a severe cellular damage (Figure 6). The treatment of AGS cells with *L. fermentum* UCO-979C significantly improved cells viability and reduced damage as shown by LDH levels (Figure 6), indicating that the UCO-979C strain was able to reduce the severity of the infection.

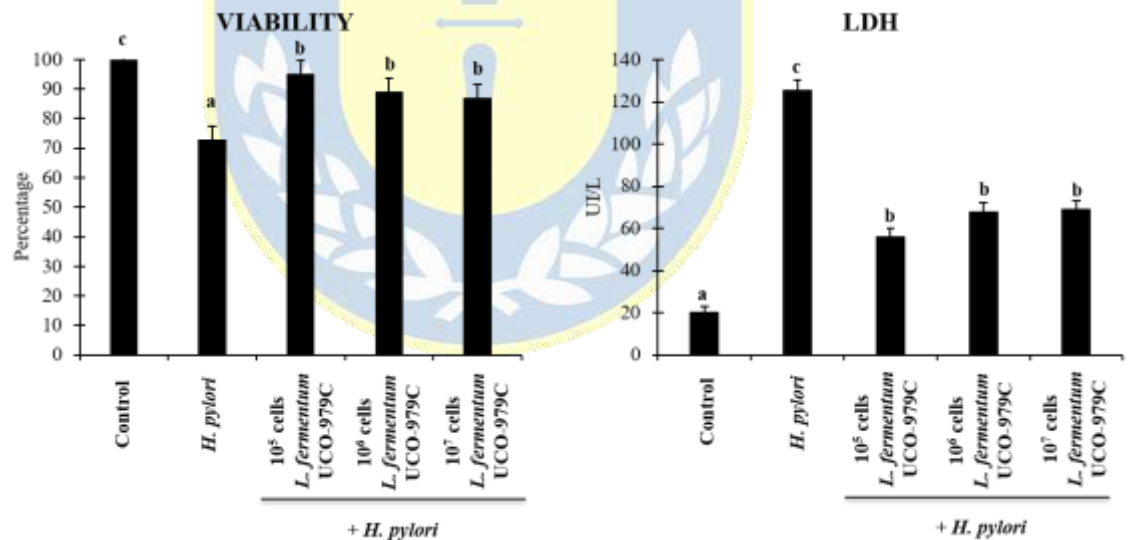


Figure 6. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on viability and cytotoxicity of human gastric epithelial cells (AGS cells) after the challenge with *Helicobacter pylori*. AGS cells were treated with different doses of *L. fermentum* UCO-979C for 24 hours and then challenged with the gastric pathogen. The percentage of viable cells by MTT colorimetric assay and the levels of LDH in culture supernatants were determined 24 hours after *H. pylori* infection.

The results represent data from three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. a-c Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

The evaluation of inflammatory cytokines and chemokines indicated that *H. pylori* challenge induced a potent inflammatory response in AGS cells (**Figure 7**). In fact, the levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 and MCP-1 were increased in AGS challenged with *H. pylori* when compared to unchallenged controls. Of interest, the preventive treatment of AGS cells with *L. fermentum* UCO-979C significantly reduced the production of inflammatory factors in response to *H. pylori* challenge (**Figure 7**).

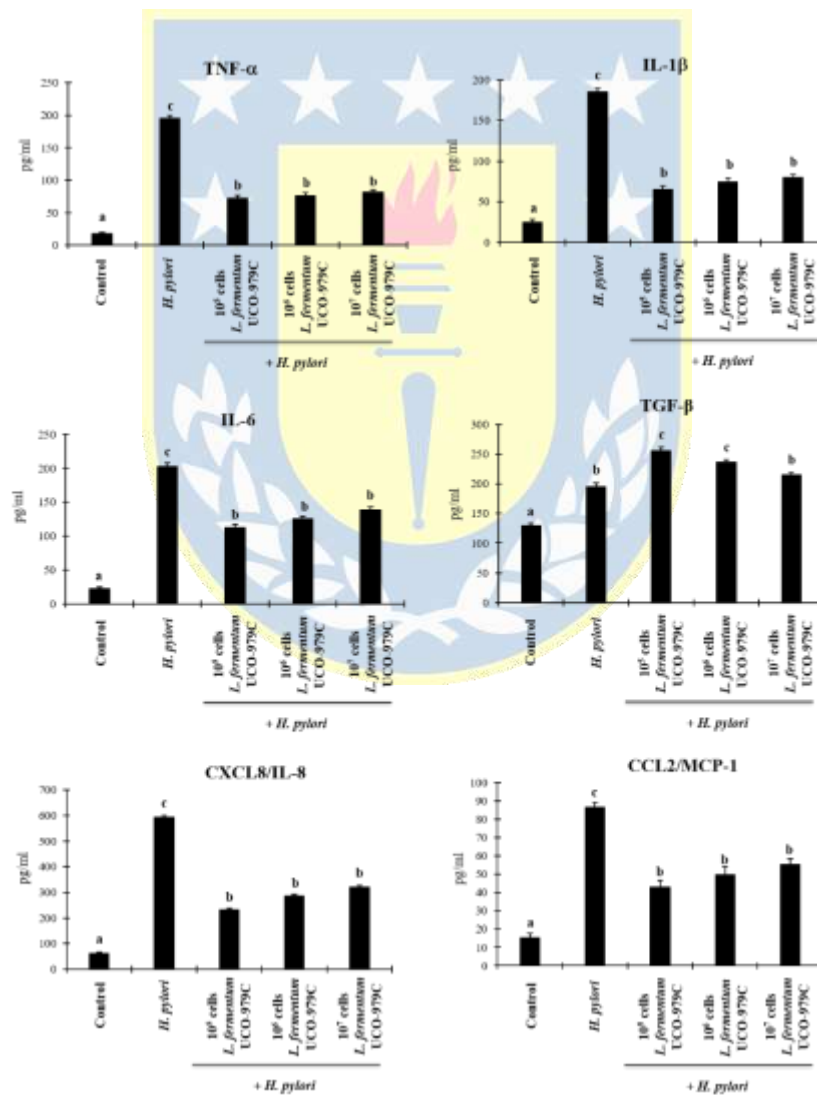
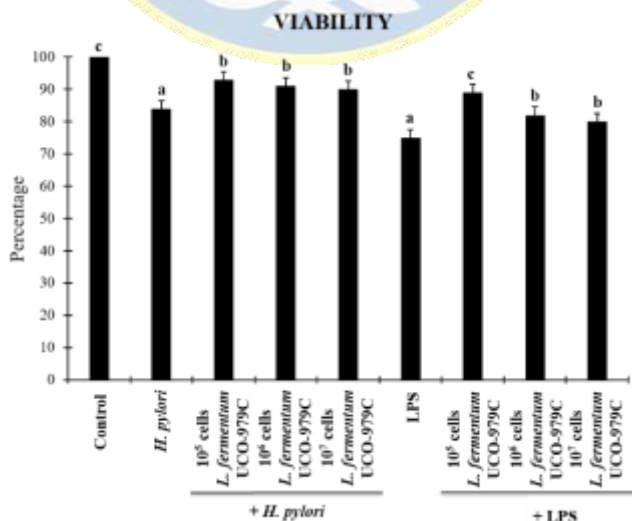


Figure 7. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on cytokine production of human gastric epithelial cells (AGS cells) after the challenge with *Helicobacter pylori*. AGS cells were treated with different doses of *L. fermentum* UCO-979C for 24 hours and then challenged with the gastric pathogen. The levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, TGF- β , IL-8, and MCP-1 (pg/ml) in culture supernatants were determined 24 hours after *H. pylori* infection. The results represent data from three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. a-c Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

The challenge of AGS cells with the gastric pathogen also induced a slight but significant increase of the immunoregulatory cytokine TGF- β (**Figure 7**). However, in lactobacilli-treated AGS cells the levels of TGF- β were significantly higher when compared to infected AGS controls.

***L. fermentum* UCO-979C modifies the immune response of THP-1 cells against *H. pylori* infection**

Finally, we evaluated whether *L. fermentum* UCO-979C differentially modulated the immune response of THP-1 macrophages to *H. pylori* or LPS challenges. The stimulation of THP-1 macrophages with the gastric pathogen or LPS significantly reduced the viability of cells and increased the levels of LDH (**Figure 8**). The preventive treatment of THP-1 macrophages with the UCO-979C strain improved cells viability and reduced the release of LDH into the culture supernatants.



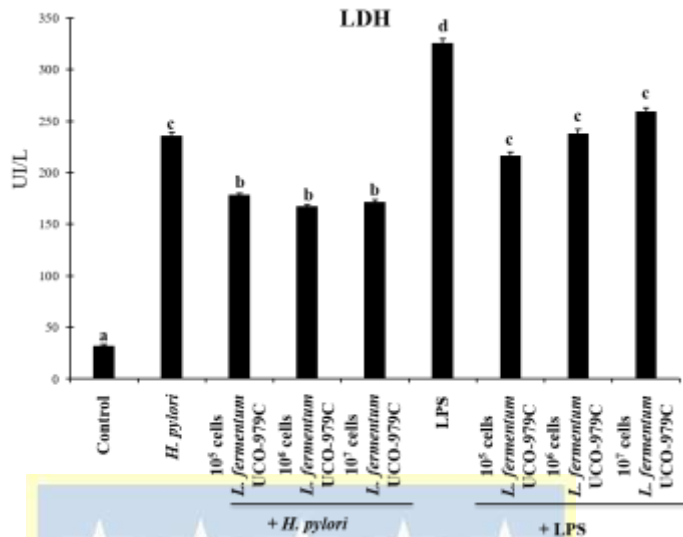


Figure 8. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on viability and cytotoxicity of human macrophages (THP-1 cells) after the challenge with *Helicobacter pylori* or LPS. Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)-differentiated THP-1 macrophages were treated with different doses of *L. fermentum* UCO-979C for 24 hours and then challenged with the gastric pathogen or LPS. The percentage of viable cells by MTT colorimetric assay and the levels of LDH in culture supernatants were determined 24 hours after *H. pylori* infection or LPS stimulation. The results represent data from three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. a-cMeans with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

Both, *H. pylori* and LPS significantly increased the production of inflammatory factors in THP-1 macrophages. However, LPS induced the production of higher levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 when compared to *H. pylori* challenge (**Figure 9**). *L. fermentum* UCO-979C significantly reduced the production of TNF- α after the challenge with the gastric pathogen, but it was not able to induce changes in IL-1 β or IL-6 levels (**Figure 9**). Interestingly, the UCO-979C strain reduced the production of these three inflammatory cytokines in response to LPS stimulation.

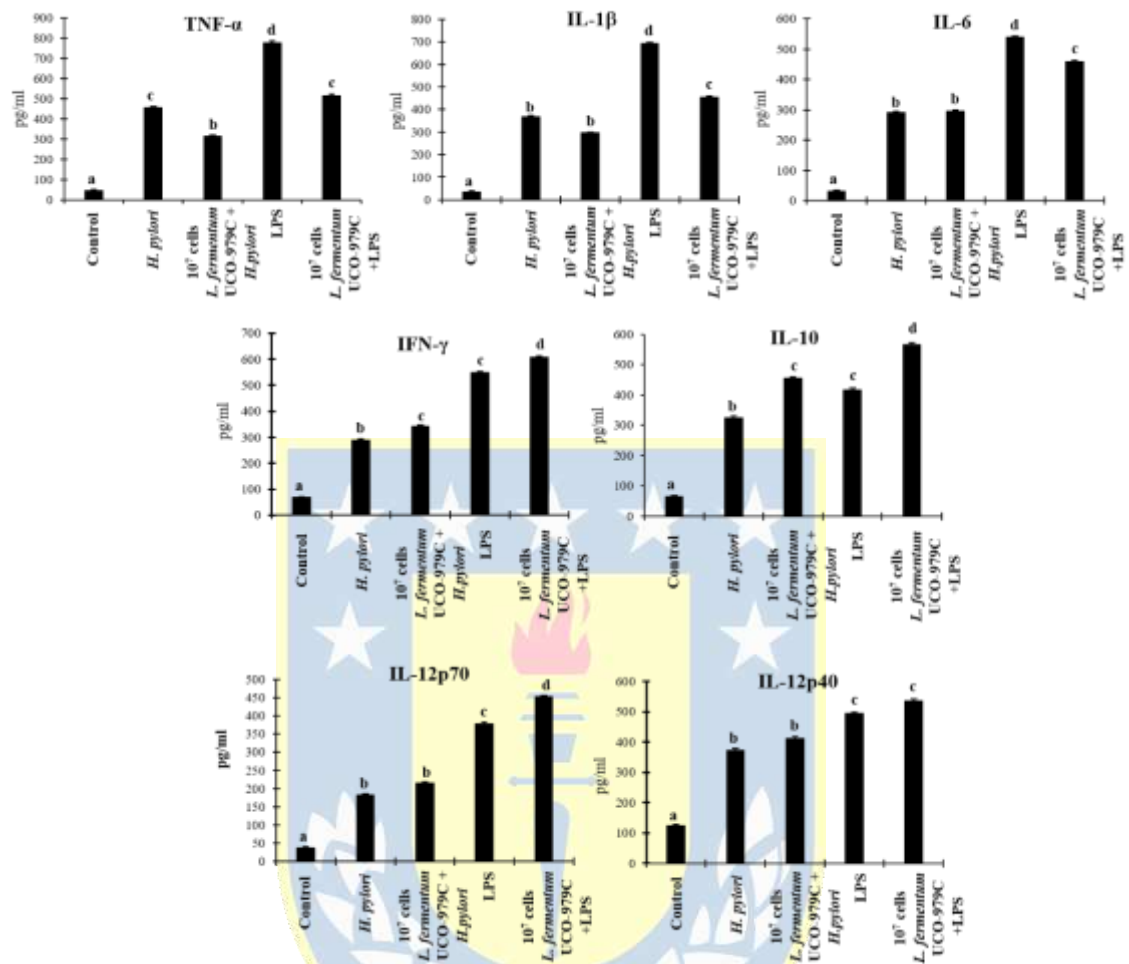


Figure 9. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on cytokine production of human macrophages (THP-1 cells) after the challenge with *Helicobacter pylori* or LPS. Phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)-differentiated THP-1 macrophages were treated with 10^7 cells of *L. fermentum* UCO-979C for 24 hours and then challenged with the gastric pathogen or LPS. The levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-12p40 and IFN- γ (pg/ml) in culture supernatants were determined 24 hours after *H. pylori* infection or LPS stimulation. The results represent data from three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. a-c Means with different letters differ significantly ($p < 0.05$).

The production of the Th1 cytokines IFN- γ , IL-12p70 and IL-12p40 was also increased in THP-1 macrophages after the challenges with both LPS and *H. pylori* (Figure

9). *L. fermentum* UCO-979C was not able to induce changes in the production of IL-12p70 or IL-12p40 in *H. pylori* -challenged THP1 macrophages but it slightly increased IFN- γ levels. On the other hand, the UCO-979C strain improved the levels of IFN- γ and IL-12p70 in LPS-challenged macrophages (**Figure 9**).

Both, *H. pylori* and LPS significantly increased the production of the immunoregulatory cytokine IL-10 in THP-1 macrophages. Of note, *L. fermentum* UCO-979C significantly improved IL-10 production in both *H. pylori* and LPS challenged macrophages when compared to controls (**Figure 9**).

DISCUSSION

Research from the last decade, has demonstrated that various species of *Lactobacillus* are capable of improving the resistance against the gastric pathogen *H. pylori*, by inhibiting its growth as well as enhancing its eradication rates ^{8,9}. Several mechanisms have been proposed to explain the beneficial effects of probiotic lactobacilli including the production of antimicrobial compounds such as bacteriocins, autolysins and organic acids; as well as adhesion inhibition and the modulation of the immune defense ^{8,9}. Most of these studies have been performed with commercially available strains of different origins but few studies were made with probiotics strains isolated from human stomach. In this regard, we previously characterized the potential probiotic properties of *L. fermentum* UCO-979C strain isolated from a human stomach ¹². Several physiological properties of the UCO-979C strain related to its probiotic potential were evaluated, including tolerance to acid and bile, hydrophobicity, saline aggregation and in vitro adherence ^{11,14}. *L. fermentum* UCO-979C was able to resist bile salts and survive at pH 3 for 24 hours showing a behavior that was similar to the observed for other probiotics strain such as *L. rhamnosus* GG or *L. casei* Shirota with respect to its tolerance to gastrointestinal conditions. Moreover, *in vivo* experiments in Mongolian gerbils clearly demonstrated the capacity of the UCO-979 strain to colonize and survive within the gastric mucosa ¹¹.

The first step in *H. pylori* infection involves the penetration into the gastric mucin and the adhesion to epithelial cells. In addition, it was reported that *H. pylori* strains capable of forming biofilms have an improved persistence in human infections becoming refractory to the antimicrobial therapy^{15,16}. Therefore, we have also evaluated the capacity of the UCO-979C strain to form biofilms and reduce *H. pylori* adhesion^{11,14}. Our results showed that *L. fermentum* UCO-979C is able to form biofilms in both abiotic and biotic surfaces and that the exopolysaccharide synthesis is associated to this ability¹⁴. Biofilm formation by probiotic bacteria is considered a beneficial property because it contributes to colonization and longer permanence over time in the host's mucosa, thereby preventing colonization by pathogenic bacteria¹⁷. In fact, we have clearly shown in in vitro and in vivo experiments that *L. fermentum* UCO-979C significantly diminished the adhesion, growth and urease activity of *H. pylori*^{11,14}.

On the other hand, the capacity of *L. fermentum* UCO-979C to beneficially modulate the immune response to *H. pylori* infection was not studied in detail before. Our preliminary results in AGS cells showed that the UCO-979C strain was able to reduced *H. pylori* -induced IL-8 production, indicating a potential immunomodulatory effect¹¹. In this work, we have significantly advanced in the immunological characterization of the beneficial effects of *L. fermentum* UCO-979C by demonstrating its ability to modulate the inflammatory responses of both gastric epithelial cells and macrophages in response to *H. pylori* infection.

IL-8 secreted by gastric epithelial cells is a potent neutrophil-activating and chemotactic agent that plays a major role in triggering the mucosal inflammation caused by *H. pylori*¹⁸⁻²⁰. Increased levels of IL-8 in gastric fluids as well as biopsy samples have been reported in patients with *H. pylori* infection^{18,19}. Moreover, whole genome analysis performed by Eftang et al²¹ in *H. pylori* -exposed AGS cells revealed that after 3 hours exposure IL-8 is the single most upregulated gene among 38,000 genes evaluated. The levels of IL-8 mRNA in the gastric mucosa of *H. pylori* -infected patients correlate significantly with the severity of gastritis²² and the risk of gastric cancer^{23,24}. In fact, the activation of NF- κ B and upregulation of IL-8 in gastric epithelial cells were suggested as

the critical mechanisms responsible for *H. pylori* -induced chronic inflammation and gastric carcinogenesis ^{23,24}. Then, strategies to reduce *H. pylori* -induced chronic inflammation have been focus in the modulation of IL-8.

Some studies have documented the ability of lactobacilli to beneficially modulate IL-8 production during *H. pylori* infection. In this regard, it was reported that coincubation of *L. gasseri* OLL2716 with a MKN45 cell line infected with *H. pylori* inhibited expression of IL-8 when compared with the control ⁵. *L. acidophilus* LA5 was also shown to reduce IL-8 production induced by *H. pylori* in MKN45 gastric epithelial cells⁶. In addition, *L. salivarius* B101, *L. rhamnosus* B103 and *L. plantarum* XB7 inhibited IL-8 secretion from *H. pylori* -infected AGS cell ²⁵.

In our previous study ¹¹ and in this work, we demonstrated that *L. fermentum* UCO-979C significantly reduce the production of IL-8 in AGS cells challenged with *H. pylori*. We have extended these findings here by demonstrating that the UCO-979C strain also modulates the production of other inflammatory factors. Reduced levels of TNF- α , IL-1 β , IL-6, and MCP-1 were found in *L. fermentum* UCO-979C treated AGS cells when compared to untreated infected controls. This finding is of importance since it should not be automatically assumed that probiotics capable of modulating the production of IL-8 in AGS cells also modulate other inflammatory factors in response to *H. pylori* infection. In line with this statement, it was reported that the challenge of AGS cells with *H. pylori* J99 significantly increased the levels of IL-8, TNF- α and IL-6 in agreement with the capacity of the pathogen to mount a robust inflammatory response in gastric cells⁷. However, when AGS cells were coincubated with the probiotic strain *Streptococcus thermophilus* CRL1190 and *H. pylori* a significant decrease in IL-8 production was observed while no effect was evident in the levels of TNF- α and IL-6 ⁷.

Of interest, in addition to its capacity to reduce the production of inflammatory factors we observed that *L. fermentum* UCO-979C was also capable to improve the production of TGF- β in *H. pylori* -infected AGS cells. It was shown that in the normal gastrointestinal mucosal, the TGF- β signal down regulate NF-kB activation by stimulating

the negative regulator I κ B α ²⁶. It was also reported that TGF- β negatively regulates Th1 cells and that TGF- β -deficient mice spontaneously develop gastritis²⁷. Moreover, *H. pylori* infection inhibits the TGF- β signal pathway via activation of the gastric Smad7 expression to promote inflammation ²⁸. Then, the ability of *L. fermentum* UCO-979C to improve TGF- β production would be also involved in its protective effect. Our findings are in agreement with the study of Yang et al ⁶, which were the first in demonstrating that the probiotic strain *L. acidophilus* LA5 is able to increase TGF- β and ameliorate the *H. pylori* -induced gastric inflammation *in vitro*.

In an attempt to characterize the mechanism involved in the suppression of IL-8 secretion by lactobacilli, some works have evaluated their effects in signaling pathways that mediated the production of inflammatory factors. *L. salivarius* B101 and *L. rhamnosus* B103 inhibited IL-8 secretion from *H. pylori* -infected AGS cells through the suppression of NF- κ B activation while *L. plantarum* XB7 was capable of suppressing NF- κ B and c-Jun activation ²⁵. The reduction of IL-8 production in *H. pylori* -infected MKN45 gastric epithelial cells induced by *L. acidophilus* LA5 was mediated by the inactivation of Smad7 and NF- κ B pathways ⁶. Moreover, the down-regulation of Smad7 production induced by the LA5 strain was also involved in the improved production of TGF- β ⁶. However, the receptors and cellular factors that mediate the effects on those signaling pathways were not characterized. Therefore, the detailed elucidation of the bacterial molecules and host receptor and signaling pathways involved in the immunomodulatory effects of *L. fermentum* UCO-979C on gastric epithelial cells is an interesting topic for future research.

It was reported that monocytes/macrophages play an important role in the inflammatory disease caused by *H. pylori*. Several inflammatory mediators are produced by macrophages in response to this gastric pathogen. Research work demonstrated that human monocytes and macrophages secreted IL-1 β in response to *H. pylori* infection ²⁹. Moreover, it was shown that IL-1 β is produced in a caspase-1 dependent manner in PMA-differentiated THP-1 cells after *H. pylori* challenge ³⁰. Studies in murine RAW cells also

showed that *H. pylori* and its virulence factors are capable of increasing the production of other inflammatory mediators in macrophages including TNF- α , MCP-1, IL-8, IL-6, and IFN- γ ^{31,32}. In line with these previous works, we observed here that the challenge of PMA-differentiated THP1 macrophages with *H. pylori* significantly enhanced the production of TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12p70, IL-12p40, and IFN- γ .

The present study also showed evidence of the capacity of *L. fermentum* UCO-979C to modulate the cytokine response of macrophages to *H. pylori* infection. The UCO-979C strain was capable of reducing the production of TNF- α and improving IFN- γ levels. These findings are of interest since it was described that both TNF- α and IFN- γ secreted by macrophages could have several implications during infection. It has been shown that in the case of *H. pylori* infection, TNF- α accumulation during the development of gastric injury has a negative effect on the clearance of apoptotic gastric epithelial cells³³. The lack of apoptotic cells' clearance further enhances the inflammatory state of gastric mucosa through release of additional proinflammatory mediators from the dying cells following their secondary necrosis. Studies have also demonstrated a Th1 profile of *H. pylori*-mediated inflammation. Earlier studies showed a strong upregulation of IL-12p40, IL-12p35, TNF- α , and IFN- γ mRNAs in biopsies of the antral mucosa of *H. pylori*-infected patients with severe gastric inflammation and peptic ulcer³⁴. An increase in serum level of IFN- γ occurs in *H. pylori*-infected patients and experimental animal models and is a predictor of clinical outcome^{35,36}. Although elevated and sustained levels of IFN- γ have been associated with inflammatory damage, appropriate levels of this cytokine have been linked to protection. In this regard, experiments in mice deficient in IFN- γ or IRF1 (a downstream modulator of IFN- γ) showed that animals fail to develop gastric inflammation but have increased susceptibility to *H. pylori* colonization³⁷.

In addition, we demonstrated here that *L. fermentum* UCO-979C improves the production of IL-10 in THP1 macrophages challenged with *H. pylori*. The role and the changes in IL-10 production by macrophages during *H. pylori* infection is still controversial. It was reported that IL-10 levels were decreased following *H. pylori*

challenge in RAW cells and that this effect was associated to an improved inflammation in the murine macrophages³². On the other hand, the concentration of IL-10 in THP-1 cells treated with *H. pylori* was significantly upregulated compared to that in the non-*H. pylori* -infected groups³⁸. The work suggested that the enhanced levels of IL-10 play a crucial role in the persistence of *H. pylori* infection, because it allows the escape from the host's immune responses. Interestingly, in vivo studies in macrophage-depleted mice showed a decreased IL-10 production in the gastric mucosa after *H. pylori* infection, leading to increased IL-17-mediated responses and increased neutrophil accumulation at the gastric mucosa³⁹. However, IL-10-mediated regulatory responses driven by a particular population of mononuclear phagocytes identified as CD11b⁺F4/80^{high} CD64⁺CX3CR1⁺ cells also contributed to maintaining high levels of *H. pylori* loads in the stomach by reducing effector T cell responses³⁹. Then, IL-10 would have a very complex role during *H. pylori* infection.

L. fermentum UCO-979C also modulated cytokine production in THP-1 macrophages challenged with LPS, indicating that its immunomodulatory effect is not limited to *H. pylori* infection but can be extended to other pathogens able to induce a TLR4-mediated inflammatory response. To evaluate the ability of the UCO-979C strain to beneficially influence the immune response to other pathogenic Gram negative bacteria is an interesting point for further research.

Our results allow us to hypothesize that the different balance in the TNF- α /IFN- γ /IL-10 production by macrophages induced by the UCO-979C strain could offer advantages in the protection against *H. pylori* infection by improving the clearance of the pathogen and the protection against inflammatory damage. *In vivo* studies that evaluate the ability of the UCO-979C strain to modulate the production of these three cytokines and that allow us to connect them to protective effects against *H. pylori* infection would be of great importance. We intend to carry out these studies in the immediate future.

In conclusion, we have demonstrated that *L. fermentum* UCO-979C is able to differentially modulate the cytokine response of gastric epithelial cells and macrophages

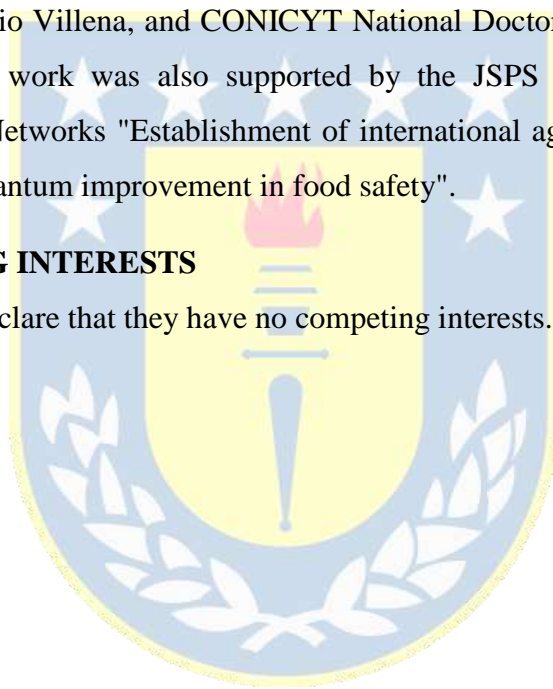
after *H. pylori* infection. Therefore, *L. fermentum* UCO-979C has several characteristics making it an excellent candidate as a probiotic to prevent infections caused by this gastric pathogen. The UCO-979C strain is able to inhibit *H. pylori* growth, reduce bacterial urease activity, decrease pathogen adhesion to gastric cells, and beneficially regulate the inflammatory response triggered by the infection in gastric epithelial cells and macrophages.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by ANPCyT–FONCyT Grants PICT-2013-3219 and PICT-201-0410 to Julio Villena, and CONICYT National Doctorate Grant 21150603 to Valeria García. This work was also supported by the JSPS Core-to-Core Program Advanced Research Networks "Establishment of international agricultural immunology research-core for a quantum improvement in food safety".

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.



REFERENCES

1. Posselt, G., Backert, S. & Wessler, S. The functional interplay of *Helicobacter pylori* factors with gastric epithelial cells induces a multi-step process in pathogenesis. *Cell Commun. Signal.* 11, 77 (2013).
2. Müller, A. & Solnick, J. V. Inflammation, Immunity, and Vaccine Development for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 16, 26–32 (2011).
3. Bamford, K., Fan, X., Crowe, S., Leary, J. & Gourley, W. Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 114, 482–92 (1998).
4. Doger, F. K. et al. Expression of NF- κ B in *Helicobacter pylori* infection. *Dig. Dis. Sci.* 51, 2306–2309 (2006).
5. Ushiyama, A. et al. *Lactobacillus gasseri* OLL2716 as a probiotic in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18, 986–991 (2003).
6. Yang, Y.-J., Chuang, C.-C., Yang, H.-B., Lu, C.-C. & Sheu, B.-S. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates *H. pylori* -induced gastric inflammation by inactivating the Smad7 and NF κ B pathways. *BMC Microbiol.* 12, 38 (2012).
7. Marcial, G., Villena, J., Faller, G., Hensel, A. & de Valdéz, G. F. Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* CRL1190 reduces the inflammatory response caused by *Helicobacter pylori*. *Benef. Microbes* 8, 451–461 (2017).
8. Homan, M. & Orel, R. Are probiotics useful in *Helicobacter pylori* eradication? *World J. Gastroenterol.* 21, 10644–10653 (2015).
9. Goderska, K., Agudo Pena, S. & Alarcon, T. *Helicobacter pylori* treatment: antibiotics or probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 1–7 (2018).
10. Hauser, G., Salkic, N., Vukelic, K., JajacKnez, A. & Stimac, D. Probiotics for standard triple *Helicobacter pylori* eradication: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Med. (United States)* 94, e685 (2015).
11. García, A. et al. Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *Electron. J. Biotechnol.* 25, 75-83. (2017).
12. Garcia C, A. et al. Probiotic properties of *Lactobacillus* spp isolated from gastric biopsies of *Helicobacter pylori* infected and non-infected individuals. *Rev. Med. Chil.* 137, 369–376 (2009).

13. Shimazu, T. et al. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* elicits anti-inflammatory activity in porcine intestinal epithelial cells by modulating negative regulators of the toll-like receptor signaling pathway. *Infect. Immun.* 80, 276–288 (2012).
14. Salas-Jara, M. J. et al. Probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C biofilm formation on AGS and Caco-2 cells and *Helicobacter pylori* inhibition. *Biofouling* 32, 1245–1257 (2016).
15. Carron, M. A., Tran, V. R., Sugawa, C. & Coticchia, J. M. Identification of *Helicobacter pylori* Biofilms in Human Gastric Mucosa. *J. Gastrointest. Surg.* 10, 712–717 (2006).
16. García, A., Salas-Jara, M. J., Herrera, C. & González, C. Biofilm and *Helicobacter pylori*: from environment to human host. *World J. Gastroenterol.* 20, 5632–8 (2014).
17. Terraf, M. C. L., Juárez Tomás, M. S., Nader-Macías, M. E. F. & Silva, C. Screening of biofilm formation by beneficial vaginal lactobacilli and influence of culture media components. *J. Appl. Microbiol.* 113, 1517–1529 (2012).
18. Crabtree, J. E. et al. Interleukin-8 expression in *Helicobacter pylori* infected, normal, and neoplastic gastroduodenal mucosa. *J. Clin. Pathol.* 47, 61–66 (1994).
19. Fan, X. G., Chua, A., Fan, X. J. & Keeling, P. W. N. Increased gastric production of interleukin-8 and tumour necrosis factor in patients with *Helicobacter pylori* infection. *J. Clin. Pathol.* 48, 133–136 (1995).
20. Suzuki, H. et al. Enhanced levels of C-X-C chemokine, human GRO α , in helicobacter gastric disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 13, 516–520 (1998).
21. Eftang, L. L., Esbensen, Y., Tannæs, T. M., Bukholm, I. R. K. & Bukholm, G. Interleukin-8 is the single most up-regulated gene in whole genome profiling of *H. pylori* exposed gastric epithelial cells. *BMC Microbiol.* 12, (2012).
22. Xuan, J. et al. Relationship between gastric mucosal IL-8 levels and histological gastritis in patients with *Helicobacter pylori* infection. *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 30, 83–88 (2005).
23. Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., König, W. & Backert, S. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 9300–9305 (2005).
24. Yamada, S. et al. Predominant mucosal IL-8 mRNA expression in non-cagA Thais is risk for gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 19, 2941–2949 (2013).

25. Thiraworawong, T. et al. Anti-inflammatory Properties of Gastric-derived *Lactobacillus plantarum* XB7 in the Context of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 19, 144–155 (2014).
26. Monteleone, G., Pallone, F. & MacDonald, T. T. Smad7 in TGF- β -mediated negative regulation of gut inflammation. *Trends Immunol.* 25, 513–517 (2004).
27. Hahm, K. B. et al. Conditional loss of TGF- β signalling leads to increased susceptibility to gastrointestinal carcinogenesis in mice. *Aliment. Pharmacol. Ther. Suppl.* 115–127 (2002).
28. Monteleone, G. et al. Induction and Regulation of Smad7 in the Gastric Mucosa of Patients with *Helicobacter pylori* Infection. *Gastroenterology* 126, 674–682 (2004).
29. Fehlings, M. et al. Comparative analysis of the interaction of *Helicobacter pylori* with human dendritic cells, macrophages, and monocytes. *Infect. Immun.* 80, 2724–2734 (2012).
30. Kameoka, S. et al. *Helicobacter pylori* induces IL-1 β protein through the inflammasome activation in differentiated macrophagic cells. *Biomed. Res.* 37, 21–27 (2016).
31. Ansari, S. A., Devi, S., Tenguria, S., Kumar, A. & Ahmed, N. *Helicobacter pylori* protein HP0986 (TieA) interacts with mouse TNFR1 and triggers proinflammatory and proapoptotic signaling pathways in cultured macrophage cells (RAW 264.7). *Cytokine* 68, 110–117 (2014).
32. Wang, F. et al. Overexpression of Tim-3 reduces *Helicobacter pylori* -associated inflammation through TLR4/NF κ B signaling in vitro. *Mol Med Rep.* 15, 3252–3258 (2017).
33. Bimczok, D. et al. *Helicobacter pylori* Infection Inhibits Phagocyte Clearance of Apoptotic Gastric Epithelial Cells. *J. Immunol.* 190, 6626–6634 (2013).
34. D’Elios, M. M. et al. T Helper 1 Effector Cells Specific for *Helicobacter pylori* in the Gastric Antrum of Patients with Peptic Ulcer Disease. *J. Immunol.* 158, 962–967 (1997).
35. Serrano, C. et al. Relationship between *Helicobacter pylori* virulence factors and regulatory cytokines as predictors of clinical outcome. *Microbes Infect.* 9, 428–434 (2007).
36. Straubinger, R. K. et al. Quantitative evaluation of inflammatory and immune responses in the early stages of chronic *Helicobacter pylori* infection. *Infect. Immun.* 71, 2693–2703 (2003).

37. Peek, R. M., Fiske, C. & Wilson, K. T. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. *Physiol. Rev.* 90, 831–858 (2010).

38. Zhang, Y. et al. The leukocyte-associated immunoglobulin (Ig)-like receptor-1 modulating cell apoptosis and inflammatory cytokines secretion in THP-1 cells after *Helicobacter pylori* infection. *Microb. Pathog.* 109, 292–299 (2017).

39. Viladomiu, M. et al. Cooperation of Gastric Mononuclear Phagocytes with *Helicobacter pylori* during Colonization. *J. Immunol.* 1601902 (2017).





CAPÍTULO V

THE EXOPOLYSACCHARIDE OF *Lactobacillus fermentum* UCO-979C IS PARTIALLY INVOLVED IN ITS IMMUNOMODULATORY EFFECT AND ITS ABILITY TO IMPROVE THE RESISTANCE AGAINST *Helicobacter pylori* INFECTION.

Garcia-Castillo, V., Marcial, G., Albarracin, L., Tomokiyo, M., Clua, P., Takahashi, H., Kitazawa, H., Garcia-Cancino, A., Villena, J.

Manuscrito publicado: *Microorganisms*. (2020). 8(4):479.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms8040479>.

ABSTRACT

Lactobacillus fermentum UCO-979C (Lf979C) beneficially modulates the cytokine response of gastric epithelial cells and macrophages after *Helicobacter pylori* infection in vitro. Nevertheless, no in vivo studies were performed with this strain to confirm its beneficial immunomodulatory effects. This work evaluated whether Lf979C improves protection against *H. pylori* infection in mice by modulating the innate immune response. In addition, we evaluated whether its exopolysaccharide (EPS) was involved in its beneficial effects. Lf979C significantly reduced TNF- α , IL-8, and MCP-1 and augmented IFN- γ and IL-10 in the gastric mucosa of *H. pylori*-infected mice. The differential cytokine profile induced by Lf979C in *H. pylori*-infected mice correlated with an improved reduction in the pathogen gastric colonization and protection against inflammatory damage. The purified EPS of Lf979C reduced IL-8 and enhanced IL-10 levels in the gastric mucosa of infected mice, while no effect was observed for IFN- γ . This work demonstrates for the first time the in vivo ability of Lf979C to increase resistance against *H. pylori* infection by modulating the gastric innate immune response. In addition, we advanced knowledge of the mechanisms involved in the beneficial effects of Lf979C by demonstrating that its EPS is partially responsible for its immunomodulatory effect.

Keywords: *Lactobacillus fermentum* UCO-979C; exopolysaccharide; *H. pylori*; gastric cytokines; immunobiotics

INTRODUCTION

Helicobacter pylori (*H. pylori*) colonizes around 50% of the world population. This bacterium is able to dominate the gastric microbiota and lead to gastric inflammation (gastritis) in infected individuals^{1,2}. The conventional treatment for *H. pylori* infection involves the combination of two antibiotics (amoxicillin/clarithromycin) and a proton pump inhibitor. Although this therapy has been useful in reducing the pathologies associated with *H. pylori*, its high cost, patient non-adherence to treatment, and the appearance of resistant strains, have led to the search for new innocuous, natural and healthier options, such as probiotics or plant derivatives³⁻⁵.

In recent years, the scientific advances in probiotics have demonstrated their ability to improve resistance against infectious diseases including those produced by gastrointestinal, respiratory and urinary pathogens⁶⁻⁸. As probiotics have been proven to restore the microbiota balance, inhibit pathogen's growth and/or modulate mucosal immune responses, these microorganisms have been widely used in the development of functional foods aiming to improve resistance against bacterial and viral pathogens⁸⁻¹⁰. For this reason, the research interest in the characterization of new probiotic strains with outstanding benefits on human health has been increased in recent years¹¹.

It is recognized that the gastric microbial community and the mucosal immune responses determine the outcome of *H. pylori* infection¹². Alterations in the microbiota and deregulation of the inflammatory response during *H. pylori* infection can lead to the development of important diseases such as peptic ulcer, gastric cancer and mucosa-associated lymphoid tissue (MALT) lymphoma^{1,2}. Thus, probiotics have appeared as an alternative to modulate stomach microbiota and/or gastric inflammation and to reduce the severity and complications of *H. pylori* infection^{13,14}. In this regard, our previous studies demonstrated the benefits of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C against the pathogenic bacteria *H. pylori*, which were related to its capability of forming biofilms¹⁵. *L. fermentum* UCO-979C inhibited bacterial growth, reduced *H. pylori* urease activity, decreased pathogen adhesion to human gastric epithelial cells and beneficially regulated the

inflammatory response in *in vitro* model by reducing the inflammatory chemokine IL-8 16. Besides, *L. fermentum* UCO-979C was able to differentially modulate the production of TNF- α , IFN- γ and IL-10 by gastric epithelial cells and macrophages, which may offer advantages in the protection against *H. pylori* infection by improving the clearance of the pathogen and the protection against inflammatory damage ¹⁷. Further *in vitro* studies demonstrated that the UCO-979C strain is a remarkable immunomodulatory agent due to its ability to differentially modulate the immune response triggered by Toll- like receptor 4 (TLR4) activation through the modulation of TLR negative regulators expression in epithelial cells ¹⁸.

Our previous studies with *L. fermentum* UCO-979C indicated the potential of this immunobiotic strain to beneficially modulate the immune response to *H. pylori* infection. However, the molecules of the UCO-979C strain involved in its immunomodulatory effect were not investigated in detail. Moreover, the ability of *L. fermentum* UCO-979C to modulate the immune response against the gastric infection *in vivo* has not been evaluated before. Therefore, the aim of this work was to evaluate the effect of *L. fermentum* UCO-979C or its secreted exopolysaccharide (EPS) on the immune response triggered by the pathogenic bacteria *H. pylori* *in vitro* and *in vivo* in a mouse model.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

L. fermentum UCO-979C ¹⁶ was obtained from the Bacterial Pathogenicity Laboratory culture collection at University of Concepción (Concepción, Chile). *L. fermentum* CRL973 was obtained from the CERELA-CONICET culture collection (Tucumán, Argentina). Lactobacilli strains were grown in Mann–Rogosa–Sharpe Agar (MRS) (Difco, Lawrence, KS, USA) at 37°C. After an overnight growth, bacteria were transferred to MRS broth and cultured at 37°C until stationary phase ¹⁵. Afterwards, the bacteria were pelleted (3000× g for 10 minutes), washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and suspended in specific media for *in vivo* or *in vitro* assays.

Commercially available *H. pylori* ATCC43504 (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) and a mouse-adapted strain *H. pylori* SS1¹⁹ were used for cell culture assays and to induce gastric infection in mice, respectively. Both strains were obtained from the Bacterial Pathogenicity Laboratory culture collection at University of Concepción (Concepción, Chile). Bacteria were cultured on Columbia blood agar base (Oxoid, Hampshire, UK) supplemented with 5% horse blood and antibiotics (supplement DENT, Oxoid, Hampshire, UK) in a microaerobic atmosphere (10% CO₂, 5% O₂, 85% N₂) at 37°C for 72 hours. The growth from the entire plate was washed twice with PBS and suspended in PBS enriched with 5% of horse serum (GE Healthcare, Chicago, IL, USA).

Exopolysaccharide Extraction

The secreted EPS was isolated according to Ferrer et al.²⁰ with slight modifications. Briefly, a chemical-defined medium (CDM) was inoculated with (2% v/v) of an overnight culture of selected lactobacilli (grown as referred in Section 2.1) and incubated for 24 hours at 37 °C under microaerobic conditions. After incubation, media were centrifuged (10,000× g, 30 minutes, at 4°C) and the supernatant treated with trichloroacetic acid (Winkler, Chile) (final concentration 15% v/v) for 2 hours under agitation. Then, proteins were precipitated by centrifugation (10,000× g for 30 minutes, at 4°C) and the supernatant was mixed with 2 volumes of absolute cold ethanol (Merck, Darmstadt, Germany) followed by an overnight incubation at 4°C, to enhance the EPS precipitation. Finally, the EPS was harvested by centrifugation (10,000× g, 30 minutes, at 4°C) and the pellet was dissolved in distilled water (1/10 of the original volume), dialyzed at 4°C by using dialysis membranes (14 kDa cut-off, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and finally lyophilized²⁰. For *in vivo* and *in vitro* assays, the dried EPS was suspended in PBS.

Cell Lines

Human gastric adenocarcinoma epithelial cells (AGS, ATCC CRL1739) were provided by the Bacterial Pathogenicity Laboratory, Department of Microbiology,

University of Concepción (Concepción, Chile). Activation, propagation and freezing were carried out according to protocol for AGS cells (<https://www.atcc.org/products/all/CRL-1739>). AGS cells were cultured and handled according to Garcia-Castillo et al. (2018) ¹⁷. After incubation, cells (1×10^5 cells/ml) in a flat-bottom 24-well were washed with warmed PBS, and fresh culture media without antibiotics was added.

The human monocytic leukemia (THP-1) cell line was provided by the Department of Clinical Biochemistry and Immunology, University of Concepción (Concepción, Chile). Activation, propagation and freezing were carried out according to protocol for THP-1 cells (<https://www.atcc.org/products/all/TIB-202>). For assays, THP-1 cells were handled according to Garcia-Castillo et al. ¹⁷. Cells were maintained in RPMI-1640 medium (Gibco) supplemented with 10% v/v of heat-inactivated fetal bovine serum (SFB) (Biological Industries, Cromwell, CT, USA), 100 U/mL of penicillin, and 100 µg/mL of streptomycin (Corning). THP-1 cells (1×10^5 cells/mL) were incubated with 200 nM of PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate) for 24 hours, to induce the differentiation of monocytes into macrophages. For immunomodulation assays, cells were washed and fresh culture media without antibiotics was added.

Effect of EPS on *H. pylori* Adhesion to AGS Cells

The effect of EPSs isolated from *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 on the adhesion of *H. pylori* ATCC 43504 to AGS cells was evaluated as previously described by Garcia-Castillo et al. ¹⁷ with modifications. Briefly, AGS cells were co-incubated with 100 µg/mL of UCO-979C EPS or CRL973 EPS for 24 h before the challenge with 10^7 CFU/mL of *H. pylori* ATCC43504 for other 24 h. After incubation, AGS cells were washed and detached with 300µL of Trypsin/EDTA 0.05% (Corning, Manassas, VA, USA), then 700µL of DMEM without antibiotics was added. Suspension was homogenized and 10-fold dilution series were performed in PBS. Serial dilutions of the bacteria/cell suspension were seeded in selective Columbia agar plates. AGS cells infected with *H. pylori* without prophylactic treatment were considered as 100% adhesion. The UCO-979C EPS concentration was selected by preliminary experiments.

Effect of EPS on AGS and THP-1 Cells Cytokines Profiles

In order to evaluate the effect of EPSs on the innate immune response, AGS cells or THP-1 differentiated macrophages were incubated with 100 µg/mL UCO-979C EPS or CRL973 EPS for 24 h, and supernatants were collected for cytokines analysis. Cells without EPS stimulation were used as basal controls.

The effect of UCO-979C EPS or CRL973 EPS in the cytokine response to *H. pylori* infection was also evaluated. AGS cells or THP-1 differentiated macrophages were incubated with 100 µg/mL of UCO-979C EPS or CRL973 EPS and then challenged with 107 CFU/mL of *H. pylori* ATCC 43504 for 24 hours. Cells without EPS stimulation and infected with *H. pylori* were used as infected controls. After incubation, supernatants were collected and kept at -80°C to determine cytokines and chemokines by ELISA (DuoSet R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The levels of TNF-α, IL-6 and IL-8, and MCP-1 (pg/ml) were determined in the supernatant of AGS cells. The levels of TNF-α, IL-6, IL-10 and IFN-γ (pg/ml) were determined in the supernatant of THP-1 cells.

Animals and experimental infection

Female adult Swiss (6-week-old) SPF (specific pathogen free) mice were obtained from the closed colony kept at CERELA-CONICET (Tucuman, Argentina). They were housed in plastic cages with controlled room temperature (22 ± 2 °C temperature, $55 \pm 2\%$ humidity) and were fed ad libitum with a conventional balanced diet. Animal welfare was ensured by researchers and special trained staff in animal care and handling at CERELA-CONICET. Animal health and behavior were monitored twice a day. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Guidelines for Animal Experimentation of CERELA. The CERELA Institutional Animal Care and Use Committee prospectively approved this research under the protocol BIOT-CRL-IBT18.

Mice were treated with viable *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 or their EPSs. Viable bacteria were administered on two consecutive days at a daily dose of 10^8 CFU/mouse. Bacteria were suspended in 5 mL of 10% skimmed milk and added to

the drinking water and the consumption was monitored ensuring each mouse drinks 5–6 mL per day. Lactobacilli viability in drinking water was assessed after 24 hours by plating in MRS and Bactlight® viability kit (Thermofisher, Buenos Aires, Argentina). UCO-979C EPS or CRL973 EPS were administered by drinking water at a concentration of 100 µg/mL for two consecutive days. The infection control only received water instead probiotic or EPS suspension. After two days of lactobacilli or EPSs administration, these mice and untreated controls were infected with *H. pylori* SS1 using 100µL of 6×10^8 CFU/mL of the pathogenic strain by gavage²¹. Mice were housed individually during the experiments and the assays for each parameter studied were performed in 5–6 mice per group. Two days post-infection (dpi), blood samples were collected in heparinized tubes by cardiac puncture under anesthesia. Afterwards, the stomachs were removed and processed for histological and immunological examination. To assess the gastric damage after *H. pylori* infection, stomachs were fixed in 4% (v/v) formalin saline solution, then dehydrated and embedded in paraffin wax (Leica Microsystems, Mannheim, Germany). Samples were cut in sections and stained with hematoxylin-eosin. Blind microscopic examination of slides was performed.

Adhesion of *H. pylori* to mouse gastric mucosa

In order to evaluate the *H. pylori* adhesion in presence or absence of lactobacilli or EPS, stomachs were aseptically excised, weighed and dissected. Each stomach was placed in BHI broth, homogenized and diluted in PBS (10 fold). Then, dilutions were seeded on selected agar media for *H. pylori* and incubated for 72 hours at 37°C under microaerobic conditions²². *H. pylori* presence was confirmed by Gram staining and positive urease activity, and the concentration was expressed as CFU per gram of stomach.

Urease activity was determined in processed stomachs by a modified version of red phenol method^{23,24}. Briefly, stomach samples were placed in a solution containing 0.002% of phenol red, urea 150 and 100 mM phosphate buffer and urease activity was measured by absorbance (570 nm) after 2 h by using Infinite M200 pro (TECAN) plate

reader. *H. pylori* SS1-infected group mean absorbance was considered as 100% of urease activity.

Gastric and serum immunological response

For evaluating the effect of the prophylactic administration of lactobacilli or their EPSs on the inflammatory response, cytokines and chemokines were measured. Briefly, stomachs from mice were individually grounded in a mortar with cold 5 mL of PBS and centrifuged ^{25,26}. Supernatant was collected and stored at -80°C until cytokine/chemokine determination. Cytokines (IFN- γ , IL-10, TNF- α) and chemokines (IL-8, MCP-1) were quantified by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits, following the manufacturer's recommendations (DuoSet R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The values were expressed as pg per gram of stomach. In addition, to evaluate the effect of lactobacilli and EPSs treatments and infection on the systemic immune response, blood samples from mice were collected in heparinized tubes by cardiac puncture. Mouse serum samples were kept at -80°C until cytokine/chemokine determination by ELISA kits. Values were expressed as pg/mL of serum.

Statistical Analysis

Experiments were performed in triplicate and results were expressed as mean \pm standard deviation. After verification of the normal distribution of data, 2-way ANOVA was used. Tukey's test (for pairwise comparisons of the means) was used to test for differences between the groups. Differences were considered significant at $p < 0.05$ or $p < 0.01$.

