

**UNIVERSITAT AUTONOMA DE BARCELONA**

**DEPARTAMENTO DE MEDICINA**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Director: Dr.Francisco Guarner Aguilar

Tutor: Prof.Juan Ramón Malagelada Benaprés

**INTERACCIONES DE LAS BACTERIAS DE LA FLORA CON EL  
SISTEMA INMUNE INTESTINAL**

Tesis presentada por **Natalia Borrueal Sainz** para la obtención del grado de  
Doctor en Medicina y Cirugía

Barcelona 2005

A mis padres, Rosario y José Mari

A Marc y Maider

A Jordi

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Juan Ramón Malagelada, por su apoyo constante durante estos años y por haberme brindado la oportunidad de trabajar en un ambiente de alta calidad científica sin el que esta tesis no hubiera sido posible.

Al Dr. Francisco Guarner, alma de éstos y muchos otros estudios de investigación en el área de inflamación de la mucosa. Gracias por todas las horas dedicadas, por las ideas, las discusiones y todas esas conversaciones en las que he llegado a entender cómo "dialogan" bacterias y epitelio.

Al Dr. Francesc Casellas, la persona que me ha enseñado mucho de lo que sé sobre enfermedad inflamatoria intestinal y que me introdujo en el mundo de la investigación. Gracias por su ánimo infatigable, su inmensa capacidad de trabajo y sobre todo por ser un buen amigo.

A la Dra. Luisa Guarner, mujer y médico íntegra y entusiasta, por haberme transmitido la pasión por el trabajo bien hecho, por el cuidado de los pacientes, por la justicia y la familia. Su ejemplo me ayuda muchos días a perseverar.

Al Dr. Jaime Vilaseca, por enseñarme a valorar a los pacientes en su integridad. Su afán de conocimiento y su capacidad para el estudio encauzaron desde que fui residente mi manera de entender mi trabajo.

A todas las personas que trabajan en el laboratorio de investigación, especialmente a las Dras. María Antolín y Mónica Carol y a Marta Llopis, coautoras de los trabajos incluidos en esta tesis, por sus ideas, sus críticas y su constancia a la hora de conseguir experimentos y técnicas de calidad inmejorables. A Montserrat Casellas, Milagros Gallart y Carmen Alastrue por la gran cantidad de horas dedicadas a los análisis de las muestras.

A Gisel Fontanet, Toni Torrejón y a la Dra. Manuela Sampedro por su trabajo en la Unitat d'atenció Crohn-colitis atendiendo a los pacientes en sus dudas, sus recaídas y sus necesidades. Su trabajo de cada día ha permitido que pudiera dedicar más tiempo a la investigación y a la realización de esta tesis.

A los cirujanos Dr. Felipe De Lara, Dr. Eloy Espín y Dr. Javier Naval, ya que sin su colaboración para la obtención de las muestras quirúrgicas, estos trabajos no se hubieran llevado a cabo.

A todos mis compañeros del Servicio de Digestivo, presentes y pasados, porque a su lado he aprendido todo lo que se de mi profesión.

A Mari Carmen Profitós y a todas las enfermeras de la planta del Servicio de Digestivo, grandes profesionales del cuidado del enfermo, por todas las horas y guardias compartidas durante estos años de trabajo.

A los pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, por su generosidad en la colaboración en nuestros estudios y su confianza en los progresos del conocimiento.

## INDICE

Abreviaturas .....	5
Artículos incluidos.....	6
Introducción.....	7
1. Interacciones bacterianas con el sistema inmune intestinal.....	8
1.1. Sistema inmune intestinal.....	8
1.2. Tolerancia oral.....	10
1.3. Papel de las células epiteliales en la regulación inmune del intestino.....	12
1.4. Interacción bacterias-sistema inmune intestinal.....	14
1.5. Inmunidad innata.....	15
1.6. Inmunidad adquirida.....	20
2. Probióticos.....	24
2.1. Definición.....	24
2.2. Efectos sobre la inmunidad innata.....	25
2.3. Efectos sobre la inmunidad adquirida.....	28
2.4. Tolerancia oral a los antígenos.....	31
2.5. Efecto antiinflamatorio.....	35
3. Enfermedad inflamatoria intestinal.....	37
3.1. Susceptibilidad genética.....	38
3.2. Factores ambientales: flora intestinal.....	40
3.2.1. Agente infeccioso específico.....	42
3.2.2. Falta de tolerancia a la flora.....	45
3.2.3. Antibióticos y enfermedad inflamatoria intestinal.....	48
3.3. Respuesta inflamatoria crónica.....	51
3.4. Modelo hipotético.....	52
4. Probióticos y enfermedad inflamatoria intestinal.....	54
4.1. Probióticos en modelos experimentales de colitis.....	54
4.2. Probióticos en enfermedad inflamatoria humana.....	57
Hipótesis.....	62
Objetivos .....	64

Artículos originales.....	66
Artículo 1.....	67
Artículo 2.....	68
Discusión .....	69
Conclusiones .....	78
Bibliografía .....	81

## ABREVIATURAS

GALT	Gut associated lymphoid tissue
Th	T helper
IL	Interleuquina
TGF $\beta$	Transforming growth factor beta
Ig	Inmunoglobulina
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor alfa
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PPR	Pattern recognition receptor
TLR	Toll-like receptor
NF $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
NK	Natural killer
IFN $\gamma$	Interferon gamma
NO	Oxido nítrico
IBD	Inflammatory bowel disease
TNBS	Acido trinitrobenzosulfónico
DSS	Dextrano sulfato sódico

## ARTICULOS INCLUIDOS

El trabajo de investigación discutido en esta tesis se basa en los siguiente artículos

1. "Increased mucosal tumor necrosis factor  $\alpha$  production in Crohn's disease can be downregulated ex-vivo by probiotic bacteria."

**N.Borrueal**, M.Carol, F.Casellas, M.Antolín, F.De Lara, E.Espín, J.Naval, F.Guarner, J.R.Malagelada.

*Gut 2002;51:659-664.*

2. "Effects of nonpathogenic bacteria on cytokine secretion by human intestinal mucosa."

**N.Borrueal**, F.Casellas, M.Antolín, M.Llopis, M.Carol, E.Espín, J.Naval, F.Guarner, J.R.Malagelada.

*American Journal of Gastroenterology 2003;98:865-870.*



## INTRODUCCION

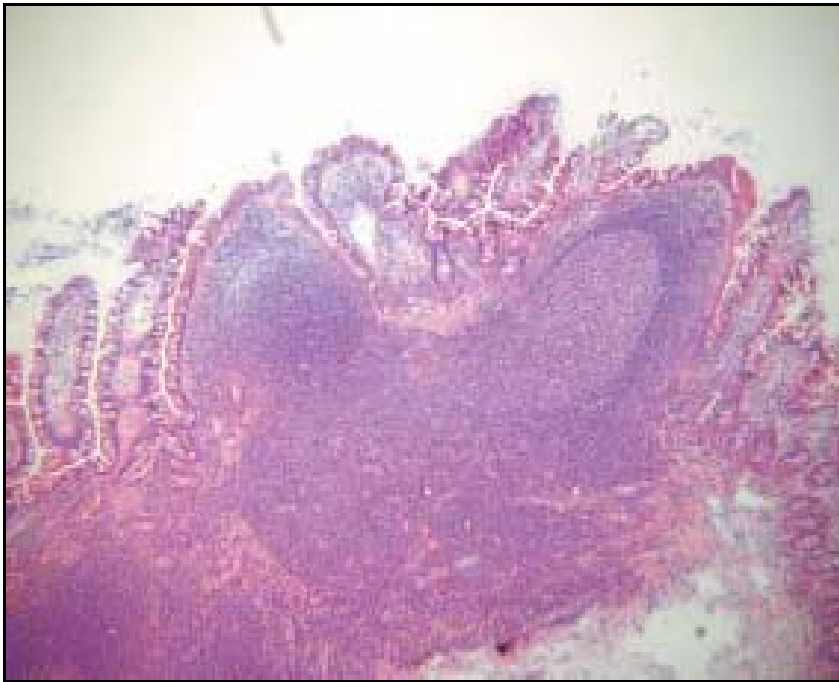
## 1. INTERACCIONES BACTERIANAS CON EL SISTEMA INMUNE INTESTINAL

El intestino es el lugar del organismo donde desde el momento del nacimiento existe el mayor y más constante estímulo antigénico por el continuo contacto con los antígenos alimentarios y los elementos de la flora intestinal normal. El intestino es, además, particularmente vulnerable como lugar de infección y como puerta de entrada al resto del organismo, ya que para mantener la función digestiva posee una enorme superficie (400 m<sup>2</sup>) formada por las vellosidades tapizadas de enterocitos. La integridad de esta capa de enterocitos se mantiene a pesar de que toda la superficie se recambia cada 2-3 días. Ya desde el nacimiento, se ponen en marcha mecanismos madurativos y adaptativos para mantener una barrera mucosa intestinal íntegra y activa e incorporar una población bacteriana normal estable. La protección frente a los agentes potencialmente dañinos se establece mediante diversos factores como la saliva, el ácido gástrico, el peristaltismo, el moco, los enzimas proteolíticos, la flora intestinal, la capa de células epiteliales y el sistema inmune intestinal (Isolauri 2001).

### ***1.1. Sistema inmune intestinal***

El tejido linfoide asociado a la mucosa intestinal (*Gut associated lymphoid tissue* ó GALT) representa la mayor masa de tejido linfoide del organismo y, por lo tanto, constituye un elemento de gran importancia en la capacidad inmunológica total del huésped. Las funciones reguladoras de la respuesta

inmune intestinal ocurren en diferentes compartimentos fisiológicos, bien en forma de agregados como en los folículos y placas de Peyer, o de manera difusa en la mucosa y el epitelio intestinal (linfocitos intraepiteliales y de la lámina propia). El intestino delgado contiene alrededor de 250 placas de Peyer (agregados de 5 o más folículos) y miles de folículos solitarios, que en el colon se encuentran en gran cantidad. Cada folículo se asocia a un epitelio especializado (células M o linfoepitelio) que carece de criptas o vellosidades y que se encarga de transportar los antígenos a su través hasta contactar con las células inmunes.