RESULTS

***L. fermentum* UCO-979C improves the resistance against *H. pylori* infection in mice**

Our previous in vitro studies have clearly demonstrated the ability of *L. fermentum* UCO-979C to inhibit *H. pylori* growth and adhesion to human gastric epithelial cells ¹⁵ and to beneficially regulate the inflammatory response triggered by the pathogen in both epithelial cells and macrophages ¹⁷. In this work, in a first set of experiments, we aimed

to confirm the immunomodulatory and anti-*H. pylori* effects of *L. fermentum* UCO-979C in an *in vivo* animal model. For this purpose, adult immunocompetent mice were treated with the UCO-979 strain, as described in detail in materials and methods, and then challenged with *H. pylori*. The non-immunomodulatory strain *L. fermentum* CRL973¹⁸ was used for comparison. As shown in **Figure 1**, mice treated with *L. fermentum* UCO-979C had lower *H. pylori* colony counts associated with the stomachs, as well as reduced urease activity when compared to the control group. On the contrary, *L. fermentum* CRL973 was not able to modify the levels of *H. pylori* colonization when compared to control mice. Although the urease activity in CRL973-treated mice was lower than the observed in the *H. pylori*-infected control group, it was significantly higher when compared to that observed in UCO-979C-treated animals (**Figure 1**).

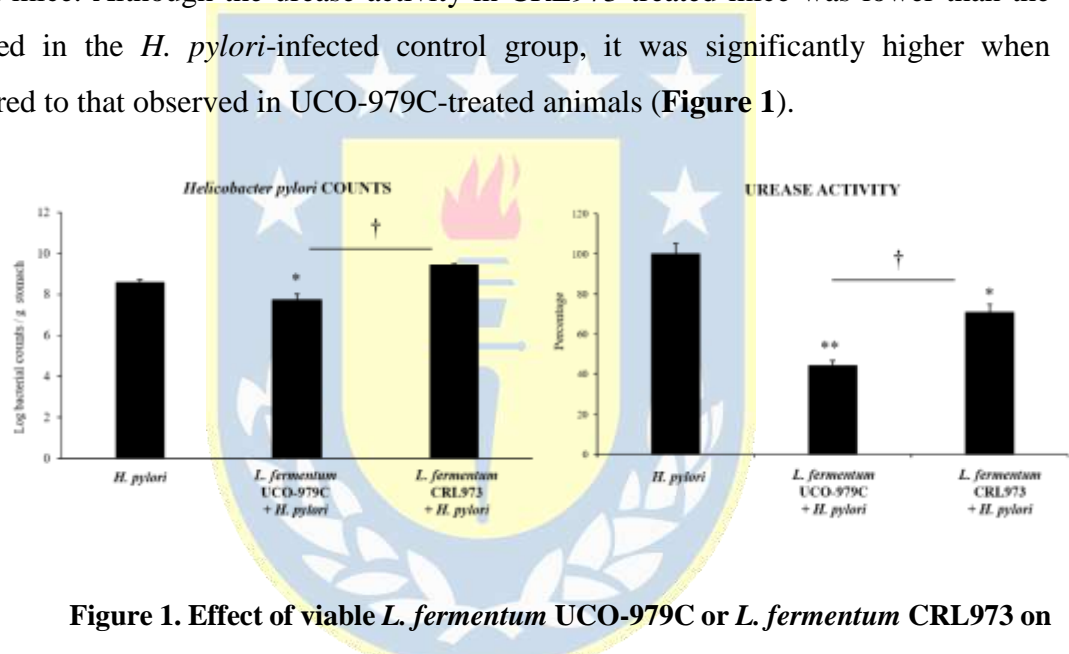
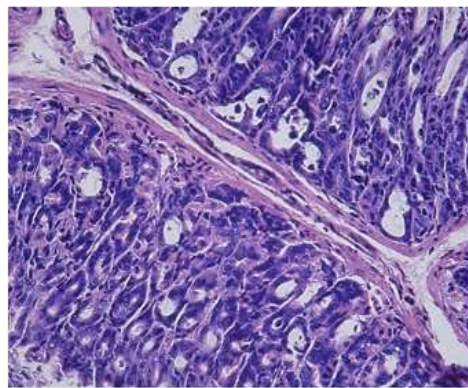


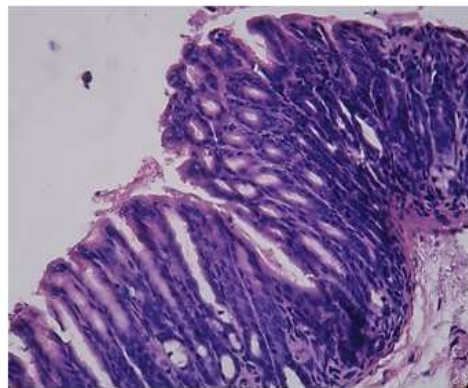
Figure 1. Effect of viable *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 on gastric colonization of *H. pylori* SS1. *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 were administered to different groups of mice for two consecutive days at a dose of 10⁸ CFU/mouse/day, then mice were challenged with *H. pylori* SS1. Two days post-infection, mice were euthanized. *H. pylori* counts (Log CFU/g of tissue) and Urease activity (% percentage) were determined in gastric explants. Mice infected with *H. pylori* were used as controls. The results represent three independent experiments and are expressed as mean \pm SD. Significant differences when compared to the control group: *(p< 0.05), ** (p< 0.01). Significant differences when compared to the indicated group: † (p< 0.05).

Histopathological analysis of stomach tissue sections was performed in the different groups of mice in order to evaluate the tissue damage and the inflammatory response (**Figure 2**). The infection of adult immunocompetent mice with *H. pylori* significantly increased the inflammatory cells infiltrating the stomach mucosa, since control mice displayed no inflammation versus notable inflammatory changes in the infected control mice. Inflammatory infiltrates consisted of neutrophils and mononuclear cells in the lamina propria and around the gastric glands, as has been described in previous publications^{27,28}.

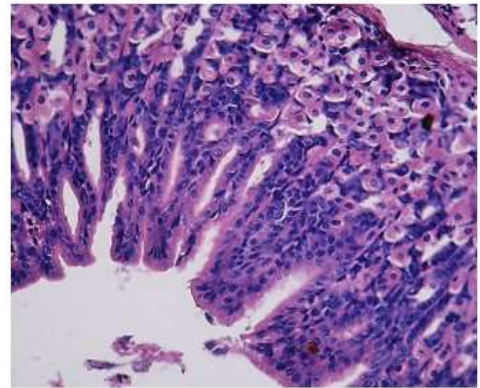
NON-INFECTED CONTROL



L. fermentum UCO-979C
+ *H. pylori*



***H. pylori* INFECTED CONTROL**



L. fermentum CRL973
+ *H. pylori*

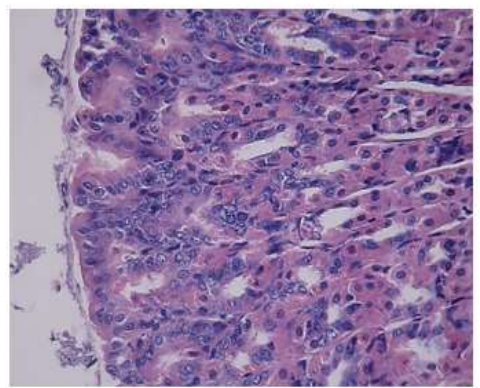


Figure 2. Effect of viable *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 in the gastric inflammatory response of competent adult mice infected with *H. pylori* SS1. *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 were administered to different groups of mice for two consecutive days at a dose of 10^8 CFU/mouse/day, then mice were challenged with *H. pylori* SS1. Two days post-infection, mice were euthanized, and histopathological evaluation of gastric samples was performed. Hematoxylin/eosin stained sections of gastric mucosa. Upper left: Normal appearance of mice gastric mucosa. Upper right: Control group: Swiss mice infected with *H. pylori*. Lower left: *L. fermentum* UCO-979-*H. pylori* group. Lower right: *L. fermentum* CRL 973-*H. pylori* group. Original magnification 200x.

The inflammation of gastric tissue in *L. fermentum* UCO-979C-treated mice was milder than that in controls after infection. There were only mild inflammatory neutrophil and mononuclear-cell infiltrates in the UCO-979C group (**Figure 2**). On the other hand, *L. fermentum* CRL973-treated mice showed neutrophil and mononuclear-cell infiltration in the gastric tissue that were not different from infected controls (**Figure 2**).

***L. fermentum* UCO-979C differentially modulates the immune response against *H. pylori* Infection in Mice**

Cytokines and chemokines were measured in the stomach (**Figure 3**) and serum (**Figure 4**) samples of lactobacilli-treated and untreated control groups after the challenge with *H. pylori*. The infection of adult immunocompetent mice with *H. pylori* significantly increased the levels of the inflammatory factors IFN- γ , TNF- α , MCP-1 and IL-8, as well as the levels of the regulatory cytokine IL-10 when compared to basal levels in non-infected animals (data not shown). Mice treated with *L. fermentum* UCO-979C had significantly higher levels of gastric and serum IFN- γ when compared to the control group (**Figure 3, 4**). On the contrary, the UCO-979C-treated group showed significantly lower levels of gastric and serum TNF- α and IL-8 compared to the control group (**Figure 3, 4**). *L. fermentum* UCO-979C was also able to reduce the levels of MCP-1 in the gastric mucosa when compared to controls (**Figure 3**). In addition to its ability to diminish inflammatory cytokines and chemokines, it was observed that the UCO-979C strain was

capable of inducing a significant increase in IL-10 levels when compared to controls in both the gastric mucosa (**Figure 3**) and serum (**Figure 4**). The group of animals treated with *L. fermentum* CRL973 did not exhibit any variation in gastric IFN- γ , IL-10, TNF- α , MCP-1 levels and only gastric IL-8 values were lower than that observed in the control group (**Figure 3**). On serum samples, there were not statistically significant differences between *L. fermentum* CRL973 and control mice (**Figure 4**).

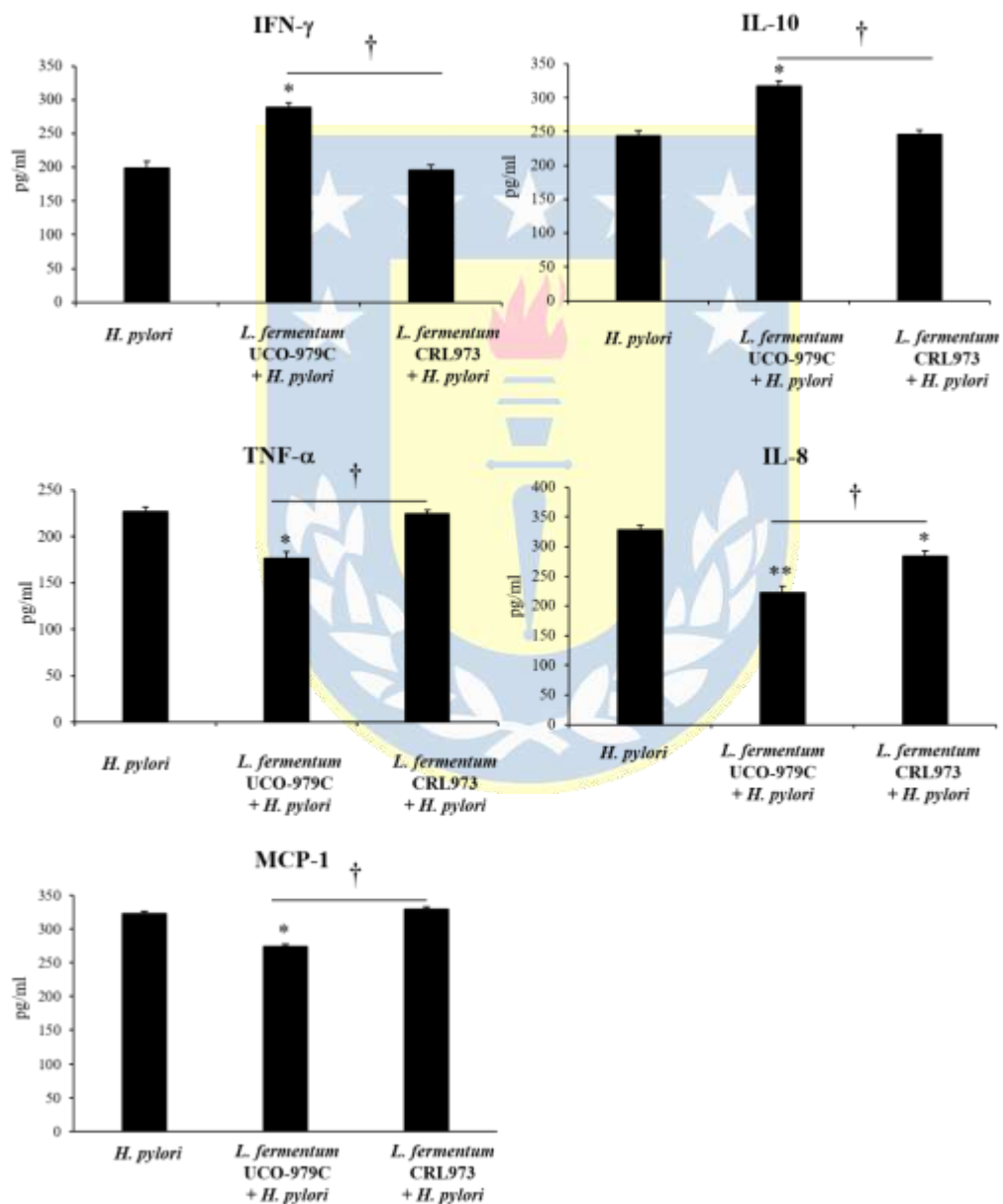


Figure 3. Effect of viable *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 on gastric cytokines and chemokines in *H. pylori* SS1-infected mice. Effect of viable *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 on gastric cytokines and chemokines in adult immunocompetent mice infected with *H. pylori* SS1. *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 were administered to different groups of mice for two consecutive days at a dose of 108 CFU/mouse/day, then mice were challenged with *H. pylori* SS1. Two days post infection, gastric concentrations of IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL-8 and MCP-1 (pg/ml) were determined. Mice infected with *H. pylori* were used as controls. Results are expressed as mean \pm SD. Significant differences when compared to the control group: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$). Significant differences when compared to the indicated group: † ($p < 0.05$).

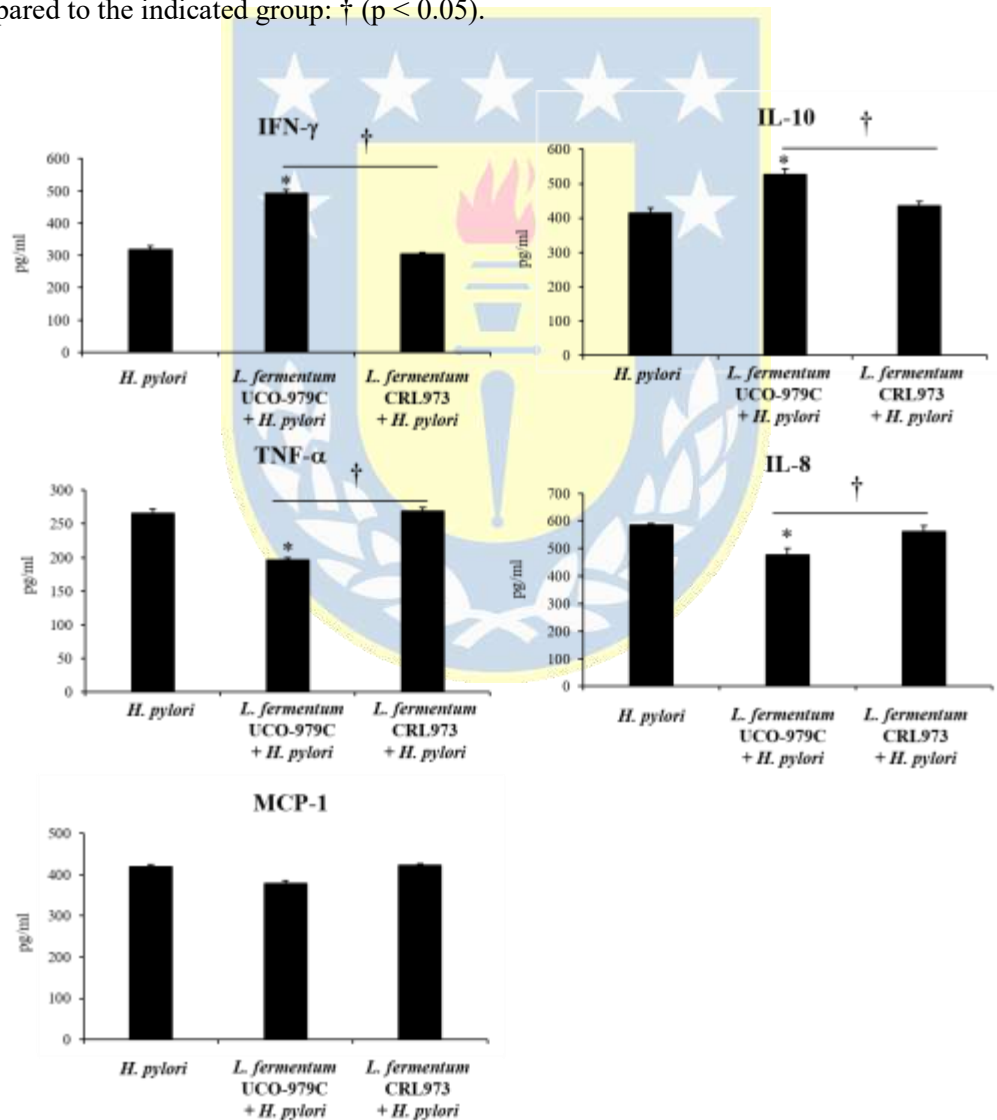


Figure 4. Effect of viable *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 on serum cytokines in adult immunocompetent mice infected with *H. pylori* SS1. *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 were administered to different groups of mice for two consecutive days at a dose of 10^8 CFU/mouse/day, then mice were challenged with *H. pylori* SS1. Two days post-infection, serum concentrations of IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL-8 and MCP-1 (pg/mL) were determined. Mice infected with *H. pylori* were used as controls. Results are expressed as mean \pm SD. Significant differences when compared to the control group: * ($p < 0.05$). Significant differences when compared to the indicated group: † ($p < 0.05$).

The EPS from *L. fermentum* UCO-979C reduces *H. pylori* adhesion to AGS Cells

In a second set of experiments, we evaluated whether the EPS produced by *L. fermentum* strain UCO-979C was involved in the *in vitro* and *in vivo* abilities to improve resistance against *H. pylori* and differentially modulate the immune response. We first evaluated the ability of the EPS produced by the UCO-979C to modify the adhesion of *H. pylori* to AGS cells. For this purpose, AGS cells were treated with UCO-979C EPS prior to *H. pylori* infection. The EPS isolated from strain *L. fermentum* CRL973 was used for comparison. As shown in Figure 5, both UCO-979C EPS and CRL973 EPS significantly reduced *H. pylori* adherence. However, the protective effect of UCO-979C EPS was greater than that for CRL973 EPS (**Figure 5**).

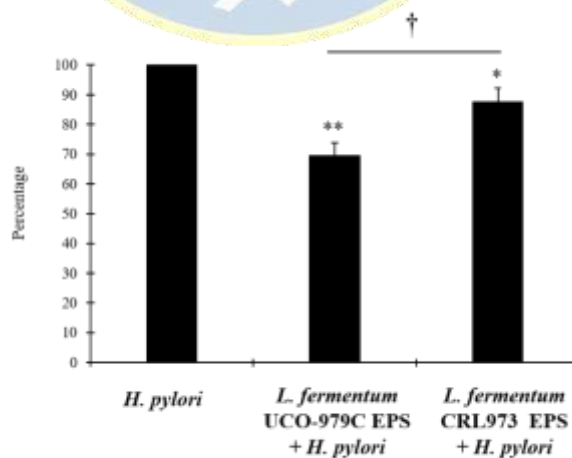


Figure 5. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C EPS pre-incubation on *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric epithelial cells (AGS cells) challenged with *H. pylori*. AGS cells were stimulated with EPS-979C or EPS-973 for 24 h before the challenge. Results are expressed in percentage, 100% correspond to infected control and represent data from three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. Significant differences when compared to the control group: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$). Significant differences when compared to the indicated group: † ($p < 0.05$).

The EPS from *L. fermentum* UCO-979C modulates cytokine profile in AGS and THP-1 Cells

We next aimed to evaluate whether the EPS produced by the probiotic strain *L. fermentum* UCO-979C was able to modify the production of cytokines and chemokines in human gastric epithelial cells and macrophages. AGS cells were stimulated with UCO-979C EPS and the levels of TNF- α , IL-6 and IL-8 were measured in culture supernatants (**Figure 6**). Again, the EPS isolated from *L. fermentum* CRL973 was used for comparison. The levels of TNF- α and IL-6 were significantly increased in the presence of UCO-979C EPS or CRL973 EPS. However, CRL973 EPS was more efficient than UCO-979C EPS to enhance TNF- α production in epithelial cells. On the contrary, IL-8 levels were not affected by UCO-979C EPS or CRL973 EPS treatments (**Figure 6**).

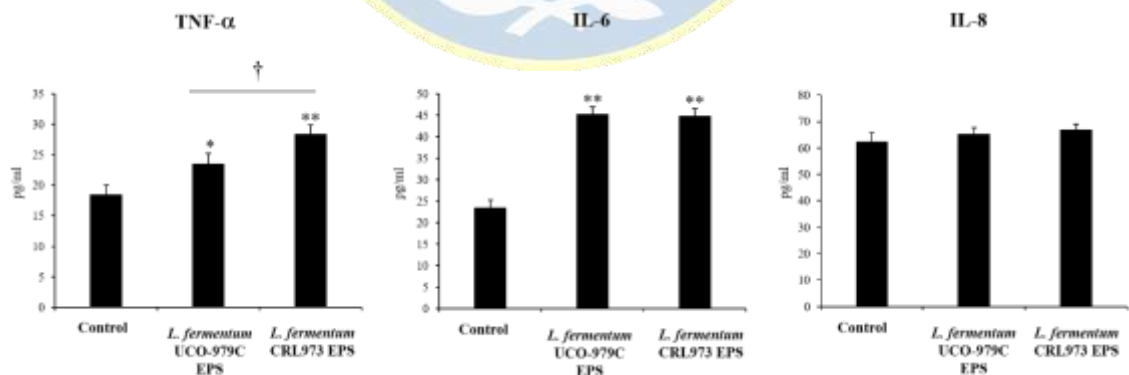


Figure 6. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS on cytokine and chemokine production of human gastric epithelial cells (AGS cells). AGS cells were incubated with 100 µg/mL of *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS. The levels of TNF- α , IL-6 and IL-8 (pg/mL) in culture supernatants were determined 24 h after stimulation. The results represent data from three independent experiments. Results are expressed as mean \pm standard deviation. Significant differences when compared to the control group: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$). Significant differences when compared to the indicated group: † ($p < 0.05$).

When the effect of EPSs on THP-1 cells was analyzed, it was observed that both UCO-979C EPS and CRL973 EPS significantly increased the levels of IL-6 and IL-10 (**Figure 7**). However, UCO-979C EPS was more efficient than CRL973 EPS to enhance IL-10 production in macrophages. The levels of TNF- α were not affected by UCO-979C EPS or CRL973 EPS treatments, while only the EPS produced by the probiotic strain *L. fermentum* UCO-979C was able to increase the production of IFN- γ (**Figure 7**).

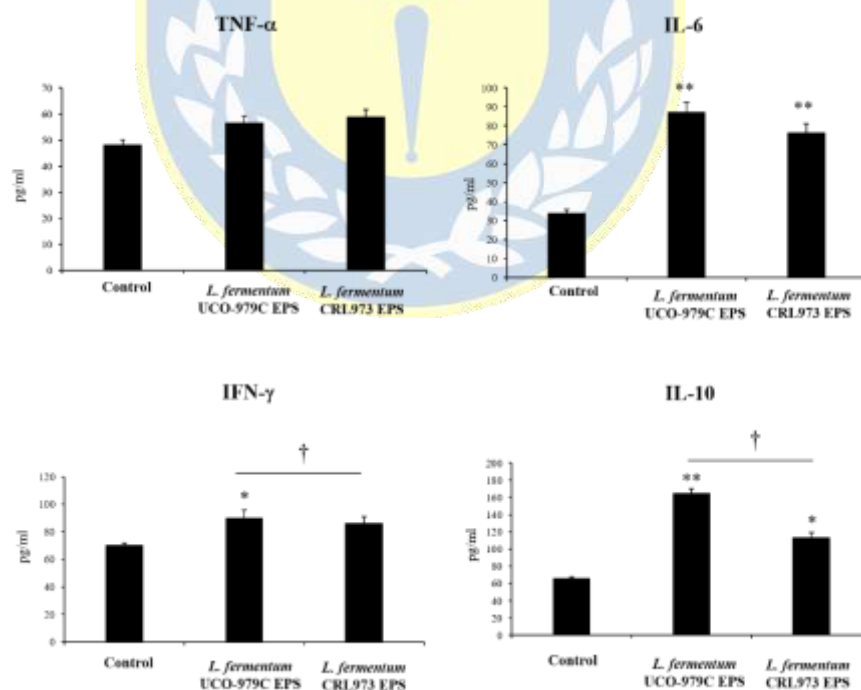


Figure 7. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS on cytokine and chemokine production of human macrophages (THP-1 cells). THP-1 cells were incubated with 100 µg/mL of *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS. The levels of TNF-α, IL-6, IFN-γ and IL-10 (pg/mL) in culture supernatants were determined 24 h after stimulation. The results represent data from three independent experiments. Results are expressed as mean± standard deviation. Significant differences when compared to the control group: * (p < 0.05), ** (p < 0.01). Significant differences when compared to the indicated group: † (p < 0.05).

We also evaluated whether the EPS of *L. fermentum* UCO-979C was able to modify the production of cytokines and chemokines in human gastric epithelial cells and macrophages in the context of *H. pylori* infection. It was observed that after the infection with *H. pylori*, secretion of TNF-α, IL-6 and IL-8 increased considerably in AGS cells (**Figure 8**) compared to basal levels (**Figure 6**). Likewise, TNF-α, IL-6, IFN-γ and IL-10 significantly increased in THP-1 cells (**Figure 9**) when compared to basal levels (**Figure 7**).

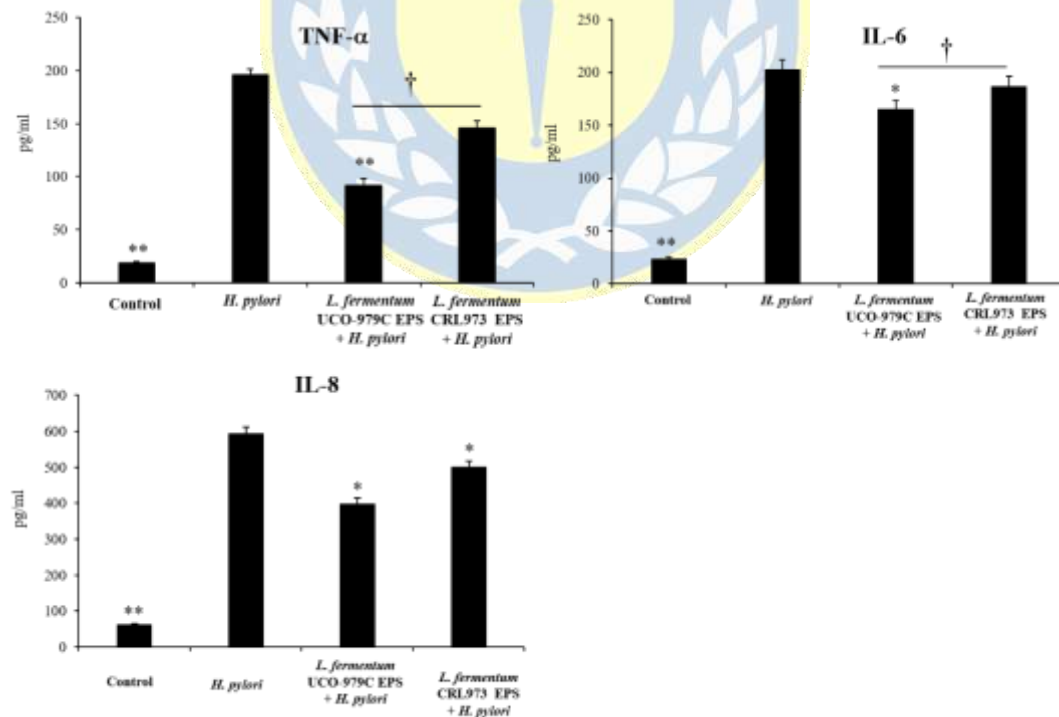


Figure 8. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS on the cytokine and chemokine production of human gastric epithelial cells (AGS cells) after *Helicobacter pylori* challenge. AGS cells were incubated with 100 µg/mL of *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS for 24 h. Then, cells were challenged with *H. pylori* 43504. The levels of TNF- α , IL-6, IFN- γ and IL-10 (pg/mL) in culture supernatants were determined 24 h after infection. Results represent data from three independent experiments. Results are expressed as mean \pm standard deviation. Significant differences when compared to the control group :*(p < 0.05), *(p < 0.01). Significant differences when compared to the indicated group: † (p < 0.05).

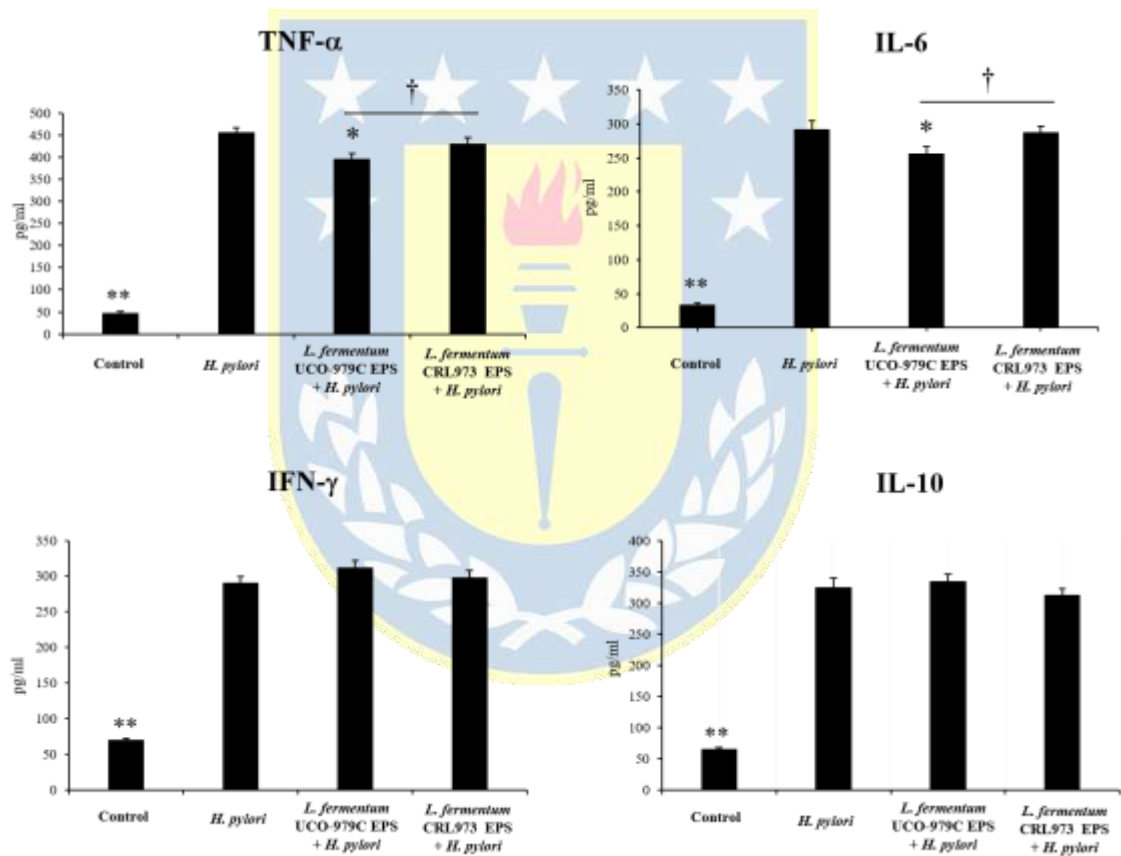


Figure 9. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS on cytokine and chemokine production of human macrophages (THP-1 cells) after *Helicobacter pylori* challenge. THP-1 cells were incubated with 100 µg/mL of *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS for 24 h. Then, cells were challenged

with *H. pylori* 43504. The levels of TNF- α , IL-6, IFN- γ and IL-10 (pg/mL) in culture supernatants were determined 24 h after infection. The results represent data from three independent experiments. Results are expressed as mean \pm standard deviation. Significant differences when compared to the control group: * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$). Significant differences when compared to the indicated group: † ($p < 0.05$).

AGS cells stimulated with UCO-979C EPS showed a significant decrease in the levels of the inflammatory cytokines TNF- α , IL-6 and IL-8 when compared with *H. pylori*-infected controls (**Figure 8**). In addition, it was observed that the levels of TNF- α and IL-8 decreased significantly in AGS cell treated with CRL973 EPS than in the control group (**Figure 8**). However, it should be noted that TNF- α was significantly lower in UCO-979C EPS-treated AGS cells than in those stimulated with CRL973 EPS.

On the other hand, the treatment of THP-1 cells with UCO-979C EPS previous to infection with *H. pylori* did not exert any effect on the levels of IFN- γ and IL-10, since the concentrations of both cytokines were not different from the control infected THP-1 cells (**Figure 9**). In addition, a modest but significant decrease in the levels of TNF- α and IL-6 was observed in THP-1 cells treated with UCO-979C EPS when compared to the infected controls (**Figure 9**). There were not statistical differences in the levels of TNF- α , IL-6, IFN- γ or IL-10 when cells treated with the EPS from *L. fermentum* CRL973 and infected control cells were compared (**Figure 9**).

The EPS from *L. fermentum* UCO-979C modulates the inflammatory response triggered by *H. pylori* infection in mice

Finally, we aimed to determine whether the EPS from *L. fermentum* UCO-979C was able to exert beneficial effects *in vivo*. For this purpose, mice were orally treated with an aqueous suspension of the lyophilized UCO-979C EPS and then challenged with *H. pylori*. Mice treated with CRL973 EPS were used for comparisons. As shown in **Figure 10**, it was observed that the treatment of mice with UCO-979C EPS did not induce significant differences in the counting of pathogenic

bacteria in stomach samples. However, a significant reduction in the urease activity in UCO-979C EPS mice was detected when compared to controls (**Figure 10**). As expected, there were not statistical differences in *H. pylori* counts or urease activity when mice treated with the EPS from *L. fermentum* CRL973 and infected controls were compared (**Figure 10**).

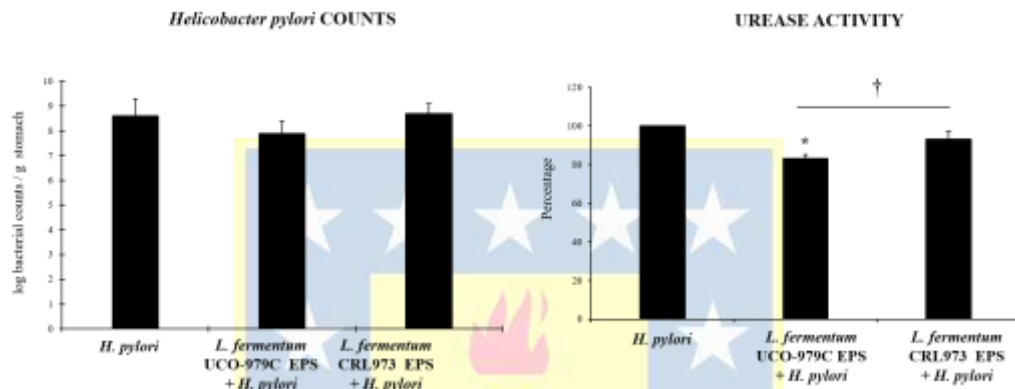


Figure 10. Effect of *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS on gastric colonization of *H. pylori* SS1. *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS were administered to different groups of mice for two consecutive days at a dose of 100µg/mL/mouse/day, then mice were challenged with *H. pylori* SS1. Two days post-infection, mice were euthanized, *H. pylori* counts (Log CFU/g of tissue) and Urease activity (% percentage) were determined in gastric explants. Mice infected with *H. pylori* were used as controls. Results are expressed as mean \pm standard deviation. Significant differences when compared to the control group: * ($p < 0.05$). Significant differences when compared to the indicated group: † ($p < 0.05$).

In order to determine the impact of UCO-979C EPS on the innate immune response, we measured gastric (**Figure 11**) and systemic (**Figure 12**) cytokines and chemokines in infected mice. It was observed that the administration of UCO-979C EPS was capable of reducing the levels of serum and gastric IL-8 as well as serum TNF- α in *H. pylori*-infected mice. In addition, UCO-979C EPS-treated mice had significantly higher levels of gastric (**Figure 11**) and serum (**Figure 12**) IL-10 than

infected controls. No differences were detected in the levels of IFN- γ and MCP-1 when UCO-979C EPS and control mice were compared. The CRL973 EPS did not exert any significant effects in the levels of gastric or serum cytokines and chemokines during *H. pylori* infection (**Figures 11 and 12**).

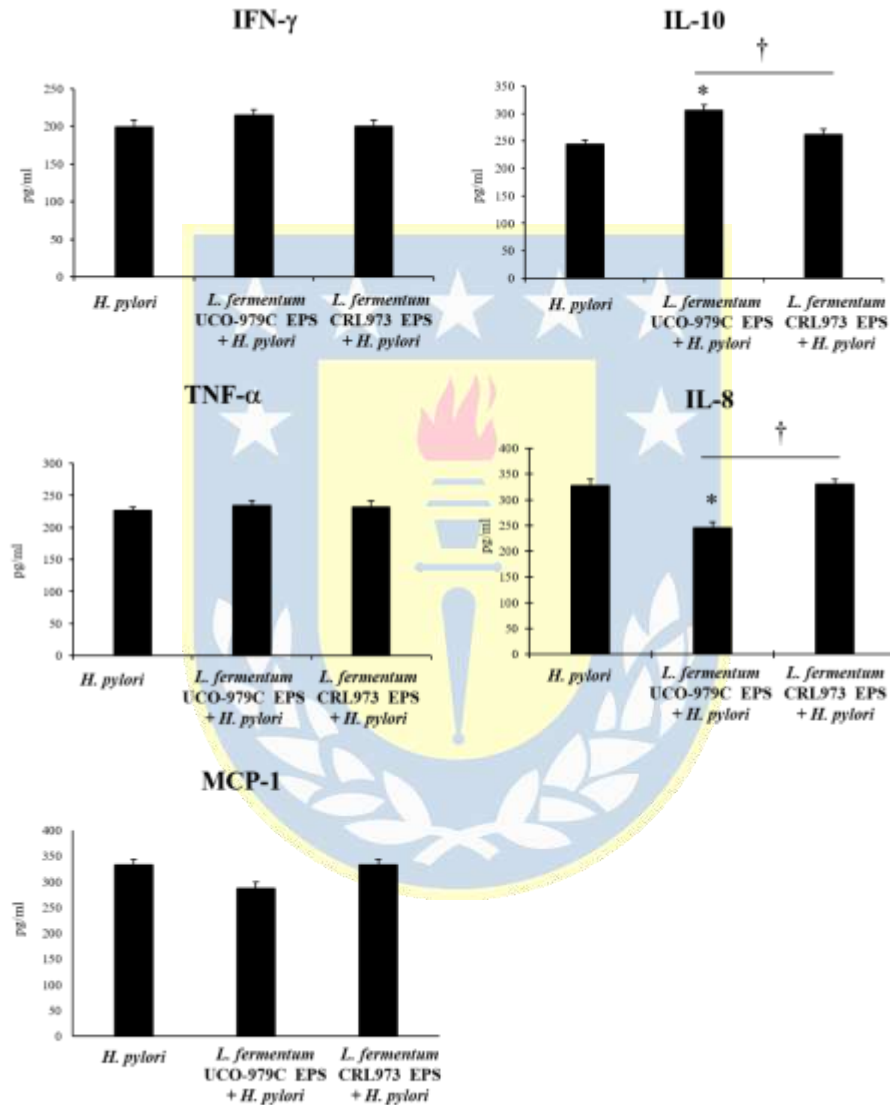


Figure 11. Effect of *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS on gastric cytokines and chemokines in adult immunocompetent mice infected with *H. pylori* SS1. *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS were administered to different groups of mice for two consecutive days at a dose of 100 μ g/mL mouse/day, then

mice were challenged with *H. pylori* SS1. Two days post-infection, gastric concentrations of IFN- γ , IL-10, TNF- α , IL-8 and MCP-1 (pg/mL) were determined. Mice infected with *H. pylori* were used as controls. Results are expressed as mean \pm standard deviation. Significant differences when compared to the control group: * ($p < 0.05$). Significant differences when compared to the indicated group: † ($p < 0.05$).

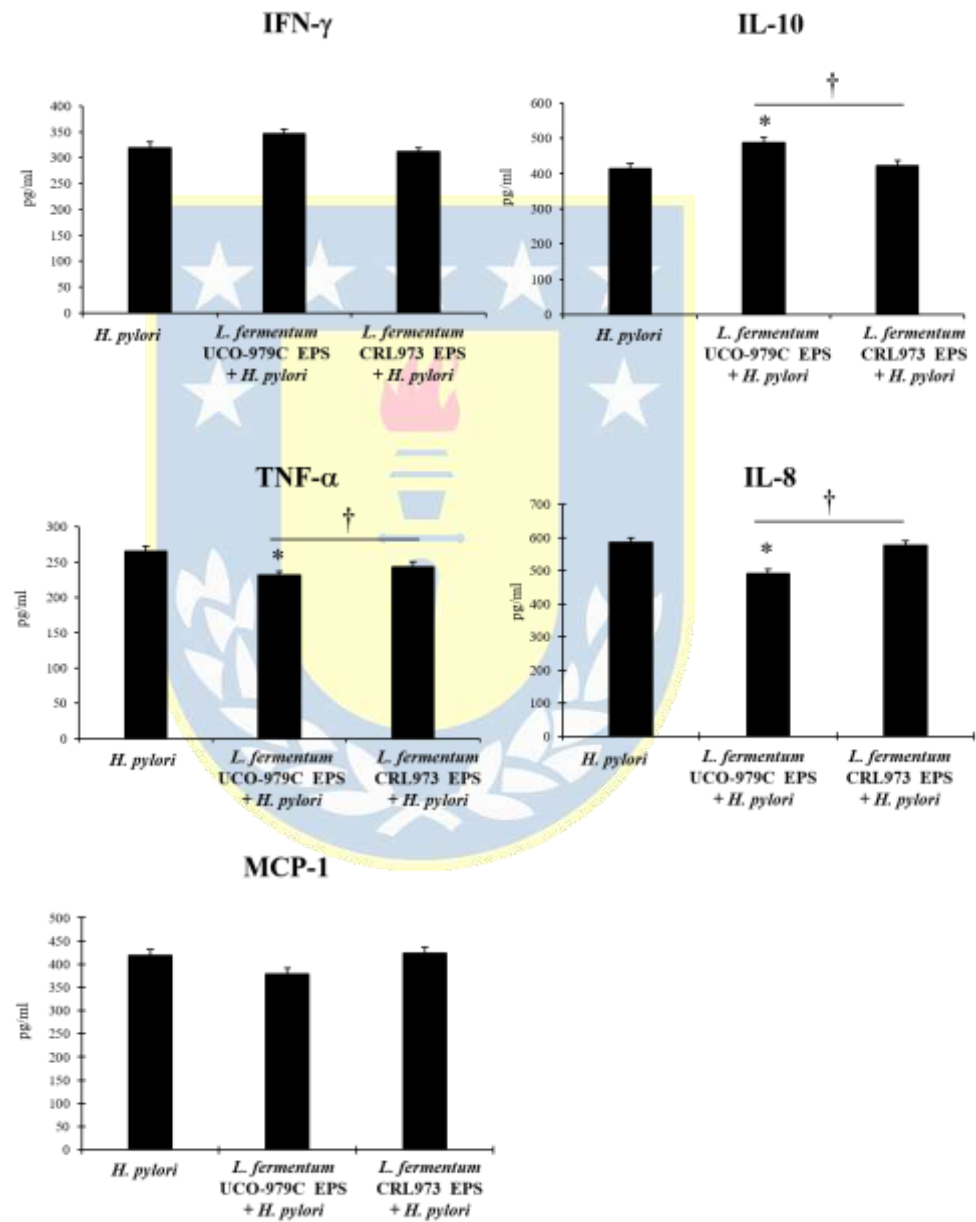


Figure 12. Effect of *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS on serum cytokines and chemokines in adult immunocompetent mice infected with *H. pylori* SS1. *L. fermentum* UCO-979C or *L. fermentum* CRL973 EPS were administered to different groups of mice for two consecutive days at a dose of 100 µg/mL mouse/day, then mice were challenged with *H. pylori* SS1. Two days post-infection, serum concentrations of IFN-γ, IL-10, TNF-α, IL-8 and MCP-1 (pg/mL) were determined. Mice infected with *H. pylori* were used as controls. Results are expressed as mean ± standard deviation. Significant differences when compared to the control group: *(p < 0.05). Significant differences when compared to the indicated group: † (p < 0.05).

DISCUSSION

H. pylori triggers mucosal and systemic immune responses in infected individuals. However, these immune responses are not always efficient for eradicating the pathogen^{29,30}. Moreover, the aggressive and persistent proinflammatory response induced by this pathogen can contribute to the development of gastritis, preceding a series of morphological changes that may lead to gastric cancer. An enhanced modification in DNA methylation in the gastric mucosa, which is considered as a preliminary stage of tumor transformation, has been reported after *H. pylori* infection^{31,32}. Moreover, the infection-associated inflammatory response rather than *H. pylori* itself has been associated to DNA methylation^{31,32}. Then, mediators of inflammation including cytokines and chemokines, are considered as important therapeutic targets to prevent gastritis and gastric cancer associated to *H. pylori* infection³³. In this regard, the beneficial effect of probiotics for the protection against *H. pylori* infection and inflammation is supported by a large amount of scientific evidence^{13,14,34}. Earlier studies reported that *L. salivarius* WB 1004³⁵, *L. rhamnosus* R0011 and *L. acidophilus* R0052³⁶ were able to differentially modulate immune responses and diminish *H. pylori* colonization in mice. The beneficial modulation of the inflammatory immune response and the reduction of *H. pylori* adhesion has been also reported in *in vitro* experiments for probiotic strains such as *L. bulgaricus*³⁷ and *L. rhamnosus* UCO-25A³⁸. Moreover,

studies have proposed the inactivation of Smad7 and NF- κ B signaling pathways³⁹ and the activation of SOCS-2/SOCS-3 signaling through STAT1/STAT3 activation and JAK2 inactivation⁴⁰ as the molecular mechanisms of action for the beneficial effects of probiotics. Then, these and other *in vitro* and *in vivo* studies have clearly demonstrated the potential of probiotics for the protection against *H. pylori* colonization as well as in the regulation of the associated inflammation.

We have carried out studies to evaluate the ability of probiotics to protect against *H. pylori* infection using mainly the strain *L. fermentum* UCO-979C. This probiotic strain was selected between other of lactic acid bacteria isolated from human gastric tissue because of its remarkable anti-*H. pylori* properties⁴¹. The UCO-979C strain strongly inhibited the adhesion, growth and urease activity of *H. pylori* in AGS cells and Mongolian gerbils^{16,42}. Moreover, *L. fermentum* UCO-979C was able to beneficially modulate the cytokine response of AGS cells and THP-1 macrophages after *H. pylori* challenge¹⁷. Here, we extend those previous findings by demonstrating, for the first time, the ability of *L. fermentum* UCO-979C to beneficially modulate the innate immune response triggered by *H. pylori* *in vivo*.

Cytokines variations during the *H. pylori* infection have a significant impact on the evolution of the gastric pathology due to their vast and pleiotropic effects on immune and epithelial cells⁴³. The increased production of proinflammatory cytokines and chemokines, including TNF- α , IL-6, IL-8 and MCP-1, during *H. pylori* gastric mucosal inflammation, has been well documented. Those inflammatory factors can be secreted by gastric epithelial cells and play a major role in triggering the mucosal inflammatory damage caused by *H. pylori*^{44,45}. In addition, *H. pylori* and its virulence factors are capable of increasing the production of the inflammatory mediators TNF- α , IL-6, and IFN- γ by macrophages, which contribute to the amplification of the inflammatory response in the gastric mucosa^{46,47}. In our previous study¹⁷, we demonstrated that *L. fermentum* UCO-979C significantly reduced the production of IL-8, TNF- α , IL-6, and MCP-1 in AGS cells and macrophages

challenged with *H. pylori*. The results presented here confirm those *in vitro* findings, by demonstrating that the UCO-979C strain reduced the levels of TNF- α , IL-8, and MCP-1 in the gastric mucosa of *H. pylori*-infected mice. In addition, our previous *in vitro* studies also revealed the ability of the UCO-979C strain to improve the levels of IL-10 in *H. pylori*-infected macrophages¹⁷, which is in line with the increased concentrations of IL-10 found in gastric and serum samples of *H. pylori*-infected mice. Increased levels of IL-10 may contribute to the chronicity of gastritis, however, this regulatory cytokine is of fundamental importance to prevent mucosal injury mediated by the inflammatory response⁴⁷⁻⁵⁰. Then, the balance in the inflammatory and regulatory cytokine production induced by *L. fermentum* UCO-979C could offer advantages in the protection against *H. pylori* infection, since a reduced inflammatory damage was observed in the histopathological analysis of gastric samples of mice.

The differential cytokine profile induced by *L. fermentum* UCO-979C treatment in *H. pylori*-infected mice could also explain the reduction in the pathogen gastric colonization. The generation of a Th1 response with the subsequent increase in the mucosal and systemic levels of IFN- γ have been described in both experimental animal models and human clinical trials^{51,52}. The production of appropriate levels of IFN- γ has been associated to the protection against *H. pylori* infection. Peek et al.⁵³ demonstrated that mice that are deficient in IFN- γ have an increased susceptibility to *H. pylori* colonization. It was also reported that the virulence factor cytotoxin-associated gene A (*cagA*) can be translocated into the cytoplasm of dendritic cells, reducing the secretion of IL-12p40 and impairing the generation of the Th1 response, which would favor the replication of *H. pylori*^{54,55}. Then, the increase in gastric IFN- γ induced by probiotics such as *L. fermentum* UCO-979C could reduce the initial replication of *H. pylori* in the initial steps of the infection.

Some studies have demonstrated that probiotic strains may exert beneficial effects on *H. pylori* infection and inflammation through the molecules produced and secreted by bacterial cells⁵⁶. Interestingly, it was reported that *L. rhamnosus* GG-

conditioned media was able to antagonize TNF- α secretion induced by *H. pylori* or LPS in murine macrophages⁵⁷. In addition, the supernatant of *L. plantarum* B7 administered to rats infected with *H. pylori* showed the ability to reduce gastric pathology and apoptotic cells rate, as well as to decrease serum TNF- α and MDA levels⁵⁸. Among the functional molecules produced by probiotics, are EPSs macromolecules, which were proposed to be involved in host microbe interactions⁵⁹. In that regard, a polysaccharide produced by *Bacteroides fragilis* can suppress IL-17 and increase IL-10 production by intestinal immune cells and in a rodent model of *Helicobacter hepaticus* infection⁶⁰. In addition, it was described that polysaccharides produced by *L. salivarius* B37 and *L. salivarius* B60 suppressed *H. pylori*-induced IL-8 production and mRNA expression in gastric epithelial cells⁶¹. To our knowledge, no other studies have demonstrated the anti-*H. pylori* inhibitory and immunomodulatory effects of EPS obtained from a probiotic strain.

We have reported that *L. fermentum* UCO-979C produces large amount of EPS and is able to form biofilms on AGS and Caco-2 cell lines, inhibiting the colonization by *H. pylori* by up to 80%¹⁵. Thus, it was concluded that the EPS was a key molecule in the ability of *L. fermentum* UCO-979C to inhibit *H. pylori* colonization. In this work, we hypothesized that UCO-979C EPS is also involved in the immunomodulatory effects of this probiotic strains in the context of *H. pylori* infection. We confirmed that the UCO-979C EPS was capable of inducing a significant reduction in *H. pylori* adhesion (~30%) to AGS cells, which was comparable with the inhibitory activity of viable *L. fermentum* UCO-979C (~44%) reported previously¹⁷. In addition, the UCO-979C EPS was able to differentially modulate the cytokine profile of AGS and THP-1 cells in response to the challenge with *H. pylori*. Similar to our previous studies with *L. fermentum* UCO-979C¹⁷, the UCO-979C EPS reduced the production of TNF- α , IL-6 and IL-8 in *H. pylori*-infected AGS cells while it diminished the production of TNF- α in *H. pylori*-infected THP-1 cells. Moreover, the in vivo studies of this work demonstrated that both *L. fermentum* UCO-979C and its EPS were able to reduce IL-8 and enhance IL-10 levels in the

gastric mucosa of infected mice. It should be noted, however, that the immunological changes induced by UCO-979C EPS in our *in vitro* and *in vivo* experiments did not completely resemble those observed for the viable UCO-979C strain. The UCO-979C EPS was not able to improve the levels of IFN- γ in infected mice, as observed for the viable bacterium. The lack of ability of UCO-979C EPS to increase IFN- γ could be related to its inability to reduce *H. pylori* counts *in vivo*. In this sense, it would be of great value to evaluate alternative treatments with UCO-979C EPS, varying concentrations and periods of administration, to conclusively rule out its ability to increase gastric IFN- γ *in vivo*.

The molecular mechanisms by which *L. fermentum* UCO-979C or its EPS modulate the secretion of inflammatory cytokines and chemokines in *H. pylori*-infected AGS cells are not known. Some studies have described the ability of probiotic lactobacilli to differentially modulate the expression of inflammatory factors in gastric epithelial cells through the suppression of NF- κ B activation^{39,62}. Recently, we described the ability of *L. fermentum* UCO-979C to modify the expression of negative regulators of TLR4 signaling in intestinal epithelial cells¹⁸. The UCO-979C strain diminished the expression of MKP-1 and Tollip in intestinal epithelial cells after the activation of TLR4, conducting the down-regulation in the expression of inflammatory factors such as IL-8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, and C3. Then, it is tempting to speculate that *L. fermentum* UCO-979C or its EPS are able to interact with pattern recognition receptors expressed in gastric epithelial cells, inducing the upregulation of negative regulators and thereby modifying the activation of signaling pathways such as the NF- κ B pathway, and reducing the production of inflammatory mediators. The detailed molecular investigation of this hypothesis is an interesting topic for future research.

In order to evaluate whether the immunomodulatory effects of *L. fermentum* UCO-979C or its EPS in the context of *H. pylori* infection were a strain-specific property, the *in vitro* and *in vivo* experiments conducted in this work were performed

in comparison with a strain of the same species, which is also able to produce EPS. Although CRL973 EPS was able to slightly reduce *H. pylori* adhesion to AGS cells and diminish the production of IL-8 and TNF- α by the gastric epithelial cells *in vitro*, neither the CRL973 strain nor its EPS were able to induce changes in *H. pylori* colonization or protect against inflammatory damage in infected mice. Interestingly, CRL973 EPS was not able to induce any significant effect in the cytokine profiles of THP-1 cells or gastric samples of infected mice. These results allow us to arrive at two conclusions. First, the modulation of immune cells (such as macrophages) would be of great relevance to achieve an optimal protective effect *in vivo*. This implies that the *in vitro* selection and characterization of immunomodulatory bacteria or their functional molecules for their application in the prevention of *H. pylori* infection should not only be limited to the use of epithelial cells but also include specialized cells of the immune system. Secondly, our results indicate that the EPS produced by *L. fermentum* UCO-979C would have unique functional characteristics that deserve to be studied in depth. Chemical, structural, genetic and genomic studies comparing the EPS of the UCO-979C and CRL973 strains as well as their ability to interact with different pattern recognition receptors would be of great importance to advance the knowledge of the molecular mechanisms involved in the effect of beneficial microorganisms against *H. pylori* infection.

The stomach mucosa is protected against pathogenic microbes by the low gastric pH, the secretion of antimicrobial peptides and mucins by epithelial cells⁶³, as well as by the presence of an associated microbiota⁶⁴. Disbiosis of gastric microbiota and inefficient production of antimicrobial peptides such as β -defensins have been implicated in an increased susceptibility to *H. pylori* infection^{63,64}. Taking into consideration that the probiotic strain *L. fermentum* UCO-979C was originally isolated from the healthy human gastric mucosa, it would be of value to investigate its influence on the gastric microbiota, the production of antimicrobial peptides as well as the interaction among them, to further characterize the mechanisms involved in its beneficial effects.

In conclusion, this work demonstrates for the first time the *in vivo* ability of the probiotic strain *L. fermentum* UCO-979C to improve the resistance against *H. pylori* infection by modulating the gastric innate immune response. In addition, our results demonstrate that the EPS expressed by *L. fermentum* UCO-979C is partially responsible for its immunomodulatory effect, impacting its anti-inflammatory activity.

Author Contributions: A.G.-C., H.K. and J.V. designed the study. V.G.-C., G.M. and P.C. performed the *in vivo* studies. V.G.-C., L.A., and M.T. performed the *in vitro* studies. V.G.-C. and L.A. did the statistical analysis. A.G.-C., H.T., H.K. and J.V. analyzed the data. V.G.-C., G.M. and J.V. wrote the manuscript. All authors read and approved the manuscript.

Funding: This study was supported by ANPCyT–FONCyT Grant PICT-2016-0410 to Julio Villena. This study was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research (A) (19H00965) from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS), and by Japan Racing Association to Haruki Kitazawa. This research was supported by grants from the project of NARO Bio-oriented Technology Research Advancement Institution (Research Program on development of innovation technology, No. 01002A) to Haruki Kitazawa. This work was also supported by JSPS Core-to-Core Program, A. Advanced Research Networks entitled Establishment of international agricultural immunology research-core for a quantum improvement in food safety. This study was also supported by grants for Scientific Research on Innovative Areas from the Ministry of Education, Culture, Science, Sports, and Technology (MEXT) of Japan (16H06429, 16K21723, and 16H06435) to Hideki Takahashi. This study was also supported by CONICYT National Doctorate Grant 21,150,603 to Valeria García.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

REFERENCES

1. Martin, M. E. & Solnick, J. V. The gastric microbial community, *Helicobacter pylori* colonization, and disease. *Gut Microbes* 5, 345–350 (2014).
2. Martin, M. E. et al. The Impact of *Helicobacter pylori* Infection on the Gastric Microbiota of the Rhesus Macaque. *PLoS One* 8, (2013).
3. Hunt, R. H. et al. The stomach in health and disease. *Gut* 64, 1650–1668 (2015).
4. Minalyan, A., Gabrielyan, L., Scott, D., Jacobs, J. & Pisegna, J. R. The Gastric and Intestinal Microbiome: Role of Proton Pump Inhibitors. *Curr. Gastroenterol. Rep.* 19, 42 (2017).
5. Ayala, G., Escobedo-Hinojosa, W. I., de la Cruz-Herrera, C. F. & Romero, I. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol.* 20, 1450–69 (2014).
6. Isolauri, E., Kirjavainen, P. V & Salminen, S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *J. Rheumatol.* 54–59 (2002). doi:10.1136/gut.50.suppl
7. Macfarlane, G. T. & Cummings, J. H. Probiotics, infection and immunity. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 15, 501–506 (2002).
8. Zelaya, H., Alvarez, S., Kitazawa, H. & Villena, J. Respiratory antiviral immunity and immunobiotics: Beneficial effects on inflammation-coagulation interaction during influenza virus infection. *Front. Immunol.* 7, (2016).
9. Hemarajata, P. & Versalovic, J. Effects of probiotics on gut microbiota: Mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. *Therap. Adv. Gastroenterol.* 6, 39–51 (2013).
10. Villena, J., Vizoso-Pinto, M. G. & Kitazawa, H. Intestinal Innate Antiviral Immunity and Immunobiotics: Beneficial Effects against Rotavirus Infection. *Front. Immunol.* 7, 1–10 (2016).
11. Azad, M. A. K., Sarker, M., Li, T. & Yin, J. Probiotic Species in the Modulation of Gut Microbiota: An Overview. *Biomed Res. Int.* 2018, 1–8 (2018).
12. Rolig, A. S., Cech, C., Ahler, E., Carter, J. E. & Ottemann, K. M. The degree of *Helicobacter pylori*-triggered inflammation is manipulated by preinfection host microbiota. *Infect. Immun.* 81, 1382–1389 (2013).
13. Delgado, S., Leite, A. M. O., Ruas-Madiedo, P. & Mayo, B. Probiotic and technological properties of *Lactobacillus* spp. Strains from the human stomach in the search for potential candidates against gastric microbial dysbiosis. *Front. Microbiol.* 5, (2014).

14. Goderska, K., Agudo Pena, S. & Alarcon, T. *Helicobacter pylori* treatment: antibiotics or probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 1–7 (2018).
15. Salas-Jara, M. J. et al. Probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C biofilm formation on AGS and Caco-2 cells and *Helicobacter pylori* inhibition. *Biofouling* 32, 1245–1257 (2016).
16. García, A. et al. Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *Electron. J. Biotechnol.* 25, 75-83. (2017).
17. Garcia-Castillo, V. et al. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Benef. Microbes* 9, 829-841. (2018).
18. Garcia-Castillo, V. et al. Evaluation of the Immunomodulatory Activities of the Probiotic Strain *Lactobacillus fermentum* UCO-979C. *Front. Immunol.* 10, 1–14 (2019).
19. Lee, A. et al. A standardized mouse model of *Helicobacter pylori* infection: Introducing the Sydney strain. *Gastroenterology* 112, 1386–1397 (1997).
20. Ferrer, J., Pinuer, L., García, A. & Bórquez, R. Effect of pH and dilution rate on specific production rate of extra cellular metabolites by *Lactobacillus salivarius* UCO_979C in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 6417–6429 (2015).
21. Sgouras, D. et al. *In Vitro* and *In Vivo* Inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* Strain Shirota. *Society* 70, 518–526 (2004).
22. Herbert, R. A. Methods for Enumerating Microorganisms and Determining Biomass in Natural Environments. 22, 1–39 (1990).
23. Coconnier, M. H., Lievin, V., Hemery, E. & Servin, A. L. Antagonistic activity against *Helicobacter* infection *in vitro* and *in vivo* by the human *Lactobacillus acidophilus* strain LB. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4573–80 (1998).
24. Hazell, S. L., Borody, T. J., Gal, A. & Lee, A. *Campylobacter pyloridis* Gastritis I: Detection of Urease as a Marker of Bacterial Colonization and Gastritis. *Am. J. Gastroenterol.* 82, 292–296 (1987).
25. Zhang, L., Su, P., Henriksson, A., O'Rourke, J. & Mitchell, H. Investigation of the immunomodulatory effects of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* on *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 13, 183–190 (2008).
26. Ghosh, N., Ghosh, P., Kesh, K., Mukhopadhyay, A. K. & Swarnakar, S. Attenuation of *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation by prior cag - Strain (AM1) infection in C57BL/6 mice. *Gut Pathog.* 9, (2017).

27. Li, B. et al. Immunodominant epitope-specific Th1 but not Th17 responses mediate protection against *Helicobacter pylori* infection following UreB vaccination of BALB/c mice. *Sci. Rep.* 5, (2015).
28. Kienesberger, S. et al. Gastric *Helicobacter pylori* Infection Affects Local and Distant Microbial Populations and Host Responses. *Cell Rep.* 14, 1395–1407 (2016).
29. Kao, J. Y. et al. *Helicobacter pylori*-secreted factors inhibit dendritic cell IL-12 secretion: a mechanism of ineffective host defense. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291, G73-81 (2006).
30. Walduck, A., Andersen, L. P. & Raghavan, S. Inflammation, Immunity, and Vaccines for *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 20, 17–25 (2015).
31. Niwa, T. et al. Inflammatory processes triggered by *Helicobacter pylori* infection cause aberrant DNA methylation in gastric epithelial cells. *Cancer Res.* 70, 1430–1440 (2010).
32. Pero, R. et al. Beta-defensins and analogs in *Helicobacter pylori* infections: mRNA expression levels, DNA methylation, and antibacterial activity. *PLoS One* 14, (2019).
33. Fox, J. G. & Wang, T. C. Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J. Clin. Invest.* 117, 60–9 (2007).
34. Chakravarty, K. & Gaur, S. Role of Probiotics in Prophylaxis of *Helicobacter pylori* Infection. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 20, 137–145 (2019).
35. Kabir, A. M. et al. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut* 41, 49–55 (1997).
36. Johnson-Henry, K. C. et al. Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in *H. pylori*-infected mice. *Dig. Dis. Sci.* 49, 1095–1102 (2004).
37. Zhou, C., Ma, F. Z., Deng, X. J., Yuan, H. & Ma, H. S. Lactobacilli inhibit interleukin-8 production induced by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-activated Toll-like receptor 4. *World J. Gastroenterol.* 14, 5090–5095 (2008).
38. Garcia-Castillo, V. et al. Characterization of the immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* properties of the human gastric isolate *Lactobacillus rhamnosus* UCO-25A. *Biofouling* 35, 922–937 (2019).
39. Yang, Y.-J., Chuang, C.-C., Yang, H.-B., Lu, C.-C. & Sheu, B.-S. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates *H. pylori*-induced gastric inflammation by inactivating the Smad7 and NFκB pathways. *BMC Microbiol.* 12, 38 (2012).
40. Lee, J. S., Paek, N. S., Kwon, O. S. & Hahm, K. B. Anti-inflammatory actions of probiotics through activating suppressor of cytokine signaling (SOCS)

expression and signaling in *Helicobacter pylori* infection: A novel mechanism. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25, 194–202 (2010).

41. Garcia C, A. et al. Probiotic properties of *Lactobacillus* spp isolated from gastric biopsies of *Helicobacter pylori* infected and non-infected individuals. *Rev. Med. Chil.* 137, 369–376 (2009).

42. Merino, J. S. et al. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strongly inhibited *Helicobacter pylori* SS1 in *Meriones unguiculatus*. *Benef. Microbes* 9, 625–627 (2018).

43. Bockerstett, K. A. & DiPaolo, R. J. Regulation of Gastric Carcinogenesis by Inflammatory Cytokines. *CMGH* 4, 47–53 (2017).

44. Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., Konig, W. & Backert, S. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 102, 9300–9305 (2005).

45. Yamada, S. et al. Predominant mucosal IL-8 mRNA expression in non-cagA Thais is risk for gastric cancer. *World J. Gastroenterol.* 19, 2941–2949 (2013).

46. Ansari, S. A., Devi, S., Tenguria, S., Kumar, A. & Ahmed, N. *Helicobacter pylori* protein HP0986 (TieA) interacts with mouse TNFR1 and triggers proinflammatory and proapoptotic signaling pathways in cultured macrophage cells (RAW 264.7). *Cytokine* 68, 110–117 (2014).

47. Wang, F. et al. Overexpression of Tim-3 reduces *Helicobacter pylori*-associated inflammation through TLR4/NF κ B signaling *in vitro*. *Mol Med Rep.* 15, 3252–3258 (2017).

48. Bauditz, J. et al. Production of IL-12 in gastritis relates to infection with *Helicobacter pylori*. *Clin. Exp. Immunol.* 117, 316–323 (1999).

49. Zhang, Y. et al. The leukocyte-associated immunoglobulin (Ig)-like receptor-1 modulating cell apoptosis and inflammatory cytokines secretion in THP-1 cells after *Helicobacter pylori* infection. *Microb. Pathog.* 109, 292–299 (2017).

50. Viladomiu, M. et al. Cooperation of Gastric Mononuclear Phagocytes with *Helicobacter pylori* during Colonization. *J. Immunol.* 198, 3195–3204 (2017).

51. Serrano, C. et al. Relationship between *Helicobacter pylori* virulence factors and regulatory cytokines as predictors of clinical outcome. *Microbes Infect.* 9, 428–434 (2007).

52. Straubinger, R. K. et al. Quantitative evaluation of inflammatory and immune responses in the early stages of chronic *Helicobacter pylori* infection. *Infect. Immun.* 71, 2693–2703 (2003).

53. Peek, R. M., Fiske, C. & Wilson, K. T. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori*-induced gastric malignancy. *Physiol. Rev.* 90, 831–858 (2010).
54. Tanaka, H. et al. The CagA protein of *Helicobacter pylori* suppresses the functions of dendritic cell in mice. *Arch. Biochem. Biophys.* 498, 35–42 (2010).
55. Eskandari-Nasab, E. et al. Circulating levels of interleukin (IL)-12 and IL-13 in *Helicobacter pylori*-infected patients, and their associations with bacterial CagA and VacA virulence factors. *Scand. J. Infect. Dis.* 45, (2013).
56. Indira, M., Venkateswarulu, T. C., Abraham Peele, K., Nazneen Bobby, M. & Krupanidhi, S. Bioactive molecules of probiotic bacteria and their mechanism of action: a review. *3 Biotech* 9, (2019).
57. Peña, J. A. & Versalovic, J. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- α production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cellular Microbiology* 5, 277–285 (2003).
58. Sunanliganon, C., Thong-Ngam, D., Tumwasorn, S. & Klaikeaw, N. *Lactobacillus plantarum* B7 inhibits *Helicobacter pylori* growth and attenuates gastric inflammation. *World J. Gastroenterol.* 18, 2472–2480 (2012).
59. Castro-Bravo, N., Wells, J. M., Margolles, A. & Ruas-Madiedo, P. Interactions of surface exopolysaccharides from Bifidobacterium and lactobacillus within the intestinal environment. *Front. Microbiol.* 9, (2018).
60. Hidalgo-Cantabrana, C. et al. Immune Modulation Capability of Exopolysaccharides Synthesised by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Probiotics Antimicrob. Proteins* 4, 227-237. (2012).
61. Panpetch, W., Spinler, J. K., Versalovic, J. & Tumwasorn, S. Characterization of *Lactobacillus salivarius* strains B37 and B60 capable of inhibiting IL-8 production in *Helicobacter pylori*-stimulated gastric epithelial cells. *BMC Microbiol.* 16, (2016).
62. Thiraworawong, T. et al. Anti-inflammatory Properties of Gastric-derived *Lactobacillus plantarum* XB7 in the Context of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 19, 144–155 (2014).
63. Pero, R. et al. β -defensins in the fight against *Helicobacter pylori*. *Molecules* 22, pii: E424. (2017).
64. Pero, R. et al. A novel view of human *Helicobacter pylori* infections: Interplay between microbiota and beta-defensins. *Biomolecules* 9, pii: E237 (2019).



CAPÍTULO VI

EVALUATION OF THE IMMUNOMODULATORY ACTIVITIES OF THE PROBIOTIC STRAIN *Lactobacillus fermentum* UCO-979C.

Garcia-Castillo, V., Ryoya K., Clua, P., Indo, Y., Takagi, M.,
Salva, S., Islam, M.A., Alvarez, S., Takahashi, H., Garcia-Cancino,
A., Kitazawa, H., and Villena, J.

Manuscrito publicado: *Front Immunol* (2019) 10:1376.
doi:10.3389/fimmu.2019.01376

ABSTRACT

Lactobacillus fermentum UCO-979C, a strain isolated from a human stomach, was previously characterized by its potential probiotic properties. The UCO-979C strain displayed the ability to beneficially regulate the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection in human gastric epithelial cells. In this work, we conducted further *in vitro* studies in intestinal epithelial cells and *in vivo* experiments in mice in order to characterize the potential immunomodulatory effects of *L. fermentum* UCO-979C on the intestinal mucosa. Results demonstrated that the UCO-979C strain is capable to differentially modulate the immune response of intestinal epithelial cells triggered by Toll-like receptor 4 (TLR4) activation, through the modulation of TLR negative regulators expression. In addition, we demonstrated for the first time that *L. fermentum* UCO-979C is able to exert its immunomodulatory effect in the intestinal mucosa *in vivo*. The oral administration of *L. fermentum* UCO-979C to mice significantly increased the production of intestinal IFN- γ , and IL-10, stimulates intestinal and peritoneal macrophages and improved Peyer's patches CD4⁺ T cells. In addition, *L. fermentum* UCO-979C augmented intestinal IL-6, reduces immature B220⁺CD24^{high} B cells from Peyer's patches, enhanced mature B B220⁺CD24^{low} cells, and significantly increased intestinal IgA. The results of this work revealed that *L. fermentum* UCO-979C has several characteristics making it an excellent candidate for the development of immunobiotic functional foods aimed to differentially regulate immune responses against gastric and intestinal pathogens.

Keywords: *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, intestinal immunity, macrophages, PIE cells

INTRODUCTION

It is widely recognized that commensal microorganisms are relevant for human and animals health, participating in nutrients digestion, vitamins synthesis, pathogens inhibition^{1,2}. The importance of beneficial microorganisms of the microbiota in the maintenance of immune health also has been demonstrated in a convincing way^{3,4}. Many effective tools have already been developed in order to study and manipulate the microbiota and improve their beneficial properties for the host, and protect against immune-related diseases^{5,6}. In this regard, the development of immunomodulatory probiotic (immunobiotic) interventions offers opportunities for the modulation of the mucosal immune system towards long lasting health⁷.

The beneficial role of immunobiotic lactic acid bacteria (LAB) has been extensively reported, supporting their implementation to improve some immunological functions in the host⁸⁻¹⁰. The potential effect of probiotics on the immune system occurs through direct and indirect interactions of bacteria with immune and non-immune cells¹¹⁻¹⁴, leading to cells' activation and proliferation, cytokines production, IgA secretion, antimicrobial peptides synthesis, and tight junctions improvement^{2,11-14}. Several research works including recent transcriptomic analysis revealed that the immunomodulatory effect of immunobiotics is strain-specific characteristic^{2,12,15}, and therefore, each individual strain has to be studied in detail in order to explore its immunomodulatory potential.

Immunobiotics has been proposed as an alternative to prevent bacterial and viral infections in gastrointestinal tract¹⁰. Experimental models have demonstrated that immunobiotics can attenuate the severity of infections caused by several gastrointestinal pathogens including *Helicobacter pylori*, *Citrobacter rodentium*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium*¹⁶. In this regard, it was reported that some *Lactobacillus* strains are able to increase the resistance against the gastric pathogen *H. pylori* and among the mechanisms proposed to explain this beneficial effects of probiotic lactobacilli are the production of antimicrobial compounds, the inhibition of pathogen's adhesion and the

modulation of the immune system ¹⁷⁻¹⁹. We previously isolated *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strain from a human stomach sample and characterized its potential probiotic properties ^{20,21}. We observed that this strain is able to efficiently adhere to gastric mucosa as demonstrated by in vitro experiments in human gastric adenocarcinoma cell-line (AGS cells) and in vivo studies in Mongolian gerbils ²¹. The *L. fermentum* UCO-979C also showed the potential to strongly inhibit the adhesion, growth and urease activity of *H. pylori* ^{21,22}. Moreover, we recently reported that *L. fermentum* UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *H. pylori* infection in human gastric epithelial cells and macrophages ²³. Our data showed a reduced level of IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-6, and MCP-1 expressions in *L. fermentum* UCO-979C-treated AGS cells when compared to untreated infected controls. In addition, improved production of TGF- β in response to *H. pylori* infection was detected in *L. fermentum* UCO-979C-treated AGS cells ²³. Interestingly, *L. fermentum* UCO-979C was also capable of reducing the production of TNF- α and improving IFN- γ and IL-10 levels in macrophages challenged with *H. pylori* ²³.

Taking into consideration the effect of *L. fermentum* UCO-979C on the gastric immune response against *H. pylori* infection, we wonder whether this probiotic Lactobacillus strain is also able to modulate immune responses in the intestinal tract. Therefore, we conducted here, *in vitro* studies in intestinal epithelial cells and *in vivo* experiments in mice in order to characterize the immunomodulatory effects of *L. fermentum* UCO-979C on the intestinal mucosa.

MATERIALS AND METHODS

Microorganisms

Lactobacillus fermentum UCO-979C was obtained from the Bacterial Pathogenicity Laboratory culture collection at University of Concepción (Concepcion, Chile) ^{20,21}. *L. fermentum* CRL973 was obtained from the CERELA culture collection (Tucuman, Argentina). Lactobacilli strains were activated from frozen stock and cultured in Mann-Rogosa Sharpe Agar (MRS Difco) at 37°C for 24 hours. After 24 hours of

incubation, a single colony was transferred to MRS broth (MRS Difco) and cultured under same conditions twice. Then, bacterial cells were washed three times with phosphate buffered saline (PBS) and adjusted to appropriate concentrations for the experiments.

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) strain 987P (O9: H-: 987 pilus+: heat stable toxin+) was obtained from the National Institute of Animal Health (Tsukuba, Japan) 24–26. ETEC cells were grown in blood agar (5% sheep blood) for 24 hours at 37°C and transferred to tryptic soy broth (TSB; Becton, Dickinson and Company, USA) and cultured 20 hours at 37°C with shaking. After incubation, the subcultures of bacteria were centrifuged at $5000 \times g$ for 10 min at 4°C and washed with PBS (pH 7.2). Finally, ETEC cells were heat killed at 100°C for 15 minutes and then washed with PBS. Heat-stable ETEC pathogen associated molecular patterns (PAMPs) were suspended in DMEM for the experimental challenge.

Sacharomyces boulardi was obtained from commercial lyophilized preparation (Floratil- Argentina). The yeast suspensions were prepared in PBS and heat inactivated during 15 minutes in 100°C water bath and adjusted to 10^7 cells/ml for *ex vivo* phagocytosis assay.

Porcine intestinal epitheliocytes

Porcine intestinal epitheliocytes (PIE cells) are non-transformed intestinal cultured cells derived from intestinal epithelia isolated from an unsuckled neonatal swine. When PIE cells are cultured, they assumed a monolayer, cobblestone and epithelial-like morphology, with close contact between cells²⁴. PIE cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% fetal calf serum FCS (Hyclone, Logan, USA), 100 mg/ml penicillin, and 100 U/ml streptomycin at 37 °C in an atmosphere of 5% CO₂. PIE cells grow rapidly and are well adapted to culture conditions even without transformation or immortalization. However, the proliferative ability of PIE cells diminishes after 50 passages in culture. Therefore, we used PIE cells only between the 20th and 40th passages in these experiments^{25,26}. Briefly, PIE cells were cultured in 250 ml flasks (1.0×10^6 cells)

for five days after reaching 80-90% confluence, changing culture media every 1-2 days, followed by subculturing in 24 well flasks for immunostimulation assays as described below.

Immunomodulatory assay in PIE cells

Lactobacilli were re-suspended in DMEM (10% FCS), enumerated in a microscope using a Petroff-Hausser counting chamber, and stored at -80°C until use. PIE cells were plated at 3×10^4 cells/well of a 12-well type I collagen-coated plates (Iwaki, Tokyo, Japan), and cultured for three days. After changing medium, lactobacilli (5×10^8 cells/ml) were added followed by stirring in microplate mixer and co-cultured for 48 hours at 37°C 5% CO_2 atmosphere. Then, each well was washed vigorously with medium at least 3 times to eliminate all the stimulants. Expression of cytokines, chemokines, complement and coagulation factors as well as negative regulators of TLR signaling were studied without any inflammatory challenge (basal levels) or after heat-stable ETEC PAMPs challenge (5×10^7 cells/ml) for 12 hours²⁵ by using RT-PCR as described below.

Quantitative expression analysis by RT-PCR

Two-step real-time qPCR was performed to characterize the expression of selected genes in PIE cells. Total RNA was isolated from each PIE cell sample using TRIzol reagent (Invitrogen). RNA purity and concentration were assessed using NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer. All cDNAs were synthesised using the PrimeScript RT Reagent kit with the treatment of gDNA eraser (Takara- Bio, Japan) according to the manufacturer's recommendations. Real-time quantitative PCR (qRT-PCR) was carried out using a 7300 real-time PCR system (Applied Biosystems, Warrington, UK) and the Platinum SYBR green qPCR SuperMix uracil-DNA glycosylase (UDG) with 6-carboxyl-X-rhodamine (ROX) (Invitrogen). The primers used in this study were described previously²⁵⁻²⁷. The PCR cycling conditions were 2 minutes at 50°C , followed by 5 minutes at 95°C , and then 40 cycles of 15 seconds at 95°C , 30 seconds at 60°C , and 30 seconds at 72°C , followed by a dissociation stage of 15 seconds at 95°C , 1 minute at 60°C , 15 seconds at 95°C and 15 seconds at 60°C . The reaction mixtures contained 2.5 μl of cDNA and 7.5 μl of master mix, which included the sense and antisense primers.

According to the guidelines for minimum information for publication of qRT-PCR experiments, β -actin was used as a housekeeping gene, to normalize cDNA levels for differences in total cDNA levels in the samples, because of its high stability across porcine various tissues²⁸. The relative index of a cytokine mRNA in PIE cells stimulated with lactobacilli was calculated as follows: first, the average cytokine expression levels from at least three samples challenged with ETEC without prestimulation with lactobacilli were set to 100. Then, relative expressions of cytokines were calculated in the samples prestimulated with lactobacilli followed by ETEC challenge²⁵.

Animals and feeding procedures

Female 6-8 week-old Balb/c mice were obtained from the closed colony kept at CERELA (Tucuman, Argentina). They were housed in plastic cages with controlled room temperature (22 ± 2 °C temperature, 55 ± 2 % humidity) and were fed ad libitum conventional balanced diet. Animal welfare was ensured by researchers and special trained staff in animal care and handling at CERELA. Animal health and behaviour were monitored twice a day. This study was carried out in strict accordance with the recommendations in the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of the Guidelines for Animal Experimentation of CERELA. The CERELA Institutional Animal Care and Use Committee prospectively approved this research under the protocol BIOT-CRL-17.

Mice were housed individually during the experiments and the assays for each parameter studied were performed in 5–6 mice per group. *L. fermentum* UCO-979C or CRL973 were administered to different groups of mice for 2 consecutive days at a dose of 10^8 cells/mouse/day in the drinking water. Bacteria were prepared as described above, suspended in 5 ml of 10% skimmed milk and added to the drinking water.

***Ex vivo* phagocytosis assay**

Peritoneal macrophages were collected aseptically from mice as described previously^{29,30}. Briefly, after exposing inner skin, cold PBS containing 10% fetal bovine serum was carefully injected into peritoneal cavity. The fluid was collected and

macrophages were washed twice with PBS containing bovine serum albumin (BSA) and adjusted to a concentration of 1×10^6 cells/ml. Phagocytosis was performed using a heat-killed *S. bouhardi*. Mixtures of opsonized yeasts in mouse autologous serum (10%) were added to 0.2 ml of macrophage suspension. The mixture was incubated for 30 minutes at 37°C. The percentage of phagocytosis was expressed as the percentage of phagocytosing macrophages in 200 cells counted using an optical microscope^{30,31}.

Nitro blue tetrazolium test (NBT)

The bactericidal activity (oxidative burst) of peritoneal macrophages was measured using the NBT reduction test (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) as previously described³⁰. Briefly, 200 μ l of peritoneal macrophages obtained as described above were incubated with 120 μ l of NBT reagent and incubated first at 37 °C for 10 minutes and then 10 minutes at room temperature. NBT was added to each sample and incubated at 37°C for 20 min. In the presence of oxidative metabolites, NBT (yellow) is reduced to formazan, which forms a blue precipitate. Smears were prepared and, after staining, the samples were examined under a light microscope for blue precipitates. Randomly, one hundred cells were counted and the percentage of NBT positive (+) cells were determined^{30,31}.

Cytokine concentrations

Blood samples were obtained through cardiac puncture at the end of each treatment and collected in heparinized tubes. Intestinal fluid samples were obtained as the method described previously³¹. Briefly, the small intestine was flushed with 5 ml of PBS and the fluid was centrifuged ($10,000 \times g$, 4°C for 10 min) to separate particulate material. The supernatant was kept frozen until use. Tumor necrosis factor α (TNF- α), interferon γ (IFN- γ), and interleukin 10 (IL-10) concentrations in serum and intestinal fluid, were measured with commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits following the manufacturer's recommendations (R&D Systems, MN, USA).

Flow cytometry

Peritoneal macrophages were collected as described above. Peyer's patches were collected and mechanically disaggregated. A single-cell suspension from the Peyer's patches of each mouse was obtained by gently passing the collected tissue through a tissue strainer with PBS with 2% FCS (FACS buffer). Cell suspensions were subjected to red blood cells lysis (Tris-ammonium chloride, BD PharMingen) followed by counting on a hemacytometer. Viability of cells was assessed by trypan blue exclusion. Cell suspensions were pre-incubated with anti-mouse CD32/CD16 monoclonal antibody (Fc block) for 30 minutes at 4°C. Cells were incubated with the antibody mixes for 30 minutes at 4°C and washed with FACS buffer. The following antibodies from BD Biosciences were used: FITC-labeled anti-mouse MHC-II, FITC-labeled anti-mouse CD86, PE-labeled anti-mouse CD11b, PE-labeled anti-mouse F4/80, PE-labeled anti-mouse Ly6C, PE-labeled anti-mouse CD24, biotinylated anti-mouse B220, FITC-labeled anti-mouse CD3, PE-labeled anti-mouse CD8, and biotinylated anti-mouse CD4 antibodies. Streptavidin-PerCP was used as a second-step reagent. Flow cytometry was performed using a BD FACSCalibur™ flow cytometer (BD Biosciences) and data were analysed using FlowJo software (TreeStar). The number of cells in each population was determined by multiplying the percentages of subsets within a series of marker negative or positive gates by the total cell number determined for each tissue.

Statistical analysis

Experiments were performed in triplicate and results expressed as the mean \pm SD. For the comparison of two groups, the Student's t-test was used. For the comparison of more than two groups, a one-way analysis of variance (ANOVA) was performed followed by and Tukey's test. In all cases, a level of significance of $p < 0.05$ was considered.

RESULTS

***L. fermentum* UCO-979C modifies cytokine profile in PIE cells**

We first evaluated whether *L. fermentum* UCO-979C was able to modify the cytokine expression profile of PIE cells by evaluating the mRNA levels of IL-6, CXCL8

(IL-8), CXCL5 (AMCF-II), CXCL9, CXCL10 (IP-10), CXCL11 and CCL8 (MCP1) as shown in **Figure 1**. Then, in order to evaluate whether the immunomodulatory effects of *L. fermentum* UCO-979C were a strain specific property, we performed comparative experiments with the strain of the same species *L. fermentum* CRL973. Stimulation of PIE cells with the UCO-979C or CRL973 strains improved the expression of IL-6 and CXCL9, respectively, while no differences were found between controls and lactobacilli-treated PIE cells when the other chemokines were analyzed. The modulation of cytokines and chemokines was also studied in the context of inflammation. For this purpose, PIE cells were treated with lactobacilli and then challenged with heat-stable ETEC PAMPs that are able to trigger Toll-like receptor 4 (TLR4) activation in this cell line^{25,26}. Untreated PIE cells challenged with ETEC were used as controls. Heat-stable ETEC PAMPs significantly improved the expression of all the inflammatory cytokines and chemokines in all the experimental groups (**Figure 1**). However, the mRNA expression levels of IL-6 and CCL8 were significantly higher in lactobacilli-treated cells. In addition, expression of CXCL8, CXCL10 and CXCL11 were lower in lactobacilli-treated PIE cells than in controls, being the UCO-979C strain more efficient than CRL973 to achieve this effect. Interestingly, only *L. fermentum* CRL973 was able to reduce CXCL5 expression (**Figure 1**). Our previous immunotranscriptomics studies in PIE cells revealed that in addition to cytokines and chemokines, immunomodulatory probiotic strains are able also to modulate factors from the complement and coagulation systems²⁷. Therefore, we evaluated the expressions of C1S, C1R, C3, CFB and F3 in PIE cells under inflammatory and non-inflammatory conditions (**Figure 2**). No significant expression differences were observed for these factors when control and lactobacilli-treated PIE cells were compared. Challenge with heat-stable ETEC PAMPs increased C1S, C1R, C3, CFB and F3 expressions in all the experimental groups. *L. fermentum* UCO-979C-treated PIE cells had significantly lower levels of C1S and C3, and higher levels of C1R and CFB expression as compared to controls. While *L. fermentum* CRL973-treated PIE cells exhibited significantly lower levels of C1S, C1R, C3 and CFB than controls (**Figure 2**). No significant differences were observed in F3 expression when control and lactobacilli-treated PIE cells were compared.

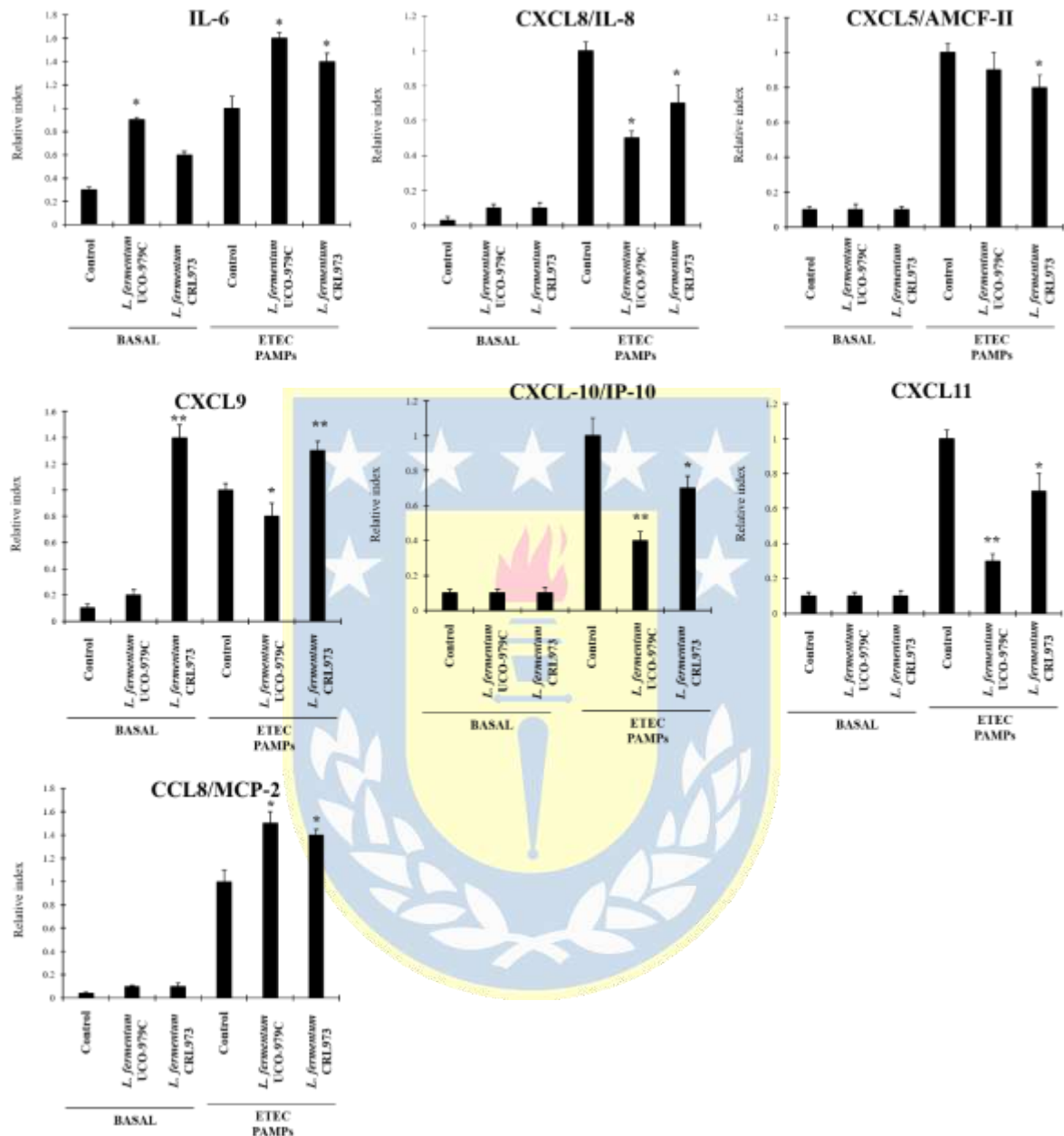


Figure 1. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C and *L. fermentum* CRL973 on the expression of cytokines and chemokines in porcine intestinal epithelial (PIE) cells. PIE cells were pre-treated with UCO-979C or CRL973 strains for 48 hours and then stimulated with heat-stable Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). The expression of cytokines (IL-6) and chemokines (CXCL5, CXCL8, CXCL9,

CXCL10, CXCL11 and CCL8) were studied at hour 48 after lactobacilli stimulation (basal) or at hour 12 after heat-stable ETEC PAMPs challenge. The results represent three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. Significantly different from control PIE cells at the same time point *(P<0.05), **(P<0.01).

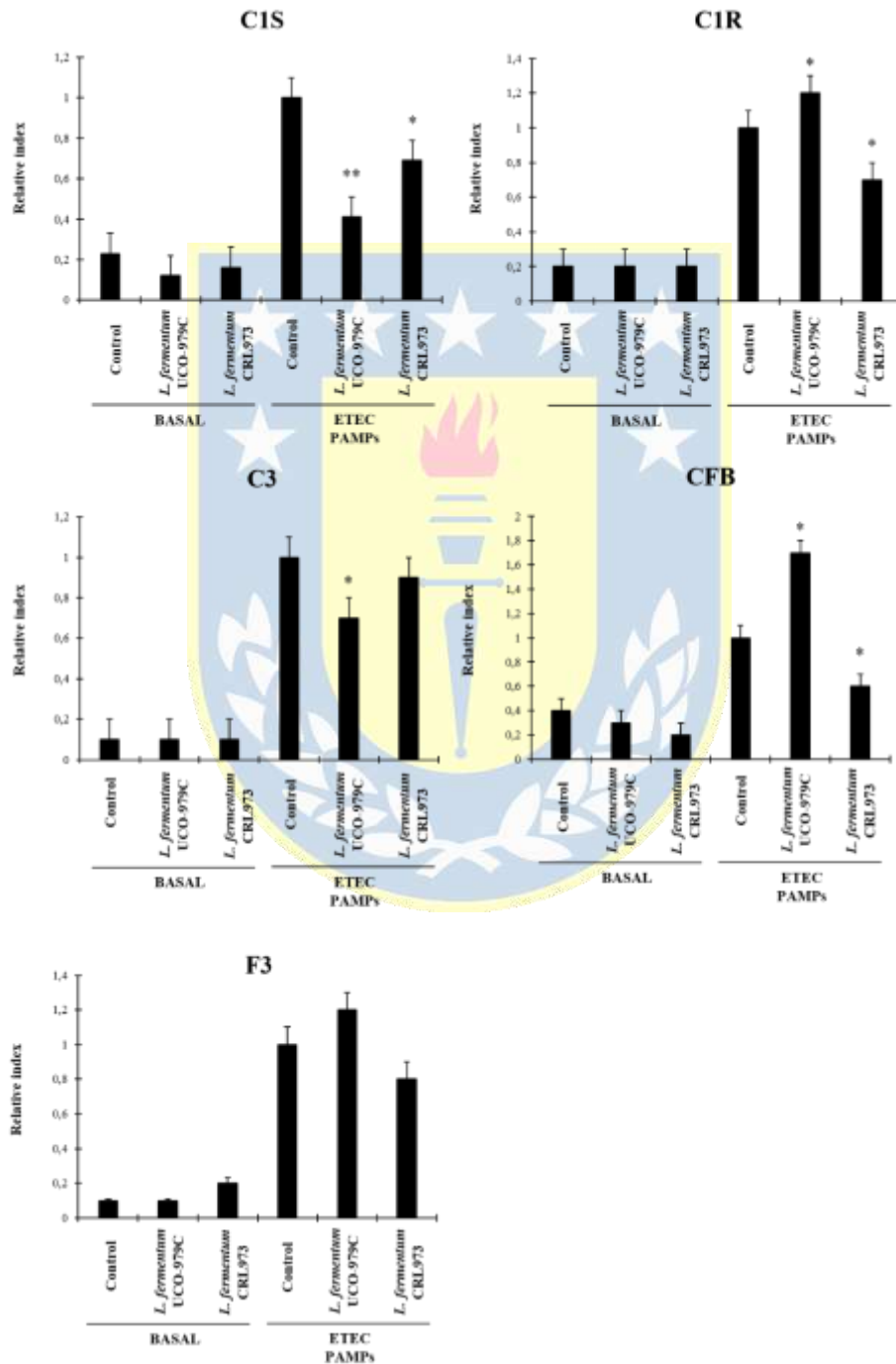


Figure 2. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C and *L. fermentum* CRL973 on the expression of factors from the complement and coagulation systems in porcine intestinal epithelial (PIE) cells. PIE cells were pre-treated with UCO-979C or CRL973 strains for 48 hours and then stimulated with heat-stable Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). The expression of factors from the complement (C1S, C1R, C3 and CFB) and coagulation (F3) systems were studied at hour 48 after lactobacilli stimulation (basal) or at hour 12 after heat-stable ETEC PAMPs challenge. The results represent three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. Significantly different from control PIE cells at the same time point *(P<0.05), **(P<0.01).

***L. fermentum* UCO-979C modifies negative regulators of TLR4 signaling in PIE cells**

We next evaluated whether *L. fermentum* UCO-979C was able to modify the expression of negative regulators of TLR4 signaling in PIE cells (**Figure 3**). No significant differences were observed in the expression of A20, Bcl3, and MKP-1 when untreated control, and lactobacilli-treated PIE cells were compared. Both, UCO-979C and CRL973 strains were able to reduce the expression of Tollip in PIE cells, while *L. fermentum* UCO-979C increased IRAK-M expression. Challenge with heat-stable ETEC PAMPs increased A20, Bcl3, MKP-1, IRAK-M and SIGIRR in all the experimental groups. *L. fermentum* UCO-979C-treated PIE cells had significantly lower levels of MKP-1 and Tollip, and higher levels of Bcl3 than controls, while *L. fermentum* CRL973 showed significantly lower levels of A20 and IRAK-M expressions than controls (**Figure 3**). Both lactobacilli improved the expression of SIGIRR; however, the CRL973 strain was more efficient to modulate this negative regulator.

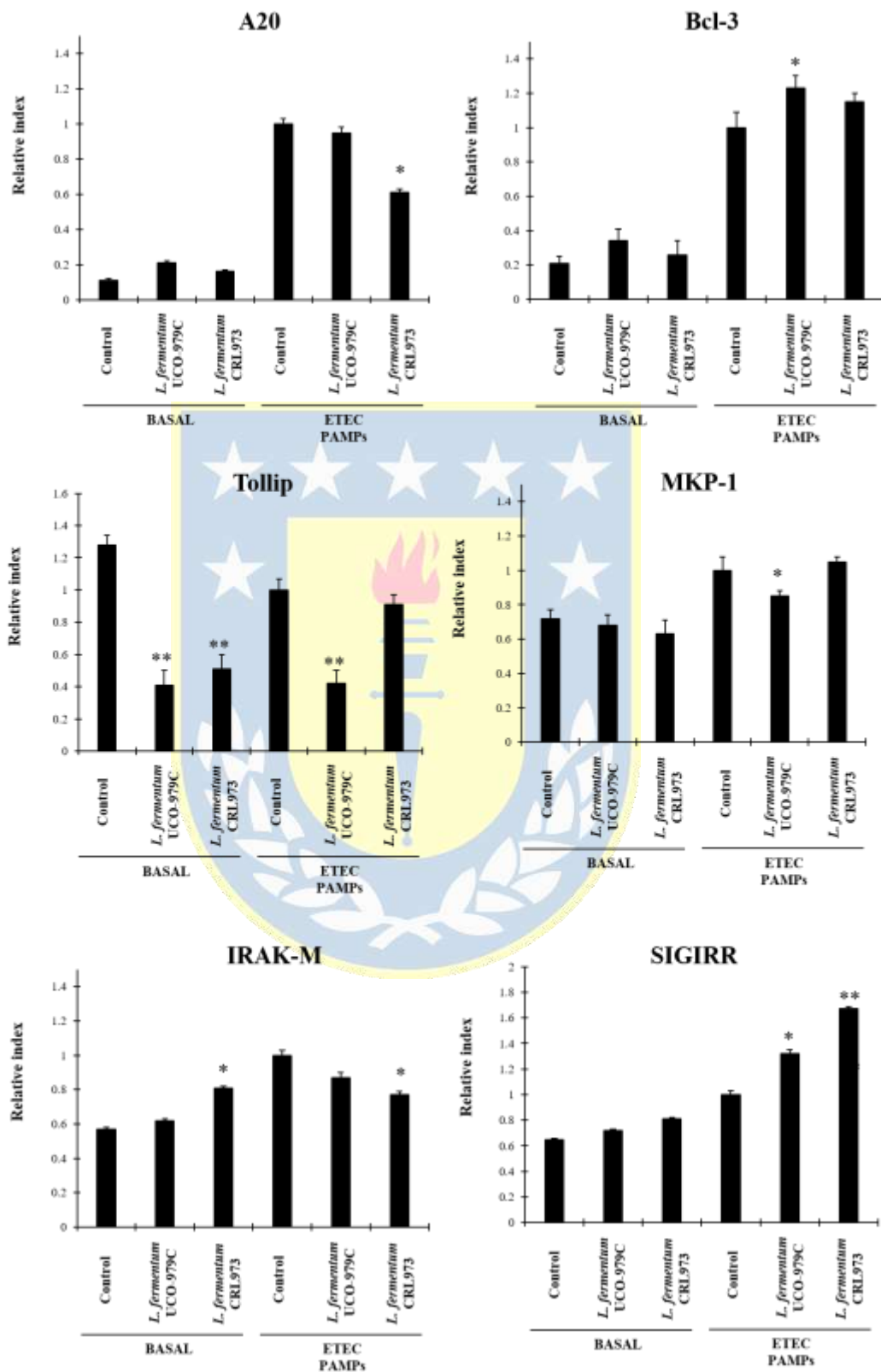


Figure 3. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C and *L. fermentum* CRL973 on the expression of negative regulators of the Toll-like receptor (TLR) signaling pathway in porcine intestinal epithelial (PIE) cells. PIE cells were pre-treated with UCO-979C or CRL973 strains for 48 hours and then stimulated with heat-stable Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). The expression of negative regulators of the TLR signaling pathway were studied at hour 48 after lactobacilli stimulation (basal) or at hour 12 after heat-stable ETEC PAMPs challenge. The results represent three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. Significantly different from control PIE cells at the same time point *(P<0.05), **(P<0.01).