*Figura 1: Morfología de una placa de Peyer humana normal (HE×40)*

*(McDonald 2003)*

A todos los niveles del intestino, el sistema inmune está procesando continuamente antígenos de la luz, por lo que los folículos linfoides de la mucosa presentan un alto grado de activación (MacDonald 2003). Una vez activados por el contacto con los antígenos, los linfocitos T y B de las placas de

Peyer adyacentes a las células M proliferan en forma de un clon antígeno-específico, pasan a la sangre y desde allí migran nuevamente a la lámina propia. La lámina propia aloja a los linfocitos T CD4+ y es el lugar donde los linfocitos B se transforman en células plasmáticas productoras de IgA secretora específica contra los diferentes antígenos ( Mac Donald 2001). En la superficie de la mucosa intestinal existe una gran producción de IgA secretora que, a diferencia de la IgA circulante, es resistente a la proteólisis intraluminal y no activa la vía del complemento por lo que no induce inflamación. Estas características, originadas en su estructura dimérica o polimérica, la hacen ideal como mecanismo de protección en las superficies mucosas que están en contacto continuo con productos antigénicos. El origen de los linfocitos intraepiteliales no está del todo claro aunque algunos estudios en ratones sugieren que pueden originarse "in situ" a partir de progenitores locales (Saito 1998).

Todas las evidencias disponibles hasta ahora sugieren que el sistema inmune intestinal responde activamente a los antígenos alimentarios y de la flora normal sin inducir enfermedad, lo que se denomina "inflamación fisiológica", caracterizada en el intestino humano por un perfil Th1 de citoquinas, con altos niveles locales de IL-12 en respuesta, probablemente, a la flora normal y a los antígenos de la dieta (Monteleone 2003).

### ***1.2. Tolerancia oral***

El término puede definirse como la respuesta fisiológica a los antígenos alimentarios y a la flora comensal mediante la inducción de un estado específico

de no-respuesta inmunológica (Mc Donald, 2001). Por el contrario, los microorganismos patógenos inducen potentes respuestas inmunes en el intestino, lo que indica que el sistema inmune intestinal es capaz de procesar y distinguir entre los antígenos inocuos y los potencialmente lesivos. En realidad, una definición mejor de la tolerancia oral sería la de tolerancia sistémica obtenida oralmente ya que el proceso se hace efectivo no sólo localmente sino sistémicamente. El balance entre tolerancia (supresión) y sensibilización (priming) depende de varios factores entre los que se incluyen la carga genética, la naturaleza del antígeno, la dosis y frecuencia de administración del mismo, la edad de la primera exposición, el estado inmunológico del huésped o la vía de exposición (materno-fetal, leche materna) (Strobel 2001). Los mecanismos que inducen la tolerancia no están demasiado claros y probablemente actúan a diferentes niveles de la cascada inmunológica complementándose unos con otros. Algunos estudios sugieren que la inducción de tolerancia depende sobre todo del tipo de exposición al antígeno (Strobel 1998, Strober 1998). Así, la administración de dosis altas del antígeno induciría la tolerancia mediante un mecanismo de delección o anergia de los linfocitos, mientras que la administración repetida del antígeno a dosis bajas la induciría a través de mecanismos reguladores celulares o bioquímicos. La delección consiste en la eliminación de clones de linfocitos T específicos para un antígeno mediante apoptosis y la anergia es la falta de respuesta a un antígeno que pasa a la sangre en grandes cantidades en ausencia de una respuesta inflamatoria que sirva de estimulación a los linfocitos. La alternativa a la delección o anergia para la eliminación de linfocitos T-específicos es la inducción de células T-

reguladoras con actividad inhibidora. Estas células inhibidoras son fundamentalmente linfocitos Th3 que ejercen su función a través de la liberación de citoquinas supresoras como la IL-10 y el TGF $\beta$  (Garside 2001). Muchas de las alteraciones en la inmunoregulación que inducen una sensibilización a antígenos (alergia) en vez de un proceso de tolerancia suceden durante la infancia. Los mecanismos de exclusión, eliminación y regulación inmune son incompletos durante un periodo de tiempo tras el nacimiento, lo que, en algunos casos, puede conducir a una incorporación aberrante de antígenos. La inmadurez inmunológica se caracteriza por una disminución de la producción de IgA y una alteración en la respuesta inmune celular que hace que predomine un perfil Th2. Esta predominancia induce un aumento de la producción de IgE y una respuesta de tipo atópica ante los antígenos fundamentalmente alimentarios. Teniendo esto en cuenta, las nuevas estrategias de tratamiento de procesos como la alergia alimentaria están dirigidas a inducir tolerancia sistémica por vía oral mediante la administración de antígenos alimentarios o bacterianos ya que, probablemente, el proceso de incorporación y presentación del antígeno en el epitelio intestinal es el punto crítico para la inducción bien de tolerancia o de una respuesta inmune específica (Nowak- Wegrzyn 2003).

### ***1.3. Papel de las células epiteliales en la regulación inmune del intestino***

En virtud de su localización anatómica, la célula epitelial intestinal tiene la capacidad de jugar un papel de gran importancia en la inmunomodulación del

intestino, ya que constituye la puerta de entrada para los antígenos luminales alimentarios y bacterianos (Shao 2001). Uno de los puntos claves de la regulación inmune del intestino será, por lo tanto, la interacción entre la célula epitelial que controla el acceso a los diferentes compartimentos de la mucosa y las células inmunes que median las respuestas inflamatorias o tolerantes. La célula epitelial tiene no sólo la capacidad de procesar y transportar activamente los antígenos hacia la lámina propia sino además actuar como célula presentadora de antígeno ya que expresa moléculas del MHC clase I y II que interactúan con las células efectoras (Van Niel G, 2003). Los linfocitos T antígeno-específicos se transforman en no-respondedores o anérgicos cuando es únicamente la célula epitelial la que presenta el antígeno. Aunque se produce una importante proliferación del clon específico, no se desencadena una respuesta inflamatoria contra las células epiteliales (Vezys 2000). Así, en un modelo de co-cultivo de células epiteliales colónicas, macrófagos y linfocitos T CD4, las células epiteliales eran capaces de prevenir la activación de los linfocitos por las células presentadoras de antígenos profesionales (Cruickshank 2004). En consecuencia, parece que, en condiciones normales, la presentación del antígeno luminal no patógeno por la célula epitelial conduce a la inactivación o supresión de la respuesta inmune. Sin embargo, en condiciones patológicas como la enfermedad de Crohn, estos mecanismos reguladores probablemente fallan conduciendo a una situación en la que la célula epitelial es obviada y los antígenos bacterianos contactan directamente con células presentadoras de antígeno "profesionales" que inducen la respuesta inflamatoria local.

#### **1.4. Interacción bacterias-sistema inmune intestinal**

El intestino humano está habitado por un complejo y dinámico ecosistema bacteriano. El hábitat intestinal de un individuo contiene entre 300 y 500 especies diferentes de bacterias y el número de células microbianas dentro de la luz intestinal es hasta 10 veces mayor que el número de células eucariotas del organismo. El colon es la región del intestino con una mayor densidad de bacterias vivas alcanzando concentraciones de hasta  $10^{11}$  –  $10^{12}$  células/g de contenido intestinal componiendo el 60% de la masa fecal. La constante interacción entre el huésped y la flora afecta a la homeostasis del organismo tanto en condiciones fisiológicas como patológicas (Guarner F, 2003). Además de formar una barrera física de membranas celulares y "tight junctions", el epitelio dispone de métodos activos para reprimir a las bacterias siendo capaz de discriminar entre la flora residente y los microorganismos patógenos. Las vías y métodos de señalización que determinan estas funciones de interacción son lo que se ha denominado "cross-talk" epitelio-bacteria (Lu 2001).

Fisiológicamente, el establecimiento de la microflora intestinal comienza ya en el nacimiento y determina el desarrollo del sistema inmune intestinal. Estudios en animales neonatos y en animales germ-free han demostrado que la interacción entre el epitelio y la flora es esencial para el desarrollo normal del sistema inmune tanto humoral como celular (Elyson 2001). Cuando el intestino de mamíferos es colonizado por nuevas especies bacterianas tras el nacimiento, aumenta el número de células plasmáticas a lo largo del intestino, la producción de anticuerpos circulantes específicos y naturales anti-bacterias, se estimula la producción en los centros germinales de las placas de Peyer de células B



antígeno-específicas (Cebra, 1998) y promueve la maduración y acumulación de linfocitos en el epitelio asociado a las placas de Peyer (Yamanaka 2003). En ausencia de microflora intestinal, los animales presentan un sistema inmune intestinal infradesarrollado: disminución de las placas de Peyer, nódulos linfáticos mesentéricos sin centros germinales ni células plasmáticas, quimiotaxis y actividad natural killer macrofágica disminuída y un número muy reducido de linfocitos intestinales (Butler 2000). Además, estos animales no producen IgA y poca IgG y se inhibe la formación de granulocitos en la médula ósea. Sin embargo, cuando se les introduce en un ambiente convencional "contaminado", el sistema inmune intestinal se desarrolla rápidamente y comienza la producción de una gran variedad de isotipos de anticuerpos, incluyendo anticuerpos específicos contra las bacterias de la propia flora. Esta interacción entre el sistema inmune intestinal y las bacterias de la flora mantiene una activación del tejido linfoide asociado a la mucosa a lo largo de toda la vida. La mayor parte de la investigación relacionada con este tema ha estado centrada hasta ahora en dilucidar los mecanismos por los que las bacterias patógenas interactúan con el sistema inmune. Su conocimiento puede ayudar a entender también cómo se produce esta interacción, en condiciones fisiológicas, con las bacterias no patógenas.

### ***1.5. Inmunidad innata***

La respuesta defensiva del huésped contra los microorganismos patógenos se basa en dos componentes bien diferenciados pero que trabajan sinérgicamente: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa o adquirida. La respuesta

adaptativa se caracteriza por una selección clonal de linfocitos antígeno-específicos que, a largo plazo, originan una protección duradera y específica. Por el contrario, la respuesta inmune innata no es específica del patógeno que invade y no genera memoria inmunológica.

La función esencial de la inmunidad innata es su capacidad de provocar una respuesta rápida contra el microorganismo patógeno sin necesidad de inducción o maduración de linfocitos, por lo que constituye la primera línea de defensa contra las enfermedades infecciosas. La inmunidad innata está mediada fundamentalmente por las células fagocíticas, neutrófilos, eosinófilos, macrófagos y células dendríticas, células que fagocitan y destruyen a los patógenos y que, al mismo tiempo, coordinan respuestas adicionales mediante la liberación de mediadores inflamatorios y citoquinas como el  $TNF\alpha$  y la IL-1 que activan de manera complementaria la inmunidad adquirida. En el macrófago, célula presentadora de antígeno, el microorganismo es degradado y los fragmentos que resultan se presentan al linfocito T para iniciar la activación de la respuesta inmune adaptativa y el establecimiento de una inmunidad protectora a largo plazo creando una intersección entre los dos tipos de inmunidad. Si hablamos en términos filogenéticos, la inmunidad innata es mucho más antigua que la adaptativa ya que ésta última sólo aparece en animales vertebrados.