***L. fermentum* UCO-979C modulates intestinal immunity in vivo**

Taking into consideration that the capacity of increasing IgA production in the gut, and stimulating macrophages and dendritic cells are amongst the beneficial effects of lactobacilli on the immune system^{30,32}, we next aimed to evaluate in vivo the ability of *L. fermentum* UCO-979C to modulate those parameters. As shown in **Figure 4**, administration of the UCO-979C strain significantly increased the phagocytic activity of peritoneal macrophages while this effect was absent in the case of CRL973 strain. In order to study the activation of respiratory burst in peritoneal macrophages, we used the NBT method as described previously³⁰. Both, UCO-979C and CRL973 treatments increased the percentage of NBT+ cells in the peritoneal cavity; we observed no significant differences between both lactobacilli-treated groups (**Figure 4**). In addition, mice orally treated with the UCO-979C strain had significantly higher levels of intestinal IgA antibodies than control animals while *L. fermentum* CRL973 did not induce significant changes (**Figure 4**). It has established that the *in vivo* immunomodulatory abilities of probiotic bacteria are in part attributable to altered production of cytokines that play pivotal roles in coordinating the immune function. Then, we analyzed the concentrations of cytokines in intestinal fluid and serum obtained from lactobacilli-treated mice, to determine the local and systemic effects induced by both *L. fermentum* strains (**Figure 5**). No significant differences were observed between lactobacilli-treated and control mice when intestinal and serum TNF- α concentrations were analyzed. Intestinal IFN- γ protein

level was augmented by both *L. fermentum* UCO-979C and CRL973 while no differences were observed for serum IFN- γ between the groups. In addition, *L. fermentum* UCO-979C significantly increased intestinal and serum IL-10 levels, an effect that was not observed for the case of CRL973 strain (**Figure 5**). We also evaluated the levels of these three cytokines: TNF- α , IFN- γ , and IL-10, in mice after the intraperitoneal challenge with LPS (**Figure 6**). The inflammatory stimulus modulated the concentration of intestinal and serum TNF- α , and IFN- γ in all experimental groups. However, TNF- α level was significantly lower in *L. fermentum* UCO-979C-treated mice when compared with those receiving the CRL973 strain or controls. In addition, both lactobacilli improved the production of intestinal IFN- γ after the challenge with LPS while only UCO-979C strain increased the levels of this cytokine in serum (**Figure 6**). LPS challenge also increased IL-10 both in intestinal fluid and serum of mice; however, the levels of this immunoregulatory cytokine were significantly higher in *L. fermentum* UCO-979C-treated mice when compared with those receiving the CRL973 strain or controls (**Figure 6**).

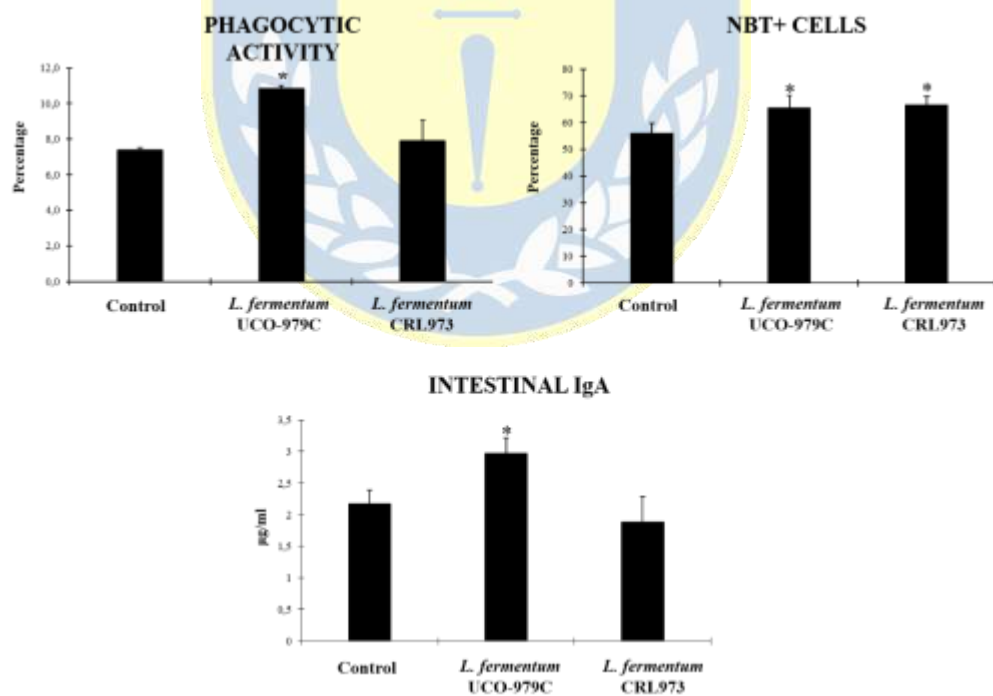


Figure 4. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C and *L. fermentum* CRL973 on peritoneal macrophages activities and intestinal IgA production in adult immunocompetent mice. *L. fermentum* UCO-979C or CRL973 were administered to different groups of mice for two consecutive days at a dose of 10⁸ cells/mouse/day. Untreated mice were used as controls. One day after the last lactobacilli administration, phagocytic and bactericidal (oxidative burst) activities of peritoneal macrophages, and intestinal IgA concentrations were determined. The results represent three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. Significantly different from control mice *(P<0.05).

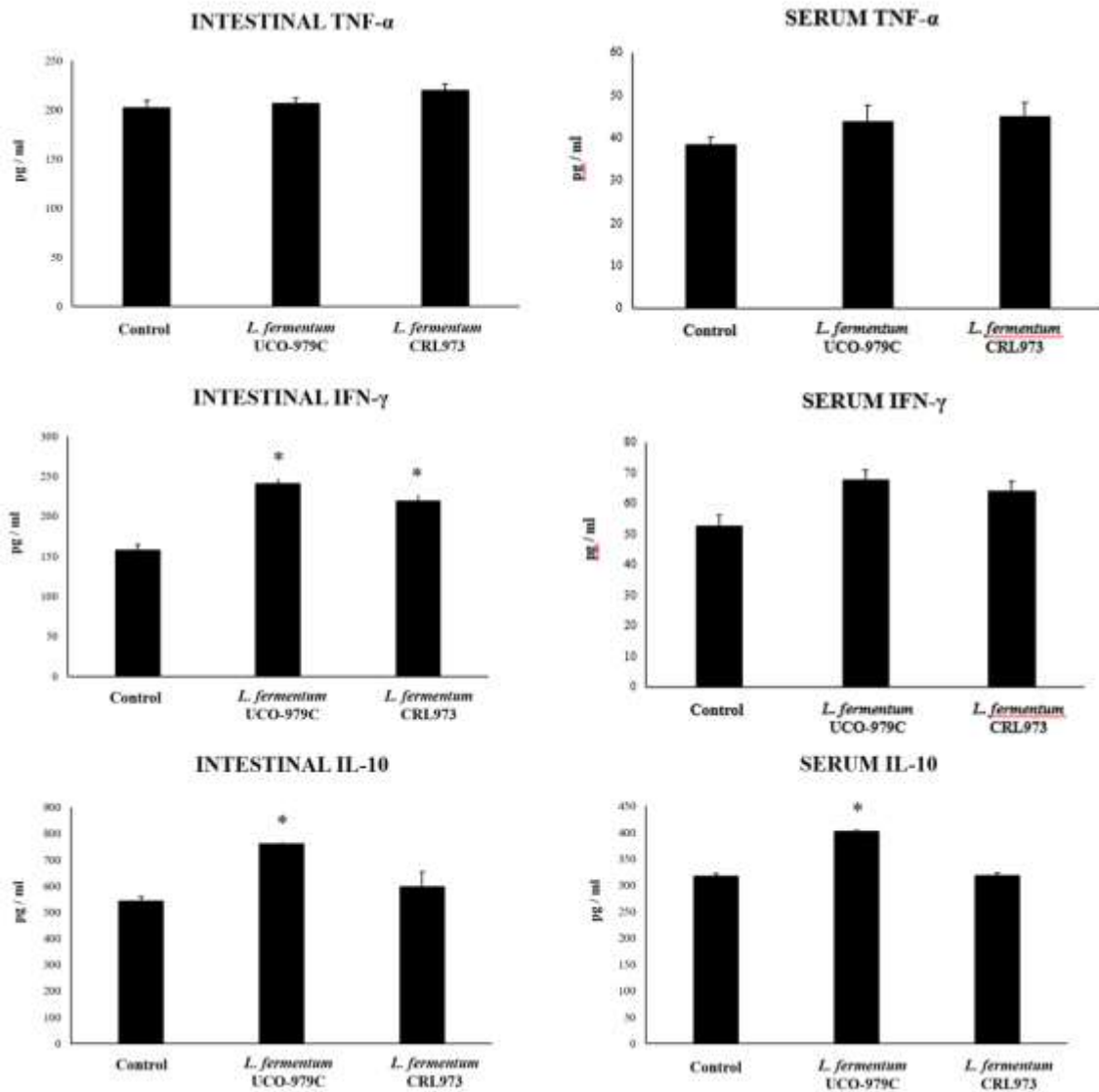


Figure 5. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C and *L. fermentum* CRL973 on intestinal and serum cytokines of adult immunocompetent mice. *L. fermentum* UCO-979C or CRL973 were administered to different groups of mice for two consecutive days at a dose of 10^8 cells/mouse/day. Untreated mice were used as controls. One day after the last lactobacilli administration, the concentrations of TNF- α , IFN- γ , and IL-10 in intestinal fluid and serum were determined. The results represent three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. Significantly different from control mice *(P<0.05).

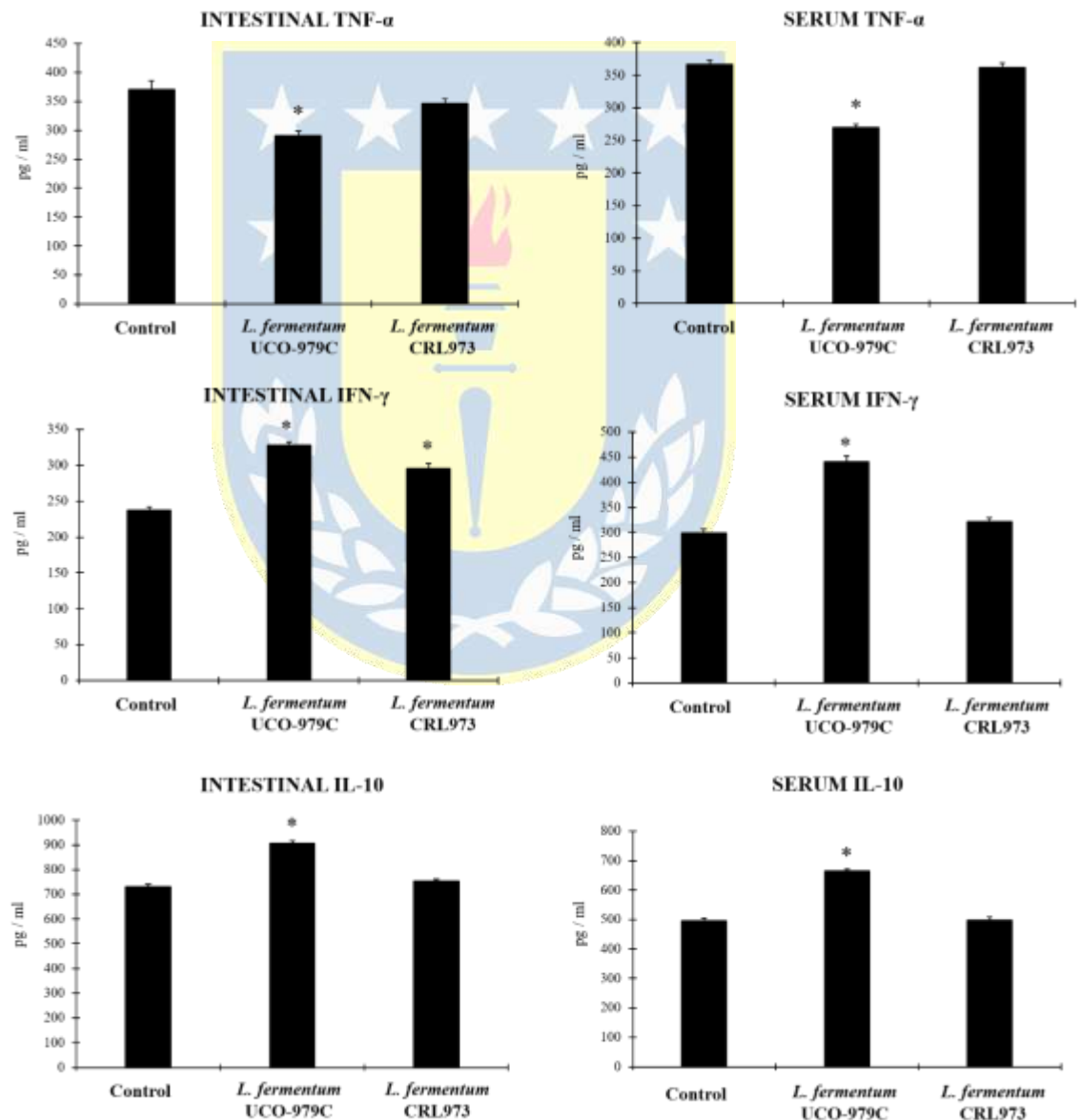


Figure 6. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C and *L. fermentum* CRL973 on intestinal and serum cytokines of adult immunocompetent mice after lipopolysaccharide (LPS) stimulation. *L. fermentum* UCO-979C or CRL973 were administered to different groups of mice for two consecutive days at a dose of 10^8 cells/mouse/day. Untreated mice were used as controls. Lactobacilli-treated and control mice were challenged with LPS by intraperitoneal injection of LPS. One day after the LPS challenge the concentrations of TNF- α , IFN- γ , and IL-10 in intestinal fluid and serum were determined. The results represent three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. Significantly different from control mice *($P < 0.05$).

L. fermentum* UCO-979C modulates intestinal immune cell populations *in vivo

We aimed to evaluate the effect of *L. fermentum* UCO-979C on peritoneal and intestinal immune cell populations in order to further characterize the immunomodulatory activity of this strain. In the peritoneal fluid, resident macrophages (F4/80⁺ cells) as well as inflammatory monocyte and neutrophils (Ly6C/Gr1⁺ cells) were studied by flow cytometry. As shown in **Figure 7**, the percentage of peritoneal F4/80⁺ macrophages as well as activated macrophages (F4/80⁺MHC-II⁺ cells) was increased in UCO-979C-treated mice when compared to controls, while no significant differences between the groups were observed when Ly6C/Gr1⁺ and Ly6C/Gr1⁺MHC-II⁺ cells were studied. Antigen presenting cells were also analyzed in Peyer's patches of mice (**Figure 8**). No significant differences were observed between UCO-979C-treated and control mice when CD11b⁺ or F4/80⁺ cells from Peyer's patches were evaluated. In addition, there were no differences between the groups in activated CD11b⁺CD86⁺ cells; however, the percentage of F4/80⁺CD86⁺ cells were significantly higher in *L. fermentum* UCO-979C-treated mice when compared with controls (**Figure 8**). Finally, B and T cells populations in Peyer's patches were studied (**Figure 9**). *L. fermentum* UCO-979C treatment improved the proportions of both CD3⁺CD4⁺ and CD3⁺CD8⁺ T cells when compared to controls. No differences between the groups were detected in the population of B220^{high} cells; however, the proportion of B220^{low} and B220⁺CD24^{high} cells (immature B cells) from Peyer's

patches were significantly reduced in *L. fermentum* UCO-979C-treated mice when compared with controls (**Figure 9**). In addition, B220⁺CD24^{low} population mature B cells) from Peyer's patches were higher in *L. fermentum* UCO-979C-treated mice than that of controls.

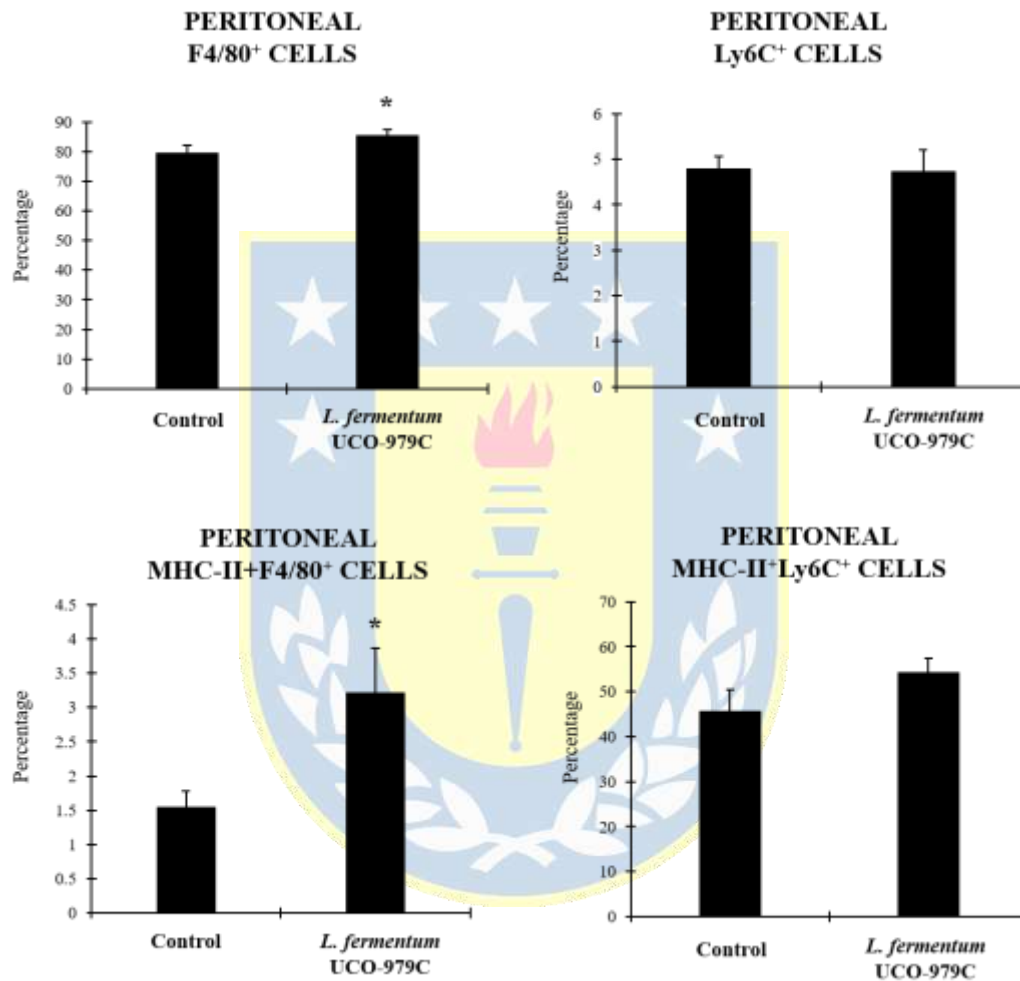


Figure 7. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on peritoneal phagocytic cells of adult immunocompetent mice. *L. fermentum* UCO-979C was administered to mice for two consecutive days at a dose of 10^8 cells/mouse/day. Untreated mice were used as controls. One day after the last lactobacilli administration, peritoneal phagocytes were evaluated by flow cytometry. The results represent three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. Significantly different from control mice *($P < 0.05$).

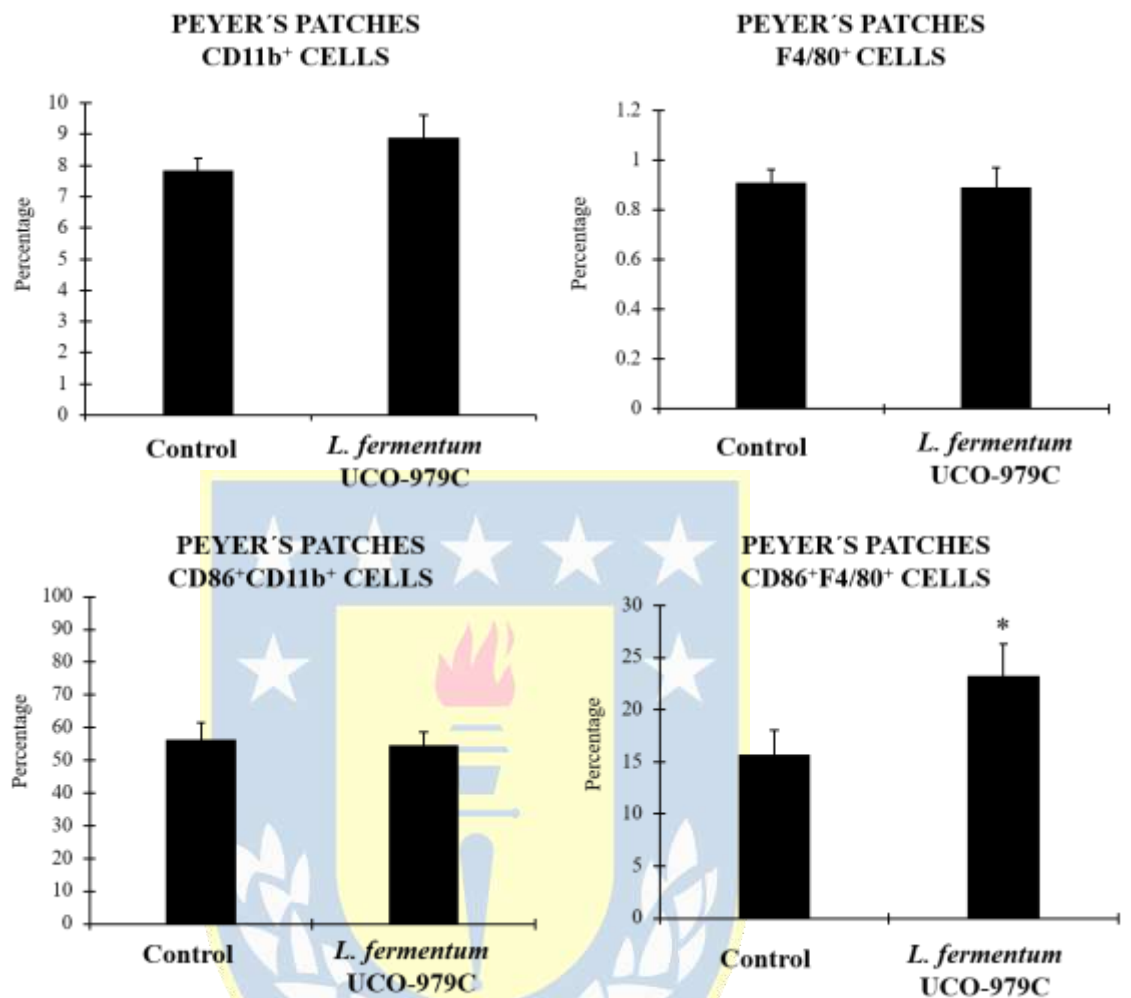


Figure 8. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on Peyer's patches phagocytic cells of adult immunocompetent mice. *L. fermentum* UCO-979C was administered to mice for two consecutive days at a dose of 10^8 cells/mouse/day. Untreated mice were used as controls. One day after the last lactobacilli administration, Peyer's patches phagocytes were evaluated by flow cytometry. The results represent three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. Significantly different from control mice *($P < 0.05$).

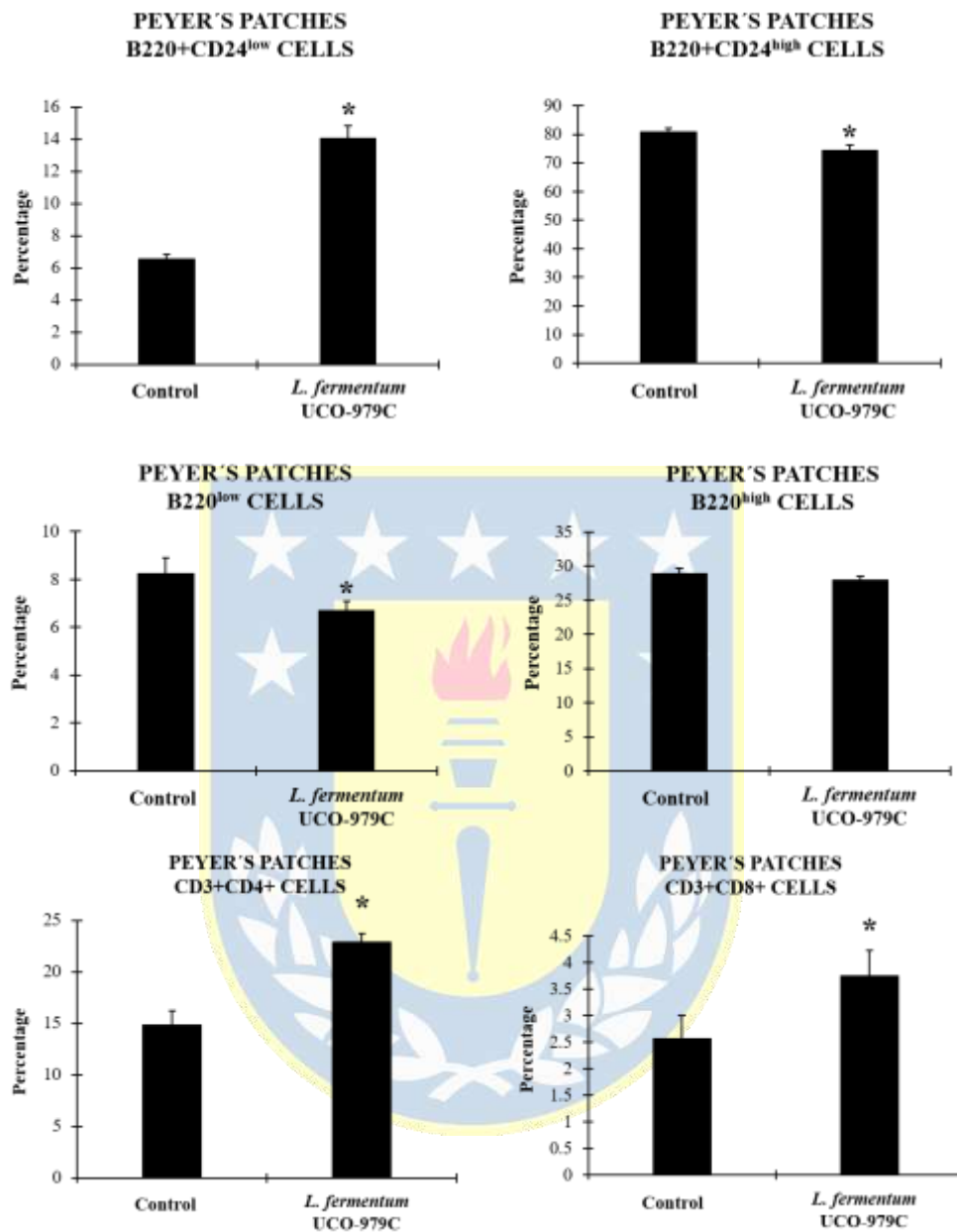


Figure 9. Effect of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on Peyer's patches lymphocytes of adult immunocompetent mice. *L. fermentum* UCO-979C was administered to mice for two consecutive days at a dose of 10^8 cells/mouse/day. Untreated mice were used as controls. One day after the last lactobacilli administration, Peyer's patches T and B cells were evaluated by flow cytometry. The results represent three independent experiments. Results are expressed as mean \pm SD. Significantly different from control mice *($P < 0.05$).

DISCUSSION

We previously reported that *L. fermentum* UCO-979C modulates the innate immune response in human gastric epithelial cells and macrophages, and improves protection against *H. pylori* infection²³. Here, we demonstrated for the first time that the UCO-979C strain is also capable of modulating the intestinal immune system.

The recent scientific advances in the biology of intestinal epithelial cells (IECs) have dramatically expanded our appreciation of their immunological functions. IECs establish an interconnected network with underlying immune cells and with the microbiota on their surface, and these complex interactions between intestinal cells and microorganisms significantly influence the host defense against threats from the intestinal lumen^{33,34}. IECs play crucial roles in the recognition of microorganisms in both homeostatic and pathologic conditions through the expression of innate receptors including the TLRs. TLR signaling by pathogens in IECs initiates signaling cascades that culminates in the expression and secretion of various cytokines, chemokines, and other inflammatory factors which signal and prime underlying immune cells^{33,34}. It was also reported that commensal and probiotic bacteria are recognized by IECs through innate receptors¹³. Moreover, immunobiotic bacteria are able to influence TLR signaling induced by pathogens in IECs and therefore, differentially modulate immune responses¹³.

We have previously used PIE cells to evaluate the effect of immunobiotic bacteria on TLR signaling induced by pathogens' PAMPs. We demonstrated that stimulation of PIE cells with heat-stable ETEC PAMPs activates NF- κ B and induces the phosphorylation of MAPK-ERK, MAPK-p38, and MAPK-JNK leading to the production of inflammatory cytokines²⁵. Later, by performing transcriptomic studies we corroborated these findings by demonstrating that activation of NF- κ B and MAPK pathways in PIE cells results in an increased expression of several chemokines including CCL4, CCL5, CCL8, CCL20, CXCL2, CXCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CSF2, as well as complement and coagulation factors²⁷. Interestingly, we have also demonstrated that prestimulation of PIE cells with the immunobiotic strain *Lactobacillus jensenii* TL2937 differentially modulate

the expression of inflammatory factors produced in response to heat-stable ETEC PAMPs challenge ^{25,27} (**Figure 10A**). The upregulation of the negative regulators MKP-1, A20, and Bcl-3 induced by the TL2937 strain in PIE cells was found to be related to the different immunotranscriptomic response after heat-stable ETEC PAMPs challenge ^{25,27}. Here, we performed similar experiments in order to evaluate the immunomodulatory effects of *L. fermentum* UCO-979C in IECs. Our results showed that the prestimulation of PIE cells with the UCO-979C strain differentially modulated the expression of inflammatory factors induced by the heat-stable ETEC PAMPs challenge (**Figure 10A**). The changes induced by *L. fermentum* UCO-979C were distinct from those previously observed in the case of immunobiotic strain TL2937. While *L. jensenii* TL2937 induced a clear and remarkable anti-inflammatory effect ^{25,27}, *L. fermentum* UCO-979C produced a stimulant/anti-inflammatory mixed effect (Figure 10A). Though some inflammatory factors such as CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, C1S and C3 were significantly reduced in UCO-979C-treated PIE cells; others like IL-6, CCL8, C1R and CFB were upregulated.

The up and down regulation of inflammatory factors correlated with the changes induced by *L. fermentum* UCO-979C on the expression of negative regulators of TLR4 signaling as evidenced by the augmented expression of SIGIRR and Bcl3, and the reduced expression of Tollip and MKP-1 (**Figure 10A**). The intestinal innate immune system needs to keep a balance in TLR activation to confer protection and avoid exaggerated inflammatory responses. Several levels of negative regulation have been described for TLR activation including the expression of membrane bound suppressors and intracellular inhibitors ^{13,35}. In this regard, some probiotic strains have shown to reduce TLR negative regulators and control the inflammation ³⁶. *Lactobacillus amylovorus* DSM 16698 was reported to diminish IL-1 β and IL-8 levels in IECs infected with ETEC K88 through the modulation of the negative regulators Tollip and IRAK-M ³⁷. ETEC K88-challenged pigs exhibited a reduced inflammatory response after *L. acidophilus* administration and this effect was associated with an increased expression of splenic Tollip, IRAK-M, A20 and Bcl-3 levels ³⁸. In addition, *L. plantarum* CGMCC1258 increased SIGIRR, Bcl3 and

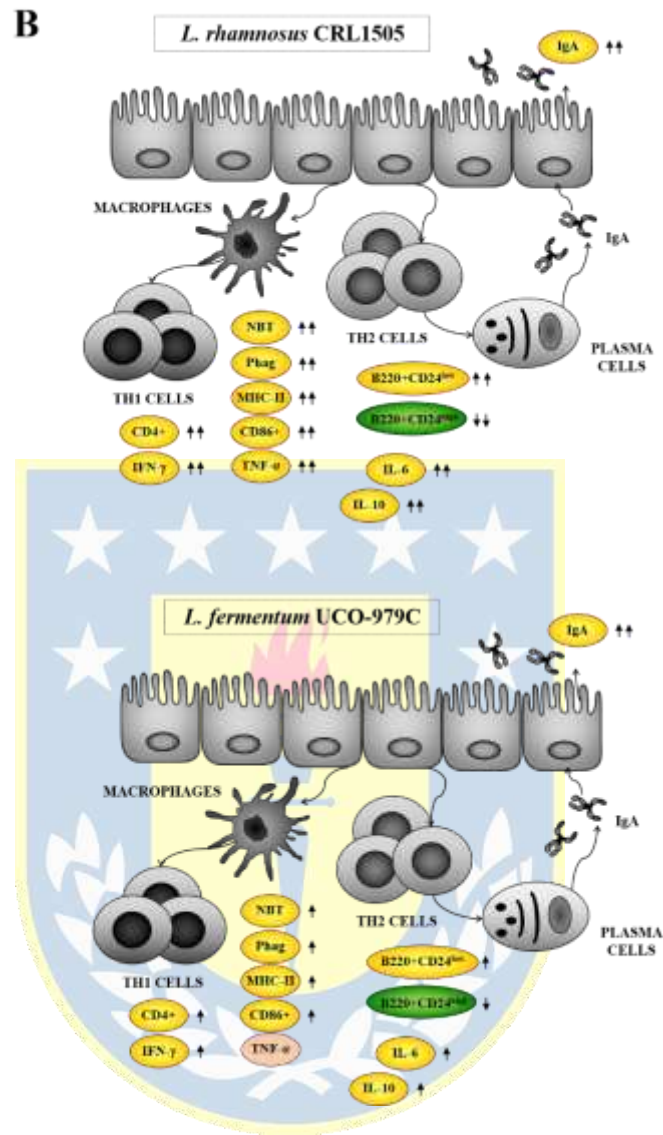


Figure 10. Proposed mechanisms for the immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C on intestinal mucosa. A) Effect of *L. fermentum* UCO-979C on intestinal epithelial cells and modulation of the inflammatory response triggered by heat-stable Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). The immunomodulatory activity of the UCO-979C strain is compared with the activity of the probiotic strain *Lactobacillus jensenii* TL2937 and with *L. fermentum* CRL973. B) Effect of *L. fermentum* UCO-979C on intestinal immune cells. The immunomodulatory activity of the UCO-979C strain is compared with the activity of the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505.

The stimulating/anti-inflammatory mixed effect of *L. fermentum* UCO-979C in PIE cells contrast with our previous findings in AGS cells²³. We demonstrated that *L. fermentum* UCO-979C significantly diminished the production of IL-8, TNF- α , IL-1 β , IL-6, and MCP-1 in AGS cells challenged with *H. pylori*. Of interest, in addition to its capacity to reduce the production of pro-inflammatory factors we observed that *L. fermentum* UCO-979C was also capable to improve the production of TGF- β in *H. pylori*-infected AGS cells. These findings indicate that it is of great importance to characterize the immunomodulatory properties of the probiotic strains in different cellular models since it is not possible to extrapolate their effect in one mucosal tissue to another.

Several studies have reported the beneficial effects of immunobiotics on intestinal health and those studies have shown that the most remarkable effect of immunobiotics on intestinal cytokine dynamics is the increase in TNF- α , IFN- γ , and the regulatory cytokine IL-10^{30,40}. We have shown consistently that the oral administration of immunobiotic strains including *L. casei* CRL431, *L. plantarum* CRL1506, and *L. rhamnosus* CRL1505 improves the production of TNF- α , IFN- γ , and IL-10 in the gut^{30,31,41}. Moreover, we have demonstrated that oral administration of the immunostimulatory strain *L. rhamnosus* CRL1505 to mice improved the activation of intestinal and peritoneal macrophages as well as Peyer's patches CD4⁺ T cells those are able to produce IFN- γ ^{30,31,41}. In the present study, the oral administration of *L. fermentum* UCO-979C significantly improved the production of IFN- γ , and IL-10 but not the TNF- α . The UCO-979C strain stimulated intestinal and peritoneal macrophages and improved Peyer's patches CD4⁺ T cells, although the effects were less pronounced than those previously observed for the CRL1505 strain (**Figure 10B**). These results indicate that *L. fermentum* UCO-979C would be capable of stimulating CD4⁺ T cells in the gut, increasing IFN- γ production and consequently stimulating the macrophages. In fact, peritoneal macrophages of UCO-979C-treated mice had improved levels of parameters that involved in several fundamental steps of the phagocytic process including attachment to surface and internalization of *S. boulardii* as well as their microbicidal activity through oxidative burst. We previously reported that *L. fermentum* UCO-979C modulated cytokine

production in THP-1 macrophages challenged either with *H. pylori* or lipopolysaccharide (LPS) ²³. The UCO-979C strain was able to reduce the production of TNF- α , and to improve IFN- γ levels in challenged THP-1 macrophages. In addition, we demonstrated that *L. fermentum* UCO-979C increased the production of IL-10 in THP-1 macrophages challenged with *H. pylori* ²³. Our previous results and those obtained in this work therefore suggest that the UCO-979C strain could exert an immunomodulatory effect on macrophages acting directly on them or indirectly through the cytokines produced by IECs or other immune cells.

Another effect that has been consistently described for probiotics on the intestinal immune system is their ability to improve secretory IgA production, which is supported in most cases by an improved production of factors released by IECs. Cytokines produced by IECs such as IL-6 are capable of promoting the switch from IgM to IgA expression in B cells ^{31,40}. It is considered that approximately 80% of antibody-secreting plasma cells in the human body are located in the gut. Intestinal antibody-secreting plasma cells produce secretory IgA that plays an important protective role against pathogens and toxins through a variety of non-inflammatory activities that increase their clearance, and prevent their access to the intestinal epithelium ⁴². Dimeric IgA may neutralize endocytosed LPS in intestinal epithelium, preventing NF- κ B activation ⁴³. IgA-producing B cells can be generated by both T cell-dependent and -independent processes ⁴⁴. T cell-dependent responses usually occur in germinal centers in lymphoid tissues such as the Peyer's patches and mesenteric lymph nodes. In such structures, B cells undergo several rounds of activation and maturation that are supported by follicular T cells that express co-stimulatory molecules and cytokines. In T-independent responses, which occur outside germinal centers, B cells are activated by IECs and innate immune cells to produce polyreactive IgA ⁴⁵. The T-independent IgA production is induced by and influences the composition of indigenous members of the microbiota ⁴². In addition, improvement of T-independent IgA induction supported by TGF- β , IL-4, IL-2, IL-6, and IL-10 was also demonstrated for immunobiotic strains including *L. casei* CRL431 ⁴⁰, *L. rhamnosus* GG ⁴⁶, and *L. rhamnosus* CRL1505 ³¹. In this work, we have observed that the oral

administration of the *L. fermentum* UCO-979C improves intestinal IL-6, reduces immature B220⁺CD24^{high} B cells from Peyer's patches, enhances mature B B220⁺CD24^{low} cells and significantly increases intestinal IgA, although these effects were less pronounced than those observed for the CRL1505 strain (**Figure 10B**).

Interestingly, *L. fermentum* CRL973 showed a modest immunomodulatory effect *in vitro* (**Figure 10A**). The CRL973 strain was more efficient to increase the expression of SIGIRR when compared to the UCO-979C strain. In addition, *L. fermentum* CRL973 reduced the expression of the negative regulators A20 and IRAK-M in PIE cells after heat-stable ETEC PAMPs challenge. However, the *in vivo* studies in mice demonstrated that the CRL973 strain was not able to exert an immunomodulatory effect since no improvement of intestinal cytokines, IgA production, or activation of peritoneal macrophages was observed in the CRL973-treated mice. These findings are of importance since they confirm the general knowledge that the immunobiotic properties are dependent on each specific strain. Moreover, results of this study open up an interesting possibility for future research since cellular, molecular and genomic comparative studies between both UCO-979C and CRL973 could help to understand the immunological mechanisms involved in the beneficial effects of *L. fermentum* UCO-979.

We have demonstrated that *L. fermentum* UCO-979C is able to differentially modulate the cytokine response of human gastric epithelial cells and macrophages, and to improve protection against *H. pylori* infection *in vitro*²³. The UCO-979C strain is also capable to modulate the immune response of intestinal epithelial cells triggered by heat-stable ETEC PAMPs challenge. Notably, we demonstrated here for the first time that *L. fermentum* UCO-979C is able to exert its immunomodulatory effect in the intestinal mucosa *in vivo*. Therefore, *L. fermentum* UCO-979C has several characteristics for making it an excellent candidate for the development of immunobiotic functional foods to prevent infections by gastric and intestinal pathogens. The *in vivo* evaluation of the ability of the UCO-979C strain to beneficially influence the immune response and improve

protection against *H. pylori* and other intestinal pathogenic Gram negative bacteria is an interesting point for further research.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by ANPCyT–FONCyT Grants PICT-2013-3219 and PICT-201-0410 to Julio Villena, CONICYT National Doctorate Grant 21150603 to Valeria García, and a Grant-in-Aid for Scientific Research (B)(2) (16H05019), Challenging Exploratory Research (26660216, 16K15028), Open Partnership Joint Projects of JSPS Bilateral Joint Research Projects from the Japan Society for the Promotion of Science (JSPS) to Haruki Kitazawa, and the grants for “Scientific Research on Innovative Areas” from the Ministry of Education, Culture, Science, Sports and Technology (MEXT) of Japan (Grant numbers: 16H06429, 16K21723, and 16H06435) to Hideki Takahashi. Md Aminul Islam was supported by JSPS (Postdoctoral Fellowship for Foreign Researchers, Program No. 18F18081). This work was also supported by the JSPS Core-to-Core Program Advanced Research Networks "Establishment of international agricultural immunology research-core for a quantum improvement in food safety".

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

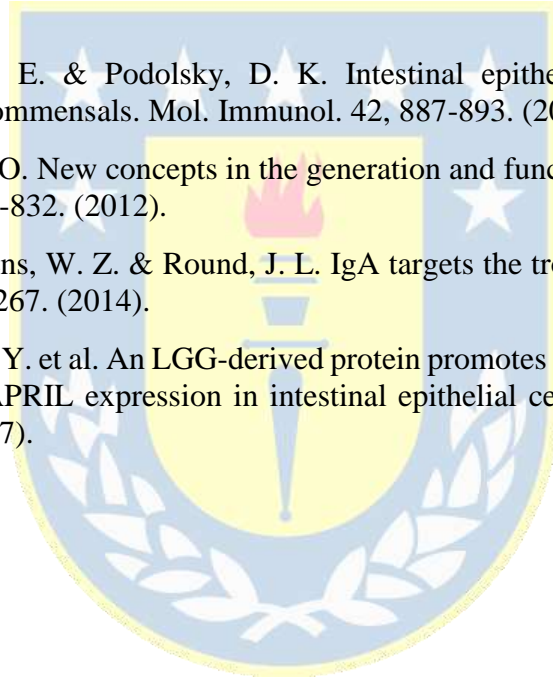
REFERENCES

1. Dicks, L. M. T., Geldenhuys, J., Mikkelsen, L. S., Brandsborg, E. & Marcotte, H. Our gut microbiota: A long walk to homeostasis. *Benef. Microbes* 9(1):3-20 (2018).
2. Sánchez, B. et al. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol. Nutr. Food Res.* 6, 1–15 (2017).
3. Hooper, L. V., Littman, D. R. & Macpherson, A. J. Interactions Between the Microbiota and the Immune System. *Science.* 336, 1268–1273 (2012).
4. Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B. & Margolles, A. Molecular players involved in the interaction between beneficial bacteria and the immune system. *Front. Microbiol.* 6, 1285 (2015).
5. Neville, B. A., Forster, S. C. & Lawley, T. D. Commensal Koch's postulates: establishing causation in human microbiota research. *Curr. Opin. Microbiol.* 42, 47–52 (2018).
6. Highlander, S. K. High throughput sequencing methods for microbiome profiling: application to food animal systems. *Anim. Health Res. Rev.* 13, 40–53 (2012).
7. Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z. & Li, L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* 3, 71–82 (2017).
8. Perdigón, G., Fuller, R. & Raya, R. Lactic Acid Bacteria and their Effect on the Immune System Further Reading. *Curr. Issues Intest. Microbiol* 2, 27–42 (2001).
9. Clancy, R. Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 38, 9–12 (2003).
10. Kitazawa, H., Villena, J. & Alvarez, S. Probiotics: Immunobiotics and Immunogenics. (CRC Press. Taylor & Francis Group, 2013).
11. Wu, R., Jeffrey, M., Johnson-Henry, K., Green-Johnson, J. & Sherman, P. Impact of Prebiotics, Probiotics and Gut Derived Metabolites on Host Immunity. *LymphoSign J.* 4, 1–24 (2016).
12. Lebeer, S. et al. Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 217–223 (2018).
13. Villena, J. & Kitazawa, H. Modulation of intestinal TLR4-inflammatory signaling pathways by probiotic microorganisms: Lessons learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937. *Frontiers in Immunology* 4, (2014).

14. Ren, C. et al. Identification of TLR2/TLR6 signalling lactic acid bacteria for supporting immune regulation. *Sci. Rep.* 6, (2016).
15. Barberi, C. et al. T cell polarizing properties of probiotic bacteria. *Immunology Letters* 168, 337–342 (2015).
16. Bron, P. A. et al. Can probiotics modulate human disease by impacting intestinal barrier function? *Br. J. Nutr.* 117, 93–107 (2017).
17. Lesbros-Pantoflickova, D., Corthésy-Theulaz, I. & Blum, A. L. *Helicobacter pylori* and probiotics. *J. Nutr.* 137, 812S–8S (2007).
18. Goderska, K., Agudo Pena, S. & Alarcon, T. *Helicobacter pylori* treatment: antibiotics or probiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 1–7 (2018).
19. Homan, M. & Orel, R. Are probiotics useful in *Helicobacter pylori* eradication? *World J. Gastroenterol.* 21, 10644–10653 (2015).
20. Garcia C, A. et al. Probiotic properties of *Lactobacillus spp* isolated from gastric biopsies of *Helicobacter pylori* infected and non-infected individuals. *Rev. Med. Chil.* 137, 369–376 (2009).
21. García, A. et al. Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *Electron. J. Biotechnol.* 25, 75-83. (2017).
22. Merino, J. S. et al. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C strongly inhibited *Helicobacter pylori* SS1 in *Meriones unguiculatus*. *Benef. Microbes* 9, 625–627 (2018).
23. Garcia-Castillo, V. et al. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection *in vitro*. *Benef. Microbes* 9, 829-841. (2018).
24. Moue, M. et al. Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1780, 134–144 (2008).
25. Shimazu, T. et al. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* elicits anti-inflammatory activity in porcine intestinal epithelial cells by modulating negative regulators of the toll-like receptor signaling pathway. *Infect. Immun.* 80, 276–288 (2012).
26. Tomosada, Y. et al. Immunoregulatory Effect of Bifidobacteria Strains in Porcine Intestinal Epithelial Cells through Modulation of Ubiquitin-Editing Enzyme A20 Expression. *PLoS One* 8, (2013).

27. Kobayashi, H. et al. Modulation of porcine intestinal epitheliocytes immunetranscriptome response by *Lactobacillus jensenii* TL2937. *Benef. Microbes* 7, 769–782 (2016).
28. Nygard, A. B., Jorgensen, C. B., Cirera, S. & Fredholm, M. Selection of reference genes for gene expression studies in pig tissues using SYBR green qPCR. *BMC Mol Biol* 8, (2007).
29. Ray, A. & Dittel, B. N. Isolation of Mouse Peritoneal Cavity Cells. *J. Vis. Exp.* 35, 1488. (2010).
30. Marranzino, G., Villena, J., Salva, S. & Alvarez, S. Stimulation of macrophages by immunobiotic *Lactobacillus* strains: Influence beyond the intestinal tract. *Microbiol. Immunol.* 56, 771–781 (2012).
31. Salva, S., Villena, J. & Alvarez, S. Immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: Impact on intestinal and respiratory infections. *Int. J. Food Microbiol.* 141, 82–89 (2010).
32. Tsukida, K. et al. Immunoregulatory effects triggered by immunobiotic *Lactobacillus jensenii* TL2937 strain involve efficient phagocytosis in porcine antigen presenting cells. *BMC Immunol.* 17, 1–12 (2016).
33. Abreu, M. T. Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: How bacterial recognition shapes intestinal function. *Nat. Rev. Immunol.* 10, 131–144. (2010).
34. Allaire, J. M. et al. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* 39, 677–696. (2018).
35. Liew, F. Y., Xu, D., Brint, E. K. & O'Neill, L. A. J. Negative regulation of toll-like receptor-mediated immune responses. *Nat. Rev. Immunol.* 5, 446–458 (2005).
36. Llewellyn, A. & Foey, A. Probiotic modulation of innate cell pathogen sensing and signaling events. *Nutrients* 9, 1–21 (2017).
37. Finamore, A. et al. *Lactobacillus amylovorus* inhibits the TLR4 inflammatory signaling triggered by enterotoxigenic *Escherichia coli* via modulation of the negative regulators and involvement of TLR2 in intestinal caco-2 cells and pig explants. *PLoS One* 9, (2014).
38. Li, H. et al. *Lactobacillus acidophilus* alleviates the inflammatory response to enterotoxigenic *Escherichia coli* K88 via inhibition of the NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in piglets. *BMC Microbiol.* 16, (2016).

39. Wu, Y. et al. Protective effects of *Lactobacillus plantarum* on epithelial barrier disruption caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in intestinal porcine epithelial cells. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 172, 55–63 (2016).
40. Maldonado, C., De Moreno De Leblanc, A., Vinderola, G., Bibas Bonet, M.E. & Perdigón, G. Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 485–492 (2007).
41. Villena, J. et al. Orally administered *Lactobacillus rhamnosus* modulates the respiratory immune response triggered by the viral pathogen-associated molecular pattern poly(I:C). *BMC Immunol.* 13, (2012).
42. Jahnsen, F. L., Bækkevold, E. S., Hov, J. R. & Landsverk, O. J. Do Long-Lived Plasma Cells Maintain a Healthy Microbiota in the Gut? *Trends Immunol.* 39, 196-208. (2018).
43. Cario, E. & Podolsky, D. K. Intestinal epithelial Tolerance versus Intolerance of commensals. *Mol. Immunol.* 42, 887-893. (2005).
44. Pabst, O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat. Rev. Immunol.* 12, 821-832. (2012).
45. Stephens, W. Z. & Round, J. L. IgA targets the troublemakers. *Cell Host Microbe* 16, 265-267. (2014).
46. Wang, Y. et al. An LGG-derived protein promotes IgA production through upregulation of APRIL expression in intestinal epithelial cells. *Mucosal Immunol.* 10, 373-384. (2017).





DISCUSIÓN GENERAL

Efecto inmunomodulador de *L. fermentum* UCO-979C en la infección por *H. pylori* en células epiteliales gástricas y macrófagos.

La relación inflamación-cáncer fue planteada en el siglo XIX por Rudolf Virchow y por décadas la evidencia ha apoyado que la inflamación crónica se asocia a la etiopatogénesis y desarrollo de varios tipos de tumores ¹⁹¹. De acuerdo a datos de GLOBOCAN 2018, el cáncer de estómago es la quinta neoplasia más común y la tercera con mayor mortalidad asociada ¹⁹². Si bien el desarrollo de cáncer gástrico es multifactorial, aproximadamente el 90% de los casos de cáncer son atribuibles a la infección por *H. pylori*, siendo responsable de un 5% de los casos globales de cáncer ^{191,193}. La infección crónica por *H. pylori* produce desórdenes gástricos que van desde la gastritis crónica al adenocarcinoma gástrico ¹⁹⁴, una respuesta inflamatoria crónica es requisito para el desarrollo de la secuencia de transformaciones epiteliales denominadas cascada de Correa, que incluye gastritis atrófica multifocal, metaplasia intestinal, displasia y cáncer ¹⁹¹.

La respuesta inmune frente a *H. pylori* implica componentes de la respuesta innata y una compleja mezcla de respuestas adaptativas Th1, Th17 y Treg. La forma clínica de la infección dependerá en gran medida del balance de estas respuestas, en particular de las cantidades y el tipo de citoquinas y quimioquinas producidas ^{195,196}. Las citoquinas son componentes esenciales en la respuesta inflamatoria y el daño en la mucosa gástrica¹⁹⁷. Es reconocido que polimorfismos en los genes que codifican para ciertas citoquinas que resultan en una expresión aumentada de dichos factores pro-inflamatorios (IL-6, IL-8, TNF- α , IL-1 β) o reducida de citoquinas anti-inflamatorias como la IL-10, están asociadas a mayor riesgo de desarrollar cáncer gástrico ^{151,196}. Por otra parte, se sugiere que la tolerancia inmunológica a la infección protege frente a formas graves de la enfermedad¹⁹⁴. La erradicación es un objetivo primario en los individuos infectados ya que disminuye significativamente el riesgo de cáncer gástrico en personas infectadas sin lesiones pre malignas ^{198,199}; sin embargo, en las últimas décadas existe un creciente interés en los mediadores de la inflamación como blanco en las estrategias de tratamiento¹⁹¹. De esta

forma, la modulación de la respuesta inmune frente a la infección puede reducir la inmunopatología o promover una respuesta inflamatoria más eficiente para erradicar a *H. pylori*²⁰⁰

Se postula que los probióticos podrían contribuir a polarizar la respuesta inmune hacia una respuesta tipo Th2, asociada con la producción de IL-4 o IL-10 lo que podría contribuir a disminuir la inflamación producto de la respuesta natural frente a *H. pylori*, caracterizada originalmente por una células T CD4+ que expresan principalmente un fenotipo Th1^{170,176}. Por tal motivo el objeto del presente estudio fue evaluar el efecto de una cepa de aislamiento gástrico, *L. fermentum* UCO-979C previamente caracterizada como probiótico¹⁸⁶, sobre la respuesta inmune en el contexto de la infección por *H. pylori*. Para ello, se estudiaron diversos parámetros inmunológicos en líneas celulares y en un modelo animal murino. El amplio recorrido metodológico abordado en este trabajo de tesis permite posicionar a la cepa UCO-979C como un probiótico inmunomodulador o inmunobiótico, con gran potencial de aplicación en el mejoramiento de la salud gastrointestinal como se discute a continuación.

Es claro que el reconocimiento innato local de *H. pylori* por parte de las células epiteliales gástricas es un importante determinante del curso de la enfermedad²⁰¹. La activación de la vía del NF-κB y regulación positiva de IL-8 en células epiteliales gástricas han sido sugeridos como los mecanismos críticos responsables de la inflamación crónica y la carcinogénesis inducida por *H. pylori*. De este modo, las estrategias para reducir la inflamación crónica se han centrado en la modulación de IL-8. Sin embargo, varias citoquinas juegan un papel relevante en el desarrollo de gastritis asociada a *H. pylori*. Citoquinas como IL-1β, IL-10, IL-6 y miembros de la familia Smad 7 también están involucrados en la respuesta de las células epiteliales frente a *H. pylori*²⁰². Por esta razón, muchas de ellas pueden ser candidatas para ser empleadas en la terapia de la inflamación gástrica, sin embargo pocos estudios han investigado el papel de otras quimioquinas diferentes a IL-8^{191,203-205}. Por este motivo, la determinación de un repertorio más amplio de citoquinas y quimioquinas para contar con un estudio inmunológico más detallado (Capítulo IV) son necesarios para hacer un abordaje más eficiente en la prevención y

tratamiento de las patologías asociadas a *H. pylori*. En este sentido, en estudios previos demostramos que *L. fermentum* UCO-979C redujo significativamente la producción de IL-8 en células AGS desafiadas con *H. pylori*, indicando un potencial efecto inmunomodulador. En este trabajo de tesis se amplió la caracterización del efecto inmunomodulador de la cepa UCO-979C estudiando un repertorio más amplio de citoquinas y quimioquinas producidas por células epiteliales y macrófagos en respuesta a la infección con el patógeno gastrointestinal.

H. pylori puede inducir la activación de una serie de vías de señalización en las células epiteliales gástricas dando como resultado la producción de citoquinas que incluyen IL-8, IL-6, TNF- α , IL-1 β , IL- α , GM-CSF, MCP-1 y TGF- β . Como se mencionó anteriormente, dichas citoquinas desempeñan un papel importante en el desarrollo de enfermedades gastroduodenales asociadas con la infección por *H. pylori*²⁰⁶. Considerando que ciertos microorganismos pueden modular la respuesta inmune y mitigar el efecto inflamatorio; en cumplimiento del objetivo 1, se determinaron los niveles de TNF- α , IL-1, IL-6, TGF- β , IL-8 y MCP-1 en el sobrenadante de células AGS estimuladas con la cepa probiótica (**Figura 2** Capítulo IV) y en células AGS infectadas con *H. pylori* pre tratadas con UCO-979C (**Figura 7** Capítulo IV), con el fin de evaluar el efecto inmunomodulador de *L. fermentum* UCO-979C.

El tratamiento de células epiteliales gástricas con *L. fermentum* UCO-979C indujo un aumento en los niveles de TNF- α IL-1 β , IL-6, MCP-1 y TGF- β sin modificar la producción de IL-8 (**Figura 2** Capítulo IV). Estudios realizados con la cepa probiótica *Streptococcus thermophilus* CRL1190 demostraron que dicho microorganismo no induce cambios significativos en los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-8 en condiciones experimentales similares²⁰⁵. Por otro lado, la cepa de aislamiento gástrico *L. rhamnosus* UCO-25A es capaz de modificar los niveles TNF- α IL-1 β , IL-6, MCP-1 y TGF- β e IL-8 en células AGS²⁰⁷. Estos resultados indican un claro efecto dependiente de cepa en la modulación de las citoquinas producidas por las células epiteliales gástricas. Esta conclusión también es válida cuando se analizan los perfiles de citoquinas en el contexto

de la infección por *H. pylori*. *S. thermophilus* disminuye los niveles de IL-8, sin ejercer efecto sobre la producción de TNF- α e IL-6, mientras que UCO-979C (**Figura 7** Capítulo IV) y UCO-25A disminuyen la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-8 y MCP-1. También se reportó que la cepa UCO25-A aumenta los niveles de IL-6 mientras que UCO-979C los disminuye. *L. acidophilus* LA5 ® disminuye la expresión de IL-8 en células MKN45 sin embargo no ejerce un efecto sobre los niveles de TGF- β 1²⁰⁸. Esto demuestra diferencias en la capacidad inmunomoduladora de las cepas probióticas asociadas al patrón de citoquinas liberadas por las células epiteliales gástricas.

Estudios en células epiteliales han demostrado que *H. pylori* puede inducir expresión de genes pro-inflamatorios a través de la interacción con TLR2, TLR4, TLR5 y TLR9²⁰⁹. El patógeno también puede ser reconocido a través de otros PRRs: el peptidoglicano puede ser inyectado a través del sistema T4SS y estimular NOD-1 induciendo la activación de la vía de señalización del NF- κ B²¹⁰. Las interacciones MAMPs-PRRs también se producen entre microorganismos benéficos y células epiteliales. Actualmente se acepta que las diferencias en las respuestas inducidas por las distintas cepas probióticas radica en la variedad de sus MAMPs (sus atributos y su cantidad) y el reconocimiento por los diferentes PRRs presentes en las células inmunes y no inmunes del huésped⁸². Componentes estructurales microbianos serían esenciales en la comunicación huésped-microorganismo y serían los responsables de la variabilidad funcional entre cepas. Entre ellos se pueden mencionar los exopolisacáridos, las proteínas de superficie, las proteínas de unión a la mucina, proteínas de unión a la fibronectina y pili, el peptidoglicano^{211,212} y los ácidos lipoteicoicos^{51,213}. De este modo es posible especular que la interacción MAMPs-PRRs producida entre *L. fermentum* UCO-979C y las células epiteliales gástricas podría inducir cambios en la posterior interacción MAMPs-PRRs llevada a cabo entre *H. pylori* y dichas células. En consecuencia, la reducción significativa de TNF- α , IL-1 β , IL-8, MCP-1 e IL-6 de las células epiteliales en respuesta al patógeno producto del pretratamiento con la cepa UCO-979C podría ser el resultado de cambios en las vías de señalización que sensan la presencia de *H. pylori*.

Algunos estudios concentrados en la evaluación del potencial rol de las vías de señalización en el efecto benéfico de cepas probióticas en el contexto de la infección de células epiteliales gástricas por *H. pylori* apoyan nuestra hipótesis. Thiraworawong et al., demostraron que el sobrenadante de cultivo de *L. plantarum* XB7 es capaz de inhibir la activación del NF- κ B y de c-Jun (sub- unidad de AP-1) resultando en una disminución en la expresión de IL-8 ¹⁷⁸. Así mismo, *L. bulgaricus* NQ2508 inhibe la adherencia de *H. pylori* a células GES-1 y también disminuye la producción de IL-8 posterior al desafío con LPS de *H. pylori*. El trabajo demostró que la cepa NQ2508 ejercía su efecto benéfico al inhibir la vía de señalización TLR4/I κ B α /NF κ B ²⁰². Aunque el desciframiento del mecanismo molecular de la acción inmunomoduladora de la cepa UCO-979C no era objetivo de la presente investigación, la elucidación de los receptores y vías de señalización modificadas por la bacteria en células epiteliales es un importante objetivo para futuras investigaciones. Estudios de expresión de PRRs, bloqueo con anticuerpos anti-TLR y análisis de expresión de proteínas de la vía MyD88-TRAF6 y activación de NF- κ B, moléculas críticas en la transducción de señales en la infección por *H. pylori*, serían de gran importancia para dilucidar si *L. fermentum* UCO-979C ejerce su efecto inmunomodulador a través de su influencia en la interacción MAMPs-PRRs.

La adhesión a la mucosa gástrica es una etapa clave en la patogénesis por *H. pylori* ²⁰²; los probióticos pueden inhibir la adhesión de *H. pylori* a las células gástricas mediante interferencia directa con la unión del patógeno o indirectamente afectando los receptores en las células huésped ^{214,215}. La inhibición de la colonización por *H. pylori* mediada por probióticos es cepa específica ²⁰². Por otro lado, también se ha reportado que algunas bacterias probióticas no tienen efecto en la eliminación del patógeno pero si tienen un efecto benéfico en la inflamación asociada a *H. pylori* ¹⁸¹. Algunos estudios demuestran que algunas bacterias probióticas pueden tener un efecto en la inflamación asociada a *H. pylori*, sin eliminar la infección ¹⁸¹. Al respecto, Panpetch et al. demostraron que el sobrenadante de cultivo de *L. salivarius* B37 y B60 reduce la producción de IL-8 inducida por *H. pylori* en células epiteliales gástricas al suprimir la activación de NF- κ B, sin suprimir la activación de c-Jun. El sobrenadante de cultivo de estas cepas no tiene efecto

sobre el crecimiento del patógeno gástrico¹⁹⁷. En otro estudio, se evaluó el efecto de *L. gasseri* OLL 2716, la dosis necesaria para reducir la adhesión a las células (10^9 UFC/ml) fue superior al número de bacterias necesario para disminuir la producción de IL-8 (10^7 UFC/ml). El trabajo sugirió que la supresión en la producción de IL-8 por parte de esta cepa no guarda relación con un bloqueo en la adhesión de *H. pylori* en células MKN45. La misma dosis de bacterias probióticas no inhibe la producción de IL-8 inducida por TNF- α por lo que los autores sugieren que este efecto es producto de un evento que ocurre entre la adhesión del patógeno y la transcripción de IL-8¹⁸².

Estudios previos han demostrado que *L. fermentum* UCO-979C produce peróxido de hidrógeno, ácido láctico¹⁸⁶, se adhiere eficientemente a células epiteliales gástricas e intestinales, sobre las cuales la cepa forma estructuras tipo biopelícula y produce exopolisacárido¹⁸⁷, coloniza y sobrevive hasta 14 días en la mucosa gástrica de gerbos de Mongolia¹⁸⁶; inhibe fuertemente la adhesión, el crecimiento, la actividad de la ureasa de *H. pylori* y reduce significativamente la producción de IL-8 en células AGS infectadas por *H. pylori*¹⁸⁶. Para sugerir el mecanismo por el cual la cepa UCO-979C ejerce un efecto sobre la producción de citoquinas y/o la colonización por *H. pylori* sería relevante estudiar el efecto de células inactivadas, sobrenadante de cultivo, expresión de genes de virulencia en *H. pylori*, estudio de mutantes, entre otros, para poder relacionar la actividad de la cepa con mecanismos de acción directos o indirectos.

Estudios refieren que la actividad de ciertas cepas probióticas frente a *H. pylori* es más evidente cuando se emplea sobrenadante de cultivo que cuando se emplean bacterias viables¹⁷⁵, en esta situación, el mecanismo puede estar relacionado con sustancias secretadas tales como el ácido láctico, peróxido, bacteriocinas y proteínas. En el caso del uso de bacterias viables como el presente estudio, la participación de moléculas de la envoltura celular y componentes de superficie celular también deben ser considerados²¹⁶. Se puede sugerir que el efecto de *L. fermentum* UCO-979C es una mezcla de eventos inhibitorios en conocimiento de su actividad anti-*H. pylori* mediados por ácido láctico, peróxido y efectos sobre las células epiteliales gástricas.

TGF- β producido por las células epiteliales actúa como un importante regulador de la función de los macrófagos, promoviendo la diferenciación de macrófagos tipo 2²¹⁷. Una baja concentración de TGF- β con IL-6 e IL-21 promueve la expresión de IL-23R y la diferenciación de células Th17 (el aumento de los niveles de IL-17 durante la infección por *H. pylori* es responsable del daño de la mucosa durante la gastritis) Por otro lado, una alta concentración de TGF- β inhibe la expresión de IL-23R, lo que favorece la generación de células Treg²¹⁸. TGF- β desempeña una función en la prevención de la inflamación, aunque no es lo suficientemente eficaz para prevenir las úlceras causadas en la patología crónica por *H. pylori*. El pretratamiento de con *L. fermentum* UCO-979C en células AGS infectadas con *H. pylori*, aumenta significativamente las concentraciones de TGF- β y disminuye las concentraciones de IL-6. Podría sugerirse que genera un microambiente de citoquinas que favorece la diferenciación hacia células Treg, aunque serían necesarios estudios más detallados para llegar a esta conclusión. Algunas cepas probióticas han demostrado modular la producción de TGF- β ; el pre-tratamiento con altas dosis de *L. acidophilus* LA5® aumenta los niveles de I κ B α citoplasmático y disminuye los niveles de NF- κ B en células MKN45 infectadas con *H. pylori*²⁰⁸, *L. acidophilus* LA5® disminuye la expresión de JAK1, STAT1 y SMAD7 y la subsecuente producción de NF- κ B en células AGS posterior al desafío con *H. pylori*²⁰⁸, la disminución en la expresión de Smad7 inducida por la a LA5 también estuvo involucrada en la producción mejorada de TGF- β ²⁰⁸.

Es importante destacar que la actividad de las cepas probiótica es dependiente de la dosis. Al respecto, *L. salivarius* WB1004 demostró disminuir la adhesión de *H. pylori* a células MKN45 y la secreción de IL-8 en un patrón dosis dependiente²¹⁹. En otro estudio, Marcial y colaboradores observaron que el pretratamiento con *S. thermophilus* CRL1190 disminuía la adhesión de *H. pylori* en células AGS de una forma dependiente de la dosis, al igual que el descenso en los niveles de IL-8 demostraba diferencias evidentes entre los grupos tratados con diferentes concentraciones del probiótico²⁰⁵. Por el contrario, un estudio de nuestro laboratorio, no demostró diferencia significativa en los recuentos de *H. pylori* en células AGS pretratadas o incubadas simultáneamente con varias

concentraciones de *L. rhamnosus* UCO-25A ²⁰⁷. Por ello, con el objetivo de caracterizar la actividad anti *H. pylori* de *L. fermentum* UCO-979C en la presente tesis se evaluaron varias concentraciones de la cepa probiótica y su efecto en la adhesión de *H. pylori* en dos modelos experimentales: pre-incubación y co-incubación con la bacteria probiótica. Las dosis óptimas a evaluar en el presente trabajo (10^5 , 10^6 , 10^7 UFC/ml de *L. fermentum* UCO-979C y 10^7 UFC/ml de *H. pylori* 43504) fueron seleccionadas considerando la citotoxicidad evaluada por el porcentaje de LDH y la viabilidad mediante el método de MTT, posterior a la incubación con las bacterias probióticas y el patógeno, considerando tiempos de exposición de 24 horas con cada microorganismo (**Figura 1 y 3** Capítulo IV). Dosis más elevadas demostraron afectar la viabilidad celular, probablemente por la acidificación del medio por el ácido láctico liberado por la cepa UCO-979C.

Como se puede evidenciar en la **Figura 5** (Capítulo IV) no se observó diferencia significativa entre las dosis evaluadas respecto al porcentaje de adhesión de *H. pylori* en las células AGS ni sobre los niveles de TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 y MCP-1 en células infectadas, pero sí sobre los valores TGF- β , los cuales fueron significativamente superiores al control infectado cuando las células fueron pre-tratadas con 10^5 y 10^6 bacterias/ml. Sin embargo, todas las dosis evaluadas muestran una disminución en los valores de mediadores de la inflamación en células infectadas por *H. pylori*, de igual forma los estudios en el modelo murino (Capítulo V) confirman que la cepa tiene una actividad anti-inflamatoria en el contexto de la infección por *H. pylori* cuando los ratones recibieron 10^8 UFC/ml por vía oral. Esta evaluación es relevante, ya que se ha descrito que una cepa probiótica en diferentes dosis puede actuar como un agente inmunoestimulador o inmunoregulador y si no se usan en la dosis optima podría ser ineficaz e incluso perjudicial para el efecto terapéutico esperado ⁵⁶.

L. fermentum UCO-979C es capaz de inhibir la adhesión de *H. pylori* a células epiteliales gástricas y disminuir los niveles de citoquinas pro-inflamatorias incluso a la menor concentración evaluada 10^5 UFC/ml. La propiedad de esta cepa de ejercer un efecto beneficioso aún en bajas densidades ofrece una ventaja desde el punto de vista

biotecnológico ya que a bajas concentraciones la cepa demuestra un efecto inhibitorio en la colonización e inflamación por *H. pylori*, una ventaja sobre otras cepas estudiadas, por ejemplo, *L. gasseri* OLL2716 requiere concentraciones más altas 10^9 UFC/ml para inhibir la adhesión por *H. pylori* que las que necesita para inhibir la producción de IL-8 (10^6 UFC/ml) en células MKN45 ¹⁸².

La inflamación causada por *H. pylori* es generada por múltiples vías de señalización tanto de las células epiteliales gástricas, que son la primera línea de defensa del huésped contra este organismo, como de las células inmunes circulantes reclutadas en el sitio de la infección ¹⁵⁴. Los macrófagos son esenciales como respondedores innatos a los productos derivados de *H. pylori* y a las señales de las células epiteliales que están en contacto directo con la bacteria en la superficie de la mucosa ¹⁹⁸. Los macrófagos son reclutados hacia la mucosa gástrica donde contribuyen a la amplificación de la respuesta inflamatoria al producir IL- 1β , TNF- α e IL-6. Además, al sintetizar IL-12 son capaces de activar la respuesta inmune innata estimulando a las células Th1 e incrementando la producción local de citoquinas como IFN- γ ^{198,220}. La interacción de los macrófagos con *H. pylori* conduce a su activación y a la secreción de citoquinas y quimioquinas. Los macrófagos reconocen el LPS de *H. pylori* a través de TLR4, además que pueden ser activados por la ureasa y por Hsp60. El reconocimiento de *H. pylori* puede ser mediado por TLR2 o TLR4 ²²¹.

La función de los macrófagos está relacionada con su estado de polarización, los macrófagos M1 promueven la inmunidad Th1, mientras que los macrófagos M2 se inducen durante la fase de resolución de la inflamación y participan en la eliminación de desechos, remodelación tisular y promoción de la inmunidad Th2. La polarización de los macrófagos está dirigida por el microambiente. Los macrófagos M1 son inducidos por IFN- γ y productos microbianos como el lipopolisacárido. Por otro lado, los macrófagos M2 son inducidos por citoquinas Th2 o anti-inflamatorias y factores de crecimiento, incluidos IL-4, IL-10 y TGF- β ²²⁰. En ese sentido, las bacterias probióticas han demostrado modular la polarización de los macrófagos, activando macrófagos hacia el fenotipo M1

para eliminar patógenos intracelulares, mientras que otras inducen macrófagos M2 con actividad anti-inflamatoria ²²². *Bacillus amyloliquefaciens* SC06 ²²³, *Enterococcus faecalis* symbioflor-1 ²²⁴ y *L. bulgaricus* DTW1, demostraron inducir un fenotipo M1. *L. acidophilus* LA1 ²²⁵, *L. rhamnosus* GG, *L. rhamnosus* GR-1 ²²⁶ inducen macrófagos M2. Diferentes cepas probióticas pueden inducir diferentes fenotipos de acuerdo a las condiciones fisiológicas o patológicas como se ha reportado en el manejo de colitis y sepsis, pueden modular la polarización a macrófagos M2, para mejorar ciertas enfermedades inflamatorias mediante la regulación de las vías de señalización NF-κB, MAPK,PI3K/Akt y STAT ²²².

Las células THP-1 activadas con esteres de forbol se diferencian en células que imitan a los macrófagos nativos derivados de monocitos; proporcionando un modelo valioso para el estudio de la actividad de macrófagos en la respuesta del huésped ²²⁷. En el presente estudio se evaluó el efecto del tratamiento de los macrófagos con la cepa *L. fermentum* UCO-979C en la producción de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-12p40 e IFN-γ (Capítulo IV). La exposición de los macrófagos al probiótico demostró un aumento significativo en todas las citoquinas estudiadas. Podría sugerirse que este efecto puede favorecer la eliminación de microorganismos invasores y contribuir a activar la respuesta inmune adaptativa.

En el presente estudio *H. pylori* y el LPS aumentaron los niveles de TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-12p40 e IFN-γ, siendo más notable el efecto para el LPS de *E. coli*. Estudios previos han demostrado que el LPS de *H. pylori* es menos potente para activar el sistema inmunológico que el LPS de otras bacterias intestinales Gram negativas, esto puede explicarse por las diferencias estructurales entre las moléculas de lípido A de LPS de *H. pylori* y la presencia de antígenos del grupo sanguíneo Lewis en la cadena lateral de carbohidratos; se especula esto puede ser benéfico para la persistencia de la bacteria ²²⁸.

En el contexto de la infección por *H. pylori*, el pretratamiento con la cepa probiótica, disminuye los niveles de los mediadores inflamatorios TNF-α e IL-1β y

aumenta la producción de IL-10. Estudios previos describen que polimorfismos que dan como resultado niveles elevados de IL-1 β y TNF- α y niveles reducidos de IL-10 se han asociado con un mayor riesgo de gastritis atrófica y cáncer gástrico ²²¹, TNF- α e IL-1 β secretada por los macrófagos durante la infección por *H. pylori* han demostrado tener una importante contribución al desarrollo de tumores ²²⁹. En el caso de IL-1 β , ciertos polimorfismos pueden predisponer a las personas a desarrollar atrofia gástrica y cáncer gástrico al aumentar de la gravedad de la inflamación gástrica y una reducción de la secreción de ácido gástrico ^{221,230}, recientemente se ha destacado IL-1 β como uno de los mediadores centrales de la inflamación la mucosa gástrica asociada a la infección por *H. pylori* ²³¹, ya que induce la expresión de TNF- α , IL-2, IL-6, IL-12 y mediadores de la inflamación como ciclooxigenasa 2 e iNOS ²³². TNF- α es secretado principalmente por macrófagos activados, se encuentra ampliamente expresada en la mucosa gástrica de individuos infectados por *H. pylori* ²²⁹. La secreción aumentada de TNF- α se ha asociado con un nivel elevado de apoptosis, en el epitelio gástrico, disminución en la eliminación de las células apoptóticas por parte de los macrófagos, esto resulta en una liberación de componentes inflamatorios y autoantígenos que aumentan la inflamación gástrica ^{198,233–235}.

En contra parte, ratones IL10-/- infectados con *H. pylori* desarrollan gastritis más grave que los ratones que expresan IL-10, se sugiere que esta citoquina tiene un importante rol en la regulación negativa de la inflamación inducida por *H. pylori* aunque esto puede favorecer una colonización más eficiente por parte del microorganismo ²³⁶, al respecto, se ha demostrado la participación de macrófagos CD11b⁺ F4/80^{high}CD64⁺CX3CR1⁺ en la inducción de una respuesta regulatoria sobre las células T efectoras mediada por IL-10 que está relacionada con densidades altas de *H. pylori* en la mucosa gástrica ²³⁷, por lo que el rol de IL-10 en la infección por *H. pylori* es controversial. Igualmente discutido es el efecto de IFN- γ en la infección por *H. pylori*. Ratones con defectos en la expresión de IFN- γ infectados por *H. pylori*, desarrollan inflamación menos severa y tienen altos niveles de colonización gástrica; se ha demostrado que IFN- γ es crucial para el control de la infección y a la vez puede modular la severidad de la inflamación gástrica al activar a

los macrófagos para producir citoquinas pro-inflamatorias favoreciendo cambios preneoplásicos en la mucosa gástrica^{221,238}.

Aunque la mayor parte de estudios referentes a la inmunomodulación por parte de cepas probióticas en la infección por *H. pylori* evalúan el efecto en células epiteliales gástricas, se ha descrito el efecto anti-inflamatorio de algunas cepas sobre macrófagos. La producción de TNF- α e IL-6 en macrófagos (THP-1 y macrófagos derivados de monocitos) estimulados con *H. pylori* fue inhibida cuando fueron co-cultivados con la cepa de aislamiento gástrico *L. gasseri* Kx110A, la inmunomodulación está relacionada con una inhibición en la expresión de ADAM17²³⁹; a diferencia de nuestro estudio, *L. gasseri* no inhibe el crecimiento de *H. pylori* y la mayor actividad inmunomoduladora se observó cuando se empleó la dosis más alta de Kx110A, se evaluó el efecto del co-cultivo con la cepa probiótica y al realizar ensayos de pretratamiento, solo se inhibió TNF- α . En el mismo estudio se evaluó la actividad de *L. rhamnosus* GG, que mostró disminución en los niveles de TNF- α a las 8 horas de incubación con *H. pylori*²³⁹, estudios previos habían demostrado que al añadir medio condicionado de GG a células THP-1 tratadas con medio condicionado de *H. pylori*, disminuía la concentración de TNF- α , efecto que no se observaba al evaluar el efecto sobre medio condicionado de *E. coli*²⁴⁰. Otra cepa de origen gástrico fue caracterizada en nuestro laboratorio, *L. rhamnosus* UCO-25A, disminuye la secreción de TNF- α e IL-8 y aumenta la producción de IL-10 e IFN- γ en células infectadas con *H. pylori*, aunque demuestra un patrón no completamente anti-inflamatorio ya que al desafiar con LPS de *E. coli*, la cepa demuestra aumentar la secreción de IL-6²⁰⁷. El sobrenadante de cultivo de *L. acidophilus* ATCC4356 evaluado en macrófagos U937 infectados con *H. pylori*, mostró un aumento en la producción de IFN- γ en comparación con el control infectado²⁴¹, un hallazgo similar al observado con UCO-979C, los autores coinciden que esto puede tener un efecto benéfico en la respuesta frente a *H. pylori* al afectar la inducción de una respuesta Th1, sin embargo, la caracterización en nuestro estudio incluye el análisis de otras citoquinas. Los resultados de los estudios en macrófagos nos permiten plantear sugerir que la relación en la producción de TNF- α /IFN-

γ /IL-10 inducida por la cepa UCO-979C podría ofrecer ventajas en la protección contra la infección por *H. pylori* mejorando la eliminación del patógeno y a la vez, la protección contra daño inflamatorio, estas observaciones serán discutidas más adelante al analizar los resultados de la administración de la cepa en un modelo *in vivo* (Capítulo V).

Dentro de los mecanismos de evasión, *H. pylori* afecta la actividad microbicida de los macrófagos a través de varios mecanismos como expresión de la catalasa, bloqueando la producción de óxido nítrico mediada por la arginasa, inducción de la apoptosis en macrófagos ²⁴¹. Para complementar los hallazgos de la actividad inmunomoduladora de UCO-979C en macrófagos, podría evaluarse si estos mecanismos de evasión se pueden ver revertidos con la preincubación con la cepa probiótica.

El tratamiento con la cepa probiótica UCO-979C demostró modular las citoquinas en células THP-1 desafiadas con LPS de *E. coli* en macrófagos. Se observó una disminución significativa en los niveles de TNF- α e IL-1 β , y un aumento en la producción IFN- γ , IL-10 e IL-12. A diferencia de lo observado en el grupo tratado con UCO-979C e infectado con *H. pylori*, en las células tratadas con LPS hubo un aumento significativo en los niveles de la forma biológicamente activa IL-12 p70. La producción de IL-12 es necesaria para inducir la producción de IFN- γ por parte de las células NK, jugando un importante rol en la resistencia innata a la infección al activar las funciones bactericidas de los macrófagos ²⁴² aunque su producción desregulada (junto con IL-23 con quien comparte la subunidad p40) está relacionada con inflamación, por lo que se considera que sus niveles deben regularse para mantener la homeostasis en el huésped ²⁴³. Además, se observó una reducción en los niveles de IL-6. En conjunto con TNF- α e IL-1 β , la citoquina IL-6 ha demostrado ser una inductora de la inflamación ²⁴⁴. Sin embargo, IL-6 es una citoquina pleiotrópica, promueve la diferenciación y maduración de los linfocitos T y B, estimula la producción de inmunoglobulinas por parte de las células B, inhibe la secreción de citoquinas pro-inflamatorias como TNF- α e IL-1 β ²⁴⁵. Existe una clara diferencia en el efecto de *L. fermentum* UCO-979C sobre dos estímulos inflamatorios *H. pylori* y LPS de *E. coli*, lo que permite sugerir el estudio de las propiedades

inmunomoduladoras de la cepa en el contexto de otras enfermedades inflamatorias relacionadas con microorganismos Gram negativos como *E. coli*.

La actividad inmunomoduladora de los probióticos sobre la respuesta inflamatoria inducida por LPS en macrófagos ha sido ampliamente caracterizada con anterioridad. Dichos estudios permitieron arribar a la conclusión de que no todas las cepas probióticas ejercen la misma acción. Por ejemplo, el sobrenadante de cultivo de *L. rhamnosus* GG inhibe la producción de TNF- α inducida en macrófagos RAW 264-7 estimulados con LPS²⁴⁰. De Marco et al, estudiaron el efecto del tratamiento del SLC varias cepas probióticas (*L. acidophilus* ATCC4356, *Lactococcus lactis* ATCC 11454, *L. casei* ATCC 334, *L. reuteri* ATCC 5514, *Saccharomyces boulardii* ATCC MYA-796) en macrófagos derivados de monocitos obtenidos de PBMC. Todas las cepas evaluadas aumentaron significativamente los niveles de TNF- α , mientras que *L. casei*, *L. lactis* y *L. reuteri* aumentaron la producción de IL-6. Por otro lado, *L. lactis* y *L. reuteri* estimularon la producción de IL-1 β e IL-10 y no hubo efecto sobre la producción de TNF- α e IL-6 en células tratadas con SLC y desafiadas con LPS. Respecto a los niveles de IL-1 β , hubo aumento en las células tratadas con *L. lactis* y *L. reuteri* y disminución en las estimuladas con *L. acidophilus*. Finalmente todas las cepas produjeron un aumento en los niveles de IL-10 respecto al control desafiado con LPS²⁴⁶. En otro estudio, macrófagos RAW 264.7 fueron tratados con el SLC *L. reuteri* CRL1098, la cepa demostró aumentar TNF- α pero no indujo cambios en IL-6 e IL-10; tras la estimulación con LPS, las células pretratadas con *L. reuteri* mostraron una disminución en los niveles de TNF- α e IL-6 y un aumento de IL-10²⁴⁷. Aunque los hallazgos con las diversas cepas probióticas son muy diversos, autores coinciden en el rol central de IL-10 en las propiedades inmunomoduladoras de ciertas especies bacterianas, con un efecto en patologías crónicas como la colitis ulcerativa, la enfermedad intestinal crónica, enfermedad atópica, o controlar la inmunopatología en infecciones respiratorias²⁴⁷⁻²⁴⁹. En línea con los hallazgos de estudios previos, la cepa UCO-979C tiene capacidad de inducir la secreción de IL-10 en macrófagos en el contexto de dos estímulos inflamatorios (*H. pylori* y LPS de *E. coli*). Es clara la necesidad de identificar los mecanismos involucrados en esta actividad, confirmar

los hallazgos en modelos animales y estudios clínicos para lograr un uso racional de la cepa de acuerdo a su actividad.

Peña & Versalovic sugieren que la inhibición de la producción de TNF- α producida por *L. rhamnosus* GG puede ser secundaria a la interferencia con la activación de NF-kB, ya que otros genes regulados por NF-kB como IL-12 no están disminuidos y la producción de IL-10 no se ve afectada ²⁴⁰. En el presente estudio, el tratamiento con UCO-979C disminuye la expresión de TNF- α , IL-1 β e IL-6 en macrófagos desafiados con LPS, por lo que podríamos sugerir que una interferencia en la activación de NF-kB podría ser responsable del efecto de la cepa UCO-979C. El LPS bacteriano actúa a través de TLR4 activando la producción de citoquinas tipo 1 y tipo 2 a través de diferentes patrones cinéticos y de señalización; la producción de TNF- α es temprana, depende de MyD88, mientras que la producción de IL-4 es tardía, sostenida y requiere las vías TRAM y MyD88. Para caracterizar el mecanismo involucrado en la modulación de citoquinas en macrófagos, producto del tratamiento con *L. fermentum*- 979C sería relevante investigar las vías de señalización celular y su participación en el efecto observado.

En conclusión, en el Capítulo IV se demostró que la cepa UCO-979C tiene la habilidad de regular la respuesta inflamatoria gatillada por *H. pylori* en células epiteliales gástricas y macrófagos, donde también se demostró el efecto sobre la inflamación producida por el LPS de *E. coli*. Es relevante descifrar el mecanismo que produce el efecto, si UCO-979C actúa directamente en alguna vía de señalización o su efecto guarda relación con la inhibición del patógeno. Sin embargo, podemos sugerir que además de su actividad inhibitoria sobre *H. pylori*, *L. fermentum* UCO979-C ejerce un efecto directo sobre componentes de la respuesta inmune, ya que cuando las células se incuban con el probiótico (sin patógeno), se observa una modulación de las citoquinas. Además, el perfil anti- inflamatorio de citoquinas producido se observa también cuando células tratadas con UCO-979C son desafiadas con LPS de *E. coli*, por lo cual se puede sugerir una actividad anti-inflamatoria inespecífica. Con estos resultados presentados en el capítulo IV, se da cumplimiento al objetivo 1.

Efecto inmunomodulador de L. fermentum UCO-979C en la infección por H. pylori en un modelo animal

L. fermentum UCO-979C sobrevive a pH ácido, inhibe diferentes cepas de *H. pylori in vitro* y ha demostrado colonizar transitoriamente el estómago en gerbos de Mongolia ¹⁸⁶. Estos resultados son prometedores respecto al uso de la cepa en la infección por *H. pylori* en un modelo animal. Por otra parte, considerando los resultados previos respecto a su actividad inmunomoduladora en células epiteliales gástricas y macrófagos (Capítulo IV), el pretratamiento con la cepa probiótica podría generar un microambiente de citoquinas en la mucosa gastrointestinal que prepararía a las células ante un contacto con el patógeno, favoreciendo su eliminación y disminuyendo la respuesta inflamatoria responsable del daño gástrico. Por tal motivo, el estudio en el modelo animal se diseñó bajo un modelo de administración profiláctica (Capítulo V).

Varios estudios en modelos animales han evaluado el efecto de los probióticos sobre la respuesta inflamatoria en la mucosa gástrica producto de la infección por *H. pylori*. La administración de una mezcla de *L. rhamnosus* R0011 y *L. acidophilus* R0052 redujo la colonización por *H. pylori* y aminoró la inflamación gástrica inducida por el patógeno en ratones C57BL/6 ²⁵⁰. La administración de *L. casei* Shirota durante nueve meses a ratones C57BL/6 disminuyó los niveles de colonización, atenuó la gastritis y demostró una tendencia a la disminución de la IgG anti-*H. pylori* ²⁵¹. En un estudio clínico se administró *L. johnsonii* La1 durante 16 semanas en voluntarios positivos para *H. pylori* y se demostró que el tratamiento tuvo un efecto favorable disminuyendo el grado de inflamación gástrica y aumentando el grosor de la capa de mucus. Aunque ningún sujeto mostró erradicación de la infección, se observó una tendencia a la disminución de la infección aunque sin diferencias significativas entre los grupos. *L. johnsonii* La1 no inhibe la colonización de *H. pylori* en el modelo animal C57BL/6, sin embargo, los niveles séricos de MIP-2 (homólogo funcional murino de la IL-8 humana) mostraron un descenso significativo en el grupo tratado con el probiótico a la semana en las etapas tempranas de la infección. Se observaron también diferencias en los niveles de MIP-2 y KC en la

mucosa gástrica; y dichos hallazgos se correlacionaron con el estudio histopatológico donde se evidenció una menor infiltración neutrofílica y linfocítica en el grupo que recibió la cepa La1¹²⁷. Es importante destacar que *L. johnsonii* La1 disminuyó la infiltración de células inflamatorias en la mucosa gástrica, sin ejercer un efecto inhibitorio sobre la colonización por *H. pylori*^{127,158,179}.

El siguiente objetivo de este trabajo fue demostrar *in vivo* el efecto de *L. fermentum* UCO-979C en el contexto de la infección por *H. pylori*. Dichos estudios son de gran valor para complementar los hallazgos *in vitro* debido a que la cepa deberá atravesar las condiciones hostiles del tracto gastrointestinal conservando su la capacidad para modular las respuestas de células epiteliales e inmunes. Además, el estudio en modelo animal resulta valioso para analizar la respuesta inmune integral ya que considera la compleja interacción de la bacteria probiótica con otras células de la inmunidad y la microbiota, y las interacciones directas e indirectas que se llevan a cabo entre las células de huésped. Los estudios presentados en este trabajo de tesis demuestran que la administración oral de *L. fermentum* UCO-979C a ratones es capaz de incrementar su resistencia a la infección con *H. pylori* y de modular diferencialmente la respuesta inmunológica contra el patógeno. El test de la ureasa es un método indirecto para la detección de *H. pylori* en muestras de biopsias gástricas. La potente enzima ureasa del patógeno convierte la urea a amonio aumentando el pH del medio, el cambio de color indirectamente se relaciona con la presencia de *H. pylori*²⁵². El tratamiento con *L. fermentum* UCO-979C muestra una reducción en los recuentos de *H. pylori* que se correlaciona con una disminución en la actividad de la ureasa, mientras que la cepa *L. fermentum* CRL973 no demostró disminuir los recuentos del patógeno pero si la actividad ureasa. Ésta discordancia puede ser producto de la distribución heterogénea de la bacteria presente en la mucosa gástrica²⁵³, que se ha descrito como una causa de resultados falsos negativos en muestras de biopsias²⁵². Al respecto, dos o más biopsias gástricas mejoran la sensibilidad de la técnica²⁵⁴. De acuerdo a Ferrero et al, el cultivo microbiológico fue el método más sensible para la detección de *H. pylori* SS1 en ratones, seguido de la histología y el test de la ureasa. En nuestro estudio, no fue factible observar la presencia de *H. pylori* con la tinción

Hematoxilina eosina, aunque si hubo evidencia de la inflamación en los grupos infectados con *H. pylori*. Cabe destacar que en la rutina se recomienda realizar al menos dos tipos de tinciones para el diagnóstico ²⁵⁵. Por lo tanto, en el presente estudio, los resultados más relevantes comprenden los recuentos de *H. pylori* en biopsias gástricas y la reacción inflamatoria observada con diferente intensidad entre los grupos evaluados, demostrando un claro efecto beneficioso de la cepa probiótica UCO-979C. Resultados similares fueron reportados por Sgouras et al, quienes basaron sus conclusiones sobre el efecto de *L. casei* Shirota en los datos obtenidos del aislamiento cuantitativo, por las limitaciones de la evaluación histopatológica para detectar la presencia de estructuras bacterianas ²⁵¹. Sin embargo, los estudios histológicos fueron de gran utilidad para evaluar la infiltración de células inflamatorias.

Los estudios histopatológicos se complementaron con la evaluación de un panel amplio de citoquinas gástricas para revelar el papel inmunomodulador de la cepa UCO-979C en la infección por *H. pylori*. En este sentido, Zhang et al demostraron que ratones C57BL/6 tratados con *L. casei* L26 o *Bifidobacterium lactis* B94 disminuyeron los niveles de IL-1 β y aumentaron los niveles de IL-10. *B. lactis* B94 además aumentó los niveles de IL12-23p40 respecto al control infectado que no recibió probióticos ¹⁵⁸. En otro estudio, una mezcla de *L. acidophilus*, *B. longum* y *E. faecalis* fue suministrada a ratones infectados con *H. pylori*. La intervención redujo la secreción de TNF- α , IL-1 β , IL-10, IL-6, G-CSF y MIP-2 además de disminuir la sobreexpresión de TLR2, TLR4 y Myd88. En un modelo de ratas Sprague–Dawley infectadas con *H. pylori* la administración de *L. plantarum* XB7 condujo a una disminución de CINC-1 (homólogo de IL-8 en ratas) en estómago y suero y una reducción de TNF- α en suero. El tratamiento no demostró efecto sobre TNF- α a nivel gástrico ni sobre los niveles séricos o gástricos de IL-1 β ¹⁷⁸. Los tres ejemplos mostraron además una menor inflamación gástrica, aunque, sólo la administración de *L. plantarum* XB7 demostró una disminución en la colonización por *H. pylori*.

Los resultados del estudio *in vivo* de la cepa UCO-979C confirman los hallazgos *in vitro*, al demostrar que redujo los niveles de TNF- α , MIP-2 (en adelante IL-8) y MCP-1 en la mucosa gástrica y los niveles de TNF- α e IL-8 en el suero de ratones infectados con *H. pylori*. Además, el aumento de las concentraciones de IL-10 e IFN- γ en muestras gástricas y de suero se correlacionó con los hallazgos *in vitro* en macrófagos infectados con *H. pylori*. El equilibrio en la producción de citoquinas inflamatorias y reguladoras inducida por *L. fermentum* UCO-979C podría ofrecer ventajas en la protección frente a la infección por *H. pylori*, ya que si bien se observó un menor daño inflamatorio en el análisis histológico de muestras gástricas de ratones, no se vio favorecida la persistencia del patógeno, ya que hubo una disminución en la colonización. Esto puede ser producto del balance de citoquinas como IL-10 e IFN- γ . Resultaría de gran utilidad evaluar si dicho efecto se mantiene a largo plazo, y además identificar a las células responsables de la producción de dichas citoquinas. La caracterización de la actividad inmunomoduladora de la cepa UCO-979C también podría completarse mediante la evaluación la producción de otras citoquinas relevantes como IL-4, IL-17, IL-23 e IL-27. Estos son tópicos interesantes para futuras investigaciones.

En la mayor parte de estudios disponibles en la literatura donde se evalúa el efecto de cepas probióticas en la infección por *H. pylori* en modelos animales; la cepa probiótica se administra por un periodo extendido (3-9 meses) y se evalúa el efecto de los probióticos administrados después de la infección por *H. pylori*. Kuo et al evaluaron el efecto de un yogurt probiótico que contenía cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*. En dicho estudio, gerbos fueron infectados por *H. pylori* la semana 5 y se sacrificaron la semana 52. Distintos grupos de animales recibieron la cepa probiótica desde la 1° a la 4 semana (antes del desafío con *H. pylori*), entre la 5° y 8 semana, desde la semana 17 a la 52 o durante 52 semanas. Respecto a la reducción de la colonización por el patógeno, hubo diferencias significativas en los grupos con mayor tiempo de administración, sin embargo, respecto a la severidad de inflamación observada en la mucosa gástrica, no hubo diferencia significativa entre los grupos. El grupo con mayor tiempo de administración además

mostró reducción en la expresión de TNF- α y aumento en la expresión de IL-10 ²⁵⁶. En el presente estudio se evaluó un modelo profiláctico a corto plazo para evaluar el efecto de la cepa en las etapas iniciales de la infección, los resultados observados son prometedores ya que, no es necesaria una administración prolongada de UCO-979C para lograr un efecto anti-inflamatorio en la mucosa gástrica. No podemos asumir que el efecto a largo plazo tenga el mismo efecto, por ello, como proyección se propone evaluar el efecto por un periodo más extenso para poder evidenciar el efecto en la inflamación gástrica y colonización por el patógeno y estudiar la modulación de la respuesta inmune en un modelo infectado por *H. pylori* antes de iniciar la administración del probiótico.

Los resultados del estudio *in vivo* con *L. fermentum* UCO-979C durante etapas iniciales de la infección, permiten sugerir que puede atenuar la gastritis inducida por *H. pylori in vivo*, probablemente mediante la reducción de señales quimiotácticas. Los hallazgos no representan necesariamente que puede ocurrir en un estudio en humanos, donde una combinación de los efectos de la microbiota gástrica y el efecto por cepas clínicas pueda ofrecer variables adicionales al resultado de la infección y la intervención con una cepa probiótica determinada, pero los hallazgos son prometedores respecto a la capacidad anti inflamatoria de la cepa. En caso de llevar la administración de *L. fermentum* UCO-979C a un ensayo clínico y reproducir los efectos observados en el modelo animal (con una administración a largo plazo), el uso de esta cepa al igual que discuten Pantoflickova et al ²⁵⁷, sería relevante para mantener bajas densidades de colonización gástrica y evitar que la inflamación gástrica progrese a formas más graves de la enfermedad.

Con estos resultados se da cumplimiento con el Objetivo 2 planteado en este estudio. En conjunto, con los datos recopilados en los capítulos IV y V se acepta la Hipótesis I: *L. fermentum* UCO-979C modula beneficiosamente la respuesta inmune innata en la infección por *H. pylori*.

Rol del exopolisacárido de L. fermentum UCO-979C en la infección por H. pylori: estudio in vitro y en modelo animal

Algunos estudios han demostrado que cepas probióticas pueden ejercer efectos positivos en la inflamación producto de la infección por *H. pylori* a través de moléculas producidas y secretadas por las bacterias. Por ejemplo, el medio condicionado de *L. rhamnosus* GG disminuyó los valores de TNF- α en macrófagos peritoneales activados con medio condicionado de *Helicobacter* ²⁴⁰. Factores secretados por *L. plantarum* XB7 demostraron actividad anti-inflamatoria en células AGS infectadas con *H. pylori*, disminuyendo la producción de IL-8. Dicho efecto fue confirmado en ratas Sprague Dawley tratadas con la cepa ¹⁷⁸. *L. salivarius* B37 y B60 producen sustancias termoestables con diferente sensibilidad enzimática que inhiben la producción de IL-8 inducida por *H. pylori* en células AGS. La molécula inmunomoduladora producida por *L. salivarius* B37 es similar a un polisacárido mientras que la de B60 incluye múltiples componentes como glicoproteínas y lipoproteínas ¹⁹⁷. Marcial et al ²⁰⁵ demostraron que la cepa productora de EPS *S. thermophilus* CRL1190 regula la respuesta inflamatoria e inhibe la adhesión de *H. pylori* en células AGS. Estos estudios sugieren que los EPS producidos por las bacterias probióticas tendrían un papel relevante en la protección contra el patógeno.

Se ha descrito que algunos EPS producidos por bacterias ácido lácticas tienen propiedades inmunoestimulantes que dependen de su composición de azúcares, la longitud de cadena, el grado de ramificación, o el número de tipos de residuos de azúcares por el cual están conformados. Algunos han demostrado estar asociado a moléculas lipídicas o peptídicas. La actividad parece ser dependiente de la cepa ya que cada EPS, de acuerdo a su estructura química, puede inducir una respuesta inmune ²⁵⁸⁻²⁶⁰. Ciertas cepas inducen citoquinas inmunoestimulantes mientras que otros son más eficientes en suprimir respuestas inflamatorias ^{258,259}. Por ejemplo, la producción de un polisacárido de alto peso molecular por *L. casei* Shirota, disminuye la excesiva reacción inmune contra sus propios componentes estimuladores ²⁶¹. Por otro lado, la cepa productora de EPS *L.*

paraplantarum BGCG11 muestra un perfil inmunosupresor o anti-inflamatorio, mientras que cepas derivadas no productoras de EPS exhiben una respuesta pro-inflamatoria en PBMC ²⁶². *L. rhamnosus* KL37 induce la producción de citoquinas (TNF- α , IL-6 e IL-12) en macrófagos peritoneales murinos, produce desensitización de macrófagos y disminuye la producción de TNF- α después de la re-estimulación con EPS ²⁶³

Algunos estudios en modelos animales, han demostrado que el EPS producido por bacterias comensales o ciertas bacterias ácido lácticas aumentan la protección frente algunos patógenos ²⁶⁴. Por mencionar algunos, el polisacárido producido por *Bacteroides fragilis* protege de la colitis experimental inducida por *Helicobacter hepaticus*, al suprimir la producción del IL-17 y estimular la producción de IL-10 ²⁶⁵. Estudios han demostrado que el EPS producido por *L. delbrueckii* OLL1073R tiene la capacidad de mejorar la actividad antiviral a nivel del compartimiento respiratorio y sistémico al aumentar la producción de interferones tipo I y genes antivirales inducidos por IFN ^{266,267}. El EPS de *Bacillus subtilis* 3610 induce macrófagos con un fenotipo M2 y protege a los ratones de la colitis inducida por *Citrobacter rodentium* ²⁶⁸ y de la infección sistémica por *Staphylococcus aureus* ya que aumentan la producción de ROS y al tiempo limita la activación inflamatoria de células inmunes ²⁶⁹.

Al respecto, en ensayos previos, *L. fermentum* UCO-979C demostró gran capacidad de producir EPS (más que la reconocida cepa *L. casei* Shirota) y además una importante inhibición *in vitro* de la enzima ureasa y la adhesión de *H. pylori* ¹⁸⁷. Se relacionó la formación de biopelículas con la actividad inhibitoria frente al patógeno gástrico y se sugirió que el EPS puede participar de manera relevante en esta propiedad. Considerando estos antecedentes, en el presente trabajo se evaluó si el EPS aislado a partir de la cepa UCO-979C, tiene un efecto en su actividad inmunomoduladora (Capítulo V). Para ello se reprodujo la estrategia experimental planteada en el Capítulo IV, pero en este caso las células fueron tratadas con 100 μ g de EPS previo a la infección por *H. pylori*. Por la relevancia que tiene la actividad de los macrófagos en las etapas iniciales de la patogénesis gástrica, también se evaluó el efecto del tratamiento con EPS de UCO-979C.

El presente estudio sería el primero en demostrar la participación del EPS extraído de una bacteria probiótica, como molécula parcialmente responsable de la modulación de la respuesta inmune en la infección por *H. pylori*. Otros estudios relacionaban la modulación en la respuesta inmune con moléculas tipo polisacárido, o se relacionaba la actividad inmunomoduladora con la capacidad de la cepa para producir EPS. Resulta interesante evidenciar que el EPS de *L. fermentum* UCO-979C y *L. fermentum* CRL973 modulan el perfil de citoquinas basal en células AGS (aumenta TNF- α e IL-6, sin efecto sobre IL-8) y THP-1 (Aumentan IL-6, IL-10) respecto a las células que no reciben tratamiento. El EPS de UCO-979C además aumenta los niveles de IFN- γ . Esto puede tener un efecto estimulante/protector ante un desafío con microorganismos o agentes agresores.