El principal fundamento de la respuesta inmune innata es el reconocimiento innato de los productos microbianos que, por otra parte, son demasiado numerosos. Un sistema inmune funcional debe ser capaz de tener un mecanismo de reconocimiento de patógenos, a la vez que mantiene la

tolerancia contra los “elementos propios” (Aderem 2000). La sensibilidad y especificidad de esta importante función se mantiene, al menos en parte, por la capacidad de reconocer los patrones específicos microbianos. Por este motivo, el primer reto al que se enfrenta la inmunidad innata es la discriminación de un gran número de patógenos mediante un número restringido de receptores. El problema se ha resuelto mediante la creación de unos receptores que reconocen fragmentos de los microorganismos patógenos que no se encuentran en las células eucariotas y que están sometidos a pocas mutaciones ya que forman parte de estructuras esenciales para la vida de los mismos y que se han llamado “pathogen-associated molecular patterns” (PAMPs). A los receptores que los reconocen se les ha denominado, por lo tanto, “pattern recognition receptors” (PRR). Los PAMPs incluyen componentes de la pared celular de bacterias como el lipopolisacárido (LPS), los peptidoglicanos o los ácidos teicoicos y otros componentes de hongos, levaduras y protozoos. Existen dos tipos fundamentales de PRR, los que median los mecanismos de fagocitosis y los que inducen vías de activación de mediadores pro-inflamatorios. Las primeras investigaciones sobre estos receptores se realizaron en la mosca *Drosophila*, que carece de inmunidad adquirida, y ha dado lugar al descubrimiento de toda una familia de estos receptores de membrana denominados Toll-like receptors (TLR) (Lien 2002). Hasta el momento, se han descrito diez diferentes TLRs en mamíferos y se ha descubierto parte de sus mecanismos de acción. La activación del receptor de membrana inicia una cascada intracelular de quinasas que produce una translocación de factores de transcripción desde el citoplasma al núcleo. El factor de transcripción más



diferentes tipos de TLR se expresan en monocitos, neutrófilos, células NK, células B, células dendríticas, células endoteliales y también en las células epiteliales intestinales.

La unión de los PAMPs a los TLRs produce activación celular que en el caso de las células presentadoras de antígenos profesionales como las células dendríticas, induce su maduración y la expresión de moléculas de superficie que determinarán tanto la potencia como la polarización de las células T en lo que se refiere al perfil de citoquinas (Cummings 2004).

La superficie luminal del intestino y del colon está continuamente expuesta a bacterias comensales Gram negativas y por lo tanto al LPS, lo que debería inducir la activación de los TLRs y la estimulación de la liberación de mediadores pro-inflamatorios. Sin embargo, por una parte, las células dendríticas presentadoras de antígeno pueden inducir en el linfocito Tnaïve un fenotipo Tregulador que mediante citoquinas como la IL-10 o el TGF $\beta$  suprimen las respuestas inflamatorias. Por otra parte, las células epiteliales intestinales expresan niveles basales bajos de este tipo de receptores para mantener una situación de "no-respuesta" ante estímulos como el LPS de las bacterias comensales (Abreu 2001). Además, recientemente ha sido descrita la capacidad de los TLR para reconocer la flora comensal e intervenir no sólo en la respuesta inflamatoria sino en la homeostasis del epitelio intestinal como mecanismo de mantenimiento de su integridad (Rakoff-Nahoum 2004).

En situaciones patológicas en las que se activan los mecanismos inflamatorios, aparecen en el medio citoquinas derivadas de los linfocitos T como el IFN- $\gamma$  o el TNF- $\alpha$  que inducen un aumento de la expresión de los TLR lo que a su vez

conlleva un aumento en la secreción de más mediadores inflamatorios por las células epiteliales (Abreu 2002). Así, la inflamación intestinal produce una sobreexpresión de los TLR2 y 4 (Hausmann 2002) lo que en situaciones patológicas, como la enfermedad inflamatoria intestinal, podrían originar una reactividad anormal a las bacterias de la propia flora (Cario 2000).

### ***1.6. Inmunidad adquirida***

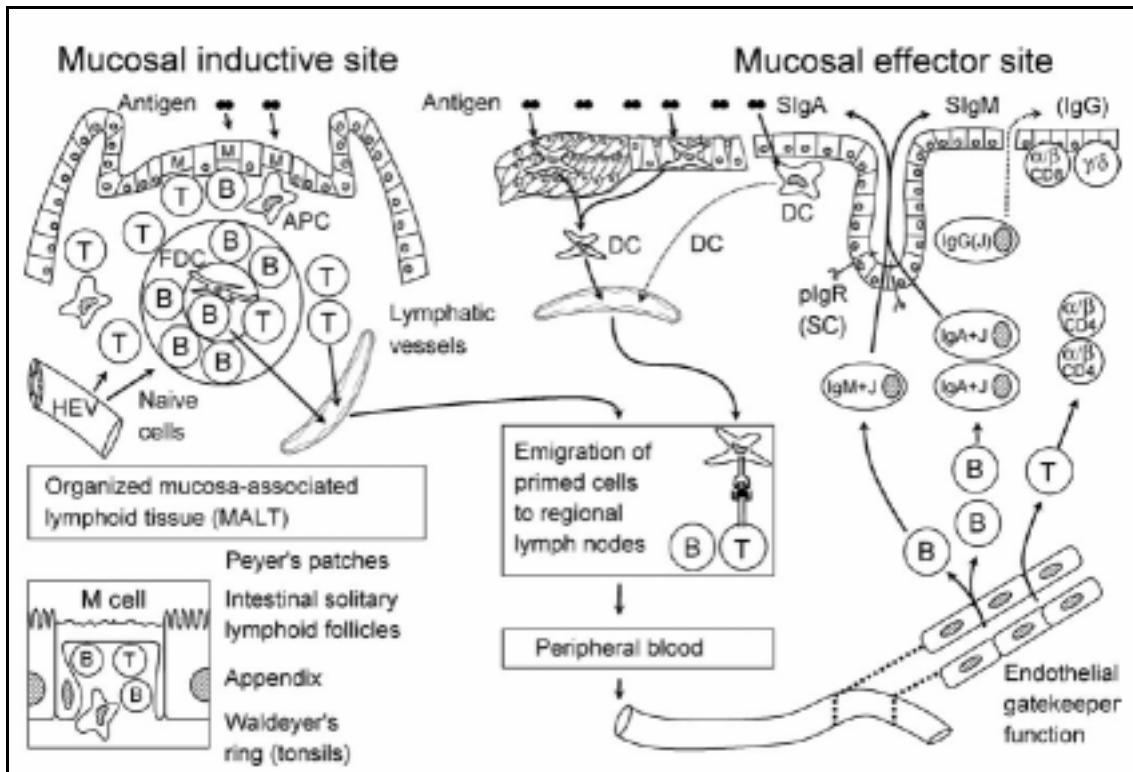
Además de la inmunidad innata, en el organismo se ha desarrollado un sistema inmune adquirido o adaptativo para proteger las superficies mucosas. Al contrario de lo que sucede con la inmunidad innata, la inmunidad adquirida es específica contra el antígeno y genera memoria inmunológica, por lo que induce una defensa duradera. Este tipo de inmunidad está protagonizado por los linfocitos B y T efectores. Las células efectoras B son las células plasmáticas productoras de inmunoglobulinas y realizan su acción mediante la inmunoexclusión e inmunoeliminación de los antígenos por los anticuerpos, IgG e IgM a nivel sistémico y del tipo IgA secretora producida localmente a nivel intestinal. Las células plasmáticas intestinales productoras de IgA derivan de las células B2 localizadas en las placas de Peyer o en los folículos solitarios y de las células B1 que residen en la cavidad peritoneal (Fagarasan 2003). El proceso se inicia mediante el contacto del antígeno con las células presentadoras que lo procesan y presentan a los linfocitos de las placas de Peyer y de los folículos, generando la proliferación de un clon antígeno-específico que pasa a sangre, se distribuye como células de memoria sistémicamente y vuelve a la lámina propia donde se aloja de forma definitiva. Ante una nuevo contacto con el antígeno,

los linfocitos T proliferan, se desencadena por un lado una respuesta inmune celular y por otro, un estímulo para que los linfocitos B se transformen en células plasmáticas productoras de Ig A secretora antígeno-específica (Fagarasan 2001). La inmunidad celular, según las moléculas co-estimuladoras expresadas por las células presentadoras de antígeno, puede polarizarse en un perfil Th1 si predominan el  $TNF\alpha$  y el  $IFN\gamma$  citoquinas que activan a los macrófagos e inducen mecanismos citotóxicos. Si la polarización es hacia el perfil Th2, se inducen las citoquinas IL-4, IL-5 e IL-13 que median la producción de IgE y la activación de los eosinófilos en las reacciones de tipo alérgico. El balance entre estos dos perfiles depende en parte de la secreción de citoquinas antiinflamatorias por el linfocito T regulador activado también por las células presentadoras de antígeno, fundamentalmente células dendríticas (Stagg 2004).

El hecho de que la estimulación de linfocitos antígeno-específicos que se produce localmente en el intestino se haga efectiva también a nivel sistémico, ha dado lugar a un campo muy relevante de investigación como es el de las vacunas administradas oralmente. El proceso de inmunoexclusión de antígenos mediante anticuerpos sucede no sólo en condiciones patológicas (p.ej. infección por una bacteria patógena) sino en condiciones fisiológicas. Las células dendríticas retienen bacterias comensales de manera que se induce la producción de IgA específica para eliminar las bacterias evitando su penetración en la mucosa y sin producir una respuesta a nivel sistémico (Macpherson 2004). En un estudio realizado en voluntarios sanos, se analizó por citometría de flujo los diferentes tipos de Igs que recubren a las bacterias de las heces. La mayor

parte de las bacterias están recubiertas de IgA y menos de IgG e IgM por lo que se induce una exclusión de la bacteria sin generar un proceso inflamatorio epitelial (Van der Waaij 1996). La IgA secretora, al contrario que la IgG o M, por su estructura, no activa vías de inflamación como la del complemento, lo que la hace ideal para proteger superficies mucosas en continuo contacto con antígenos. Por el contrario, en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, los linfocitos intestinales producen una alta concentración de IgG dirigida contra bacterias no patógenas de la propia flora comensal (Macpherson 1996). En el mismo sentido, Duchmann y colaboradores demostraron que las células mononucleares de la mucosa intestinal inflamada de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal proliferaban cuando se exponían *in vitro* a antígenos bacterianos de la flora autóloga. Sin embargo, las células de las áreas de mucosa no afectada de los mismos pacientes, de pacientes en remisión y de controles sanos no proliferaban ante las bacterias autólogas (Duchmann 1997).