El EPS de UCO-979C demostró modular el perfil de citoquinas de las células AGS y THP-1 en respuesta al desafío con *H. pylori*, disminuyó significativamente los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-8 en células AGS infectadas con *H. pylori*, de la misma forma que la incubación con células viables de UCO-979C (**Figura 1**). Sin embargo, el descenso en los niveles de citoquinas es más notable cuando hay pre-incubación con bacterias viables.

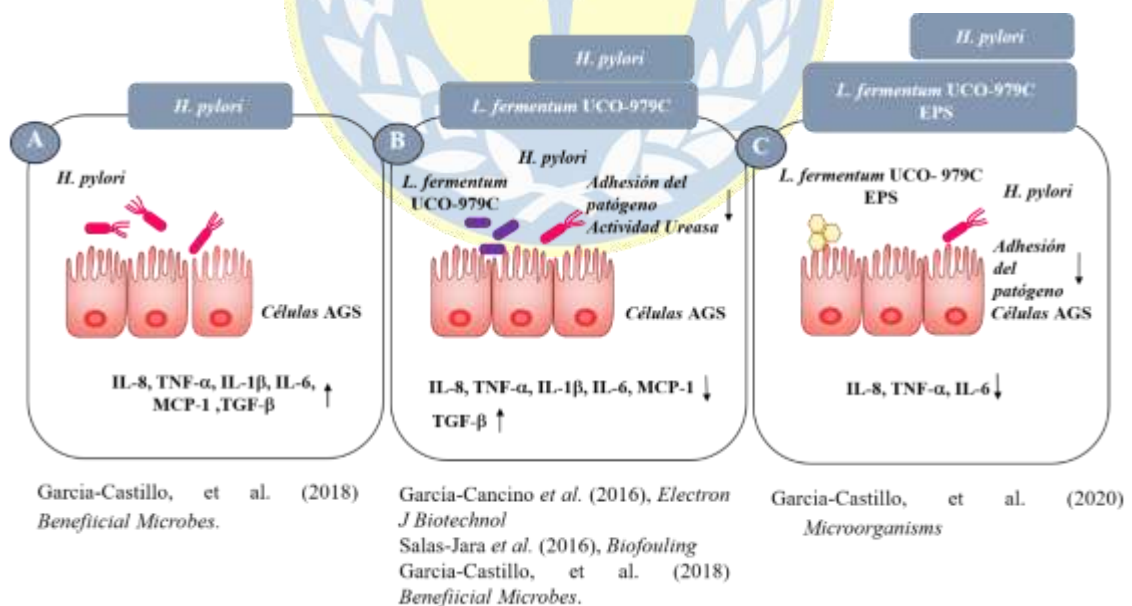


Figura 1. Respuesta inmune frente a la infección por *H. pylori* en células AGS (a). Efecto de *L. fermentum* UCO-979C viable (b), exopolisacárido (c), en la infección por *H. pylori* en células AGS. (Fuente: Elaboración propia)

Además, el EPS de UCO-979C disminuyó la producción de TNF- α e IL-6 en células THP-1 infectadas con *H. pylori*, sin efecto sobre la producción de IFN- γ e IL-10 a diferencia del efecto producido por las células viables, que produjo un importante efecto en los niveles de IFN- γ e IL-10 (**Figura 2**).

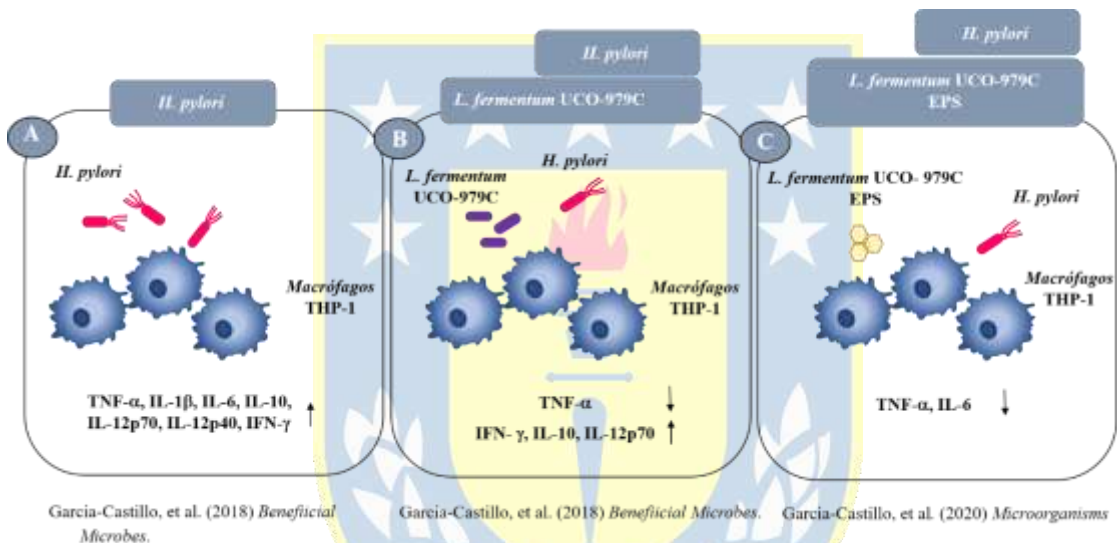
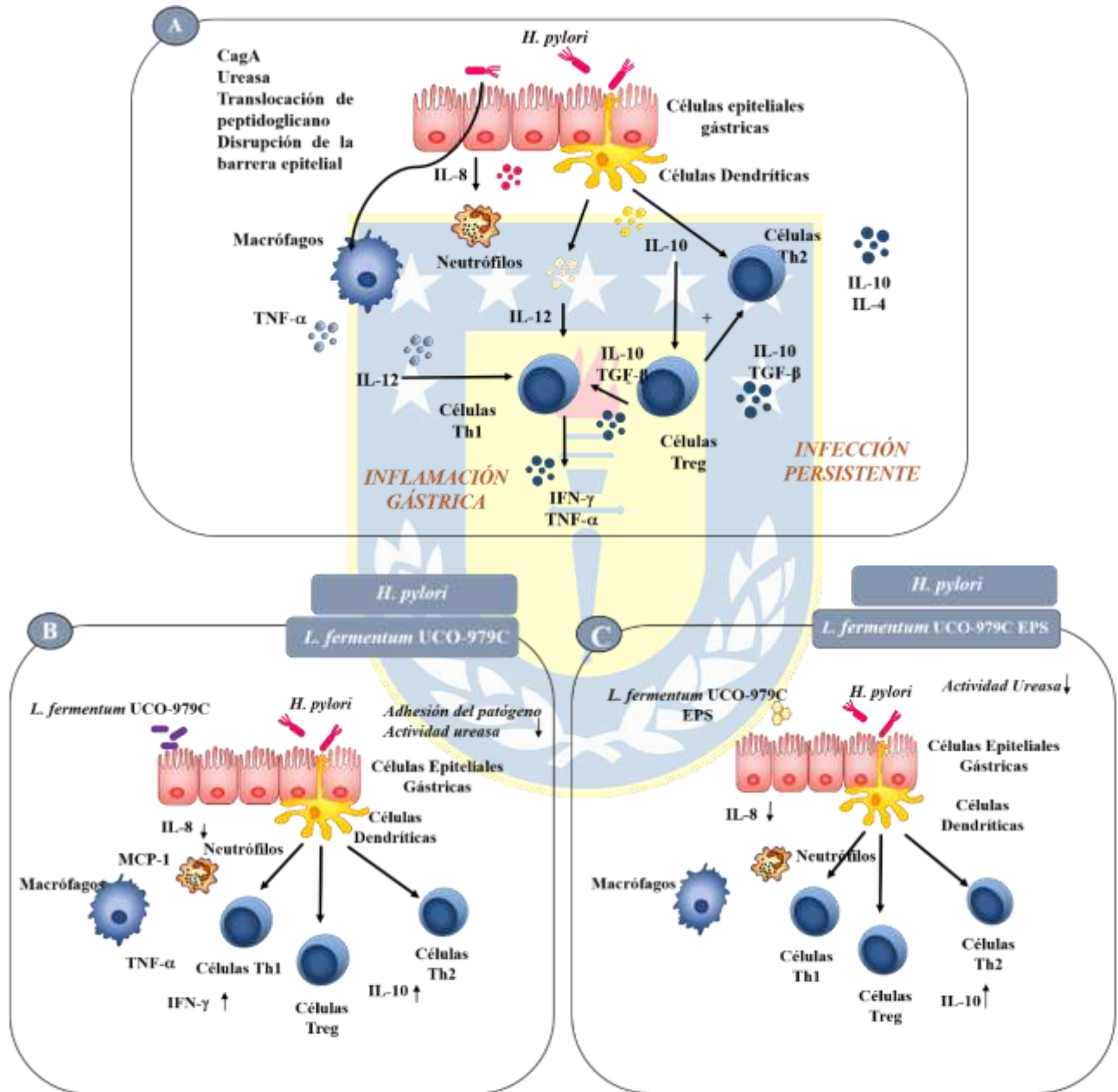


Figura 2. Respuesta inmune frente a la infección por *H. pylori* en macrófagos THP-1 (a). Efecto de *L. fermentum* UCO-979C viable (b), exopolisacárido (c), en la infección por *H. pylori* en macrófagos THP-1. (Fuente: Elaboración propia)

Los estudios *in vivo* de este trabajo demostraron que tanto *L. fermentum* UCO-979C como su EPS pudieron disminuir los niveles de IL-8 y aumentar IL-10 en la mucosa gástrica de ratones infectados. El EPS de UCO-979C no tuvo efecto sobre IFN- γ y TNF- α gástricos, algo similar a lo observado en células THP-1. Esta diferencia en la producción de IFN- γ podría estar relacionada con la incapacidad del EPS para reducir los recuentos de *H. pylori in vivo*. Estudios han demostrado que una insuficiente respuesta Th1 se asocia con una colonización bacteriana más alta, los niveles apropiados de IFN- γ se han asociado a protección contra la infección por *H. pylori*²⁷⁰.

Por otra parte, el EPS, afectó los niveles en suero de $TNF-\alpha$, probablemente este aumento está mediado por la interacción con otras células inmunes, probablemente en la mucosa intestinal, el efecto de la cepa sobre la mucosa intestinal se profundizará en el capítulo VI.



García-Castillo, et al. (2018) *Beneficial Microbes*.

García-Castillo, et al. (2020) *Microorganisms*.

Figura 3. Respuesta inmune frente a *H. pylori*. Efecto de *L. fermentum* UCO-979C viable (b), exopolisacárido (c) en la respuesta inmune local y sistémica en la infección por *H. pylori*. Modificado de Wilson & Crabtree ¹⁴⁹

En el contexto de la infección por *H. pylori*, el EPS de UCO-979C disminuyó significativamente la adhesión de *H. pylori* (~30%) a las células AGS, comparable con la actividad inhibidora de *L. fermentum* viable UCO-979C (~44%). El EPS de UCO-979C ejerce un efecto inhibitorio sobre *H. pylori* en células AGS, pero no es evidenciable en el modelo *in vivo*. Las diferencias observadas entre células viables y EPS de UCO-979C sobre los recuentos de *H. pylori* en los ensayos *in vitro* e *in vivo* nos permiten sugerir que probablemente el EPS produce un impedimento estérico para la adhesión del patógeno directamente sobre las células epiteliales gástricas (modelo celular) como ocurre con el exopolisacárido purificado de *L. plantarum* WLPL04 que inhibe la adhesión de *Escherichia coli* O157:H7 a células HT-29 ²⁷¹. El EPS de UCO-979C no tendría este efecto *in vivo* ya que la mucosa gástrica además está conformada por una capa de mucus y está colonizada por microorganismos comensales y estas barreras adicionales no permitirían un antagonismo directo. En comparación con el efecto de la cepa viva, algún mecanismo adicional que requiere células metabólicamente activas o un metabolito como el ácido láctico, podrían ser determinantes en un mayor efecto sobre la adhesión de *H. pylori* a la mucosa gástrica. Estas conclusiones son válidas si se considera que la disminución en la colonización es sólo producto en un mecanismo inhibitorio. Sin embargo, el hecho que en los modelos experimentales en los cuales no hay incremento de IFN- γ no hay disminución de la colonización, permiten sugerir que la capacidad de la cepa viable o su EPS en modular esta citoquina, tiene un efecto directo en la colonización por el patógeno. Esto respaldaría que la cepa cuenta con mecanismos complementarios inmunes y no inmunes para ejercer un efecto protector en la infección por *H. pylori*. Claramente, estudios con cepas mutantes para EPS, estudios en ratones IFN γ $-/-$ y análisis más detallados de la respuesta de células inmunes en la mucosa gástrica serían necesarios para respaldar esta teoría.

Podemos suponer que la disminución en los niveles de la quimioquina MIP-2 produjo una reducción en la infiltración leucocitaria en la mucosa gástrica, por lo que no sería evidente una reacción inflamatoria notable, a pesar que no hubo disminución en los recuentos de *H. pylori* en las muestras gástricas. Este efecto fue descrito por Yu et al ¹⁷⁹, quienes describieron que la administración de BIFICO mostró una disminución en la inflamación en la mucosa gástrica en ratones infectados con *H. pylori*, a pesar que BIFICO que no suprime la colonización por *H. pylori*, si disminuye MIP-2. Sin embargo, en el presente estudio no se realizaron análisis histopatológicos en los grupos que recibieron EPS previo a la infección por *H. pylori*, por lo que el efecto sobre este parámetro es desconocido.

Los ratones tratados con *L. fermentum* UCO-979C ó EPS UCO-979C mostraron valores similares de citoquinas y quimioquinas (salvo los niveles de IFN- γ). Esto puede apuntar a un rol del exopolisacárido en la respuesta inmune. En un estudio previo, células PBMC fueron estimuladas con concentraciones crecientes de EPS purificado de *L. paraplantarum* BGCG11, a medida que aumentaba la concentración, el perfil de citoquinas era similar al obtenido por la cepa probiótica productora de EPS ²⁶². En el presente estudio se evaluó el efecto de 100 ug/ml de EPS ya que esta concentración no demostró un efecto deletéreo sobre las líneas celulares, probablemente concentraciones superiores podrían favorecer la producción de IFN- γ , esto tendría que evaluarse en un modelo animal.

Para evaluar si los efectos inmunomoduladores de *L. fermentum* UCO-979C o su EPS en el contexto de la infección por *H. pylori* eran una propiedad específica de la cepa, los experimentos en este trabajo se realizaron en comparación con una cepa de la misma especie, que también es capaz de producir EPS. Aunque el EPS CRL973 fue capaz de reducir ligeramente la adhesión de *H. pylori* a las células AGS y disminuir la producción de IL-8 y TNF- α , ni la cepa CRL973 ni su EPS pudieron proteger contra el daño inflamatorio en ratones infectados. El EPS de CRL973 no fue capaz de inducir ningún efecto significativo en los perfiles de citoquinas de células THP-1 o muestras gástricas de

ratones infectados. Al respecto, se puede sugerir que el estudio de la modulación de citoquinas en macrófagos podría ser relevante en la selección de bacterias con actividad inmunomoduladora en la infección por *H. pylori*.

El resultado de los análisis inmunológicos realizados para evaluar el efecto de la administración de *L. fermentum* CRL973 viable y su EPS en ratones no muestra diferencias significativas en sus cifras, por lo que puede considerarse que el EPS sería el principal componente responsable de su efecto. Los estudios químicos, estructurales y genómicos que comparen las cepas UCO-979C y CRL973 y su EPS, así como su capacidad para interactuar con diferentes PRRs serían de gran importancia para avanzar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en el efecto inmunomodulador de UCO-979C. La composición química de los EPS ha demostrado ser determinante en la capacidad inmunomoduladora de estas macromoléculas. EPS con carga negativa (fosfato en su composición) y/o de pequeño tamaño, pueden actuar como estimuladores de diferentes células inmunes, mientras que EPS neutros y de gran tamaño (cerca de 10^6 Da) tienen un perfil supresor y pueden atenuar una respuesta excesiva²⁷², ayudando así a las bacterias probióticas a influir sobre la respuesta inmune del huésped.

El contenido de monosacáridos del EPS es un factor que afecta las propiedades anti-inflamatorias²⁷³. Una breve caracterización del EPS producido por la cepa *L. fermentum* UCO-979C se realizó en un estudio previo (sin publicar), donde los resultados de la cromatografía en capa fina sugieren que el EPS está compuesto por los azúcares ramnosa y manosa lo que indica que el EPS de la cepa *L. fermentum* UCO-979C corresponde a un heteropolisacárido formado por la polimerización de dos azúcares. Mediante un screening de la composición y la actividad sobre macrófagos RAW, Chen et al concluyó que la presencia de galactosa, ramnosa y glucosamina en el EPS, mejora el efecto anti-inflamatorio en macrófagos²⁷³. En el presente estudio no evaluamos el efecto del pretratamiento de macrófagos con EPS desafiados con LPS, sin embargo, se evidencia una actividad anti-inflamatoria en el modelo de infección por *H. pylori*. Además, la cepa viable demuestra una notable actividad anti-inflamatoria en macrófagos tratados con LPS,

por lo que podríamos sugerir que la composición del EPS en UCO-979C guarda relación con su perfil de actividad. Claramente es necesario purificar el EPS, determinar la composición monosacárida y profundizar en las proporciones molares de los diferentes azúcares.

Con el objetivo de comprender las diferencias en las respuestas producidas por las dos cepas de *L. fermentum*, se proyecta completar un análisis del clúster de EPS de las cepas *L. fermentum* UCO-979C y CRL973 en comparación con el de la cepa *L. fermentum* YL-11 (**Figura 4**). Al respecto, algunas genomas de *Lactobacillus* cuentan con un clúster de EPS único (como *L. johnsonii*) y otras especies como *L. plantarum* tienen varios clúster. En los clúster genéticos los primeros genes del clúster incluyen un regulador transcripcional, un módulo fosforegulador o una glicosil transferasa están presentes en un orden específico (epsABCDE). En otros clúster solo unos pocos de estos genes se ubican de la misma forma, mientras que en algunos clúster la organización de los genes es un mosaico²⁷⁴. En un análisis de 146 clúster de EPS de bacterias lácticas, solo 41 demostraron ser “genéricos”. Se observó que ninguno de los clúster de cepas nómadas era genérico y el 65% de los clúster de cepas adaptadas al huésped eran genéricos²⁷⁴. *L. fermentum* rara vez se encuentra en ecosistemas intestinales, frecuentemente es aislado de plantas y cereales fermentados; puede ser un ejemplo de una especie que experimenta una reversión del estilo de vida de huésped adaptado a vida libre⁴¹.

L. fermentum CRL973 (ATCC14931) fue aislado de remolacha fermentada. En su clúster de EPS (**Figura 5**) están presentes los genes que codifican para: regulador transcripcional LytR, determinante de longitud de cadena, fosfotirosin fosfatasa, tirosin kinasa, síntesis de azúcar UDP, glicosiltransferasas y flipasa. Aparentemente presenta una estructura “genérica”, probablemente relacionada con su adaptación al medio ambiente. Por su parte, *L. fermentum* UCO-979C fue aislado de una biopsia gástrica, su clúster no demuestra una organización clásica, lo que puede dar cuenta que puede encontrarse en diversos ambientes y tener mayor flexibilidad metabólica²⁷⁴. La reducción del genoma se correlaciona con la adaptación a un huésped, siendo más pequeño en huéspedes adaptados

comparado con especies nómadas y de vida libre ⁴¹. Con relación al tamaño del genoma, no existen diferencias notables en el tamaño del genoma de las dos cepas: el genoma publicado de CRL973 tiene 1797 kb mientras que el genoma de UCO-979C (con contigs ordenados mediante MeDuSa ²⁷⁵) es de 1978 kb por lo tanto, probablemente UCO-979C es una cepa nómada.

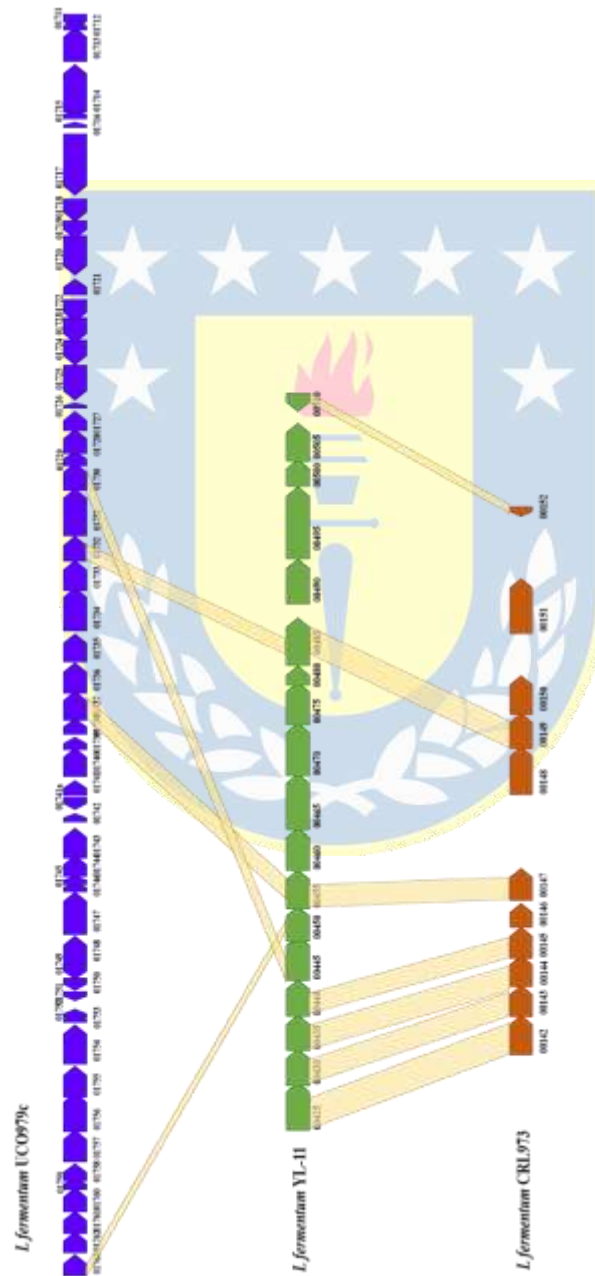


Figura 4. Clúster genético relacionado con la biosíntesis de EPS de *L. fermentum* UCO-979C y *L. fermentum* CRL973 comparado con el clúster de *L. fermentum* YL-11. Las líneas naranjas indican identidad entre los genes

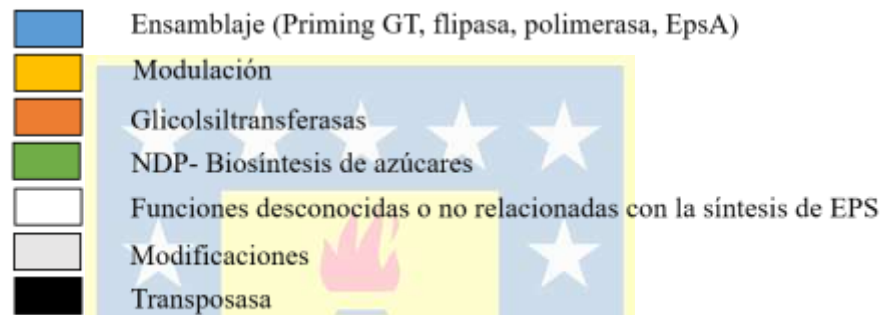


Figura 5. Clúster genético biosíntesis Eps *L. fermentum* CRL973.

En su clúster de EPS, *L. fermentum* UCO-979C (**Figura 6**) no presenta un clásico gen epsA, en su lugar al parecer la regulación es ejercida por un gen que codifica una proteína putativa regulatoria RecX. Además, el clúster presenta genes que participan en transferir el azúcar UDP al *lipid carrier*, genes con actividad tirosin kinasa, polimerasas, determinantes de longitud de cadena, flipasa, glicosiltransferasas, otras que participan en la biosíntesis y regulación del polisacárido, además de varias transposasas. Llama la atención la presencia de ciertos genes: por ejemplo, UCO979c_01757 codifica para una UDP galactopiranososa mutasa relacionada con la biosíntesis de galactofuranosa, un gen similar fue descrito en *L. rhamnosus* GG, relacionado con la presencia de residuos de galactofuranosa en su EPS ²⁷⁶. La galactofuranosa es esencial para la viabilidad de varios patógenos y no se observa en mamíferos ²⁷⁷, por lo que puede tener un importante rol en el reconocimiento por el sistema inmune. El gen UCO979c_01755 corresponde a una aciltransferasa relacionada con la producción de EPS acetilado, importante en las

interacciones huésped microorganismo ²⁷⁸. El gen UCO979c_01753 podría corresponder a una dextranucrasa, también presente en *L. fermentum* 222, indicando que la cepa es capaz de producir homopolisacáridos del tipo dextran ²⁷⁹ mientras que el gen UCO979c_01730 codifica para una dTDP-glucosa 4,6-dehidratasa, involucrada en la síntesis de ramnosa ²⁸⁰. Algunos genes presentes en el clúster no guardan relación con la síntesis de EPS, entre ellos algunos relacionados con la síntesis de peptidoglican, autolisinas, transportadores, proteínas hipotéticas y no caracterizadas. Organizaciones genéticas similares han sido descritas por Nissilä et al en aislamientos clínicos de *L. rhamnosus* ²⁸¹

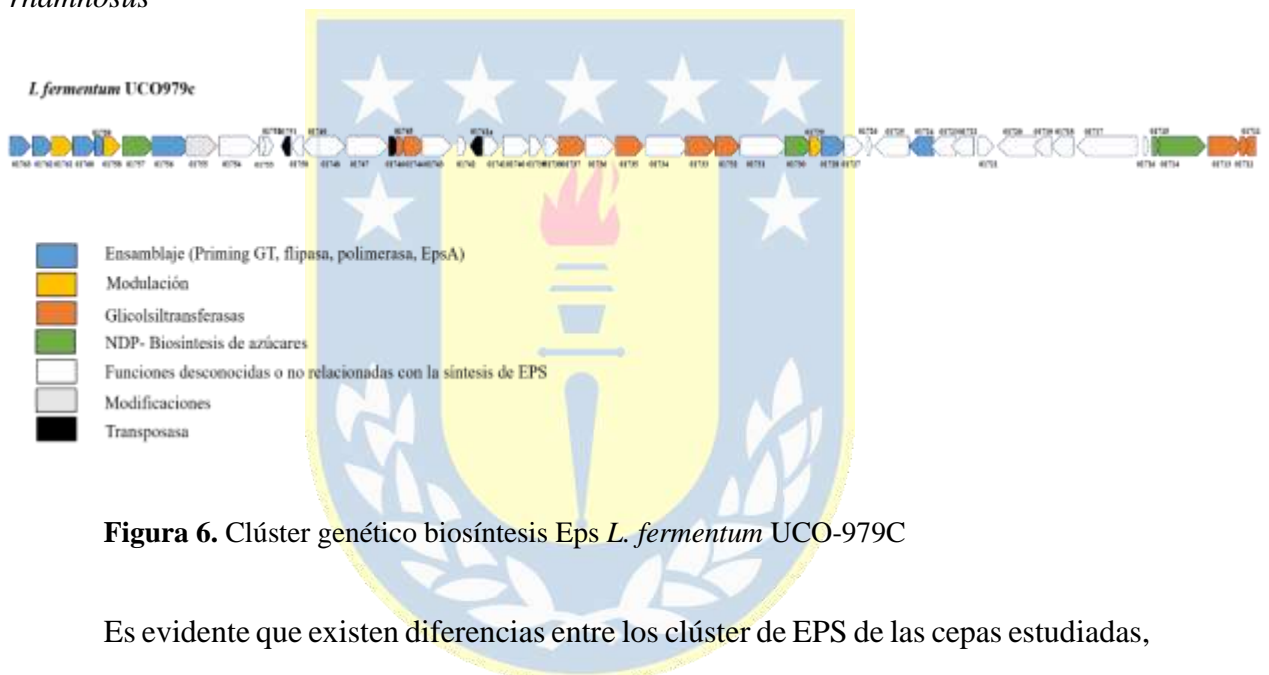


Figura 6. Clúster genético biosíntesis Eps *L. fermentum* UCO-979C

Es evidente que existen diferencias entre los clúster de EPS de las cepas estudiadas, La participación de estos genes en la producción de EPS, el efecto sobre características fenotípicas de la cepa y finalmente el resultado sobre la respuesta inmune, pueden ser evaluados mediante un análisis de delección de genes. Al respecto, Lee et al ²⁸², observaron diferencias en el transcriptoma, en la composición de los polisacáridos de superficie, características fenotípicas como resistencia al ácido, sales biliares, adherencia y propiedades inmunomoduladoras, de dos cepas de *L. plantarum* productoras de EPS: SF2A35B y Lp90; con sus hallazgos, los autores ratifican la importancia del EPS como un determinante cepa específico en la interacción con el hospedador.

Los PRRs involucrados en el reconocimiento de EPS sintetizados por probióticos han comenzado a ser caracterizados en los últimos años. Algunos heteropolímeros sintetizados por bifidobacterias o lactobacilos pueden ser reconocidos por TLR4³⁹. También se ha descrito que el reconocimiento de ciertos β -glucanos puede ocurrir por interacción con receptores de tipo lectina C²⁸². Para profundizar en la comprensión de la actividad inmunomoduladora de *L. fermentum* UCO-979C, resulta relevante definir los receptores que interactúan con el EPS para tener una mejor comprensión del mecanismo de acción. Lo que resulta claro es que el EPS, en combinación con otros componentes de superficie, contribuye en la actividad inmunomoduladora de UCO-979. Con los resultados presentados en el capítulo V, se da cumplimiento al Objetivo 3 del presente trabajo y se acepta la hipótesis: El exopolisacárido de *L. fermentum* UCO-979C tiene un efecto beneficioso en la infección por *H. pylori*.

Efecto de L. fermentum UCO-979C en células epiteliales intestinales porcinas y en la inmunidad intestinal y sistémica en un modelo murino.

Por mucho tiempo, sólo se reconocía que las células epiteliales intestinales participaban en la absorción durante la digestión, sin embargo, los estudios de la última década han demostrado que dichas células poseen múltiples funciones²⁸³. Lejos de ser sólo una barrera física inerte, las células epiteliales intestinales son cruciales en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, interactúan y se adaptan al ambiente cambiante a través del procesamiento simultáneo de la información biológica de los microorganismos entéricos y las señales derivadas del huésped^{283,284}. Los microorganismos comensales modulan la respuesta de las células inmunes en el intestino, de forma recíproca, las células inmunes interactúan con las células epiteliales intestinales para regular la colonización por microorganismos. Alteraciones en la composición de la microbiota, respuestas inmunes anormales, fallas en el control de los procesos inflamatorios a nivel de las células epiteliales han demostrado estar directamente relacionados con la patogénesis de varias enfermedades^{284,285}. Las células epiteliales intestinales reconocen y responden a los microorganismos presentes en el lumen intestinal

gracias a los PRRs que identifican los MAMPs, estos receptores incluyen los receptores NODs y TLRs ²⁸³. La unión de los TLRs con sus respectivos ligandos, inicia una cascada de señalización que conduce a la expresión y secreción de varias citoquinas y quimioquinas que ejercen un efecto sobre las células de la inmunidad presentes en las capas subyacentes de la mucosa intestinal ²⁸⁶. Los microorganismos probióticos y comensales pueden modular la función de las células epiteliales incluyendo efectos directos como la mejora en la función de barrera epitelial, producción de mucina, inducción de péptidos antimicrobianos, producción de proteínas del shock térmico, modulación de citoquinas pro-inflamatorias e inmunoreguladoras e interferencia con patógenos ⁸³. Al respecto existe un número creciente de estudios *in vivo* e *in vitro* del efecto de probióticos sobre células epiteliales intestinales ⁸³. Por ejemplo *S. cerevisiae* CNCM I-3856 inhibe la expresión de IL-6 e IL-8 inducida por ETEC en células IPEC-1, asociado a una disminución en la fosforilación de ERK1/2 y p38²⁸⁷. *L. rhamnosus* GG disminuyó la expresión de TNF- α e MIP-2 e indujo la expresión de la subunidad IL-10R2 del receptor de IL-10, relacionado con la activación de supresores de la activación de citoquinas (SOCS) dependiente de STAT3 ²⁸⁸. Por último *B. lactis* inhibe la activación de NF- κ B mediada por IL-1 β o TNF- α en células HT-29 bloqueando la degradación de I κ B α , además previene la colitis aguda inducida por DSS en ratones ²⁸⁹.

El sistema *in vitro* de células epiteliales intestinales porcinas (células PIE), ha demostrado ser útil para el estudio de la respuesta inflamatoria mediada por TLRs y el efecto de bacterias probióticas en dichas vías de señalización inducidas por la acción de PAMPs. Estos estudios *in vitro* han permitido la selección de microorganismos con actividad inmunomoduladora con efecto benéfico en enfermedades inflamatorias intestinales ²⁹⁰⁻²⁹². La señalización desregulada de TLR puede contribuir a la pérdida de tolerancia y resultar en daño tisular. Un ejemplo de ellos es el daño intestinal mediado por la respuesta inflamatoria desencadenada por la interacción entre LPS y TLR4. Los LPS presentes en las membranas externas de patógenos Gram negativos como *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) desencadenan la producción de mediadores pro-inflamatorios que conducen a inflamación y daño tisular ²⁹⁰. Un estudio transcriptómico en células PIE

permitió identificar un grupo de genes que pueden ser usados como potenciales biomarcadores para el screening y evaluación de nuevas cepas inmunobióticas con actividad anti-inflamatoria, para la prevención de desórdenes inflamatorios intestinales que incluyen: *CCL8*, *CXCL5*, *CXCL9*, *CXCL10*, *CXCL11*, *C1R*, *C1S*, *C3*, *CFB*, *F3* y *SAA2*¹⁰⁷.

En el presente estudio evaluamos si *L. fermentum* UCO-979C modifica el perfil de expresión de citoquinas y quimioquinas en células PIE, en comparación con la cepa *L. fermentum* CRL973, el efecto observado (**Figuras 1 y 2** Capítulo VI) confiere un perfil mixto anti-inflamatorio/estimulante a ambas cepas de *L. fermentum*, lo que difiere de lo observado previamente en *L. jensenii* TL2937, que exhibe un efecto completamente anti-inflamatorio¹⁰⁷.

Dentro de los parámetros evaluados, las quimioquinas ligando C-X-C, han demostrado tener un importante rol en la inflamación hacen parte de las quimioquinas inducibles que se secretan en respuesta a estímulos inflamatorios²⁹³. *CXCL10*, *CXCL9* y *CXCL11* se expresan diferencialmente en varias condiciones patológicas, por ejemplo en IBD. IFN- γ y TNF- α estimulan a las células epiteliales intestinales a secretar estas quimioquinas²⁹³. Los receptores de las quimioquinas han sido blanco para el diseño de drogas terapéuticas en varias enfermedades inflamatorias, sin embargo los resultados no han sido exitosos principalmente a los efectos adversos que están asociados a las múltiples funciones que dichos factores inmunológicos cumplen en el organismo²⁹³. Por ello, alternativas como la modulación de la respuesta inflamatoria mediante la administración oral de cepas inmunomoduladoras como *L. fermentum* UCO-979C son prometedoras. Al respecto, la administración *L. jensenii* TL2937 alivia la colitis inducida por Dextran sulfato de sodio (DSS) en ratones Balb/c, lo que se correlaciona con la disminución de las quimioquinas *CXCL4*, *CXCL5*, *CXCL9*, *CXCL10* en el análisis transcriptómico en células PIE tratadas con DSS²⁹⁴.

Por otra parte, se ha demostrado la presencia de proteínas del complemento en el tracto gastrointestinal de mamíferos, se han detectado proteínas como C2, C3, C4 y CFB

en la mucosa de humanos con enfermedades inflamatorias, sugiriendo que varias proteínas del complemento están presentes en la mucosa normal y que el sistema del complemento se activa durante condiciones inflamatorias ^{295,296}. Se sugiere que están presentes como un mecanismo temprano de defensa, siendo su principal rol la opsonización de microorganismos y la quimiotaxis de células del huésped ^{295,296}. Pocos estudios analizan el efecto de los probióticos sobre los componentes del complemento y la actividad es específica de la cepa. En este sentido, se observó que *B. breve* IPLA20004 aumentó la expresión de C3 en células HT29. Mientras que *L. jensenii* TL2937 y *L. fermentum* UCO-979C disminuyen su expresión ²⁹⁵. Llama la atención que en un estudio se demostró que la eliminación de la microbiota con penicilina, disminuyó la expresión de los genes de la vía del complemento, sugiriendo que la microbiota puede contribuir a la estimulación regulada del complemento ²⁹⁶. Estudios más detallados deben desarrollarse para una mejor comprensión del efecto de la administración de cepas probióticas sobre la expresión de genes del sistema del complemento en la mucosa intestinal en el contexto de enfermedades inflamatorias.

La respuesta pro-inflamatoria producto de la estimulación de los TLR debe ser precisa, respondiendo eficientemente frente a los peligros exógenos y endógenos y a la vez reestablecer el balance inmune para evitar una reacción patológica. Dentro de los mecanismos regulatorios se encuentran: reguladores extracelulares, proteínas regulatorias transmembranales (RP105, ST2L, SIGIRR, TRAILR), reguladores negativos de moléculas adaptadoras (MyD88 soluble, SARM, SOCS1), factores que afectan proteínas efectoras (IRAK-M, IRAK2, TRAF4, TOLLIP, A20, arrestinas 1,2, LIND, FLN29, CYLD, SHIP2) y moléculas que afectan factores de transcripción (Pin-2, PI3K, ATF3, Bcl3) ²³. Algunos estudios han evaluado el efecto de cepas probióticas sobre los reguladores negativos de los TLRs; por ejemplo, el SLC de *L. amylovorus* DSM 16698T disminuye IL-1 β e IL-8 inducido por ETEC mediante la inhibición de la vía de señalización de TLR4 en células Caco-2 y explantes de cerdo mediante la modulación de los reguladores negativos Tollip e IRAK-M ²⁹⁷. *L. casei* OLL2768 disminuye la expresión de IL-6, IL-8, IL-1 α y MCP-1 producto del desafío con ETEC a través de un efecto en la

activación de NF- κ B e inhibe la vía de señalización p38 en células epiteliales intestinales bovinas a través de la modulación de los reguladores negativos Bcl3 y Tollip ²⁹⁸. En estudios previos, *L. jensenii* TL2937 demostró disminuir la expresión de IL-6 e IL-8 en células PIE, en respuesta a LPS o ETEC al inhibir las vías de señalización NF- κ B y MAPK. Dicho efecto estuvo asociado al aumento de la expresión de los reguladores negativos MKP-1, A20 y Bcl3 ²⁹⁰. La inducción de reguladores negativos por parte de cepas probióticas tiene un impacto relevante en la homeostasis intestinal al evitar una respuesta inflamatoria sostenida.

Al respecto, en el presente estudio, *L. fermentum* UCO-979C aumentó los niveles de Bcl3 y SIGIRR y *L. fermentum* CRL973 aumentó la expresión de SIGIRR en células PIE desafiadas con ETEC en comparación con el control. Por otro lado, A20 e IRAK-M disminuyeron en el tratamiento con CRL973 mientras que Tollip y MKP-1 disminuyeron con UCO-979C. El efecto de cepas probióticas sobre pocos o múltiples reguladores negativos podría correlacionarse directamente con la intensidad de su efecto sobre la respuesta inflamatoria intestinal, como es evidente al comparar la actividad de UCO-979C y CRL973 con la de *L. jensenii* TL2937 (**Figura 10** Capítulo VI). La cepa UCO-979C disminuye la expresión de Tollip en células PIE, un efecto similar al observado con la administración de *L. reuteri* 100-23 en ratones libres de lactobacilos. La menor expresión de Tollip fue relacionada con una adecuada respuesta temprana al estímulo con microorganismos²⁹⁹. Por otro lado, células epiteliales intestinales deficientes en SIGIRR son más susceptibles a la inflamación intestinal dependiente de microorganismos comensales³⁰⁰. Por lo tanto, el aumento en su expresión producto del tratamiento con UCO-979C y CRL973, podría contribuir a la homeostasis intestinal. La disminución en la expresión de algunos reguladores negativos y el aumento en la expresión de otros, puede estar relacionada con la respuesta mixta pro/anti-inflamatoria que exhibe UCO-979C.

El efecto de *L. fermentum* UCO-979C en células PIE contrasta con los hallazgos previos en células AGS, donde se observó un neto efecto anti-inflamatorio en el contexto

de la infección por *H. pylori*. La cepa UCO-979C disminuyó la producción de IL-6 y MCP-1 en células epiteliales gástricas, mientras que en células epiteliales porcinas aumentó la expresión de IL-6 y MCP-2. Debe destacarse que existen diferencias metodológicas respecto al microorganismo que induce el estado inflamatorio. Por otra parte, en el estudio en células AGS se estudiaron los niveles de proteínas mientras que en células PIE se estudiaron los niveles de expresión de ARNm. De este modo, sería relevante complementar el estudio con la determinación de las citoquinas y quimioquinas mediante ELISA para confirmar este efecto. Por otra parte las diferencias observadas entre los modelos celulares confirman la importancia de no extrapolar la actividad observada por una cepa de un tejido a otro.

Cabe destacar, que *L. fermentum* UCO-979C no demuestra el mismo nivel de adherencia a las células epiteliales intestinales porcinas (PIE), que a células epiteliales gástricas de origen humano (AGS) en periodos de incubación de 24 horas (**Figura 7**). El recuento en placa menor a 3×10^6 UFC/ml; en células AGS y Caco-2, los valores de adhesión son del orden de 10^8 y 10^7 UFC/ml respectivamente, después de 24 horas de adhesión. Esto indicaría que puede haber componentes en las células epiteliales gástricas, ausentes en las células epiteliales intestinales, que definen esta diferencia, que es más notable en las células de origen porcino. La variabilidad en la actividad inmunomoduladora y la adhesión sería dependiente de una combinación de varias estructuras de superficie que actúan simultáneamente como el peptidoglicano, los exopolisacáridos, los ácidos lipoteicoicos y las adhesinas³⁰¹.

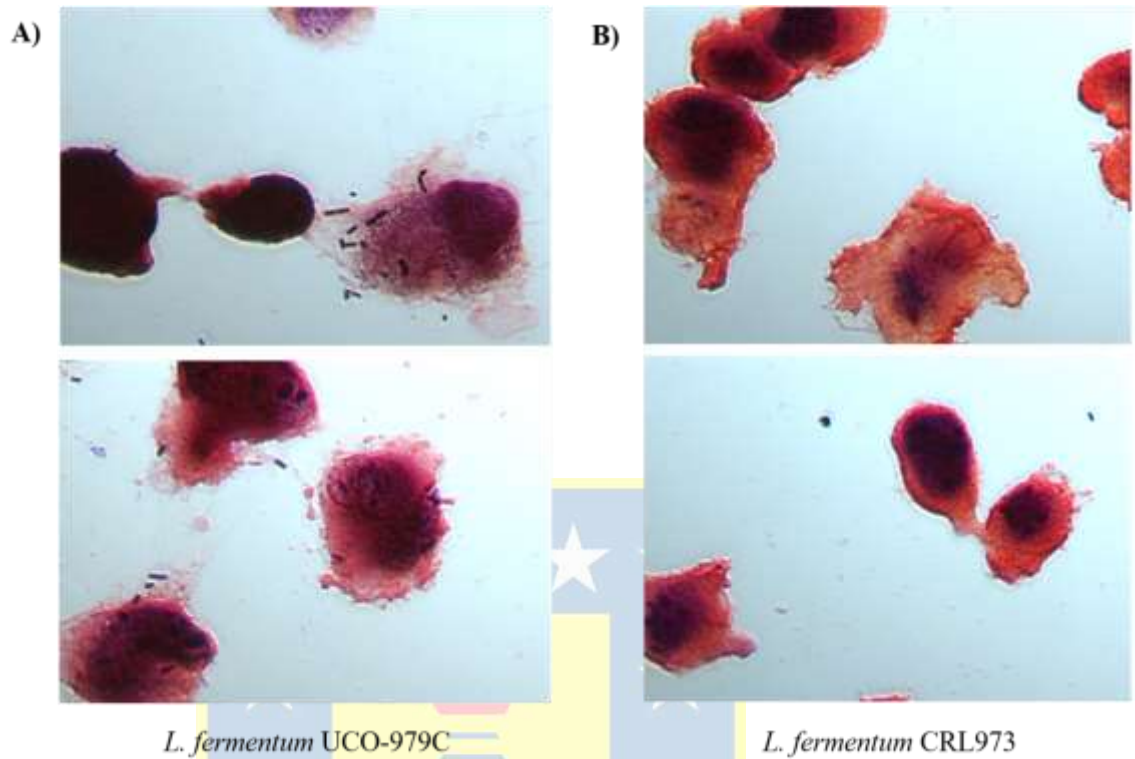


Figura 7. Adhesión de cepas de *L. fermentum* a células epiteliales intestinales porcinas. Células PIE tratadas con 5×10^8 UFC/ml A) *L. fermentum* UCO-979C, B) *L. fermentum* CRL973. Incubación 24 Horas. Observación microscópica 100X. (Fuente: Elaboración propia).

La relación adherencia/inmunomodulación es un tema controvertido. Algunos autores sugieren que una interacción más estrecha y prolongada entre las bacterias y la mucosa intestinal hace factible su contacto con células del GALT³⁰². Por otra parte, en un estudio funcional y genómico de varias cepas de *L. salivarius* aisladas del tracto intestinal porcino, se concluyó que no hay correlación entre la capacidad inmunomoduladora de las cepas, con su habilidad de adhesión a las mucinas y a células epiteliales, aunque la cepa *L. salivarius* FFIG58, destaca por sus propiedades adherentes en células PIE, además de modular la respuesta inmune gatillada por la activación de TLR3 y TLR4 en células PIE³⁰¹.

El estudio en células PIE demostró la habilidad de *L. fermentum* UCO-979C de modular la respuesta inflamatoria producto del desafío con ETEC. De esta forma se da cumplimiento al objetivo N°4 del presente trabajo. Sin embargo, el modelo *in vitro* no considera el efecto de las interacciones celulares tan diversas que ocurren en el epitelio intestinal; las células epiteliales intestinales pueden influenciar las células presentadoras de antígeno y los linfocitos en la mucosa intestinal ³⁰³. Por tal motivo, es necesario confirmar los hallazgos sobre las propiedades inmunomoduladoras a nivel intestinal en un modelo *in vivo*.

La IgA es un importante componente humoral de la respuesta inmune en mucosas. Las células B en la lámina propia se diferencian a células plasmáticas y secretan IgA dimérica, la cual es transportada hacia el lumen intestinal mediante un receptor en las células epiteliales. La IgA secretora, protege al huésped al capturar antígenos, evitando la entrada de oportunistas patógenos y toxinas, además de controlar la relación simbiótica comensal-huésped ^{23,304}. La IgA secretora es transportada a través de las células M en las placas de Peyer, gatillando respuestas inmunes locales y sistémicas, permitiendo a antígenos en el lumen tener acceso a células presentadoras de antígeno ³⁰⁵. Varios microorganismos probióticos han demostrado modular la secreción de IgA en el fluido intestinal y el número de células secretoras de IgA. Por ejemplo, la administración oral de *L. salivarius* CICC 23174 ó *L. plantarum* CGMCC 1557 por diez días aumentó los niveles de IgA intestinal en ratones Balb/c ³⁰⁶. *L. crispatus* KT-11 aumentó los niveles de IgA intestinal en ratones C3H/HeN tratados durante 5-10 semanas ³⁰⁷. *L. casei* Zhang demostró inducir respuesta inmune en la mucosa al aumentar la producción de IgA secretora, hasta por 30 días, los valores más altos se observaron al día 5, y los mejores resultados se observaron con la administración de la dosis más alta ³⁰⁸. En el presente estudio, la administración oral de *L. fermentum* UCO-979C aumentó los niveles de IgA intestinal, mientras que CRL973 no demostró diferencia significativa con el grupo control. Como es evidente en otros estudios, la dosis y el tiempo de evaluación son relevantes al analizar el efecto de una cepa sobre un parámetro de la respuesta inmune. Los resultados con UCO-979C resultan prometedores considerando que existe un efecto desde el día 2 de

administración; un estudio más prolongado sería valioso para evaluar por cuánto tiempo se mantiene la respuesta. El aumento de los niveles de IgA puede contribuir al aumento de la resistencia a infecciones gastrointestinales, como se ha evidenciado en estudios clínicos ^{110,309,310}. La administración oral de probióticos ha demostrado aumentar en número de células IgA⁺ en la lámina propia, bronquios y glándulas mamarias, respaldando que inducen el ciclo de IgA, refuerzan y mantienen la vigilancia inmunológica en mucosas distantes del intestino ³¹¹. Una proyección del presente trabajo incluye evaluar el efecto protector de IgA inducido por *L. fermentum* UCO-979C en el desafío con patógenos intestinales y en mucosas distantes.

Varias citoquinas son fundamentales para estimular la producción de IgA, incluyendo IL-4, TGF- β , IL-5, IL-6 e IL-10 ³⁰⁴. IL-6 promueve la diferenciación terminal de las células B en células plasmáticas, además, es capaz de polarizar células T CD4⁺ vírgenes a células efectoras Th2. La capacidad para inducir IL-6 en cepas de lactobacilos es consistente con el hallazgo general que muchas especies inducen IL-6 y mejoran las respuestas de IgA intestinal ³¹². IL-10 también estimula las células B y aumenta la producción de anticuerpos en células B activadas ³¹³. Al respecto, *L. fermentum* UCO-979C demostró aumentar los niveles de IL-6 en células PIE y como se discutirá más adelante, demostró un aumento en los números de células B maduras y un aumento en los niveles de IL-10, esto podría tener relación con el aumento de IgA intestinal.

Otro parámetro de la respuesta inmune que ha demostrado ser influenciado por el uso de probióticos es la actividad fagocítica ³¹⁴. La fagocitosis es la piedra angular de la respuesta inmune innata temprana y los mecanismos de defensa del huésped ³¹⁵; es el proceso mediante el cual las células fagocíticas, envuelven partículas extrañas, las procesan y pueden presentarlas como antígenos ³¹⁴. Los fagocitos liberan especies reactivas del oxígeno, enzimas líticas y quimioquinas que participan en el reclutamiento de células inmunes ³¹⁶. Algunos microorganismos probióticos modulan la fagocitosis y la función de los macrófagos. Por ejemplo, *L. plantarum* CGMCC 1.557, administrado por 20 días en ratones, aumentó la actividad fagocítica en macrófagos ³⁰⁶; la suplementación

de la dieta en con la bebida probiótica Dahi (*L. acidophilus* LaVK2 y *B. bifidum* BbVK3) durante cuatro meses, produjo una mejora en los índices fagocíticos y la producción de especies reactivas del oxígeno en los macrófagos peritoneales de ratones ancianos ³¹⁷. *L. rhamnosus* CRL1505, *L. plantarum* CRL1506 y *L. casei* CRL431 aumentan la actividad fagocítica y microbicida en macrófagos peritoneales ⁷⁶. El proceso de fagocitosis comprende varias etapas, que incluyen la internalización y el procesamiento por el endosoma. En el presente trabajo pudimos evidenciar el efecto en la capacidad *ex vivo* de los macrófagos peritoneales de fagocitar levaduras, expresado en porcentaje ³¹⁴ a la vez que se demuestra la capacidad de eliminar a los microorganismos fagocitados mediante el estallido respiratorio evaluado a través de la producción de anión superóxido O₂⁻ mediante la técnica NBT ³¹⁸. La administración oral de *L. fermentum* UCO-979C aumentó la actividad fagocítica de los macrófagos peritoneales en ratones Balb/c; además, UCO-979C y CRL973 mostraron aumentar el estallido respiratorio en macrófagos peritoneales. Cabe destacar, que este efecto se obtuvo tras la administración por 2 días de 10⁸ células/ml a diferencia de los estudios mencionados previamente, en los que se administra la bacteria por periodos más extensos, únicamente CRL431 fue administrada en un periodo similar, pero empleando un inóculo más alto. Esto demuestra que los tiempos de administración y las dosis deben ser evaluados particularmente para cada cepa.

Como se mencionó con anterioridad, la mayor parte de bacterias probióticas con actividad inmunomoduladora demuestran un efecto notable sobre las citoquinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 ⁷⁶. En el presente estudio se evaluó el efecto de la administración de UCO-979C en el perfil de citoquinas en suero y en fluido intestinal en ratones Balb/c; se administraron 1.5x10⁸ UFC/ratón/día de *L. fermentum* UCO-979C o *L. fermentum* CRL973 durante dos días en el agua de bebida. No hubo efecto sobre los niveles de TNF- α intestinales ni séricos, mientras que IL-10 a nivel sérico e intestinal e IFN- γ intestinal se vieron aumentados después del tratamiento con UCO-979C, por su parte, CRL973 no demostró ningún efecto en las citoquinas evaluadas. Es reconocido que las citoquinas producidas en el intestino delgado, producto de la estimulación con una cepa probiótica, pueden ser liberadas a circulación ⁷⁶. Este efecto es evidente en el presente estudio donde

los valores séricos se ven afectados por la administración de UCO-979C. Otros autores han descrito variaciones en las citoquinas intestinales y sistémicas, producto de la administración de cepas probióticas, coinciden con que el efecto inmunomodulador es dependiente de la cepa, lo que influye en la selección racional de las cepas probióticas de acuerdo a la actividad esperada ³¹⁹. *L. salivarius* CICC 23174 aumentó los niveles de IFN- γ en suero al día 20, *L. plantarum* CGMCC 1557 y *L. salivarius* CICC 23174 aumentaron los niveles séricos de IL-10 al día 10 de administración de 1×10^9 UFC/ratón/día. En otro estudio, *L. casei* CRL431, *L. plantarum* CRL1506, y *L. rhamnosus* CRL1505 estimulan la producción de TNF- α e IFN- γ en el intestino ⁷⁶. Nuestros resultados se correlacionan con estos estudios que muestran que cepas probióticas pueden estimular simultáneamente mediadores pro- y anti-inflamatorios ³⁰⁶.

En el contexto del desafío inflamatorio, otros estudios han evaluado el efecto de cepas probióticas. *L. rhamnosus* JL-1 fue administrado por 2 semanas en diferentes dosis (10^7 , 10^8 , 10^9) por vía intragástrica, en ratones Balb/c, y posteriormente fueron desafiados con LPS de *E. coli* O55:B5; los ratones que recibieron *L. rhamnosus* mostraron una disminución en la expresión de citoquinas pro inflamatorias IL-1 β , IL-6, TNF- α , siendo el resultado más significativo el observado en el grupo tratado con la dosis más alta, que se correlaciona con una disminución en el daño patológico inducido por el LPS ³²⁰. La administración de *L. casei* CRL 431, en ratones Balb/c antes y después de la infección por *Salmonella enterica* Typhimurium, disminuyó la severidad de la infección y mejoró la supervivencia de los animales, mostró disminución de los niveles de TNF- α y aumento de los valores IFN- γ , IL-6 and IL-10 en la lámina propia ³²¹. En el presente estudio, se evaluó el efecto del desafío intraperitoneal con LPS, los ratones que recibieron UCO-979C mostraron valores más bajos de TNF- α y un aumento en IFN- γ e IL-10 en suero y fluido intestinal, mientras que CRL973 sólo aumentó el valor de IFN- γ intestinal. La activación local del sistema inmune en la mucosa intestinal en los ratones tratados con *L. fermentum* UCO-979C puede explicar la respuesta favorable frente al desafío con LPS en el modelo *in vivo*.

Además, se evaluó el efecto de la administración del probiótico sobre poblaciones de células inmunes peritoneales e intestinales en ratones Balb/c. Se demostró que en el fluido peritoneal, UCO-979C produjo un aumento en el número de macrófagos residentes (F4/80⁺)³²² y de macrófagos activados (F4/80⁺MHC-II⁺)³²² respecto al control, no se observó efecto sobre los monocitos y neutrófilos inflamatorios (Ly6C/Gr1⁺ y Ly6C/Gr1⁺MHC-II⁺)³²³ (**Figura 7** Capítulo VI). Morhardt et al observaron que en estado homeostático, los principales productores de IL-10 en la mucosa intestinal son las células T CD4⁺ y los macrófagos³²⁴. Esto puede explicar los resultados del presente estudio donde se ven aumentados los niveles de IL-10, macrófagos peritoneales (células F4/80⁺), macrófagos activados (MHC-II F4/80⁺) y linfocitos CD3⁺CD4⁺, en los ratones tratados con UCO-979C. Sin embargo, debido a la diversidad de células inmunes que pueden producir IL-10 (células B, mastocitos, granulocitos, macrófagos, células dendríticas y subconjuntos de células T) sería relevante evaluar cuales poblaciones celulares participan en la producción de IL-10 y en la modulación de la respuesta producida por UCO-979C. El aumento en el número de macrófagos activados en las placas de Peyer, puede tener relación con los hallazgos previamente descritos de aumento en el estallido respiratorio en macrófagos peritoneales.

El aumento en los niveles de IFN- γ puede correlacionarse con un aumento en el número de células T CD3⁺CD4⁺ y CD3⁺CD8⁺, en conocimiento que esta citoquina es secretada predominantemente por linfocitos activados. También sería interesante evaluar la participación de otras poblaciones celulares como células $\gamma\delta$ y células NK que también están relacionadas con la producción de IFN- γ . Las células presentadoras de antígenos profesionales también participan en la secreción de IFN- γ sin embargo, no se observó efecto sobre las células dendríticas (CD11b⁺)³²⁵, células dendríticas activadas³²⁶ (CD11b⁺CD86⁺), macrófagos (F4/80⁺) pero si hubo un aumento en los macrófagos activados (F4/80⁺CD86⁺) respecto al control (**Figura 8** Capítulo VI). En otros estudios se describió el aumento en la expresión en moléculas co-estimuladoras en células dendríticas (CD86, CD80, CD40 y MHC-II) en células dendríticas derivadas de médula ósea co-cultivadas con una dosis alta de probióticos VSL#3, consistente con células dendríticas

más maduras ³²⁷, algo similar fue observado por Christensen et al, al incubar varias cepas probióticas con células dendríticas derivadas de médula ósea de ratón, todas las cepas aumentaron la expresión de MHC-II y CD86, siendo más eficientes aquellas cepas que además demostraron mayor capacidad de producir IL-12, demostrando diversidad en la capacidad de modular la activación de las células DC ³¹². Por otra parte, IL-10 previene la expresión de moléculas co-estimuladoras (CD80, CD86, MHC-II) ³²⁸, podría existir un loop negativo en la expresión de CD86 en las células CD11b⁺ debido al aumento en los niveles de IL-10, posterior a la administración de IL-10.

Las células dendríticas convencionales en ratones cDC1 son CD103⁺CD11b⁻, mientras que las cDC2 comprenden células CD103⁻CD11b⁺ y una población de CD103⁺CD11b⁺. Por lo tanto, son necesarios marcadores de superficie celular adicionales para definir la presencia de más subconjuntos de células dendríticas en las muestras obtenidas a partir de los ratones alimentados con UCO-979C, ya que colectivamente este grupo heterogéneo es el responsable de generar respuestas regulatorias y efectoras ³²⁹. Las células CD103⁺CD11b⁻ cDC son necesarias para la generación de células Treg inducibles en los nódulos linfoides mesentéricos posterior a la ingestión oral de antígenos proteicos, además son la principal fuente de IL-12 en el estado de equilibrio, (steady state) ³³⁰ (IL-12 induce a las células CD4⁺ a diferenciarse hacia Th1 ³³¹). Sería relevante evaluar las diferentes subpoblaciones de células dendríticas en las placas de Peyer y su participación en la polarización de la respuesta inmune posterior a la administración de UCO-979C, además complementar con el estudio de otras citoquinas como IL-12, IL-17, IL-4 y el efecto sobre otros subconjuntos de células T (Treg, Th17).

El efecto de las bacterias ácido lácticas en el desarrollo y función en GALT, no ha sido profundamente estudiada, se reconoce que la microbiota juega un rol esencial en el desarrollo de las células B en el GALT en mamíferos ³³². En una publicación reciente, se describe que la intervención con *L. rhamnosus* GG en ratones Balb/c promueve el desarrollo y maduración de los linfocitos B, mejora la capacidad de activación y presentación de antígenos de los linfocitos B, y regula la secreción de inmunoglobulina

por los linfocitos B³³². En línea con estos hallazgos, en el presente trabajo, se evaluaron las células B en las placas de Peyer. La administración de UCO-979C favoreció la aparición de células maduras B220⁺CD24^{low} y disminuyó la población de células inmaduras B220⁺CD24^{high}^{333–335}, en comparación con el grupo control (**Figura 9** Capítulo VI), esto sugiere que UCO-979C puede tener un efecto en la inmunidad humoral de los ratones, aunque sería necesario evaluar más marcadores y el efecto en otros compartimientos (Bazo, MLN, Médula ósea).

El estudio en ratones Balb/c demostró el efecto *L. fermentum* UCO-979C en la inmunidad intestinal y sistémica, dando cumplimiento al objetivo 5 del presente trabajo. Con los hallazgos en los estudios *in vitro* e *in vivo* a nivel intestinal presentados en el capítulo VI, se acepta la Hipótesis 3: *L. fermentum* UCO-979C, posee actividad inmunomoduladora evidenciable en modelos *in vitro* e *in vivo*.

Consideraciones generales y proyecciones del estudio de *L. fermentum* UCO-979C

Los resultados de la presente investigación respaldan la actividad inmunomoduladora de *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, con efecto a nivel gástrico, intestinal y sistémico. La cepa demuestra un importante efecto sobre la colonización y la respuesta inflamatoria producidos por el patógeno gástrico *H. pylori* y en patologías intestinales inflamatorias producto de la acción de patógenos Gram negativos como *E. coli*. Acorde a lo referido en la literatura, la actividad inmunomoduladora es dependiente de la cepa, existiendo diferencias significativas con la cepa tipo *L. fermentum* CRL973 (ATCC 14931).

Como se discutió previamente, la especificidad dependerá de variaciones sutiles en la estructura molecular de MAMPs en las cepas probióticas (modificaciones del exopolisacárido, expresión de ciertas lipoproteínas, liberación al medio de lipoproteínas, cantidad de ácido lipoteicoico y su estructura/modificación, producción exopolisacárido)²⁵. El género *Lactobacillus* es muy heterogéneo y se encuentran en

diversos hábitats por lo que sus habilidades biosintéticas son diversas ⁷³. Considerando la disponibilidad de secuencias genómicas de *Lactobacillus* con actividad inmunomoduladora, la genómica comparativa puede establecer una relación entre las diferencias en el genoma, e identificar genes y moléculas con funciones probióticas/inmunobióticas relevantes ²⁵. Estudios de este tipo han permitido identificar genes relevantes en las propiedades de adherencia y componentes de superficie en *L. plantarum* WCFS1 ³³⁶, *L. rhamnosus* GG ³³⁷, *L. fermentum* YL 11 ³³⁸, y *L. salivarius* FFIG 58 ³⁰¹ entre otros, relacionados con su actividad probiótica. Análisis transcriptómicos permiten correlacionar genes con funcionalidades específicas, ya que la expresión de ciertos genes en diferentes condiciones fisiológicas permite comprender la relación con el fenotipo ^{25,339}. Los genes seleccionados a través de estudios genómicos y transcriptómicos, requerirán verificación respecto a fenotipos específicos, que se podrán llevar a cabo a través de cepas modificadas genéticamente ²⁵. Por ejemplo, se realizó la comparación del efecto de la cepa wild type *L. plantarum* WCFS1 y su variante negativa para la D-Alaninación (*dltX-D*), en la respuesta de las células dendríticas y células T, demostrando la relación entre la inmunomodulación producida por la cepa y la D-alaninación de los ácidos teicóicos en la bacteria ³⁴⁰. En otro estudio se evaluó la participación del pili SpaCBA de *L. rhamnosus* GG en la interacción con macrófagos *in vitro*, a través de la comparación de la cepa wild type, con mutantes de superficie estableciendo un rol de los pili SpaCBA en la capacidad de adhesión a los macrófagos y la actividad de éstas células ³⁴¹. Mizuno et al, evaluaron la capacidad inmunomoduladora del EPS de *Streptococcus thermophilus* ST538, para ello desarrollaron cepas mutantes de *S. thermophilus* $\Delta epsB$ and $\Delta epsC$, demostrando la participación del EPS en la actividad antiviral de la cepa ³⁴².

Recientemente se ha descrito el potencial de varias cepas de *L. fermentum* con varios efectos benéficos en la salud y en la industria alimentaria ^{343,344}. Algunas cepas de *L. fermentum* demuestran actividad inmunomoduladora, dentro de las cuales podemos mencionar: *L. fermentum* ATCC14931 ³⁴⁵, HFB3 ³⁴⁶, NCDC 400 ³⁴⁷, L930BB ^{348,349}, LfQi6, CECT5716 ^{350,351}, Lf1 ^{352,353}, MCC 2760 ^{354,355}, Lf2 ³⁵⁶, F-6 ³⁵⁷. Además, algunas

de estas cepas son productoras de EPS. Considerando los hallazgos del presente estudio, donde podemos sugerir que el EPS de *L. fermentum* UCO-979C es parcialmente responsable de su actividad inmunomoduladora se proyecta completar un análisis genómico comparativo de 57 cepas de *L. fermentum* que incluye estudios filogenéticos, análisis del pangenoma, estudios de genómica comparativa, análisis de las características únicas del genoma de *L. fermentum* UCO-979C y en particular la comparación del clúster de su EPS con el de otras cepas de la misma especie con o sin actividad inmunomoduladora. Este estudio comparativo ofrecerá información adicional sobre genes únicos en UCO-979C que podrían estar relacionados con su función probiótica, con la proyección de analizar su efecto en la actividad inmunomoduladora. Dichos estudios serán complementados con la generación de mutantes de la cepa UCO-979C modificadas en sus genes de EPS.

Por otra parte, adicional a su actividad biológica, los exopolisacáridos han demostrado tener propiedades reológicas que los hacen útiles en la industria de alimentos como texturizantes ³⁵⁸. Al respecto, *L. fermentum* UCO-979C, demostró producción de EPS a altos índices de dilución, alcanzando concentraciones cercanas a 1 g/L, algo significativo en comparación con otras cepas¹⁸⁹, lo que hace a la cepa atractiva para el uso industrial. Se ha evaluado el efecto inmunomodulador empleando la administración de células viables. Si la cepa recibe algún tratamiento industrial (encapsulado, liofilización, etc) debe evaluarse que la cepa conserve la actividad durante el procesamiento y almacenamiento. Al respecto existe un estudio ³⁵⁹ de un helado que incorporó la cepa UCO-979C probiótica en distintas bases de helado, y se demostró que la bacteria mantiene la capacidad de inducir TGF- β en células AGS, aunque en menor proporción que la cepa liofilizada. También se observó que la cepa en dichas condiciones fue capaz de inhibir *in vitro* a *H. pylori* lo que respalda que la cepa mantiene su actividad, luego de la liofilización e incorporación en un alimento funcional. Por otra parte, se ha descrito que los exopolisacáridos pueden servir como sustratos fermentables (prebióticos) para otros microorganismos ²⁷². Por ello sería interesante estudiar el efecto del EPS de UCO-979C

sobre la microbiota intestinal, actividad que podría complementar su efecto inmunomodulador.

La cepa *L. fermentum* UCO-979C, resulta prometedora para prevenir infecciones por patógenos gástricos e intestinales no solo por su actividad inmunomoduladora. En estudios previos no publicados, se demostró la capacidad de UCO-979C de inhibir patógenos como: *E. coli* 0157:H7, *E. coli* ATCC 25922, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Salmonella thyphimurium* y *Listeria monocytogenes*, principalmente mediante la producción de ácido láctico. Un estudio interesante para el futuro inmediato sería la evaluación *in vivo* de la actividad de la cepa UCO-979c sobre las infecciones producidas por dichos microorganismos patógenos y la relación con la modulación de la respuesta inmune.

Por otra parte, el presente estudio evaluó el efecto de *L. fermentum* UCO-979C en el contexto de la infección por *H. pylori*, en un modelo profiláctico, en animales adultos, que reciben un esquema corto de administración de probiótico. Sería relevante estudiar el efecto de la administración de UCO-979C en un modelo animal previamente infectado por *H. pylori*. Además por otra parte sería de interés evaluar el efecto a largo plazo de la administración de la cepa UCO-979C respecto a la colonización y el efecto en la respuesta inflamatoria a nivel gástrico. De acuerdo a la literatura, la infección por *H. pylori* ocurre en la infancia temprana; se han descrito diferencias respecto a la respuesta inmune frente a *H. pylori* en niños y en adultos, con menores niveles de inflamación en la infancia, que probablemente pueden jugar un rol en la persistencia de la infección. La selección del modo de administración va a depender si se pretende erradicar el microorganismo en etapas temprana o si se busca disminuir el efecto inflamatorio en individuos ya infectados. Por lo tanto, también sería relevante estudiar el efecto profiláctico de la administración de la cepa en una etapa temprana en un modelo de infección infantil, para revelar el potencial efecto y poder seleccionar el mejor modo de administración. Posterior a ello, la siguiente etapa exige un estudio preliminar en humanos para validar el efecto.



1. La cepa probiótica *Lactobacillus fermentum* UCO-979C tiene una notable actividad inhibitoria *in vitro* sobre el patógeno gástrico *Helicobacter pylori*, disminuye la adhesión a células epiteliales gástricas (AGS). Además, *L. fermentum* UCO-979C tiene la habilidad de modular la producción de citoquinas y quimioquinas en células epiteliales gástricas y macrófagos en el contexto de la infección por *H. pylori*. La cepa UCO-979C reduce la producción de factores pro-inflamatorios y aumenta citoquinas inmunorreguladoras como TGF- β en células AGS. Además, incrementa IFN- γ en macrófagos desafiados con *H. pylori*, lo que indica un notable efecto inmunomodulador.

2. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C ejerce actividad inhibitoria sobre *H. pylori* en un modelo *in vivo* de infección. Ratones suizos tratados con *L. fermentum* UCO-979C mostraron valores gástricos y séricos más bajos de TNF- α , IL-8 y MCP-1, y valores más altos de IFN- γ e IL-10 que los ratones infectados controles. Los estudios histológicos mostraron que la cepa disminuye el daño al tejido gástrico y la infiltración de células inflamatorias.

3. El exopolisacárido de *L. fermentum* UCO-979C disminuye la adhesión de *H. pylori* en células AGS. Además, reduce los niveles de TNF- α , IL-6 e IL-8 en células AGS y de TNF- α e IL-6 en células THP-1 infectadas con *H. pylori*. La cepa UCO-979C también redujo los niveles de IL-8 y aumentó los niveles de IL-10 en la mucosa gástrica de ratones suizos infectados por *H. pylori*.

4. *Lactobacillus fermentum* UCO-979C modula la expresión de citoquinas, quimioquinas, factores del complemento y de la coagulación en células epiteliales intestinales porcinas desafiadas con ETEC. Algunos factores inflamatorios como CXCL8, CXCL9, CXCL10, CXCL11, C1S y C3 disminuyeron en las células tratadas con la bacteria probiótica y otros como IL-6, CCL8, C1R y CFB aumentaron su expresión. La respuesta inflamatoria es modulada por cambios en la expresión de los reguladores negativos SIGIRR y Bcl3.

5. La administración oral de *Lactobacillus fermentum* UCO-979C a ratones Balb/c modula la respuesta inmune intestinal en diferentes niveles: aumenta la IgA y las células B maduras en placas de Peyer. También demuestra un efecto sobre la fagocitosis, el estallido respiratorio en macrófagos peritoneales y el porcentaje de macrófagos peritoneales activados. Por otra parte, aumenta el porcentaje de ciertas poblaciones celulares como linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ en placas de Peyer, lo que guarda correlación con el aumento de IFN- γ a nivel intestinal. Además, aumenta los niveles intestinales y sistémicos de IFN- γ e IL-10 y disminuye TNF- α en ratones desafiados con LPS.

6. La cepa *L. fermentum* UCO-979C, posee propiedades inmunomoduladoras relevantes, que la hacen candidata a ser evaluada en estudios clínicos, para el manejo de enfermedades inflamatorias producidas por patógenos Gram negativos.

7. La actividad inmunomoduladora de *L. fermentum* UCO-979C es intrínseca a la cepa y no es compartida por otras cepas de la misma especie.

8. El exopolisacárido de *L. fermentum* UCO-979C posee un papel relevante en su capacidad inmunomoduladora, aunque no es posible descartar que otras estructuras o factores bacterianos también intervengan en su interacción beneficiosa con el sistema inmunológico del huésped.

9. Considerando las propiedades inmunomoduladoras demostradas en el presente estudio, el exopolisacárido de *L. fermentum* UCO-979C tiene potenciales aplicaciones en la industria de los alimentos. Es necesario profundizar en su purificación, caracterización química y funcional y estudiar mutantes de la cepa para genes relacionados con la biosíntesis del polisacárido, que permitan establecer relación con su actividad.

The logo of the University of the Republic of Chile is a shield-shaped emblem. It features a blue background with five white stars in a horizontal row at the top. Below the stars is a yellow shield containing a blue torch with a pink and red flame. The entire shield is surrounded by a white laurel wreath. The text "REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS" is overlaid on the center of the logo in a bold, black, serif font.

**REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

1. Esser, D. et al. Functions of the Microbiota for the Physiology of Animal Metaorganisms. *J. Innate Immun.* **11**, 393–404 (2019).
2. Wang, S. et al. Rational use of prebiotics for gut microbiota alterations: Specific bacterial phylotypes and related mechanisms. *J. Funct. Foods* **66**, (2020).
3. Bultman, S. J. Emerging roles of the microbiome in cancer. *Carcinogenesis* **35**, 249–255 (2014).
4. Schippa, S. & Conte, M. P. Dysbiotic events in gut microbiota: Impact on human health. *Nutrients* **6**, 5786–5805 (2014).
5. Kamada, N. & Nunez, G. Role of the Gut Microbiota in the Development and Function of Lymphoid Cells. *J. Immunol.* **190**, 1389–1395 (2013).
6. Giorgetti, G. M. et al. Interactions between Innate Immunity, Microbiota, and Probiotics. *J. Immunol. Res.* **2015**, (2015).
7. Wang, B., Yao, M., Lv, L., Ling, Z. & Li, L. The Human Microbiota in Health and Disease. *Engineering* **3**, 71–82 (2017).
8. Schwabe, R. F. & Jobin, C. The microbiome and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **13**, 800–812 (2013).
9. D'Argenio, V. & Salvatore, F. The role of the gut microbiome in the healthy adult status. *Clin. Chim. Acta.* **451**, 97–102 (2015).
10. Oh, J. & Unutmaz, D. Immune cells for microbiota surveillance. *Science* **366**, 419–420 (2019).
11. Ash, C. Prospecting for drugs in the microbiome. *Science* **366**, 1324–1326 (2019).
12. Indira, M., Venkateswarulu, T. C., Abraham Peele, K., Nazneen Bobby, M. & Krupanidhi, S. Bioactive molecules of probiotic bacteria and their mechanism of action: a review. *3 Biotech* **9**, (2019).
13. Isolauri, E., Kirjavainen, P. V & Salminen, S. Probiotics: a role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *J. Rheumatol.* 54–59 (2002). doi:10.1136/gut.50.suppl
14. Dhiman, R. K. et al. Probiotic VSL#3 reduces liver disease severity and hospitalization in patients with cirrhosis: A randomized, controlled trial. *Gastroenterology* **147**, 1327–1337 (2014).
15. Fujiya, M., Ueno, N. & Kohgo, Y. Probiotic treatments for induction and maintenance of remission in inflammatory bowel diseases: A meta-analysis of randomized controlled trials. *Clin. J. Gastroenterol.* **7**, 1–13 (2014).
16. Ford, A. C. et al. Efficacy of prebiotics, probiotics, and synbiotics in irritable bowel syndrome and chronic idiopathic constipation: systematic review and meta-

- analysis. *Am. J. Gastroenterol.* **109**, 1547–1562 (2014).
17. Guo, Q., Goldenberg, J. Z., Humphrey, C., El Dib, R. & Johnston, B. C. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst. Rev.* **4**, (2019).
 18. Trush, E. A. et al. The Evolution of Human Probiotics: Challenges and Prospects. *Probiotics Antimicrob. Proteins* (2020). doi:10.1007/s12602-019-09628-4
 19. Martín, R. & Langella, P. Emerging health concepts in the probiotics field: Streamlining the definitions. *Front. Microbiol.* **10**, (2019).
 20. Lauzon, H. L., Dimitroglou, A., Merrifield, D. L., Ringø, E. & Davies, S. J. Probiotics and Prebiotics: Concepts, Definitions and History. in *Aquaculture Nutrition* 169–184 (2014). doi:10.1002/9781118897263.ch7
 21. Wieërs, G. et al. How Probiotics Affect the Microbiota. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **9**, (2020).
 22. Chugh, B. & Kamal-Eldin, A. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. *Curr. Opin. Food Sci.* **32**, (2020).
 23. Kemgang, T. S., Kapila, S., Shanmugam, V. P. & Kapila, R. Cross-talk between probiotic lactobacilli and host immune system. *J. Appl. Microbiol.* **117**, 303–319 (2014).
 24. Anukam, K. C. & Reid, G. Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff 's observation. *Commun. Curr. Reserach Educ. Top. Trends Appl. Microbiol.* 466–473 (2007).
 25. Lee, I. C., Tomita, S., Kleerebezem, M. & Bron, P. A. The quest for probiotic effector molecules - Unraveling strain specificity at the molecular level. *Pharmacol. Res.* **69**, 61–74 (2013).
 26. Gasbarrini, G., Bonvicini, F. & Gramenzi, A. Probiotics History. *J. Clin. Gastroenterol.* **50**, S116-119 (2016).
 27. FAO/WHO Working Group. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 1–11 (2002).
 28. Hill, C. et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 506–514 (2014).
 29. Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S., Gomez-Llorente, C. & Gil, A. Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition and Metabolism* **61**, 160–174 (2012).
 30. Kechagia, M. et al. Health Benefits of Probiotics: A Review. *ISRN Nutr.* 2013,

(2013).

31. Commane, D., Hughes, R., Shortt, C. & Rowland, I. The potential mechanisms involved in the anti-carcinogenic action of probiotics. *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* **591**, 276–289 (2005).
32. Dong, H., Rowland, I. & Yaqoob, P. Comparative effects of six probiotic strains on immune function in vitro. *Br. J. Nutr.* **108**, 459–70 (2012).
33. Sanders, M. E., Merenstein, D., Merrifield, C. A. & Hutkins, R. Probiotics for human use. *Nutr. Bull.* **43**, 212–225 (2018).
34. Plaza-Diaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M. & Gil, A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv. Nutr.* **10**, S40-66 (2019).
35. Fontana, L., Bermudez-Brito, M., Plaza-Diaz, J., Munoz-Quezada, S. & Gil, A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br J Nutr* **109** Suppl, S35-50 (2013).
36. Liong, M. T. Safety of probiotics: Translocation and infection. *Nutr. Rev.* **66**, 192–202 (2008).
37. Roselli, M. et al. Immunomodulating effects of probiotics for microbiota modulation, gut health and disease resistance in pigs. *Anim. Feed Sci. Technol.* **233**, 104–119 (2017).
38. Liu, Q. et al. Surface components and metabolites of probiotics for regulation of intestinal epithelial barrier. *Microb. Cell Fact.* **19**, (2020).
39. Delgado, S., Sánchez, B., Margolles, A., Ruas-Madiedo, P. & Ruiz, L. Molecules produced by probiotics and intestinal microorganisms with immunomodulatory activity. *Nutrients* **12**, 391 (2020).
40. Chang, C. J. et al. Next generation probiotics in disease amelioration. *J. Food Drug Anal.* **27**, 615–622 (2019).
41. Duar, R. M. et al. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Rev.* **41**, s27-48 (2017).
42. Salvetti, E., Torriani, S. & Felis, G. E. The Genus *Lactobacillus*: A Taxonomic Update. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **4**, 217–226 (2012).
43. Aoudia, N. et al. Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: Effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. *Food Microbiol.* 1–9 (2015). doi:10.1016/j.fm.2015.04.009
44. Lebeer, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S. C. J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 728–764,

Table of Contents (2008).

45. Gueimonde, M. & Salminen, S. New methods for selecting and evaluating probiotics. *Dig. Liver Dis.* **38**, 242–247 (2006).
46. Kitazawa, H., Villena, J. & Alvarez, S. Probiotics: Immunobiotics and Immunogenics. (CRC Press. Taylor & Francis Group, 2013).
47. Madsen, K. L. Enhancement of Epithelial Barrier Function by Probiotics. *J. Epithel. Biol. Pharmacol.* **5**, 55–59 (2012).
48. Lebeer, S., Vanderleyden, J. & De Keersmaecker, S. C. J. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 171–184 (2010).
49. Delcenserie, V. et al. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Current Issues in Molecular Biology* **10**, 37–54 (2008).
50. Rijkers, G. T. et al. Guidance for Substantiating the Evidence for Beneficial Effects of Probiotics : Current Status and Recommendations for Future Research 1 – 3. *J. Nutr.* 671–676 (2010). doi:10.3945/jn.109.113779.671S
51. Sanders, M. E., Benson, A., Lebeer, S., Merenstein, D. J. & Klaenhammer, T. R. Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Curr. Opin. Biotechnol.* **49**, 207–216 (2018).
52. Clancy, R. Immunobiotics and the probiotic evolution. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **38**, 9–12 (2003).
53. Papadimitriou, K. et al. Discovering probiotic microorganisms: In vitro, in vivo, genetic and omics approaches. *Frontiers in Microbiology* **6**, (2015).
54. Dargahi, N., Johnson, J., Donkor, O., Vasiljevic, T. & Apostolopoulos, V. Immunomodulatory effects of probiotics: Can they be used to treat allergies and autoimmune diseases? *Maturitas* **119**, 25–38 (2019).
55. Martín, R. et al. Role of commensal and probiotic bacteria in human health: A focus on inflammatory bowel disease. *Microb. Cell Fact.* **12**, (2013).
56. Wen, K. et al. High dose and low dose *Lactobacillus acidophilus* exerted differential immune modulating effects on T cell immune responses induced by an oral human rotavirus vaccine in gnotobiotic pigs. *Vaccine* **30**, 1198–1207 (2012).
57. Deepika, G. & Charalampopoulos, D. Surface and adhesion properties of lactobacilli. *Advances in applied microbiology* **70**, 127–152 (2010).
58. Haller, D. et al. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* **47**, 79–87 (2000).
59. Netea, M. G., Schlitzer, A., Placek, K., Joosten, L. A. B. & Schultze, J. L. Innate

- and Adaptive Immune Memory: an Evolutionary Continuum in the Host's Response to Pathogens. *Cell Host Microbe* **25**, 13–26 (2019).
60. Yousefi, B. et al. Probiotics importance and their immunomodulatory properties. *J. Cell. Physiol.* **234**, 8008–8018 (2019).
 61. Rabb, H. The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: Implications for the kidney. *Kidney Int.* **61**, 1935–1946 (2002).
 62. Halloran, K. & Underwood, M. A. Probiotic mechanisms of action. *Early Hum. Dev.* **135**, 58–65 (2019).
 63. Abbas, A. K., Lichtman, A. H. & Pillai, S. Cellular and Molecular Immunology. Elsevier (2014).
 64. Maldonado, C., De Moreno De Leblanc, A., Vinderola, G., Bibas Bonet, M. E. & Perdigón, G. Proposed model: Mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clin. Vaccine Immunol.* **14**, 485–492 (2007).
 65. Salva, S., Villena, J. & Alvarez, S. Immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: Impact on intestinal and respiratory infections. *Int. J. Food Microbiol.* **141**, 82–89 (2010).
 66. de LeBlanc, A. de M., Matar, C., Thériault, C. & Perdigón, G. Effects of milk fermented by *Lactobacillus helveticus* R389 on immune cells associated to mammary glands in normal and a breast cancer model. *Immunobiology* **210**, 349–358 (2005).
 67. Zelaya, H., Alvarez, S., Kitazawa, H. & Villena, J. Respiratory antiviral immunity and immunobiotics: Beneficial effects on inflammation-coagulation interaction during influenza virus infection. *Front. Immunol.* **7**, (2016).
 68. Villena, J., Vizoso-Pinto, M. G. & Kitazawa, H. Intestinal Innate Antiviral Immunity and Immunobiotics: Beneficial Effects against Rotavirus Infection. *Front. Immunol.* **7**, 1–10 (2016).
 69. McGhee, J. R. & Fujihashi, K. Inside the Mucosal Immune System. *PLoS Biol.* **10**, (2012).
 70. Ahluwalia, B., Magnusson, M. K. & Öhman, L. Mucosal immune system of the gastrointestinal tract: maintaining balance between the good and the bad. *Scand. J. Gastroenterol.* **52**, 1185–1193 (2017).
 71. Boyaka, P. N. & Fujihashi, K. Host defenses at mucosal surfaces. in *Clinical Immunology: Principles and Practice: Fifth Edition* (eds. Rich, R. R., Fleisher, T. A. & Weyand, C. M.) 285–298 (Elsevier Science, 2019). doi:10.1016/B978-0-7020-6896-6.00020-X
 72. Bron, P. A., Van Baarlen, P. & Kleerebezem, M. Emerging molecular insights into

- the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 66–78 (2012).
73. Wells, J. M. Immunomodulatory mechanisms of lactobacilli. *Microb. Cell Fact.* **10**, S17 (2011).
 74. Sengupta, R. et al. The role of cell surface architecture of lactobacilli in host-microbe interactions in the gastrointestinal tract. *Mediators of Inflammation* 2013, (2013).
 75. Kim, C. H. Immune regulation by microbiome metabolites. *Immunology* **154**, 220–229 (2018).
 76. Marranzino, G., Villena, J., Salva, S. & Alvarez, S. Stimulation of macrophages by immunobiotic *Lactobacillus* strains: Influence beyond the intestinal tract. *Microbiol. Immunol.* **56**, 771–781 (2012).
 77. Lesbros-Pantoflickova, D., Corthésy-Theulaz, I. & Blum, A. L. *Helicobacter pylori* and probiotics. *J. Nutr.* **137**, 812S–8S (2007).
 78. Ventolini, G. Vaginal lactobacillus: Biofilm formation in vivo - clinical implications. *Int. J. Womens. Health* **7**, 243–247 (2015).
 79. Secor, P. R. et al. Staphylococcus aureus Biofilm and Planktonic cultures differentially impact gene expression, mapk phosphorylation, and cytokine production in human keratinocytes. *BMC Microbiol.* **11**, 143 (2011).
 80. Jones, S. E., Paynich, M. L. & Knight, K. L. Exopolysaccharides: Sweet success with probiotic therapeutics. *Inflamm. Cell Signal.* **1334**, 334–334 (2014).
 81. Vastano, V. et al. The *Lactobacillus plantarum* Eno A1 Enolase Is Involved in Immunostimulation of Caco-2 Cells and in Biofilm Development. *Adv. Exp. Med. Biol.* (2015). doi:10.1007/5584_2015_5009
 82. Villena, J., Aso, H. & Kitazawa, H. Regulation of Toll-like receptors-mediated inflammation by immunobiotics in bovine intestinal epitheliocytes: Role of signalling pathways and negative regulators. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
 83. Llewellyn, A. & Foey, A. Probiotic modulation of innate cell pathogen sensing and signaling events. *Nutrients* **9**, 1–21 (2017).
 84. Kawashima, T. et al. The molecular mechanism for activating IgA production by *Pediococcus acidilactici* K15 and the clinical impact in a randomized trial. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
 85. Nwobodo, D. C. & Ugwu, M. C. Immunomodulatory Potentials of Probiotics : A Review. *Asian J. Immunol.* **3**, 1–15 (2020).
 86. Aziz, N. & Bonavida, B. Activation of natural killer cells by probiotics. *For.*

Immunopathol. Dis. Therap. **7**, 41–55 (2016).

87. Rizzello, V., Bonaccorsi, I., Dongarr, M. L., Fink, L. N. & Ferlazzo, G. Role of natural killer and dendritic cell crosstalk in immunomodulation by commensal bacteria probiotics. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011, 473097 (2011).
88. Azad, M. A. K., Sarker, M. & Wan, D. Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *Biomed Res. Int.* 2018, (2018).
89. Yahfoufi, N., Mallet, J. F., Graham, E. & Matar, C. Role of probiotics and prebiotics in immunomodulation. *Curr. Opin. Food Sci.* **20**, 82–91 (2018).
90. Hardy, H., Harris, J., Lyon, E., Beal, J. & Foey, A. D. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defences: Homeostasis and immunopathology. *Nutrients* **5**, 1869–1912 (2013).
91. Frei, R., Akdis, M. & O'mahony, L. Prebiotics, probiotics, synbiotics, and the immune system: Experimental data and clinical evidence. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **31**, 153–158 (2015).
92. Mohammadi, A. A. et al. Effects of probiotics on biomarkers of oxidative stress and inflammatory factors in petrochemical workers: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Int. J. Prev. Med.* **6**, (2015).
93. Carasi, P. et al. Impact of kefir derived lactobacillus kefiri on the mucosal immune response and gut microbiota. *J. Immunol. Res.* 2015, (2015).
94. Barberi, C. et al. T cell polarizing properties of probiotic bacteria. *Immunology Letters* 168, 337–342 (2015).
95. You, J., Dong, H., Mann, E. R., Knight, S. C. & Yaqoob, P. Probiotic modulation of dendritic cell function is influenced by ageing. *Immunobiology* **219**, 138–148 (2014).
96. García-Castillo, V., Sanhueza, E., McNerney, E., Onate, S. A. & García, A. Review microbiota dysbiosis: A new piece in the understanding of the carcinogenesis puzzle. *Journal of Medical Microbiology* **65**, 1347–1362 (2016).
97. Fuentes, S. et al. A strain of *Lactobacillus plantarum* affects segmented filamentous bacteria in the intestine of immunosuppressed mice. *FEMS Microbiol. Ecol.* **63**, 65–72 (2008).
98. Benyacoub, J. et al. Immune modulation property of *Lactobacillus paracasei* NCC2461 (ST11) strain and impact on skin defences. *Benef. Microbes* **5**, (2014).
99. Ibnou-Zekri, N., Blum, S., Schiffrin, E. J. & Von der Weid, T. Divergent patterns of colonization and immune response elicited from two intestinal *Lactobacillus* strains that display similar properties in vitro. *Infect. Immun.* **71**, 428–436 (2003).

100. Basu, S., Paul, D. K., Ganguly, S., Chatterjee, M. & Chandra, P. K. Efficacy of high-dose *Lactobacillus rhamnosus* GG in controlling acute watery diarrhea in Indian children: A randomized controlled trial. *J. Clin. Gastroenterol.* **43**, 208–213 (2009).
101. Maragkoudakis, P. A., Chingwaru, W., Gradisnik, L., Tsakalidou, E. & Cencic, A. Lactic acid bacteria efficiently protect human and animal intestinal epithelial and immune cells from enteric virus infection. *Int. J. Food Microbiol.* **141**, 91–97 (2010).
102. Kandasamy, S. et al. Unraveling the differences between gram-positive and gram-negative probiotics in modulating protective immunity to enteric infections. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
103. Nader-Macías, M. E. F., Otero, M. C., Espeche, M. C. & Maldonado, N. C. Advances in the design of probiotic products for the prevention of major diseases in dairy cattle. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 1387–1395 (2008).
104. Uyeno, Y., Shigemori, S. & Shimosato, T. Effect of Probiotics/Prebiotics on Cattle Health and Productivity. *Microbes Environ. Environ.* **30**, 126–132 (2015).
105. Suda, Y. et al. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* as immune-health promoting factor to improve growth performance and productivity in post-weaning pigs. *BMC Immunol.* **15**, (2014).
106. Villena, J. & Kitazawa, H. Modulation of intestinal TLR4-inflammatory signaling pathways by probiotic microorganisms: Lessons learned from *Lactobacillus jensenii* TL2937. *Frontiers in Immunology* **4**, (2014).
107. Kobayashi, H. et al. Modulation of porcine intestinal epitheliocytes immunotranscriptome response by *Lactobacillus jensenii* TL2937. *Benef. Microbes* **7**, 769–782 (2016).
108. Salva, S. et al. Development of a fermented goats' milk containing *Lactobacillus rhamnosus*: In vivo study of health benefits. *J. Sci. Food Agric.* **21**, 2355–2362 (2011).
109. Zelaya, H. et al. Immunobiotic lactobacilli reduce viral-associated pulmonary damage through the modulation of inflammation-coagulation interactions. *Int. Immunopharmacol.* **19**, 161–173 (2014).
110. Villena, J. et al. Probiotics for Everyone ! The Novel Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 and the Beginning of Social Probiotic Programs in Argentina. *Int. J. Biotechnol. Wellness Ind.* **1**, 189–198 (2012).
111. Albarracin, L. et al. Transcriptomic analysis of the innate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial cells: Influence of immunobiotic lactobacilli. *Front. Immunol.* **8**, (2017).

112. Ishizuka, T. et al. Immunobiotic bifidobacteria strains modulate rotavirus immune response in porcine intestinal epitheliocytes via pattern recognition receptor signaling. *PLoS One* **11**, 1–19 (2016).
113. Villena, J. et al. Immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* strains differentially modulate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial and antigen presenting cells. *BMC Microbiol.* **14**, 126 (2014).
114. Villena, J., Rodriguez, V., Kitazawa, H., Salva, S. & Alvarez, S. Modulation of mucosal antiviral immune response by immunobiotic lactic acid bacteria. *Microb. Pathog. Strateg. Combat. them Sci. Technol. Educ.* 1814–1821 (2013).
115. Villena, J., Laiño, J., Suvorov, A., Melnikov, V. & Alvarez, S. Immunobiotic and Recombinant Lactic Acid Bacteria : Soldiers in the Fight Against Streptococcus pneumoniae. (2015).
116. Herrera, M. et al. Dietary supplementation with Lactobacilli improves emergency granulopoiesis in protein-malnourished mice and enhances respiratory innate immune response. *PLoS One* **9**, (2014).
117. Özdemir, Ö. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: An update from laboratory and clinical data. *Clin. Exp. Immunol.* **160**, 295–304 (2010).
118. Azcárate-Peril, M. A., Sikes, M. & Bruno-Bárcena, J. M. The intestinal microbiota, gastrointestinal environment and colorectal cancer: a putative role for probiotics in prevention of colorectal cancer? *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* **301**, G401-24 (2011).
119. de Moreno de Leblanc, A. & Perdigón, G. The application of probiotic fermented milks in cancer and intestinal inflammation. *Proc. Nutr. Soc.* **69**, 421–8 (2010).
120. de Moreno de Leblanc, A. & Perdigón, G. Yogurt feeding inhibits promotion and progression of experimental colorectal cancer. *Med. Sci. Monit.* **10**, BR96-104 (2004).
121. Stein, M., Ruggiero, P., Rappuoli, R. & Bagnoli, F. *Helicobacter pylori* CagA: From Pathogenic Mechanisms to Its Use as an Anti-Cancer Vaccine. *Front. Immunol.* **4**, 328 (2013).
122. Takahashi, M., Taguchi, H., Yamaguchi, H., Osaki, T. & Kamiya, S. Studies of the effect of *Clostridium butyricum* on *Helicobacter pylori* in several test models including gnotobiotic mice. *J. Med. Microbiol.* **49**, 635–642 (2000).
123. Schulz, C., Koch, N., Schütte, K., Pieper, D. H. & Malfertheiner, P. *H. pylori* and its modulation of gastrointestinal microbiota. *J. Dig. Dis.* **16**, 109–117 (2015).
124. Kusters, J. G., Vliet, A. H. M. Van, Ernst, J. & Kuipers, E. J. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 449–490 (2006).