**Figura 3: Descripción esquemática del sistema inmune intestinal humano**

Los lugares de inducción para las células T y B están constituidos por los tejidos linfoides regionales asociados a la mucosa (MALT) con sus folículos de células B y el epitelio de células M asociado al folículo a través del cual los antígenos exógenos lumenales son transportados activamente hasta alcanzar las células presentadoras de antígeno profesionales (APC) que incluyen a las células dendríticas (DC), macrófagos, células B y células dendríticas foliculares. Además las células dendríticas sub o intraepiteliales pueden capturar antígenos y migrar vía linfática a los ganglios linfáticos regionales donde se transforman en APC activas estimulando a los linfocitos T para generar respuestas inmunes activas o supresoras. Los linfocitos B y T naive llegan al MALT (y a los ganglios linfáticos) a través de vénulas endoteliales (HEV). Después de haber sido primados para transformarse en linfocitos T/B efectores o de memoria, migran nuevamente desde el MALT y los ganglios linfáticos regionales vía linfática o sanguínea para su subsecuente extravasación en los lugares efectores. Este proceso está dirigido por el perfil de moléculas de adhesión y quemokinas expresadas en la microvasculatura, de manera que las células endoteliales controlan la inmunidad local de la mucosa.

## 2. PROBIOTICOS

### **2.1. Definición**

La demostración de que la flora intestinal es de gran importancia en el desarrollo del sistema inmune y en el mantenimiento de los procesos inmunológicos normales locales y sistémicos, ha fomentado la investigación sobre bacterias con efectos beneficiosos a nivel inmunológico que puedan ser usadas para mejorar la salud de las personas. En este sentido, y por consenso, se ha definido a los probióticos como aquellos microorganismos vivos que ingeridos en cantidad adecuada ejercen efectos beneficiosos para la salud más allá de sus propiedades puramente nutricionales (Guarner 1998). Según esta definición, los probióticos, para ser efectivos, no necesitan colonizar, sino que el punto crucial es que el consumo de una cepa específica demuestre ejercer un beneficio concreto en la salud. Aunque clásicamente el concepto de probiótico se ha asociado con los lactobacilos y bifidobacterias, actualmente podemos incluir en el término a otras cepas bacterianas no patógenas como alguna cepa de *Escherichia coli* u otros microorganismos no bacterianos como el *Saccharomyces boulardii*. En diferentes estudios, tanto en animales como en humanos, distintas cepas de microorganismos probióticos han demostrado su capacidad para modular las respuestas inmunológicas cuando son administrados por vía oral. Los probióticos son capaces de producir una estimulación de la inmunidad innata y de la inmunidad adquirida o específica, confiriendo al huésped un aumento potencial en la resistencia a microorganismos patógenos (Cross 2002). Por el contrario, los probióticos, en situaciones patológicas de hiperestimulación del sistema inmune, pueden

inducir una inhibición del mismo frenando las reacciones de hipersensibilidad o de falta de tolerancia (alergia) o ejerciendo un teórico efecto antiinflamatorio. Este espectro tan complejo de efectos sobre la inmunidad del huésped es lo que confiere a los probióticos sus propiedades inmunomoduladoras.

## ***2.2. Probióticos: estimulación de la inmunidad innata***

La inmunidad innata provoca una respuesta rápida no específica contra los microorganismos patógenos constituyendo la primera línea de defensa contra las enfermedades infecciosas. La inmunidad innata está mediada fundamentalmente por leucocitos (granulocitos y macrófagos), células que fagocitan y destruyen a los patógenos y que, al mismo tiempo, coordinan respuestas adicionales mediante la liberación de mediadores inflamatorios y citoquinas.

Estudios "in vitro", fundamentalmente con células murinas, han demostrado que el cultivo de macrófagos o leucocitos con distintas cepas de probióticos induce un aumento en la respuesta inmune innata estimulándose la liberación de diferentes mediadores como el  $\text{TNF}\alpha$ , IL-6, NO, IL-12 o  $\text{IFN}\gamma$  (Tejada-Simón 1999 a, Kato 1999). Sin embargo, los resultados de los estudios cuando las bacterias son administradas por vía oral son más contradictorios. En un estudio realizado en ratones alimentados con diferentes probióticos durante 2 semanas no se evidenció ningún cambio en la síntesis de citoquinas e inmunoglobulinas por las células inmunes de bazo, placas de Sélter y ganglios linfáticos (Tejada-Simón 1999 b). Sin embargo, cuando el efecto era analizado "ex vivo" en leucocitos extraídos de los animales, algunos probióticos inducían una

estimulación de la síntesis de citoquinas y otros una atenuación de la misma (Tejada-Simón 1999 c). Por el contrario, otro estudio (Ha 1999) demostró que en animales alimentados con yogur durante 2-4 semanas se producía una disminución de la expresión de RNA de distintas citoquinas siendo este efecto más prominente sobre el  $TNF\alpha$ .

Diferentes estudios "in vitro" en humanos demostraron que la exposición de células mononucleares de sangre periférica a bacterias gram positivas de la propia flora o a diferentes especies de lactobacilos era capaz de estimular la inmunidad innata mediante la inducción de la liberación de  $TNF\alpha$ , IL-10, IL-12, IL-18 o  $IFN\gamma$  (Chen 1999, Hessle 1999, Miettinen 1998). Sin embargo, la exposición directa de las células inmunes de sangre periférica a los microorganismos probióticos no representa adecuadamente la interacción fisiológica sistema inmune-bacterias. Consecuentemente, los estudios que pueden tener mayor relevancia son los llevados a cabo mediante la administración oral del probiótico, generalmente en forma de leche fermentada. En los últimos años, se han llevado a cabo múltiples estudios con diferentes bacterias como *Lactobacillus acidophilus* La1, *Bifidobacterium bifidum* Bb12, *Bifidobacterium lactis* HN019, *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Lactobacillus johnsonii* La1 o *Lactobacillus* GG y en algunos de ellos se ha comparado su efecto con el placebo de manera randomizada a doble ciego (Schiffrin 1995, Donnet-Hughes 1999, Chiang 2000, Gill 2001 a, Gill 2001 b, Sheih 2001, Arunachalam 2000). En todos los estudios se observan hallazgos similares en su efecto sobre la respuesta inmune innata: aumento de linfocitos totales, CD4, CD25 y células NK, de la capacidad fagocítica de mononucleares y

polimorfonucleares, de la actividad antitumoral NK y de la actividad bactericida. Sólo en un estudio en el que se administró *Lactobacillus casei* Shirota (Spanhaak 1998) no se evidenció ningún efecto en la inmunidad no específica. La mayoría de los estudios anteriormente reseñados se han realizado en voluntarios sanos de edad avanzada, ya que el tratamiento con probióticos podría constituir una alternativa efectiva y segura para estimular un sistema inmune funcionalmente en declive, lo que se ha denominado "inmunosenescencia". Otro grupo particularmente vulnerable es el de los niños preescolares que acuden a centros de día, ya que presentan un riesgo de presentar infecciones gastrointestinales y respiratorias tres veces superior al de los niños cuidados en casa. Un estudio con leche fermentada con *Lactobacillus* GG administrado a largo plazo en este grupo de niños demostró una disminución en el número y severidad de las infecciones respiratorias (Hatakka 2001). En otro estudio, doble ciego y randomizado contra placebo, la suplementación a largo plazo de la leche con *Bifidobacterium lactis* y *Streptococcus thermophilus* en niños entre 3 y 24 meses, redujo también la frecuencia de uso de antibióticos (Saavedra 2004).

El concepto de inmunomodulación, en este caso en la respuesta innata, queda bien patente en un estudio (Pelto 1998) en el que se administró leche con *Lactobacillus* GG ATCC 53103 a sujetos sanos y a pacientes con alergia a la leche. El efecto sobre la inmunidad innata se valoró mediante la expresión de receptores de fagocitosis antes y después de la ingesta de leche. Mientras que en los sujetos sanos se producía un aumento en la expresión de los receptores, en los pacientes alérgicos, el *Lactobacillus* GG revertía el aumento de expresión

de los receptores inducido previamente por la leche. Probablemente, el efecto inmunomodulador de los probióticos depende por una parte del estado inmunológico basal del huésped, y por otra, de la cepa específica estudiada por lo que las indicaciones para la aplicación del tratamiento con probióticos en humanos deberían establecerse en función de estos dos conceptos.

### **2.3. Probióticos: efectos sobre la inmunidad adquirida**

Al contrario que la inmunidad innata, la inmunidad adquirida está dirigida específicamente contra el antígeno y genera memoria inmunológica, por lo que induce una defensa duradera. Este tipo de inmunidad está protagonizado fundamentalmente por la inmunoexclusión de antígenos por anticuerpos, mayoritariamente del tipo IgA secretora que se produce localmente por los linfocitos B. El uso de probióticos para estimular la inmunidad adquirida tiene como objetivo mejorar la respuesta del huésped contra los microorganismos patógenos, es decir, prevenir o tratar las enfermedades infecciosas.

En ratones, la ingestión de un yogur con *Lactobacillus acidophilus* y *Bifidobacterium* produce un aumento en la respuesta inmune específica local y sistémica (IgA) cuando son inmunizados con toxina de cólera vía oral (Tejada-Simon 1999 d). En voluntarios sanos, la administración conjunta de *Salmonella typhi* atenuada vía oral y leche fermentada con *Lactobacillus acidophilus* y Bifidobacterias, induce un aumento cuatro veces mayor de la IgA específica que en el grupo control (Link-Amster 1994 ). Estos resultados no han podido ser reproducidos con *Lactococcus lactis* ni *Lactobacillus GG*, aunque los sujetos que

consumían este último, mostraban una tendencia a producir un mayor título de IgA específica (Fang 2000).

Ya que los probióticos son capaces de estimular la inmunidad específica contra microorganismos patógenos, parte de la investigación ha ido dirigida al tratamiento de enfermedades infecciosas, fundamentalmente gastrointestinales. En este campo, el tema mejor estudiado es el de la diarrea infantil, producida en la mayor parte de los casos por rotavirus. Desde hace más de diez años existen estudios con distintas cepas de probióticos que demuestran que su administración desde el inicio de los síntomas, reduce la duración y la frecuencia de la diarrea y disminuye el tiempo de hospitalización (Isolauri 1991, Shornikova 1997a, Shornikova 1997 b, Guandalini 2000, Rosenfeldt 2002 a, Rosenfeldt 2002 b). Recientemente, se han publicado dos meta-análisis que valoran los resultados de los estudios publicados y que confirma que los *Lactobacillus* son seguros y efectivos en el tratamiento de la diarrea aguda infecciosa en los niños y que reducen la duración y la severidad de la diarrea (Van Niel 2002, Huang 2002). Además del efecto beneficioso sobre la gastroenteritis ya establecida, la administración de *Bifidobacterium bifidus* y *Streptococcus termophilus* (Saavedra 1994) o *Lactobacillus* GG (Szajewska 2001) en niños hospitalizados reduce el riesgo de diarrea nosocomial y gastroenteritis por rotavirus durante el ingreso. El beneficio terapéutico obtenido con los probióticos en la diarrea aguda infecciosa se relaciona directamente con una estimulación de la inmunidad humoral inespecífica y específica. Este hecho se refleja en un aumento del número total de células secretoras de inmunoglobulinas, del número de células secretoras de

inmunoglobulinas específicas contra el rotavirus y de IgA en suero (Majmaa 1995, Kaila 1992). Por este motivo, los probióticos, y en concreto el *Lactobacillus* GG podría utilizarse como potenciador de la vacuna contra rotavirus ya que induce un aumento en la seroconversión (Isolauri 1995). Además este efecto es más patente cuando se utilizan bacterias vivas (Kaila 1995) y se acompaña de una disminución en la excreción de virus en heces lo que sugiere que potencia un mecanismo de inmunoexclusión (Guarino 1997). En conclusión, todos los datos acumulados hasta la fecha demuestran que los probióticos son realmente eficaces en el tratamiento y prevención de la diarrea aguda infecciosa infantil y según una revisión reciente de Cochrane también él la del adulto (Allen 2004).

Los resultados del tratamiento con probióticos (diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Saccharomyces boulardii*) en la prevención de la diarrea asociada a antibióticos incluyendo la diarrea por *Clostridium difficile* son también prometedores según dos metaanálisis recientes (D'Souza 2002, Cremonini 2002) aunque hacen falta estudios más homogéneos y con criterios más estrictos para asegurar este beneficio. Sin embargo, los datos para la prevención de la diarrea del viajero son aún muy limitados.

Un campo de investigación todavía en sus inicios pero muy prometedor y que aprovecha las propiedades estimuladoras de la inmunidad adquirida es el del desarrollo de nuevas vacunas en las que los probióticos actuarían como vectores o potenciadores de las mismas (Seegers 2002).

Estudios recientes han puesto de manifiesto la probable utilidad de los probióticos (concretamente el *Lactobacillus plantarum* 299) en situaciones en



las que la traslocación de la propia flora intestinal puede originar infecciones graves como en receptores de trasplante hepático (Rayes 2002) o en pacientes con pancreatitis aguda (Oláh 2002). En ambos estudios, la administración de *Lactobacillus plantarum* redujo el número de pacientes que presentaron sepsis e infecciones. Sin embargo, un estudio realizado en pacientes sometidos a cirugía abdominal de manera electiva, y a los que se les administraba preoperatoriamente una mezcla de lactobacilos, bifidobacterias y oligofructosa, no ha demostrado un beneficio en el sentido de disminuir las complicaciones sépticas postoperatorias (Anderson 2004). Probablemente, en el efecto beneficioso de los probióticos en las patologías asociadas a la translocación bacteriana confluyen diferentes mecanismos además de la propia estimulación de la inmunidad. Los probióticos podrían inducir una resistencia a que las bacterias potencialmente patógenas invadan los tejidos más allá de la luz intestinal (efecto barrera) mediante la competición por los lugares de anclaje en el borde en cepillo de los enterocitos, por los nutrientes o mediante la liberación de bacteriocinas (Guarner 2003).

#### ***2.4. Probióticos y tolerancia oral a los antígenos***

Las enfermedades alérgicas, caracterizadas por la alteración en la inmunoregulación que induce una sensibilización a antígenos sobrepasando los mecanismos de tolerancia suceden fundamentalmente durante la infancia. Los mecanismos de exclusión, eliminación y regulación inmune son incompletos durante un periodo de tiempo tras el nacimiento, lo que, en algunos casos, puede conducir a una incorporación aberrante de antígenos. Es precisamente

tras el nacimiento cuando numerosos antígenos de la dieta se incorporan por primera vez e interaccionan con el sistema inmune intestinal. El incremento de las condiciones higiénicas en las sociedades occidentales ha reducido la exposición a antígenos y las infecciones precoces, y este hecho se ha propuesto como el motivo del aumento de la prevalencia de las enfermedades atópicas (hipótesis de la higiene en la alergia). La respuesta inmune a los antígenos bacterianos induce un aumento de citoquinas Th1 que contrarrestan la respuesta altamente polarizada Th2 de los neonatos que de mantenerse produce un incremento de Ig E y enfermedades atópicas (Kalliomaki 2002). Los resultados de estudios realizados en ratones sugieren que, efectivamente, algún factor de la flora intestinal es el que promueve la tolerancia oral a los antígenos. La ingestión de ovoalbúmina por vía oral en ratones normales y en ratones "germ-free" tras la inmunización peritoneal con la misma sustancia, induce una respuesta inmune diferente en cada grupo. Mientras que en el grupo de ratones normales se produce una falta de producción de IgG mantenida durante 3 meses (tolerancia sistémica inducida oralmente), en el grupo de ratones "germ-free" esta falta de respuesta sistémica se mantiene sólo durante 1-3 semanas (Moreau 1996).

En este mismo sentido, bacterias de la flora y algunos probióticos, son capaces de inducir un cambio en el perfil inmunológico inducido por los antígenos. En ratones a los que se les inmuniza con ovoalbúmina intraperitonealmente, la administración conjunta de *Lactobacillus casei* Shirota por vía oral, induce un descenso en la IgE sérica y en la IgE producida en respuesta a la reestimulación con ovoalbúmina. Además, el patrón de secreción de citoquinas

por las células inmunes de los ratones expuestos al probiótico cambiaba de Th2 a Th1, es decir, promovían un comportamiento más tolerogénico (Matsukazi 1998). También en ratones, la introducción de antígenos extraños como la leche de vaca en el periodo neonatal induce un aumento de permeabilidad que se asocia a una infiltración eosinofílica de la mucosa intestinal (Arvola 1993). Sin embargo, la adición de *Lactobacillus* GG a la leche revierte este defecto de permeabilidad asociándose a un aumento en el número de células productoras de anticuerpos anti-beta-lactoglobulina, es decir, estimulando la respuesta inmune antígeno específica (Isolauri 1993).

Todos estos estudios sugieren que los probióticos pueden ejercer un efecto regulador sobre los mecanismos inmunológicos responsables de la tolerancia a los antígenos por lo que podrían ser beneficiosos en el campo de las enfermedades atópicas o alérgicas. En los últimos años, se han publicado diferentes estudios clínicos relacionados con este tema. En un estudio randomizado, doble-ciego, controlado con placebo, se estudió el efecto de la suplementación dietética con probióticos (*Bifidobacterium lactis* Bb12 y *Lactobacillus casei* GG) en 27 niños con eczema atópico en los primeros meses de vida. Los niños cuya dieta se complementó con probióticos presentaron una mejoría significativa en el score utilizado para valorar el eczema atópico, con la práctica desaparición del mismo a los 2 meses. Además, estos resultados clínicos se relacionaban con una disminución de los marcadores inflamatorios relacionados con la alergia como la proteína eosinofílica X (Isolauri 2000). En un estudio similar del mismo grupo, también en niños con dermatitis atópica, la ingestión de *Lactobacillus* GG inducía un aumento en suero de la citoquina

antiinflamatoria IL-10 lo que sugiere que los probióticos son capaces de inhibir respuestas inflamatorias más allá del ambiente intestinal a través de la modulación de la liberación de mediadores pro y anti-inflamatorios (Pessi 2000).

Si los resultados del tratamiento con probióticos en las enfermedades atópicas son esperanzadores, todavía son más llamativos los obtenidos en la prevención primaria de las mismas. En un estudio randomizado, doble-ciego, controlado con placebo, se administró *Lactobacillus* GG en el periodo prenatal a madres con un familiar de primer grado o su pareja afectos de enfermedad atópica y en el periodo post-natal a sus hijos durante 6 meses (Kalliomaki 2001). De esta manera, se seleccionaron niños con alta probabilidad de presentar eczema atópico crónico que es la manifestación alérgica más común en los primeros años de vida. La diferencia entre los dos grupos fue significativa, ya que la frecuencia de aparición de eczema atópico a los 2 años de vida en el grupo *Lactobacillus* GG fue la mitad de la del grupo placebo (15/64 vs 31/68). Posteriormente, ha sido publicado el seguimiento de esos mismos niños a los 4 años de vida comprobándose que la disminución en la incidencia de eczema atópico se mantiene (14/53 en el grupo probiótico vs 25/54 en el grupo placebo) (Kalliomaki 2003). Recientemente, se ha publicado un estudio con un diseño similar pero en el que únicamente la dieta de las madres era suplementada con el *Lactobacillus* GG, tanto en el periodo del embarazo como en el de la lactancia (Rautava 2002). El riesgo de padecer eczema atópico en los niños a los 2 años de edad fue significativamente inferior en el grupo cuyas madres tomaron el probiótico (15% vs 47%). Además, la ingesta del

Lactobacillus GG se relacionaba con un incremento en la concentración de TGF $\beta$  (citoquina antiinflamatoria) en la leche materna.

Los resultados de todos estudios sugieren que, realmente, la administración de determinados probióticos son de utilidad en el tratamiento y prevención de las enfermedades atópicas.

### **2.5. Probióticos y efecto antiinflamatorio**

Mientras que algunos probióticos son capaces de estimular la inmunidad innata y específica, otras cepas han demostrado poseer características teóricamente antiinflamatorias mediante la modulación de la liberación de citoquinas. Las implicaciones que puede tener este aspecto en enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal son de gran relevancia, ya que en la etiopatogenia de la misma convergen una falta de tolerancia a la flora y una respuesta inflamatoria exagerada.

En este sentido, diferentes estudios *in vitro* con células del sistema inmune o líneas celulares epiteliales han demostrado un efecto teóricamente antiinflamatorio de algunos probióticos. Así, en un estudio realizado con linfocitos T CD4<sup>+</sup> de bazo murino, *Lactobacillus paracasei* inhibía marcadamente la actividad proliferativa de los linfocitos, disminuía globalmente las citoquinas Th1 y Th2, estimulaba de forma dosis-dependiente el TGF $\beta$  y mantenía los niveles de IL-10 (Von der Weid 2001). En otro modelo de cocultivo de células epiteliales CaCO-2 con leucocitos humanos, una cepa de *Lactobacillus johnsonii* de origen intestinal no inducía la liberación de TNF $\alpha$  o IL-1 $\beta$ , pero sí la del TGF $\beta$ , presentando un perfil global antiinflamatorio. Además, el reconocimiento

de las bacterias y la respuesta secretora inducida en las células epiteliales requería la presencia de las células inmunes ya que aquellas, aisladamente, no respondían al estímulo antigénico (Haller 2000). En el mismo sentido, ni *Lactobacillus* GG ni las diferentes cepas de lactobacillus y bifidobacterias de la mezcla VSL#3 (probióticos utilizados con éxito en patología humana) inducían citoquinas proinflamatorias como la IL-8 en un modelo con monocapas de células epiteliales en cultivo (Lammers 2002).