125. Brzozowski, T. et al. Effect of probiotics and triple eradication therapy on the cyclooxygenase (COX)-2 expression, apoptosis, and functional gastric mucosal impairment in *Helicobacter pylori*-infected Mongolian gerbils. *Helicobacter* **11**, 10–20 (2006).
126. Molecular Pathogenesis and Signal Transduction by *Helicobacter pylori* Volumen 400 de Current Topics in Microbiology and Immunology. (Springer International Publishing, 2017). doi:10.1007/978-3-319-50520-6
127. Sgouras, D. N., Panayotopoulou, E. G., Martinez-gonzalez, B., Petraki, K. & Michopoulos, S. Gastritis and Reduces Levels of Proinflammatory Chemokines in C57BL / 6 Mice. *Society* **12**, 1378–1386 (2005).
128. Sachs, G. & Scott, D. R. *Helicobacter pylori*: Eradication or Preservation. *F1000 Med. Rep.* **4**, 1–5 (2012).
129. Hooi, J. K. Y. et al. Global Prevalence of *Helicobacter pylori* Infection: Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterology* **153**, 420–429 (2017).
130. New Global Cancer Data: GLOBOCAN 2018. Available at: <https://www.uicc.org/news/new-global-cancer-data-globocan-2018>. (Accessed: 3rd January 2019)
131. International Agency for Research on Cancer. Cancer Tomorrow. Available at: https://gco.iarc.fr/tomorrow/graphic-isotype?type=0&population=900&mode=population&sex=0&cancer=39&age_group=value&apc_male=0&apc_female=0. (Accessed: 3rd January 2019)
132. Csendes, A. & Figueroa, M. Situación del cáncer gástrico en el mundo y en Chile. *Rev. Chil. Cir.* **69**, 502–507 (2017).
133. Myllyluoma, E. The role of probiotics in *Helicobacter pylori* infection. (University of Helsinki, 2007).
134. Vallejos M, C. et al. Prevalencia de la resistencia a metronidazol, claritromicina y tetraciclina en *Helicobacter pylori* aislado de pacientes de la región metropolitana. *Rev. Med. Chil.* **135**, 287–293 (2007).
135. Yucel, O. Prevention of *Helicobacter pylori* infection in childhood. *World J. Gastroenterol.* **20**, 10348–10354 (2014).
136. Skene, C., Young, A., Every, A. & Sutton, P. *Helicobacter pylori* flagella: Antigenic profile and protective immunity. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **50**, 249–256 (2007).
137. Quaglia, N. C. & Dambrosio, A. *Helicobacter pylori*: A foodborne pathogen? *World J. Gastroenterol.* **24**, 3472–3487 (2018).
138. Moyat, M. & Velin, D. Immune responses to *Helicobacter pylori* infection. *World*

- J. Gastroenterol. 20, 5583–5593 (2014).
139. Dunn, B. E., Cohen, H. & Blaser, M. J. *Helicobacter pylori*. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 720–741 (1997).
 140. Tobias, J., Lebens, M., Wai, S. N., Holmgren, J. & Svennerholm, A. M. Surface expression of *Helicobacter pylori* HpaA adhesion antigen on *Vibrio cholerae*, enhanced by co-expressed enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial antigens. *Microb. Pathog.* **105**, 177–184 (2017).
 141. Ansari, S. & Yamaoka, Y. *Helicobacter pylori* virulence factors exploiting gastric colonization and its pathogenicity. *Toxins* (Basel). **11**, (2019).
 142. Teymournejad, O., Mobarez, A. M., Hassan, Z. M., Moazzeni, S. M. & Ahmadabad, H. N. In Vitro Suppression of Dendritic Cells by *Helicobacter pylori* OipA. *Helicobacter* **19**, 136–143 (2014).
 143. Gur, C. et al. The *Helicobacter pylori* HopQ outermembrane protein inhibits immune cell activities. *Oncoimmunology* **8**, (2019).
 144. White, J. R., Winter, J. A. & Robinson, K. Differential inflammatory response to *Helicobacter pylori* infection: Etiology and clinical outcomes. *J. Inflamm. Res.* 2015, 137–147 (2015).
 145. Shaffer, C. L. et al. *Helicobacter pylori* exploits a unique repertoire of type iv secretion system components for pilus assembly at the bacteria-host cell interface. *PLoS Pathog.* **7**, (2011).
 146. Barrozo, R. M. et al. CagY Is an Immune-Sensitive Regulator of the *Helicobacter pylori* Type IV Secretion System. *Gastroenterology* **151**, (2016).
 147. Hatakeyama, M. *Helicobacter pylori* CagA and gastric cancer: A paradigm for hit-and-run carcinogenesis. *Cell Host Microbe* **15**, 306–316 (2014).
 148. Mahdi, B. M. Role of Immunity in Gastric Ulcer. *J. Gastroenterology Hepatol. Res.* (2013). doi:10.6051/j.issn.2224-3992.2013.02.347
 149. Wilson, K. T. & Crabtree, J. E. Immunology of *Helicobacter pylori*: Insights Into the Failure of the Immune Response and Perspectives on Vaccine Studies. *Gastroenterology* **133**, 288–308 (2007).
 150. Niu, Q. et al. Immune Response in *H. pylori* -Associated Gastritis and Gastric Cancer. *Gastroenterol. Res. Pract.* 2020, (2020).
 151. White, J. R., Winter, J. A. & Robinson, K. Differential inflammatory response to *Helicobacter pylori* infection: Etiology and clinical outcomes. *Journal of Inflammation Research* **8**, 137–147 (2015).
 152. Lamb, A. & Chen, L. F. Role of the *Helicobacter pylori*-Induced inflammatory

- response in the development of gastric cancer. *J. Cell. Biochem.* **114**, 491–497 (2013).
153. Suarez, G., Reyes, V. E. & Beswick, E. J. Immune response to *H pylori*. *World J. Gastroenterol.* **12**, 5593–5598 (2006).
 154. Figueiredo, C. A., Marques, C. R., Costa, R. dos S., da Silva, H. B. F. & Alcantara-Neves, N. M. Cytokines, cytokine gene polymorphisms and *Helicobacter pylori* infection: Friend or foe? *World J. Gastroenterol.* **20**, 5235–5243 (2014).
 155. Javed, S., Skoog, E. C. & Solnick, J. V. Impact of *Helicobacter pylori* virulence factors on the host immune response and gastric pathology. in Impact of *Helicobacter pylori* Virulence Factors on the Host Immune Response and Gastric Pathology 21–52 (2019). doi:10.1007/978-3-030-15138-6_2
 156. Portal-Celhay, C. & Perez-Perez, G. I. Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: Mechanisms and clinical outcomes. *Clin. Sci.* **110**, 305–314 (2006).
 157. Ushiyama, A. et al. *Lactobacillus gasseri* OLL2716 as a probiotic in clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* infection. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **18**, 986–991 (2003).
 158. Zhang, L., Su, P., Henriksson, A., O'Rourke, J. & Mitchell, H. Investigation of the immunomodulatory effects of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium lactis* on *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* **13**, 183–190 (2008).
 159. Patel, A., Shah, N. & Prajapati, J. B. Clinical application of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection--a brief review. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **47**, 429–37 (2014).
 160. Ayala, G., Escobedo-Hinojosa, W. I., de la Cruz-Herrera, C. F. & Romero, I. Exploring alternative treatments for *Helicobacter pylori* infection. *World J. Gastroenterol.* **20**, 1450–69 (2014).
 161. Kaur, B., Balgir, P. P., Kumar, B. & Garg, N. *Helicobacter pylori* infection: Efficacy of probiotics and role of genome wide association studies. *Archives of Clinical Microbiology* **1**, (2010).
 162. Tacconelli, E. et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect. Dis.* **18**, 318–327 (2018).
 163. Smith, M., Morain, C. O. & Mcnamara, D. *Helicobacter pylori* resistance to current therapies. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **35**, 6–13 (2019).
 164. Camargo, M. C. et al. The problem of *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics: a systematic review in Latin America. *Am. J. Gastroenterol.* **109**, 485–95 (2014).
 165. Borody, T., Ren, Z., Pang, G. & Clancy, R. Impaired host immunity contributes to

- Helicobacter pylori* eradication failure. *Am. J. Gastroenterol.* **97**, 3032–3037 (2002).
166. Kopitar, A. N. et al. Specific T cell responses to *Helicobacter pylori* predict successful eradication therapy. *J. Infect.* **54**, 257–261 (2007).
167. Gotteland, M., Brunser, O., C. S. Systematic review: are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? *Aliment. Pharmacol. Ther.* **23**, 1077–1086 (2006).
168. Malfertheiner, P. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* **61**, 646–64 (2012).
169. Malfertheiner, P. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection-the Maastricht V/Florence consensus report. *Gut* **66**, 6–30 (2017).
170. Emara, M. H., Elhawari, S. A., Yousef, S., Radwan, M. I. & Abdel-Aziz, H. R. Emerging Role of Probiotics in the Management of *Helicobacter Pylori* Infection: Histopathologic Perspectives. *Helicobacter* **21**, 3–10 (2016).
171. Wang, F. et al. Probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy: Systematic review and network meta-analysis. *Clin. Res. Hepatol. Gastroenterol.* **41**, 466–475 (2017).
172. Kamiya, S., Yonezawa, H. & Osaki, T. Role of Probiotics in Eradication Therapy for *Helicobacter pylori* Infection. in *Helicobacter pylori* in Human Diseases. Advances in Experimental Medicine and Biology (eds. Kamiya, S. & Backert, S.) 243–255 (Springer, Cham, 2019).
173. Gotteland, M., Brunser, O. & Cruchet, S. Systematic review: Are probiotics useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*? *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* **23**, 1077–1086 (2006).
174. Liévin-Le Moal, V. & Servin, A. L. Anti-infective activities of Lactobacillus strains in the human intestinal microbiota: From probiotics to gastrointestinal anti-infectious biotherapeutic agents. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 167–199 (2014).
175. Ruggiero, P. Use of probiotics in the fight against *Helicobacter pylori*. *World J. Gastrointest. Pathophysiol.* **5**, 384–391 (2014).
176. Song, H. Y., Zhou, L., Liu, D. Y., Yao, X. J. & Li, Y. What roles do probiotics play in the eradication of *Helicobacter pylori*? current knowledge and ongoing research. *Gastroenterol. Res. Pract.* **2018**, 1–9 (2018).
177. Panpetch, W., Thiraworawong, T. & Tumwasorn, S. Human gastric biopsy-derived lactobacilli suppress *Helicobacter pylori*- induced interleukin-8 production from gastric epithelial cells in vitro. *Int. J. Interf. Cytokine Mediat. Res.* **3**, 43–49 (2011).
178. Thiraworawong, T. et al. Anti-inflammatory Properties of Gastric-derived

- Lactobacillus plantarum* XB7 in the Context of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* **19**, 144–155 (2014).
179. Yu, H.-J. Probiotic BIFICO cocktail ameliorates *Helicobacter pylori* induced gastritis. *World J. Gastroenterol.* **21**, 6561 (2015).
 180. Zhou, C., Ma, F. Z., Deng, X. J., Yuan, H. & Ma, H. S. Lactobacilli inhibit interleukin-8 production induced by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide-activated Toll-like receptor 4. *World J. Gastroenterol.* **14**, 5090–5095 (2008).
 181. Ryan, K. A., O'Hara, A. M., Van Pijkeren, J. P., Douillard, F. P. & O'Toole, P. W. *Lactobacillus salivarius* modulates cytokine induction and virulence factor gene expression in *Helicobacter pylori*. *J. Med. Microbiol.* **58**, 996–1005 (2009).
 182. Tamura, A. et al. Suppression of *Helicobacter pylori*-induced interleukin-8 production in vitro and within the gastric mucosa by a live *Lactobacillus* strain. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **21**, 1399–1406 (2006).
 183. García C, A. et al. Probiotic properties of *Lactobacillus* spp isolated from gastric biopsies of *Helicobacter pylori* infected and non-infected individuals. *Rev. Med. Chil.* **137**, 369–376 (2009).
 184. García, A., Sáez, K., Delgado, C. & González, C. L. Low co-existence rates of *Lactobacillus* spp. and *Helicobacter pylori* detected in gastric biopsies from patients with gastrointestinal symptoms. *Rev. Española Enfermedades Dig.* **104**, 473–478 (2012).
 185. Karlyshev, A. V et al. Draft Genome Sequence of a Probiotic Strain, *Lactobacillus fermentum* UCO-979C. *Genome Announc* **3**, 3–4 (2015).
 186. García, A. et al. Characterization of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, a probiotic strain with a potent anti-*Helicobacter pylori* activity. *Electron. J. Biotechnol.* **25**, 75-83. (2017).
 187. Salas-Jara, M. J. et al. Probiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C biofilm formation on AGS and Caco-2 cells and *Helicobacter pylori* inhibition. *Biofouling* **32**, 1245–1257 (2016).
 188. Felten, A., Barreau, C., Bizet, C., Lagrange, P. H. & Philippon, A. *Lactobacillus* species identification, H₂O₂ production, and antibiotic resistance and correlation with human clinical status. *J. Clin. Microbiol.* **37**, 729–733 (1999).
 189. Ferrer, J., Pinuer, L., García, A. & Bórquez, R. Effect of pH and dilution rate on specific production rate of extra cellular metabolites by *Lactobacillus salivarius* UCO_979C in continuous culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 6417–6429 (2015).
 190. Sanhueza, E., Paredes-Osses, E., González, C. L. & García, A. Effect of pH in the survival of *Lactobacillus salivarius* strain UCO_979C wild type and the pH acid

- acclimated variant. *Electron. J. Biotechnol.* **18**, 343–346 (2015).
191. Piazuolo, M. B., Riechelmann, R. P., Wilson, K. T. & Algood, H. M. S. Resolution of gastric cancer-promoting inflammation: A novel strategy for anti-cancer therapy. in *Current Topics in Microbiology and Immunology* (ed. Backert, S.) 319–359 (Springer, Cham, 2019). doi:10.1007/978-3-030-15138-6_13
 192. Rawla, P. & Barsouk, A. Epidemiology of gastric cancer: Global trends, risk factors and prevention. *Prz. Gastroenterol.* **14**, 26–38 (2019).
 193. Holleczeck, B., Schöttker, B. & Brenner, H. *Helicobacter pylori* infection, chronic atrophic gastritis and risk of stomach and esophagus cancer: Results from the prospective population-based ESTHER cohort study. *Int. J. Cancer* **146**, 2773–2783 (2020).
 194. Arnold, I. C. et al. Tolerance rather than immunity protects from *Helicobacter pylori* induced gastric preneoplasia. *Gastroenterology* **140**, 199–209 (2011).
 195. Müller, A. & Solnick, J. V. Inflammation, Immunity, and Vaccine Development for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* **16**, 26–32 (2011).
 196. Bockerstett, K. A. & DiPaolo, R. J. Regulation of Gastric Carcinogenesis by Inflammatory Cytokines. *CMGH* **4**, 47–53 (2017).
 197. Panpetch, W., Spinler, J. K., Versalovic, J. & Tumwasorn, S. Characterization of *Lactobacillus salivarius* strains B37 and B60 capable of inhibiting IL-8 production in *Helicobacter pylori*-stimulated gastric epithelial cells. *BMC Microbiol.* **16**, (2016).
 198. Wroblewski, L. E., Peek, R. M. & Wilson, K. T. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: Factors that modulate disease risk. *Clin. Microbiol. Rev.* **23**, 713–739 (2010).
 199. Homan, M. & Orel, R. Are probiotics useful in *Helicobacter pylori* eradication? *World J. Gastroenterol.* **21**, 10644–10653 (2015).
 200. Ikuse, T., Blanchard, T. G. & Czinn, S. J. Inflammation, immunity, and vaccine development for the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. in *Current Topics in Microbiology and Immunology* (ed. Backert, S.) 1–19 (Springer, Cham, 2019). doi:10.1007/978-3-030-15138-6_1
 201. Robinson, K., Argent, R. H. & Atherton, J. C. The inflammatory and immune response to *Helicobacter pylori* infection. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **21**, 237–259 (2007).
 202. Song, H., Zhou, L., Liu, D., Ge, L. & Li, Y. Probiotic effect on *Helicobacter pylori* attachment and inhibition of inflammation in human gastric epithelial cells. *Exp. Ther. Med.* **18**, 1551–1562 (2019).

203. Yamaoka, Y. et al. Chemokines in the gastric mucosa in *Helicobacter pylori* infection. *Gut* **42**, 609–617 (1998).
204. Brandt, S., Kwok, T., Hartig, R., König, W. & Backert, S. NF- κ B activation and potentiation of proinflammatory responses by the *Helicobacter pylori* CagA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9300–9305 (2005).
205. Marcial, G., Villena, J., Faller, G., Hensel, A. & de Valdéz, G. F. Exopolysaccharide-producing *Streptococcus thermophilus* CRL1190 reduces the inflammatory response caused by *Helicobacter pylori*. *Benef. Microbes* **8**, 451–461 (2017).
206. Alzahrani, S. et al. Effect of *Helicobacter pylori* on gastric epithelial cells. *World J. Gastroenterol.* **20**, 12767–12780 (2014).
207. Garcia-Castillo, V. et al. Characterization of the immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* properties of the human gastric isolate *Lactobacillus rhamnosus* UCO-25A. *Biofouling* **35**, 922–937 (2019).
208. Yang, Y.-J., Chuang, C.-C., Yang, H.-B., Lu, C.-C. & Sheu, B.-S. *Lactobacillus acidophilus* ameliorates H. pylori-induced gastric inflammation by inactivating the Smad7 and NF κ B pathways. *BMC Microbiol.* **12**, 38 (2012).
209. Michalkiewicz, J. et al. Innate immunity components and cytokines in gastric mucosa in children with *Helicobacter pylori* infection. *Mediators Inflamm.* **2015**, (2015).
210. Kumar Pachathundikandi, S., Brandt, S., Madassery, J. & Backert, S. Induction of TLR-2 and TLR-5 expression by *Helicobacter pylori* switches cagPAI-dependent signalling leading to the secretion of IL-8 and TNF- α . *PLoS One* **10**, (2011).
211. Kolling, Y., Salva, S., Villena, J. & Alvarez, S. Are the immunomodulatory properties of *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 peptidoglycan common for all Lactobacilli during respiratory infection in malnourished mice? *PLoS One* **13**, e0194034 (2018).
212. Clua, P. et al. Peptidoglycan from immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* improves resistance of infant Mice to respiratory syncytial viral infection and secondary pneumococcal pneumonia. *Front. Immunol.* **8**, (2017).
213. Mizuno, H. et al. Lipoteichoic Acid Is Involved in the Ability of the Immunobiotic Strain *Lactobacillus plantarum* CRL1506 to Modulate the Intestinal Antiviral Innate Immunity Triggered by TLR3 Activation. *Front. Immunol.* **11**, 571 (2020).
214. De Klerk, N. et al. Lactobacilli reduce *Helicobacter pylori* attachment to host gastric epithelial cells by inhibiting adhesion gene expression. *Infect. Immun.* **84**, 1526–1535 (2016).
215. Zhang, S., Guo, J. & Liu, L. Treating bacteria with bacteria: The role of probiotics

- in the eradication of *Helicobacter pylori* . *Int. J. Clin. Exp. Med.* **10**, 4330–4341 (2017).
216. Hevia, A., Delgado, S., Sánchez, B. & Margolles, A. Molecular players involved in the interaction between beneficial bacteria and the immune system. *Front. Microbiol.* **6**, (2015).
 217. Troncone, E., Marafini, I., Stolfi, C. & Monteleone, G. Transforming growth factor- β 1/Smad7 in intestinal immunity, inflammation, and cancer. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
 218. Shamsdin, S. A. et al. Alterations in Th17 and the Respective Cytokine Levels in *Helicobacter pylori* -Induced Stomach Diseases. *Helicobacter* **20**, 460–475 (2015).
 219. Kabir, A. M. et al. Prevention of *Helicobacter pylori* infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. *Gut* **41**, 49–55 (1997).
 220. Quiding-Järbrink, M., Raghavan, S. & Sundquist, M. Enhanced M1 macrophage polarization in human *Helicobacter pylori* -associated atrophic gastritis and in vaccinated mice. *PLoS One* **5**, (2010).
 221. Algood, H. M. S. & Cover, T. L. *Helicobacter pylori* persistence: An overview of interactions between H. pylori and host immune defenses. *Clin. Microbiol. Rev.* **19**, 597–613 (2006).
 222. Wang, Y., Liu, H. & Zhao, J. Macrophage Polarization Induced by Probiotic Bacteria: a Concise Review. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **12**, 798–808 (2020).
 223. Ji, J., Hu, S. L., Cui, Z. W. & Li, W. F. Probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* mediate M1 macrophage polarization in mouse bone marrow-derived macrophages. *Arch. Microbiol.* **195**, 349–356 (2013).
 224. Christoffersen, T. E. et al. In Vitro Comparison of the Effects of Probiotic, Commensal and Pathogenic Strains on Macrophage Polarization. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **6**, 1–10 (2014).
 225. Kim, D. H. et al. *Lactobacillus acidophilus* suppresses intestinal inflammation by inhibiting endoplasmic reticulum stress. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **34**, 178–185 (2019).
 226. Kim, S. O., Sheikh, H. I., Ha, S. D., Martins, A. & Reid, G. G-CSF-mediated inhibition of JNK is a key mechanism for *Lactobacillus rhamnosus*-induced suppression of TNF production in macrophages. *Cell. Microbiol.* **8**, 1958–1971 (2006).
 227. Auwerx, J. The human leukemia cell line, THP-1: A multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia* (1991). doi:10.1007/BF02041244

228. Innocenti, M., Svennerholm, A. M. & Quiding-Järbrink, M. *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides preferentially induce CXC chemokine production in human monocytes. *Infect. Immun.* **69**, 3800–3808 (2001).
229. Tavares, R. & Pathak, S. K. Induction of TNF, CXCL8 and IL-1 β in macrophages by *Helicobacter pylori* secreted protein HP1173 occurs via MAP-kinases, NF- κ B and AP-1 signaling pathways. *Microb. Pathog.* **125**, 295–305 (2018).
230. Hong, J. B., Zuo, W., Wang, A. J. & Lu, N. H. *Helicobacter pylori* infection synergistic with IL-1 β gene polymorphisms potentially contributes to the carcinogenesis of gastric cancer. *Int. J. Med. Sci.* **13**, 298–303 (2016).
231. Tran, L. S., Chonwerawong, M. & Ferrero, R. L. Regulation and functions of inflammasome-mediated cytokines in *Helicobacter pylori* infection. *Microbes Infect.* **19**, 449–458 (2017).
232. Tourani, M. et al. Association of TNF- α but not IL-1 β levels with the presence of *Helicobacter pylori* infection increased the risk of peptic ulcer development. *Cytokine* **110**, 232–236 (2018).
233. Tsai, H. F. & Hsu, P. N. Modulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-mediated apoptosis by *Helicobacter pylori* in immune pathogenesis of gastric mucosal damage. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* **50**, 4–9 (2017).
234. Hua-Xiang Xia, H. & Talley, N. J. Apoptosis in gastric epithelium induced by *Helicobacter pylori* infection: implications in gastric carcinogenesis. *Am. J. Gastroenterol.* **96**, (2001).
235. Bimczok, D. et al. *Helicobacter pylori* Infection Inhibits Phagocyte Clearance of Apoptotic Gastric Epithelial Cells. *J. Immunol.* **190**, 6626–6634 (2013).
236. Chen, W., Shu, D. & Chadwick, V. S. *Helicobacter pylori* infection: mechanism of colonization and functional dyspepsia Reduced colonization of gastric mucosa by *Helicobacter pylori* in mice deficient in interleukin-10. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **16**, 377–383 (2001).
237. Viladomiu, M. et al. Cooperation of Gastric Mononuclear Phagocytes with *Helicobacter pylori* during Colonization. *J. Immunol.* **198**, 3195–3204 (2017).
238. Sayi, A. et al. The CD4 + T Cell-Mediated IFN- γ Response to *Helicobacter* Infection Is Essential for Clearance and Determines Gastric Cancer Risk. *J. Immunol.* **182**, 7085–7101 (2009).
239. Gebremariam, H. G. et al. Lactobacillus gasseri Suppresses the Production of Proinflammatory Cytokines in *Helicobacter pylori* -Infected Macrophages by Inhibiting the Expression of ADAM17. *Front. Immunol.* **10**, 2326 (2019).
240. Peña, J. A. & Versalovic, J. Lactobacillus rhamnosus GG decreases TNF- α

- production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cellular Microbiology* **5**, 277–285 (2003).
241. Taghizadeh, S., Falsafi, T., Kermanshahi, R. K. & Ramezani, R. Antagonistic and Immunomodulant Effects of Two Probiotic Strains of *Lactobacillus* on Clinical Strains of *Helicobacter pylori*. *Galen Med. J.* **9**, (2020).
242. Lawrence, C. & Nauciel, C. Production of interleukin-12 by murine macrophages in response to bacterial peptidoglycan. *Infect. Immun.* **66**, 4947–4949 (1998).
243. Shida, K., Kiyoshima-Shibata, J., Kaji, R., Nagaoka, M. & Nanno, M. Peptidoglycan from lactobacilli inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through Toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. *Immunology* **128**, e858–e869. (2009).
244. Jian, Z. jian et al. Interleukin-6 secretion by bacterial lipopolysaccharide-stimulated bovine alveolar macrophages in vitro. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **49**, 51–60 (1995).
245. Saavedra Ramírez, P. G., Vásquez Duque, G. M. & González Naranjo, L. A. Interleucina-6: ¿amiga o enemiga? Bases para comprender su utilidad como objetivo terapéutico. *Iatreia* **24**, (2011).
246. De Marco, S. et al. Probiotic cell-free supernatants exhibited anti-inflammatory and antioxidant activity on human gut epithelial cells and macrophages stimulated with LPS. *Evidence-based Complement. Altern. Med.* **2018**, (2018).
247. Griet, M. et al. Soluble factors from *Lactobacillus reuteri* CRL1098 have anti-inflammatory effects in acute lung injury induced by lipopolysaccharide in mice. *PLoS One* **9**, (2014).
248. Niers, L. E. M. et al. Identification of strong interleukin-10 inducing lactic acid bacteria which down-regulate T helper type 2 cytokines. *Clin. Exp. Allergy* **35**, 1481–1489 (2005).
249. Rocha-Ramírez, L. M. et al. Probiotic *Lactobacillus* Strains Stimulate the Inflammatory Response and Activate Human Macrophages. *J. Immunol. Res.* **2017**, (2017).
250. Johnson-Henry, K. C. et al. Probiotics reduce bacterial colonization and gastric inflammation in *H. pylori*-infected mice. *Dig. Dis. Sci.* **49**, 1095–1102 (2004).
251. Sgouras, D. et al. In Vitro and In Vivo Inhibition of *Helicobacter pylori* by *Lactobacillus casei* Strain Shirota. *Society* **70**, 518–526 (2004).
252. Fennerty, B. A Review of Tests for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Lab. Med.* **29**, 561–566 (1998).
253. Calik, Z. et al. Investigation of *Helicobacter pylori* antigen in stool samples of

- patients with upper gastrointestinal complaints. *Brazilian J. Microbiol.* **47**, 167–171 (2016).
254. Seo, J.-H. Limitations of urease test in diagnosis of pediatric *Helicobacter pylori* infection. *World J. Clin. Pediatr.* **4**, 143–147 (2015).
 255. Lee, J. Y. & Kim, N. Diagnosis of *Helicobacter pylori* by invasive test: Histology. *Ann. Transl. Med.* **3**, (2015).
 256. Kuo, C. H. et al. Long-term use of probiotic-containing yogurts is a safe way to prevent *Helicobacter pylori* : Based on a mongolian gerbil's model. *Biochem. Res. Int.* (2013). doi:10.1155/2013/594561
 257. Pantoflickova, D. et al. Favourable effect of regular intake of fermented milk containing *Lactobacillus johnsonii* on *Helicobacter pylori* associated gastritis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **18**, 805-813. (2003).
 258. Farnworth, E. R., Champagne, C. P. & Van Calsteren, M. R. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: Food uses, production, chemical structures, and health effects. in *Handbook of Nutraceuticals and Functional Foods, Second Edition* (ed. WILDMAN, R. E. C.) 353–372 (CRC Press, 2016).
 259. Bajpai, V. K. et al. Exopolysaccharide and lactic acid bacteria: Perception, functionality and prospects. *Bangladesh J. Pharmacol.* **11**, 1–23 (2016).
 260. Ciszek-Lenda, M. et al. Strain specific immunostimulatory potential of lactobacilli-derived exopolysaccharides. *Cent. J. Immunol.* **36**, (2011).
 261. Yasuda, E., Serata, M. & Sako, T. Suppressive effect on activation of macrophages by *Lactobacillus casei* strain shirota genes determining the synthesis of cell wall-associated polysaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4746–4755 (2008).
 262. Nikolic, M. et al. Characterisation of the exopolysaccharide (EPS)-producing *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11 and its non-EPS producing derivative strains as potential probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **158**, 155–162 (2012).
 263. Ciszek-Lenda, M., Nowak, B., Śróttek, M., Gamian, A. & Marcinkiewicz, J. Immunoregulatory potential of exopolysaccharide from *Lactobacillus rhamnosus* KL37. Effects on the production of inflammatory mediators by mouse macrophages. *Int. J. Exp. Pathol.* **92**, 382–391 (2011).
 264. Laiño, J., Villena, J., Kanmani, P. & Kitazawa, H. Immunoregulatory Effects Triggered by Lactic Acid Bacteria Exopolysaccharides: New Insights into Molecular Interactions with Host Cells. *Microorganisms* **4**, (2016).
 265. Mazmanian, S. K., Round, J. L. & Kasper, D. L. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* (2008). doi:10.1038/nature07008
 266. Kitazawa, H. et al. Phosphate group requirement for mitogenic activation of

- lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Int. J. Food Microbiol.* **40**, 169–175 (1998).
267. Kanmani, P. et al. Exopolysaccharides from *Lactobacillus delbrueckii* OLL1073R-1 modulate innate antiviral immune response in porcine intestinal epithelial cells. *Mol. Immunol.* **93**, 253–265 (2018).
268. Jones, S. E. & Knight, K. L. Bacillus subtilis-mediated protection from *Citrobacter rodentium*-associated enteric disease requires espH and functional flagella. *Infect. Immun.* **80**, 710–719 (2012).
269. Paik, W., Alonzo, F. & Knight, K. L. Probiotic exopolysaccharide protects against systemic *Staphylococcus aureus* infection, inducing dual-functioning macrophages that restrict bacterial growth and limit inflammation. *Infect. Immun.* **87**, (2019).
270. Peek, R. M., Fiske, C. & Wilson, K. T. Role of innate immunity in *Helicobacter pylori* -induced gastric malignancy. *Physiol. Rev.* **90**, 831–858 (2010).
271. Liu, Z. et al. Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *J. Dairy Sci.* **100**, 6895–6905 (2017).
272. Hidalgo-Cantabrana, C. et al. Immune Modulation Capability of Exopolysaccharides Synthesised by Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria. *Probiotics Antimicrob. Proteins* **4**, 227-237. (2012).
273. Chen, Y. C., Wu, Y. J. & Hu, C. Y. Monosaccharide composition influence and immunomodulatory effects of probiotic exopolysaccharides. *Int. J. Biol. Macromol.* **133**, 575–582 (2019).
274. Deo, D., Davray, D. & Kulkarni, R. A diverse repertoire of exopolysaccharide biosynthesis gene clusters in *Lactobacillus* revealed by comparative analysis in 106 sequenced genomes. *Microorganisms* **7**, (2019).
275. Bosi, E. et al. MeDuSa: A multi-draft based scaffolder. *Bioinformatics* **31**, 2443–2451 (2015).
276. Lebeer, S. et al. Identification of a gene cluster for the biosynthesis of a long, galactose-rich exopolysaccharide in *Lactobacillus rhamnosus* GG and functional analysis of the priming glycosyltransferase. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 3554–3563 (2009).
277. Richards, M. R. & Lowary, T. L. Chemistry and biology of galactofuranose-containing polysaccharides. *ChemBioChem* **10**, 1920–1938 (2009).
278. Ferreira, A. S. et al. Distribution of cepacian biosynthesis genes among environmental and clinical *Burkholderia* strains and role of cepacian exopolysaccharide in resistance to stress conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 441–450 (2010).

279. Illegghems, K., De Vuyst, L. & Weckx, S. Comparative genome analysis of the candidate functional starter culture strains *Lactobacillus fermentum* 222 and *Lactobacillus plantarum* 80 for controlled cocoa bean fermentation processes. *BMC Genomics* **16**, (2015).
280. Zivkovic, M. et al. Exopolysaccharide production and ropiness phenotype are determined by two gene clusters in putative probiotic strain *Lactobacillus paraplantarum* BGCG11. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 1387–1396 (2015).
281. Nissilä, E. et al. Genotypic and phenotypic diversity of *Lactobacillus rhamnosus* clinical isolates, their comparison with strain GG and their recognition by complement system. *PLoS One* **12**, (2017).
282. Lee, I. C. et al. Strain-specific features of extracellular polysaccharides and their impact on *Lactobacillus plantarum*-host interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **82**, 3959–3970 (2016).
283. Dahan, S., Roth-Walter, F., Arnaboldi, P., Agarwal, S. & Mayer, L. Epithelia: Lymphocyte interactions in the gut. *Immunol. Rev.* **215**, 243–253 (2007).
284. Hörmannspurger, G. et al. Post-translational inhibition of IP-10 secretion in IEC by probiotic bacteria: Impact on chronic inflammation. *PLoS One* **4**, e4365 (2009).
285. Gaudino, S. J. & Kumar, P. Cross-talk between antigen presenting cells and T cells impacts intestinal homeostasis, bacterial infections, and tumorigenesis. *Front. Immunol.* **10**, (2019).
286. Allaire, J. M. et al. The Intestinal Epithelium: Central Coordinator of Mucosal Immunity. *Trends Immunol.* **39**, 677-696. (2018).
287. Zanello, G. et al. *Saccharomyces cerevisiae* modulates immune gene expressions and inhibits ETEC-mediated ERK1/2 and p38 signaling pathways in intestinal epithelial cells. *PLoS One* **6**, (2011).
288. Mirpuri, J. et al. *Lactobacillus rhamnosus* (LGG) Regulates IL-10 Signaling in the Developing Murine Colon through Upregulation of the IL-10R2 Receptor Subunit. *PLoS One* **7**, (2012).
289. Kim, S. W. et al. *Bifidobacterium lactis* inhibits NF- κ B in intestinal epithelial cells and prevents acute colitis and colitis-associated colon cancer in mice. *Inflamm. Bowel Dis.* **16**, 1514–1525 (2010).
290. Shimazu, T. et al. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* elicits anti-inflammatory activity in porcine intestinal epithelial cells by modulating negative regulators of the toll-like receptor signaling pathway. *Infect. Immun.* **80**, 276–288 (2012).
291. Moue, M. et al. Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originally established porcine intestinal epitheliocyte cell line. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1780**, 134–144 (2008).

292. Garcia-Castillo, V., Albarracin, L., Kitazawa, H. & Villena, J. Screening and characterization of immunobiotic lactic acid bacteria with porcine immunoassay systems. in *Methods in Molecular Biology* 131–144 (Springer, 2019). doi:10.1007/978-1-4939-8907-2_12
293. Kulkarni, N., Pathak, M. & Lal, G. Role of chemokine receptors and intestinal epithelial cells in the mucosal inflammation and tolerance. *J. Leukoc. Biol.* **101**, 377–394 (2017).
294. Sato, N. et al. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* TL2937 Alleviates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis by Differentially Modulating the Transcriptomic Response of Intestinal Epithelial Cells. *Front. Immunol.* 11, (2020).
295. Tarradas, J., Tous, N., Esteve-garcia, E. & Brufau, J. The control of intestinal inflammation: A major objective in the research of probiotic strains as alternatives to antibiotic growth promoters in poultry. *Microorganisms* 8, (2020).
296. Benis, N. et al. High-level integration of murine intestinal transcriptomics data highlights the importance of the complement system in mucosal homeostasis. *BMC Genomics* 20, (2019).
297. Finamore, A. et al. *Lactobacillus amylovorus* inhibits the TLR4 inflammatory signaling triggered by enterotoxigenic *Escherichia coli* via modulation of the negative regulators and involvement of TLR2 in intestinal caco-2 cells and pig explants. *PLoS One* 9, (2014).
298. Takanashi, N. et al. Advanced application of bovine intestinal epithelial cell line for evaluating regulatory effect of lactobacilli against heat-killed enterotoxigenic *Escherichia coli*-mediated inflammation. *BMC Microbiol.* 13, (2013).
299. Hoffmann, M. et al. *Lactobacillus reuteri* 100-23 transiently activates intestinal epithelial cells of mice that have a complex microbiota during early stages of colonization. *J. Nutr.* 138, 1684–1691 (2008).
300. Tomosada, Y. et al. Immunoregulatory Effect of Bifidobacteria Strains in Porcine Intestinal Epithelial Cells through Modulation of Ubiquitin-Editing Enzyme A20 Expression. *PLoS One* 8, (2013).
301. Zhou, B. et al. Selection of immunobiotic *Ligilactobacillus salivarius* strains from the intestinal tract of wakame-fed pigs: Functional and genomic studies. *Microorganisms* 8, (2020).
302. López, P. et al. Exopolysaccharide-producing Bifidobacterium strains elicit different in vitro responses upon interaction with human cells. *Food Res. Int.* 46, 99–107 (2012).
303. Fujie, H. et al. Toll-like receptor-2-activating bifidobacteria strains differentially regulate inflammatory cytokines in the porcine intestinal epithelial cell culture

- system: Finding new anti-inflammatory immunobiotics. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **63**, 129–139 (2011).
304. Mantis, N. J., Rol, N. & Corthésy, B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol.* **4**, 603–611. (2011).
 305. Favre, L., Spertini, F. & Corthésy, B. Secretory IgA Possesses Intrinsic Modulatory Properties Stimulating Mucosal and Systemic Immune Responses. *J. Immunol.* **175**, 2793–2800 (2005).
 306. Ren, D. et al. Evaluation of immunomodulatory activity of two potential probiotic *Lactobacillus* strains by invivo tests. *Anaerobe* **35**, 22–27 (2015).
 307. Tobita, K., Yanaka, H. & Otani, H. Heat-treated *Lactobacillus crispatus* KT strains reduce allergic symptoms in mice. *J. Agric. Food Chem.* **57**, 5586–5590 (2009).
 308. Ya, T. et al. Immunological evaluation of *Lactobacillus casei* Zhang: A newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China. *BMC Immunol.* **9**, (2008).
 309. Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A. & Mitsuoka, T. Effect of a probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. *Int. J. Food Microbiol.* **42**, 39–44 (1998).
 310. Kaila, M. et al. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr. Res.* **32**, 141–144 (1992).
 311. Maldonado Galdeano, C., Cazorla, S. I., Lemme Dumit, J. M., Vélez, E. & Perdígón, G. Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. *Ann. Nutr. Metab.* **74**, 115–124 (2019).
 312. Christensen, H. R., Frokiaer, H. & Pestka, J. J. Lactobacilli Differentially Modulate Expression of Cytokines and Maturation Surface Markers in Murine Dendritic Cells. *J. Immunol.* **168**, 171–178 (2002).
 313. Chon, H. & Choi, B. The effects of a vegetable-derived probiotic lactic acid bacterium on the immune response. *Microbiol. Immunol.* **54**, 228–236 (2010).
 314. Lomax, A. & Calder, P. Probiotics, Immune Function, Infection and Inflammation: A Review of the Evidence from Studies Conducted in Humans. *Curr. Pharm. Des.* **15**, 1428–1518 (2009).
 315. Stuart, L. M. & Ezekowitz, R. A. Phagocytosis and comparative innate immunity: Learning on the fly. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 131–141 (2008).
 316. Isolauri, E., Kirjavainen, P. V. & Salminen, S. Probiotics: A role in the treatment of intestinal infection and inflammation? *Gut* **iii54–59** (2002). doi:10.1136/gut.50.suppl_3.iii54
 317. Kaushal, D. & Kansal, V. K. Dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and

- Bifidobacterium bifidum* improves phagocytic potential of macrophages in aged mice. *J. Food Sci. Technol.* **51**, 1147–1153 (2014).
318. Hyung, S. C., Jun, W. K., Cha, Y. N. & Kim, C. A quantitative nitroblue tetrazolium assay for determining intracellular superoxide anion production in phagocytic cells. *J. Immunoass. Immunochem.* **27**, 31–44 (2006).
319. Maassen, C. B. M. et al. Strain-dependent induction of cytokine profiles in the gut by orally administered *Lactobacillus* strains. *Vaccine* **18**, 2613–2623 (2000).
320. Li, X. et al. Protective effects of a novel *Lactobacillus rhamnosus* strain with probiotic characteristics against lipopolysaccharide-induced intestinal inflammation in vitro and in vivo. *Food Funct.* **11**, 5799–5814 (2020).
321. Castillo, N. A., Perdigán, G. & De Moreno De Leblanc, A. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice. *BMC Microbiol.* **11**, (2011).
322. dos Anjos Cassado, A. F4/80 as a major macrophage marker: The case of the peritoneum and spleen. *Results Probl. Cell Differ.* **62**, 161–179 (2017).
323. Lee, P. Y., Wang, J.-X., Parisini, E., Dascher, C. C. & Nigrovic, P. A. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 585–594 (2013).
324. Morhardt, T. L. et al. IL-10 produced by macrophages regulates epithelial integrity in the small intestine. *Sci. Rep.* **9**, (2019).
325. Collin, M., MCGovern, N. & Haniffa, M. Human dendritic cell subsets. *Immunology* **140**, 22–30 (2013).
326. Budd, R. C., Fortner, K. A. & Lymphocytes, T. Chapter 12 - T Lymphocytes. Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology, 2-Volume Set (2017).
327. Drakes, M., Blanchard, T. & Czinn, S. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infect. Immun.* **72**, 3299–3309 (2004).
328. Wei, H. X., Wang, B. & Li, B. IL-10 and IL-22 in Mucosal Immunity: Driving Protection and Pathology. *Front. Immunol.* **11**, (2020).
329. Stagg, A. J. Intestinal Dendritic Cells in Health and Gut Inflammation. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
330. Joeris, T., Müller-Luda, K., Agace, W. W. & Mowat, A. M. I. Diversity and functions of intestinal mononuclear phagocytes. *Mucosal Immunol.* **10**, 845–864 (2017).
331. Hsieh, C. S. et al. Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science* **260**, 547–549 (1993).

332. Shi, C. et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* on the development of B cells in gut-associated lymphoid tissue of BALB/c mice. *J. Cell. Mol. Med.* 24, 8883–8886 (2020).
333. Kaminski, D. A., Wei, C., Qian, Y., Rosenberg, A. F. & Sanz, I. Advances in human B cell phenotypic profiling. *Front. Immunol.* 10, (2012).
334. Cascalho, M. et al. A B220-, CD19- population of B cells in the peripheral blood of quasimonoclonal mice. *Int. Immunol.* 12, 29–35 (2000).
335. Mensah, F. F. K. et al. CD24 expression and B cell maturation shows a novel link with energy metabolism: Potential implications for patients with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Front. Immunol.* 9, (2018).
336. Pretzer, G. et al. Biodiversity-based identification and functional characterization of the mannose-specific adhesin of *Lactobacillus plantarum*. *J. Bacteriol.* 187, 6128–6136 (2005).
337. Kankainen, M. et al. Comparative genomic analysis of *Lactobacillus rhamnosus* GG reveals pili containing a human-mucus binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 17193–17198 (2009).
338. Wei, Y., Li, F., Li, L., Huang, L. & Li, Q. Genetic and Biochemical Characterization of an Exopolysaccharide With in vitro Antitumoral Activity Produced by *Lactobacillus fermentum* YL-11. *Front. Microbiol.* 10, (2019).
339. Milward, E. A. et al. Transcriptomics. in *Encyclopedia of Cell Biology* 160–165 (2016). doi:10.1016/B978-0-12-394447-4.40029-5
340. Smelt, M. J. et al. The Impact of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 Teichoic Acid D-Alanylation on the Generation of Effector and Regulatory T-cells in Healthy Mice. *PLoS One* 8, (2013).
341. Vargas García, C. E. et al. Piliation of *Lactobacillus rhamnosus* GG promotes adhesion, phagocytosis, and cytokine modulation in macrophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 81, 2050–2062 (2015).
342. Mizuno, H. et al. Exopolysaccharides From *Streptococcus thermophilus* ST538 Modulate the Antiviral Innate Immune Response in Porcine Intestinal Epitheliocytes. *Front. Microbiol.* 11, (2020).
343. Ale, E. C., Rojas, M. F., Reinheimer, J. A. & Binetti, A. G. *Lactobacillus fermentum*: Could EPS production ability be responsible for functional properties? *Food Microbiol.* 90, (2020).
344. Naghmouchi, K. et al. *Lactobacillus fermentum*: a bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* (2019). doi:10.1080/10408398.2019.1688250

345. Frick, J. S. et al. *Lactobacillus fermentum* attenuates the proinflammatory effect of *Yersinia enterocolitica* on human epithelial cells. *Inflamm. Bowel Dis.* **13**, 83–90 (2007).
346. Sharma, R. et al. Diet supplemented with phytochemical epigallocatechin gallate and probiotic *Lactobacillus fermentum* confers second generation synbiotic effects by modulating cellular immune responses and antioxidant capacity in aging mice. *Eur. J. Nutr.* (2019). doi:10.1007/s00394-018-01890-6
347. Ali, S. A., Kumar, S., Mohanty, A. K. & Behare, P. Draft genome sequence of *Lactobacillus fermentum* NCDC 400, isolated from a traditional Indian dairy product. *Genome Announc.* **6**, (2018).
348. Paveljšek, D. et al. *Lactobacillus fermentum* L930BB and *Bifidobacterium animalis* subsp. *Animalis* IM386 initiate signalling pathways involved in intestinal epithelial barrier protection. *Benef. Microbes* **9**, 515–525 (2018).
349. Čitar, M. et al. Human intestinal mucosa-associated *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with probiotic properties modulate IL-10, IL-6 and IL-12 gene expression in THP-1 cells. *Benef. Microbes* **6**, 1–12 (2015).
350. Pérez-Cano, F. J., Dong, H. & Yaqoob, P. In vitro immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 and *Lactobacillus salivarius* CECT5713: two probiotic strains isolated from human breast milk. *Immunobiology* **215**, 996–1004 (2010).
351. Olivares, M. et al. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition* **23**, 254–260 (2007).
352. Xu, J. & Verstraete, W. Evaluation of nitric oxide production by lactobacilli. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 504–507 (2001).
353. Chauhan, R. et al. Amelioration of colitis in mouse model by exploring antioxidative potentials of an indigenous probiotic strain of *Lactobacillus fermentum* Lf1. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–12 (2014).
354. Archer, A. C., Kurrey, N. K. & Halami, P. M. In vitro adhesion and anti-inflammatory properties of native *Lactobacillus fermentum* and *Lactobacillus delbrueckii* spp. *J. Appl. Microbiol.* **125**, 243–256 (2018).
355. Archer, A. C., Muthukumar, S. P. & Halami, P. M. Anti-inflammatory potential of probiotic *Lactobacillus* spp. on carrageenan induced paw edema in Wistar rats. *Int. J. Biol. Macromol.* **81**, 530–537 (2015).
356. Vitlic, A. et al. Isolation and characterization of a high molecular mass β -glucan from *Lactobacillus fermentum* Lf2 and evaluation of its immunomodulatory activity. *Carbohydr. Res.* **476**, 44–52 (2019).
357. ZhiMin, H., HePing, Z., YongJie, J., SiGuo, L. & GuanHong, L. Effect of probiotic

- Lactobacillus fermentum* F6 on β -defensin-9 expression in epithelial cells of chicken small intestine. *Chinese J. Vet. Sci.* **32**, 1142–1147 (2012).
358. Li, W. et al. Structural Characterization and Anticancer Activity of Cell-Bound Exopolysaccharide from *Lactobacillus helveticus* MB2-1. *J. Agric. Food Chem.* **63**, 3454–3463 (2015).
359. Paucar, C. Desarrollo de un helado artesanal probiótico con la cepa *Lactobacillus fermentum* UCO-979C con actividad inmunomoduladora y anti-*Helicobacter pylori*. (Universidad de Concepción, 2020).



SOBRE EL AUTOR

Valeria García Castillo, Doctor (Candidato) en Ciencias con Mención en Microbiología, Magister en Medicina transfusional, Bacterióloga y Laboratorista clínico. Área de experticia: manejo de técnicas de microbiología, cultivo celular, biología molecular, citometría de flujo y manejo de animales de laboratorio. Realizo colaboración con laboratorios en Argentina (Laboratorio de Inmunobiotecnología- CERELA CONICET) y Japón (Food & Feed Immunology Group and Livestock Immunology- Universidad de Tohoku), participando en investigaciones que han generado varias publicaciones sobre metodologías *in vitro* para la selección de bacterias con actividad inmunomoduladora para la aplicación en enfermedad inflamatoria intestinal, infecciones respiratorias e intestinales en humanos y animales.

I. ARTÍCULOS DE INVESTIGACIÓN

Zhou, B.; Albarracin, L.; Indo, Y.; Arce, L.; Masumizu, Y.; Tomokiyo, M.; Islam, M.A.; **García-Castillo, V.**; Ikeda-Ohtsubo, W.; Nochi, T.; Morita, H.; Takahashi, H.; Kurata, S.; Villena, J.; Kitazawa, H. Selection of Immunobiotic *Ligilactobacillus salivarius* Strains from the Intestinal Tract of Wakame-Fed Pigs: Functional and Genomic Studies. *Microorganisms* 2020, 8, 1659. doi:10.3390/microorganisms8111659

García-Castillo V., Tomokiyo M, Raya Tonetti F, Islam MA, Takahashi H, Kitazawa H and Villena J (2020) Alveolar Macrophages Are Key Players in the Modulation of the Respiratory Antiviral Immunity Induced by Orally Administered *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. *Front. Immunol.* 2020. 11:568636. doi: 10.3389/fimmu.2020.568636.

Sato N, Yuzawa M, Islam MA, Albarracin L, **García-Castillo V.**, Ikeda-Ohtsubo W, Iwabuchi N, Xiao J, Garcia-Cancino A, Villena J, Kitazawa H. Evaluation of Porcine Intestinal Epitheliocytes as an In vitro Immunoassay System for the Selection of Probiotic Bifidobacteria to Alleviate Inflammatory Bowel Disease. *Probiotics & Antimicro. Prot.* 2020. doi: 10.1007/s12602-020-09694-z.

Sato N, **García-Castillo V.**, Yuzawa M, Islam AM, Albarracin L, Tomokiyo M, Ikeda-Ohtsubo W, Garcia-Cancino A, Takahashi H, Villena J, Kitazawa H. Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* TL2937 alleviates dextran sodium sulfate-induced colitis by differentially modulating the transcriptomic response of intestinal epithelial cells. *Frontiers Immunology* 2020 11:2174. doi: 10.3389/fimmu.2020.02174

Clua P., Tomokiyo M., Raya Tonetti F., Islam, M. A., **García Castillo. V.**, Marcial, G., Salva, S., Alvarez, S., Takahashi, H., Kurata, S., Kitazawa, H., & Villena, J. The Role of Alveolar Macrophages in the Improved Protection against Respiratory Syncytial Virus and Pneumococcal Superinfection Induced by the Peptidoglycan of *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. *Cells* 2020, 9(7), 1653. doi:10.3390/cells9071653.

Albarracin L, **Garcia-Castillo V**, Masumizu Y, Indo Y, Islam MA, Suda Y, Garcia- Cancino A, Aso H, Takahashi H, Kitazawa H, et al. Efficient Selection of New Immunobiotic Strains With Antiviral Effects in Local and Distal Mucosal Sites by Using Porcine Intestinal Epitheliocytes. *Front Immunol* 2020, 11:453. doi:10.3389/fimmu.2020.00543

Mansilla F, Takagi M, **Garcia-Castillo V**, Nader-Macias ME, Vignolo G, Kitazawa H, Villena J. Modulation of Toll-like receptor-mediated innate immunity in bovine intestinal epithelial cells by lactic acid bacteria isolated from feedlot cattle. *Benef Microbes* 2020 11(3):269–282. doi 10.3920/BM2019.0189.

Garcia-Castillo V, Marcial G, Albarracín L, Tomokiyo M, Clua P, Takahashi H, Kitazawa H, Garcia-Cancino A, Villena J. The exopolysaccharide of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C is partially involved in its immunomodulatory effect and its ability to improve the resistance against *Helicobacter pylori* infection. *Microorganisms* (2020) 8(4):479. doi:10.3390/microorganisms8040479.

Garcia-Castillo V, Marín-Vega AM, Ilabaca A, Albarracín L, Marcial G, Kitazawa H, Garcia-Cancino A, Villena J. Characterization of the immunomodulatory and anti- *Helicobacter pylori* properties of the human gastric isolate *Lactobacillus rhamnosus* UCO- 25A. *Biofouling* (2019) 35(8):922–937. doi:10.1080/08927014.2019.1675153.

Albarracin L, Komatsu R, **Garcia-Castillo V**, Aso H, Iwabuchi N, Xiao JZ, Abe F, Takahashi H, Villena J, Kitazawa H. Deciphering the influence of paraimmunobiotic bifidobacteria on the innate antiviral immune response of bovine intestinal epitheliocytes by transcriptomic analysis. *Benef Microbes* (2019) 10(2):1076199–209. doi:10.3920/BM2018.0024

Garcia-Castillo V, Komatsu R, Clua P, Indo Y, Takagi M, Salva S, Islam MA, Alvarez S, Takahashi H, Garcia-Cancino A, et al. Evaluation of the Immunomodulatory Activities of the Probiotic Strain *Lactobacillus fermentum* UCO-979C. *Front Immunol* (2019) 10:1376.1–14. doi:10.3389/fimmu.2019.01376

Garcia-Castillo V, Zelaya H, Ilabaca A, Espinoza-Monje M, Komatsu R, Albarracín L, Kitazawa H, Garcia-Cancino A, Villena J. *Lactobacillus fermentum*

UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection in vitro. *Benef Microbes* (2018) 9(5):829–841. doi:10.3920/BM2018.0019

II. GENOME ANNOUNCEMENTS

Zhou B, Albarracin L, Masumizu Y, Indo Y, Islam AM, **García-Castillo V**, Ikeda-Ohtsubo W, Suda Y, Aso H, Villena J, Kitazawa H. Draft Genome Sequence of *Ligilactobacillus salivarius* FFIG58 Isolated from the Intestinal Tract of Wakame-fed pig. *Microbiol Resour Announc* (2020). 8(34) e00839-20. doi: 10.1128/MRA.00839-20

García-Cancino A, Albarracin L, Espinoza-Monje M, Campos-Martin J, **García-Castillo V**, Nakano Y, Ikeda-Ohtsubo W, Guitierrez-Zamorano C, Morita H, Kitazawa H, et al. Draft Genome Sequence of *Weissella viridescens* UCO-SMC3, Isolated from the Slime of *Helix aspersa* Müller Snails. *Microbiol Resour Announc* (2019) 8(11) e01654-18. doi:10.1128/mra.01654-18

III. ARTICULO DE REVISIÓN

García-Castillo V, Sanhueza E, McNerney E, Onate SA, García A. Review microbiota dysbiosis: A new piece in the understanding of the carcinogenesis puzzle. *J Med Microbiol* (2016) 65(12):1347–1362. doi:10.1099/jmm.0.000371

IV. CAPITULO DE LIBRO

García-Castillo V, Albarracin L, Kitazawa H, Villena J. “Screening and characterization of immunobiotic lactic acid bacteria with porcine immunoassay systems,” in *Methods in Molecular Biology* (Springer), 131–144. doi:10.1007/978-1-4939-8907-2_12

V. SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

Una cepa inmunobiótica de *Lactobacillus rhamnosus* RGM 2413 y su uso como Inmunomodulador e inhibidor del patógeno gástrico *Helicobacter pylori*. Solicitante: Universidad de Concepción. Solicitud Número: 201703473. Diciembre 2017.

VI. PARTICIPACIÓN EN EVENTOS

8th Congress of European Microbiologists. FEMS 2019. Modalidad de trabajo poster Immunobiotic *Lactobacillus jensenii* TL2937 Alleviates Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Mice. Glasgow. 7-11 Julio 2019

XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología- ALAM- Modalidad trabajo poster. "In vivo studies of the immunomodulatory and anti-*Helicobacter pylori* activities of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C". Santiago-Chile. Noviembre 13-16 de 2018.

XII Congress of the Latin American Association of Immunology – ALAI. XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology – SMI. . Modalidad de trabajo poster. "Immunomodulatory properties of microcapsules containing *Lactobacillus rhamnosus* UCO-25A in planktonic o biofilm forms: impact on intestinal and systemic immunity". Cancún- México. Mayo 14-18 de 2018.

XII Congress of the Latin American Association of Immunology – ALAI. XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology – SMI. . Modalidad de trabajo poster. "Comparative study of the immunomodulatory activities of lactobacilli strains in porcine intestinal epithelial cells: effect on the innate antiviral immune response". Cancún- México. Mayo 14-18 de 2018.

XII Congress of the Latin American Association of Immunology – ALAI. XXIII Congress of the Mexican Society of Immunology – SMI. . Modalidad de trabajo poster. "*Lactobacillus fermentum* UCO-979C beneficially modulates the innate immune response triggered by *Helicobacter pylori* infection". Cancún-México. Mayo 14-18 de 2018.

Tohoku Forum for Creativity. New Horizons in Food Science via Agricultural Immunology Stage 1. Frontiers in agricultural immunology. Youth program for agricultural immunology. Modalidad de trabajo poster/ Presentación oral. Immunobiotic *Lactobacillus fermentum* UCO-979C and its effect against *Helicobacter pylori* infection. Sendai. Japón. Julio 21-22 de 2017.

V Simposio internacional de Bacterias lácticas. Modalidad presentación oral y trabajo póster. Study of biofilm formation by *Lactobacillus fermentum* UCO-979C, isolated from stomach, and its influence on *Helicobacter pylori* "in vitro" colonization using AGS and Caco-2 cells as model. CERELA-CONICET. San Miguel de Tucumán. Argentina. Octubre 19-21 de 2016.

V Simposio internacional de Bacterias lácticas. Modalidad presentación de trabajo póster. Immunomodulatory activity of *Lactobacillus fermentum* UCO-979C in gastric epithelial cells and its effect against *Helicobacter pylori* infection.

CERELA-CONICET. San Miguel de Tucumán. Argentina. Octubre 19-21 de 2016.

Short term visiting training. Tohoku University Research-Oriented Incoming Student (ROIS) Scholarship. Sendai-Japón. Enero- Febrero de 2018.

JSPS Core-to-Core Program A Grant (Advanced Research Networks):
“Establishment of international agricultural immunology research-core for a quantum improvement in food safety”. Sendai-Japón. Julio- Octubre 2017.