### 3. ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL: ENFERMEDAD DE CROHN

La colitis ulcerosa y la enfermedad de Crohn son patologías complejas del tracto gastrointestinal de carácter inflamatorio crónico y cuya etiología es desconocida. Por el momento, aunque se conocen diferentes mecanismos implicados en la patogénesis de las lesiones, no existe un único agente o alteración celular o molecular que pueda explicar todos los aspectos de la enfermedad.

La mayor incidencia y prevalencia de la enfermedad inflamatoria intestinal, tanto de colitis ulcerosa como de enfermedad de Crohn, ocurre en los países del norte de Europa y en Norteamérica. En estas áreas, la incidencia es de 3.1 a 14.6 casos/100.000 habitantes / año y la prevalencia de 26 a 199 casos /100.000 habitantes. En España, la incidencia de la enfermedad de Crohn ha ido aumentando en las últimas décadas siendo todavía inferior que en las áreas del Norte de Europa (Mate 1994, Brullet 1998). En el último estudio realizado entre 1994 y 1997 la incidencia de enfermedad de Crohn ha sido de 5.95 casos/100.000 habitantes / año y la prevalencia de 87.45 casos/100.000 habitantes (Saro 2003).

La teoría etiopatogénica que actualmente cuenta con más aceptación sugiere que la inflamación intestinal se produce a partir de una reactividad anormal de los linfocitos T hacia elementos de la flora bacteriana entérica en individuos genéticamente susceptibles (Shanahan 2002). El reconocimiento de estos tres factores involucrados: genes, bacterias y sistema inmune, ha permitido no sólo profundizar en la fisiopatología de la enfermedad sino aplicar nuevas

estrategias terapéuticas (Elson 2002).

### ***3.1. Susceptibilidad genética***

Los datos epidemiológicos conocidos desde hace años, como las diferencias étnicas en la incidencia de la enfermedad, ya sugerían que la enfermedad de Crohn podía tener un componente genético (Rozen 1979). Los estudios familiares demostraron la existencia de agregación familiar (mayor para la enfermedad de Crohn que para la colitis ulcerosa), con un riesgo de padecerla de hasta 10 veces mayor que el de la población general entre familiares de primer grado (Orholm 1991, Orholm 1999). Por otra parte, los estudios en gemelos han evidenciado un porcentaje de concordancia para enfermedad de Crohn de alrededor del 20-58% para los monozigotos y del 5% para los dizigotos (Thompson 1996, Tysk 1998, Orholm 2000). Basándose en todos estos datos epidemiológicos, los estudios genéticos se han dirigido, por lo tanto, a identificar genes de susceptibilidad para padecer enfermedad de Crohn, que condicionaran una respuesta inflamatoria inadecuada ante ciertos factores ambientales. El primer gen de susceptibilidad para la enfermedad de Crohn descubierto se encuentra en la región pericentromérica del cromosoma 16, en el locus designado IBD1 (Hugot 1996). Diferentes mutaciones en un gen de este locus, el NOD2 (llamado también CARD15), confieren un aumento en la susceptibilidad para la enfermedad de Crohn (Hugot 2001, Ogura 2001, Hampe 2001) y no para la colitis ulcerosa. El riesgo relativo de tener la enfermedad es de alrededor de 3 para los heterocigotos de alguna mutación en dicho gen y de 10-30 para los homocigotos o dobles heterocigotos. El gen NOD2 codifica la



proteína NOD2 expresada en los monocitos y que parece tener un papel importante en el reconocimiento de los productos microbianos y en las respuestas de inmunidad innata frente a bacterias, a semejanza de los toll-like receptors (TLRs) con los que comparte estructuralmente una región rica en leucina. Las proteínas NOD y los TLRs reconocen productos bacterianos y activan el NF- $\kappa$ B, factor de transcripción nuclear crucial en la iniciación de las respuestas inmunoinflamatorias que promueven la producción de citoquinas proinflamatorias como el TNF $\alpha$  (Inohara 2002). Además de su expresión en las células inmunes, la proteína NOD2 se expresa también en las células epiteliales y podría funcionar como un factor antibacteriano luminal mediante el reconocimiento de bacterias intracelulares (Hisamatsu 2003).

Sin embargo, las mutaciones del NOD2 consideradas como principales o que confieren susceptibilidad para la enfermedad aparecen sólo entre el 10-30 % de los pacientes con enfermedad de Crohn (Vermeire 2002, Lesage 2002) por lo que se están investigando y describiendo nuevas mutaciones en otros genes del cromosoma 16 (Hampe 2002 a) y en otros cromosomas como el locus IBD2 en el cromosoma 12, el locus IBD3 en el cromosoma 6 (región HLA), el locus IBD4 en el cromosoma 14 (Watts 2002), el locus IBD5 en el cromosoma 5 (Peltekova 2004) o el gen DLG5 en el cromosoma 10 (Stoll 2004). Otro aspecto importante si se tiene en cuenta la enorme heterogenicidad en las manifestaciones clínicas de la enfermedad de Crohn, es la relación entre las alteraciones en el genotipo y su relación con el fenotipo. Así, los hallazgos de diferentes trabajos demuestran una asociación entre las principales mutaciones del gen NOD2 y la enfermedad de Crohn de afectación ileal estenosante (Cuthbert 2002, Ahmad

2002, Hampe 2002 b). Este hallazgo se ha explicado sobre la base de que la expresión de NOD2 es muy prominente en las células de Paneth de las criptas, células muy abundantes en el ileon terminal donde ejercen una función antibacteriana (Lala 2003). Otros estudios han demostrado la asociación entre mutaciones en el locus IBD5 y otros fenotipos de la enfermedad de Crohn como la afectación perianal (Armuzzi 2003). Sin embargo, la falta de concordancia total para la enfermedad de Crohn en los gemelos monozigotos, la variación del riesgo en un mismo grupo étnico según la región geográfica en la que vivan y el aumento en la incidencia de la enfermedad en los últimos años, sugieren la influencia de factores ambientales en el desarrollo de la enfermedad.

### ***3.2. Factores ambientales: flora intestinal***

La enfermedad de Crohn es frecuente en Europa y Norteamérica donde su incidencia ha aumentado en la segunda mitad del siglo XX. Algunos autores postulan que los cambios que se han producido en las últimas décadas en determinados factores ambientales como la mejora en las condiciones higiénicas y sanitarias, el aumento en el consumo de productos estériles y no fermentados o la universalización de la vacunación (hipótesis de la higiene), podrían haber alterado la flora, el sistema inmune intestinal o ambos y haber jugado un papel importante en el crecimiento del número de casos de enfermedades de base inmunológica como la alergia o la enfermedad de Crohn. En este sentido, en un estudio epidemiológico publicado ya hace 10 años (Gent 1994) se demostró que el riesgo de una persona de padecer enfermedad de Crohn era 5 veces superior si en el domicilio habitual disponía de agua caliente

corriente y cuartos de baño separados. En el mismo sentido, un estudio reciente ha demostrado que el uso de antibióticos en el periodo previo al diagnóstico en un grupo de 587 pacientes con enfermedad de Crohn era mayor que en un grupo control (Card 2004).

Teniendo en cuenta que el intestino es el órgano más directamente expuesto a la acción de los múltiples microorganismos que componen la flora bacteriana intestinal, no es extraño que buena parte de la investigación sobre la etiología de estas enfermedades se haya centrado en la influencia de las bacterias en la iniciación y perpetuación del proceso inflamatorio (Shanahan 2004). El concepto de que el contenido intestinal contribuye a la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal se basa en algunos estudios realizados en pacientes con enfermedad de Crohn sometidos a una resección ileal y anastomosis ileocolónica. La ausencia de contacto de la mucosa con el contenido intestinal mediante una ileostomía previene la recurrencia. Cuando el tránsito intestinal se reestablece aparecen nuevamente las lesiones de la mucosa intestinal lo que sugiere que algún elemento en el contenido intestinal es el que las determina (Rutgeerts 1991, D'Haens 1998). Estas observaciones plantean diversas cuestiones aún por resolver: ¿existe un agente infeccioso específico responsable de la enfermedad inflamatoria intestinal?, ¿tiene la enfermedad inflamatoria su origen en un defecto primario del sistema inmune que condiciona una respuesta exagerada frente a una flora intestinal no patógena (falta de tolerancia inmunológica)?, ¿sería posible alterar el curso natural de la enfermedad modificando la flora intestinal mediante antibióticos o probióticos?

### 3.2.1. Agente infeccioso específico

Aunque los métodos tradicionales no han sido capaces de demostrar un patógeno específico como el causante de la enfermedad inflamatoria intestinal, los nuevos métodos de biología molecular actualmente disponibles han propiciado nuevas posibilidades de estudio, ya que la etiología infecciosa de la enfermedad inflamatoria intestinal todavía es una opción plausible (Fiocchi 1998).

Durante la década de los 80 y principios de los 90 se postuló la posible relación de la enfermedad de Crohn con la infección por micobacterias a raíz del descubrimiento de un microorganismo no clasificado pero relacionado con el *Mycobacterium paratuberculosis* en pacientes con esta enfermedad (Chiodini 1984). Sin embargo, los resultados de las investigaciones posteriores han sido muy contradictorios y poco concluyentes. Algunos estudios demostraron la presencia en suero de pacientes con enfermedad de Crohn títulos elevados de anticuerpos contra *Mycobacterium paratuberculosis* (Thayer 1984), pero este dato no ha podido ser confirmado en estudios posteriores (Kobayashi 1988). La detección del *M.paratuberculosis* en los tejidos de pacientes también ha sido complicada tanto por técnicas de inmunohistoquímica (Kobayashi 1989) como mediante el análisis del DNA del microorganismo (Sanderson 1992). Sin embargo, utilizando técnicas más específicas de detección de DNA en tejido intestinal en fresco de pacientes con enfermedad de Crohn, se detecta DNA de *Mycobacterium paratuberculosis* hasta en el 92% de los pacientes comparado con el 26% de controles (Bull 2003). Por otra parte, los resultados de los estudios clínicos realizados con fármacos antituberculosos han sido

contradictorios (Prantera 1994, Thomas 1998) aunque un metaanálisis sugiere que existe un beneficio del tratamiento antibiótico antimicobacterias en el mantenimiento de la remisión inducida por corticoides (Borgaonkar 2000).

La *Escherichia coli* es la especie bacteriana aeróbica Gram negativa más abundante en la flora intestinal normal en el humano, y por este motivo, diversos estudios han estudiado su papel en la patogénesis de la enfermedad inflamatoria intestinal. Ya hace más de 20 años se demostró un aumento de los títulos de anticuerpos anti-*E.coli* en pacientes con enfermedad de Crohn (Tabaqchali 1978). Más recientemente, un grupo de investigadores franceses demostró que la *E.coli* se encuentra en el 65-100% de las lesiones ileales de pacientes con enfermedad de Crohn y que además constituye la flora predominante (50-100% del número total de aerobios y anaerobios) (Darfeuille-Michaud 1998). El mismo grupo de investigadores, en estudios posteriores, ha demostrado que las cepas de *E.coli* aisladas de la mucosa ileal, poseen capacidad de adherencia e invasión del epitelio lo que les confiere la posibilidad de colonizarlo, sobrevivir y replicarse en los macrófagos induciendo la producción de grandes cantidades de TNF (Boudeau 1999, Glasser 2001). Este tipo de *E.coli* adherente-invasiva aparece especialmente en las lesiones ileales de pacientes con enfermedad de Crohn (Darfeuille-Michaud 2004).

Otro de los agentes infecciosos que han sido relacionados con la enfermedad inflamatoria intestinal y que ha suscitado diversos estudios es el virus del sarampión. Wakefield demostró que en piezas de resección intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn existían lesiones de vasculitis granulomatosa. En el estudio por microscopía electrónica de estas lesiones se

evidenciaron partículas compatibles con la presencia del virus del sarampión (Wakefield 1991, Wakefield 1993). Además, parecía que tanto la exposición perinatal al virus del sarampión como la vacunación aumentaba el riesgo de padecer una enfermedad de Crohn (Ekblom 1994, Thompson 1995). Sin embargo, estudios más recientes utilizando técnicas muy sensibles como PCR no han conseguido detectar el virus en los tejidos de pacientes con enfermedad de Crohn (Ghosh 2001).

Recientemente ha sido difundida la teoría conocida como "hipótesis de la cadena del frío" en la que la refrigeración de los alimentos, generalizada durante el siglo XX en los países desarrollados, se postula como la causa del crecimiento del número de casos de enfermedad de Crohn (Hugot 2003). Según sus autores, la refrigeración permite el crecimiento de bacterias psicrófilas (bacterias que viven entre  $-1^{\circ}\text{C}$  y  $10^{\circ}\text{C}$ ) como la *Yersinia enterocolitica* o *Yersinia pseudotuberculosis*, produciendo en individuos genéticamente predispuestos una respuesta inmunológica exagerada.

La implicación de otras bacterias como *Salmonella*, *Clostridium difficile* etc. también ha sido investigada, pero, probablemente, estas bacterias están relacionadas más con las exacerbaciones de la enfermedad que con el propio mecanismo etiopatogénico subyacente (Campieri 2001).

Los estudios más recientes utilizando no sólo cultivos convencionales sino técnicas de biología molecular no han podido demostrar la presencia de un único patógeno en las lesiones inflamatorias de la mucosa intestinal (Marteau 2004). En un estudio con biopsias de 305 pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal y en 40 controles se ha investigado mediante cultivo

convencional y FISH la flora bacteriana asociada a la mucosa. En los pacientes con enfermedad de Crohn, se han encontrado altas concentraciones de bacterias de origen fecal adheridas a la mucosa siendo más altas en las zonas no inflamadas que en las inflamadas y sin evidenciarse translocación en la lámina propia o en los macrófagos. Sólo cuando las concentraciones de bacterias superaban un determinado nivel, se podían observar por microscopía electrónica inclusiones bacterianas en los enterocitos localizados cerca de la lámina propia. Sin embargo, no se pudieron encontrar diferencias entre el grupo control y el grupo enfermedad inflamatoria intestinal en lo que se refiere a las diferentes especies aisladas, la mayoría de ellas del género *Bacteroides* entre las anaerobias o *E.coli* entre las aerobias. (Swidsinski 2002). Por el contrario, otro estudio utilizando tecnología similar ha evidenciado una reducción en las bacterias anaeróbicas normales (*Bacteroides*, *Eubacterium* y *Lactobacillus*) en la mucosa de pacientes con enfermedad inflamatoria activa (Ott 2004). Los resultados de estos estudios contradicen la hipótesis de un único microorganismo como agente etiológico de la enfermedad inflamatoria intestinal, haciendo más probable la existencia de una respuesta inmunológica anormal en el huésped, quizá determinada por algún defecto genético, que originaría una alteración global en la interacción huésped-bacteria (Braun 2002).

### **3.2.2. Falta de tolerancia a la flora**

La tolerancia de la mucosa intestinal puede definirse como el proceso activo por el cual una respuesta inmune potencialmente agresiva es suprimida al

reconocer como no patógeno a un determinado componente del tracto intestinal. El intestino está en contacto permanente con bacterias de la flora intestinal normal, proteínas y antígenos de origen alimentario o productos bacterianos potencialmente patógenos, y tiene que discriminar y ejecutar una acción selectiva contra unos y otros. La flora intestinal no es parte del huésped y, por lo tanto, la tolerancia inmunológica previene una respuesta inmune contra las "bacterias propias", que en caso de producirse conduciría a una situación de inflamación crónica (Macpherson 1996).

La posibilidad de que sean los componentes de la flora intestinal normal los que inicien o perpetúen la enfermedad inflamatoria intestinal ha sido ampliamente estudiada. Los resultados experimentales obtenidos en modelos animales demuestran que las bacterias de la luz intestinal están incriminadas en los mecanismos de inflamación intestinal. Nuestro grupo de investigación observó en un modelo animal de colitis que los antibióticos de amplio espectro que alcanzan niveles adecuados en la luz intestinal ejercen un efecto antiinflamatorio. En cambio, en este modelo de colitis, los mismos antibióticos administrados por vía parenteral carecen de efecto antiinflamatorio (Videla 1994). Además, comprobamos que son las bacterias vivas de la flora, más que los antígenos de origen alimentario o la propia endotoxina bacteriana, los que estimulan la actividad inflamatoria de la mucosa intestinal lesionada (Videla 1997) siendo algunos géneros como los *Bacteroides* los que contribuyen particularmente a la formación de lesiones mucosas profundas y crónicas (García-Lafuente 1997). Además, las lesiones contaminadas con ciertas especies de bacterias anaerobias evolucionan fácilmente a fibrosis intestinal



(Mourelle 1998) mientras que otros elementos de la flora normal como los lactobacilos no contaminan las lesiones de la mucosa ni inducen inflamación en la pared intestinal.

En el modelo animal de colitis por TNBS, los ratones perdían la tolerancia a la flora autóloga mientras persistía la inflamación y ésta se restablecía cuando los ratones eran tratados con IL-10 o anticuerpos anti IL-12 (Duchmann 1996). Además, los ratones deficientes selectivamente en IL-10 o IL-2 (citoquinas antiinflamatorias y promovedoras de tolerancia), sanos en condiciones "germ-free", desarrollan una colitis espontáneamente cuando son colonizados con bacterias (Kühn 1993, Ehrhardt 1997).

En humanos, las células mononucleares de la mucosa intestinal inflamada de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal proliferan cuando se exponen *in vitro* a antígenos bacterianos de la flora autóloga. Sin embargo, las células de las áreas de mucosa no afectada de los mismos pacientes, de pacientes en remisión y de controles sanos no proliferan ante las mismas bacterias, lo que sugiere que en la mucosa inflamada existe una pérdida de la tolerancia a la flora autóloga (Duchmann 1995) que desencadena el proceso inmunoinflamatorio y las lesiones de la mucosa. Algunos investigadores proponen que probablemente no se trate de una alteración global en la tolerancia a la flora sino una pérdida de tolerancia selectiva a distintos microorganismos o autoantígenos que originaría diferentes subtipos de pacientes con enfermedad de Crohn (Landers 2002), aspecto éste último que aún está por determinar. La causa de la pérdida de tolerancia podría deberse a una alteración en los mecanismos de regulación inmune, en la barrera mucosa que permitiría el

contacto de las células efectoras inmunes locales con los productos bacterianos o a un fallo en el reconocimiento de los microorganismos de la flora comensal.

### **3.2.3. Antibióticos y enfermedad inflamatoria intestinal**

Si algún elemento en la flora fuera el responsable etiopatogénico de la enfermedad, el tratamiento con antibióticos de amplio espectro, mediante la disminución de la carga bacteriana, teóricamente reduciría el estímulo del proceso inmuno-inflamatorio. Un estudio de nuestro centro (Casellas 1998) en pacientes con colitis ulcerosa activa investigó el efecto antiinflamatorio del tratamiento con amoxicilina-clavulánico administrado con cubierta entérica para evitar su absorción en intestino delgado y se comparó con el tratamiento convencional con metil-prednisolona. El estudio demostró una reducción significativa de la actividad metabólica de la flora, valorada mediante la eliminación de hidrógeno en el aliento tras la administración de lactulosa, solamente en los pacientes tratados con el antibiótico de amplio espectro con cubierta entérica. A los cinco días de tratamiento se observó una importante inhibición de la liberación de eicosanoides inflamatorios en la mucosa rectal de los pacientes de los dos grupos. Sin embargo, la respuesta más llamativa fue la supresión en la liberación de interleukina-8, que prácticamente se anuló en los pacientes tratados con antibióticos, mientras que no se modificó en los pacientes tratados con corticoides. Estos datos sugieren que la presencia de flora juega un papel importante en la patogénesis de las lesiones inflamatorias, de modo que la reducción de la carga bacteriana tiene un efecto antiinflamatorio más profundo incluso que el de los antiinflamatorios

esteroides de uso habitual.

En este mismo sentido, desde hace años, se han llevado a cabo estudios clínicos y experimentales para aclarar el papel del tratamiento con antibióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal no sólo por su acción antibacteriana sino porque a algunos de ellos, además, se les atribuye efectos inmunomodulares, como en el caso del metronidazol y el ciprofloxacino (Sands 2000). Sin embargo, los datos no pueden considerarse concluyentes, probablemente porque muchos de los estudios incluyen pocos pacientes, son muy heterogéneos desde el punto de vista clínico y los criterios de efectividad del tratamiento así como la duración del mismo son muy variables (Kruis 2004). En la colitis ulcerosa se han realizado estudios con vancomicina, metronidazol, tobramicina, rifaximina y ciprofloxacino. La vancomicina vía oral no resultó efectiva en un estudio con pacientes con colitis ulcerosa activa, aunque presentó una tendencia a disminuir la necesidad de cirugía (Dickinson 1985). El metronidazol, activo contra bacterias anaerobias, tampoco fue efectivo vía endovenosa asociado al tratamiento convencional del brote severo de colitis ulcerosa (Chapman 1986). La tobramicina administrada por vía oral durante una semana (se trata de un antibiótico no absorbible activo frente a bacterias Gram negativas) resultó más efectiva que el placebo para controlar el brote de colitis ulcerosa (Burke 1990). Sin embargo, la tobramicina no ha demostrado ser eficaz ni para mantener la remisión (Lobo 1993), o cuando se administra por vía endovenosa asociada a metronidazol en casos de brote severo (Mantzaris 1994). La administración de rifaximina, un antibiótico no absorbible de amplio espectro, sólo ha sido investigada en un estudio con pocos pacientes

en los que induce una mejoría clínica y endoscópica al compararlo con placebo (Gionchetti 1999). El ciprofloxacino es el fármaco más ampliamente utilizado en estudios clínicos recientes dado su amplio espectro tanto para bacterias Gram positivas como negativas. Aunque el tratamiento a corto plazo, bien por vía oral (Mantzaris 1997) o vía endovenosa (Mantzaris 2001) no ha demostrado eficacia en la colitis ulcerosa activa, un estudio en el que se administró el antibiótico durante 6 meses demostró la superioridad del ciprofloxacino sobre el placebo en disminuir la tasa de recidiva (Turunen 1998).

En la enfermedad de Crohn se han realizado diversos estudios con metronidazol, ciprofloxacino y claritromicina. El metronidazol ha demostrado ser eficaz en estudios clínicos en el tratamiento de enfermedad de Crohn activa leve o moderada (Sutherland 1991), en el tratamiento de la enfermedad perianal (Jakobovits 1984) y como tratamiento preventivo de la recidiva postquirúrgica (Rutgeerts 1995). El ciprofloxacino sólo (Colombel 1999) o en combinación con el metronidazol (Greenbloom 1998) también ha sido efectivo en el tratamiento de la enfermedad de Crohn activa sobre todo de afectación colónica (Steinhart 2002) y con una tasa de remisión similar a la conseguida con metil-prednisolona (Prantera 1996). Por último, se ha publicado un estudio abierto no controlado con claritromicina, antibiótico elegido por su amplio espectro y su capacidad de penetrar en macrófagos. La claritromicina, administrada durante 4-12 semanas a pacientes con enfermedad de Crohn activa mostró unos resultados muy prometedores en controlar la actividad y mantener la remisión (Leiper 2000).

Teniendo en cuenta los resultados de todos los estudios, probablemente el

éxito del tratamiento con antibióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal radique en la elección de fármacos con amplio espectro, activos intracelularmente y con pocos efectos secundarios para mantenerlos durante un periodo prolongado de tiempo, y en la selección cuidadosa de los grupos de pacientes a tratar para valorar la eficacia real del tratamiento (Colombel 2001).

### **3.3. Respuesta inflamatoria crónica**

En la enfermedad inflamatoria intestinal, la alteración en el reconocimiento de la propia flora desvía el sentido de la respuesta inflamatoria y conduce a una situación de activación no controlada de las células T CD4 + (helper) sobre todo de tipo Th1. La activación Th1 origina la secreción de citoquinas como el TNF $\alpha$  que desencadenan la respuesta inflamatoria, los procesos de destrucción tisular mediados por metaloproteinasas, el daño vascular, la adhesión y reclutamiento de células inflamatorias, etc. (Ficchi 1998). En condiciones normales, a pesar de estar continuamente estimulado, el sistema inmune intestinal, ha desarrollado mecanismos para prevenir la inflamación excesiva y el daño tisular. En primer lugar, la producción de citoquinas antiinflamatorias (TGF $\beta$  e IL-10) por linfocitos T reguladores y células epiteliales mantienen un estado de hiporespuesta (Monteleone 2002). En segundo lugar, los linfocitos de la lámina propia están sometidos a un proceso estrechamente controlado de apoptosis o muerte programada que impide su acumulación (Boirivant 1996). Diferentes estudios en modelos animales sugieren que en la enfermedad inflamatoria intestinal existe una disminución en las citoquinas antiinflamatorias como la IL-10. Además, los animales genéticamente deficientes en IL-10 desarrollan una

colitis mientras que la administración exógena de dicho mediador mejora la lesión colónica(Steidler 2000). Por otra parte, en la enfermedad de Crohn, los linfocitos T de la mucosa intestinal son resistentes a la apoptosis por un mecanismo que depende de la IL-6 y que perpetúa el proceso inflamatorio (Boirivant 1999, Atreya 2000). Como consecuencia, se produce un estado de activación permanente de los linfocitos CD4+ y la síntesis de grandes cantidades de citoquinas (IL-12, IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ) con un perfil polarizado Th1 que median la respuesta inflamatoria y el daño tisular.

### **3.4. Modelo hipotético**

Todos los aspectos que se han reseñado continúan siendo investigados y todavía no hay una teoría definitiva. Sin embargo, parece claro que el daño tisular en la enfermedad de Crohn es consecuencia de la activación incontrolada de los linfocitos T de la lámina propia cuando interactúan con las células presentadoras de antígenos en respuesta a la exposición a bacterias de la propia flora en pacientes susceptibles genéticamente.

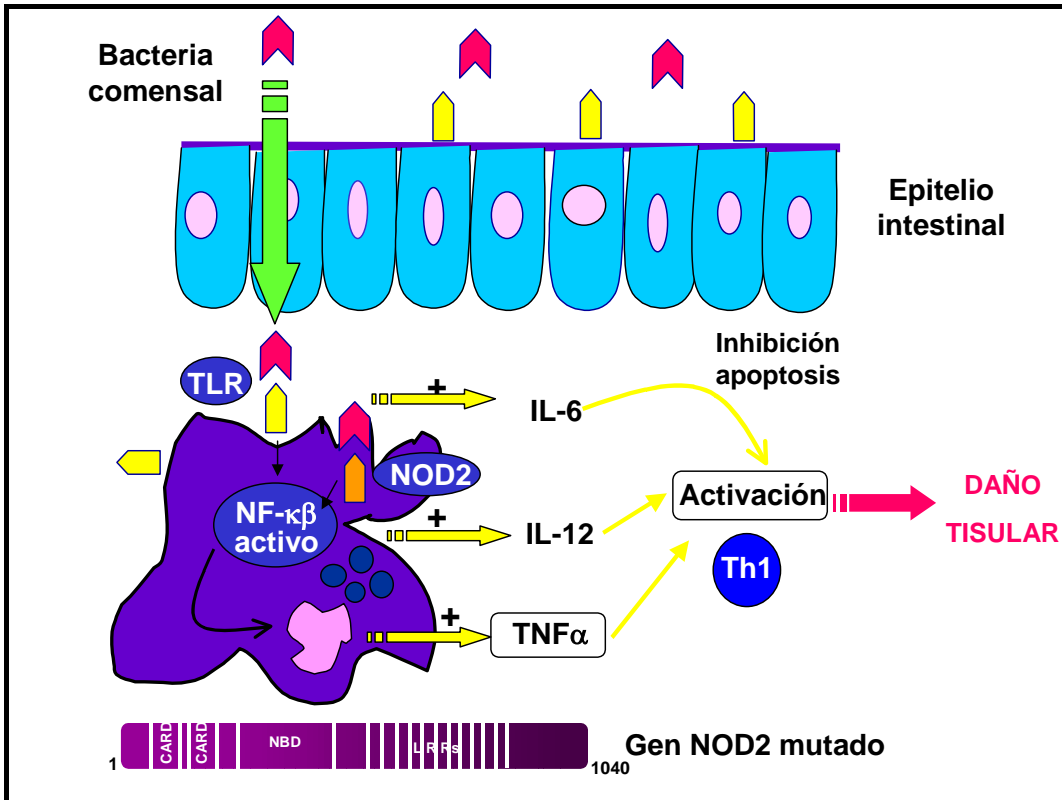


Figura 4: Factores implicados en la fisiopatología de la inflamación en la enfermedad de Crohn.

## 4. PROBIOTICOS Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

La estrategia básica del tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal ha estado dirigida hasta ahora a modular o suprimir las respuestas inflamatorias y, salvo los estudios de tratamiento con antibióticos, se ha prestado poca atención a modificar el microambiente intestinal en lo que se refiere a la flora (Shanahan 2001 a). Aunque el uso de antibióticos parece ser el método más obvio de manipular la flora, sus desventajas en términos de falta de especificidad, riesgo de sobrecrecimiento de patógenos y desarrollo de resistencias, hacen que se hayan investigado formas más sutiles y controladas como son la administración de prebióticos y probióticos (Sartor 2004). Además, la modificación de la flora intestinal mediante probióticos ofrece la oportunidad, no sólo de actuar desde el punto de vista microbiológico sino probablemente desde el punto de vista inmunológico (Shanahan 2000, Shanahan 2001b). Los estudios realizados sugieren que, además del efecto puramente competitivo con otras bacterias y la producción de sustancias antimicrobianas, los probióticos pueden modificar el diálogo epitelio-sistema inmune intestinal ejerciendo un efecto inmunomodulador y que algunos de ellos podrían tener propiedades antiinflamatorias al interactuar con la mucosa intestinal.

### ***4.1. Probióticos en modelos experimentales de colitis***

Los resultados de los estudios con animales en modelos experimentales de colitis tratados con probióticos han resultado esperanzadores. En el modelo de colitis en rata inducida por ácido acético, la administración de *Lactobacillus reuteri* R2LC inmediatamente tras la inducción prevenía la instauración de la



colitis. Sin embargo, si la administración se realizaba de forma más retardada o con concentraciones menores de bacterias el efecto era menos prominente (Fabia 1993). De la misma forma, en el modelo de enterocolitis en ratas inducida con metrotexato intraperitoneal, la ingestión de lactobacilos, y especialmente *Lactobacillus plantarum*, disminuía la severidad de la colitis mejorando la pérdida de peso y la permeabilidad intestinal y reduciendo la mieloperoxidasa local, la translocación bacteriana y los niveles plasmáticos de endotoxina (Mao 1996). El modelo de ratones deficientes en IL-10 resulta interesante para estudiar el papel de las bacterias en el inicio de la inflamación de la mucosa del colon. La colitis crónica espontánea que desarrollan estos ratones requiere la presencia de bacterias en la luz intestinal (no la desarrollan en condiciones "germ-free"), se previene y trata con antibióticos y presenta características similares a la enfermedad de Crohn humana (Kuhn 1993, Sellon 1998, Madsen 2000). Los ratones deficientes en IL-10 presentan en el periodo neonatal niveles disminuidos de lactobacilos en colon y un aumento de bacterias adheridas y translocadas en la mucosa colónica, desarrollando una colitis a las 4 semanas de vida. La repoblación del colon con *Lactobacillus sp* atenúa la colitis y disminuye la translocación y adherencia de otras bacterias (Madsen 1999). El tratamiento de estos ratones con VSL#3, un preparado probiótico liofilizado con 8 bacterias diferentes, induce la normalización de la función epitelial, de la permeabilidad de la mucosa y una reducción en la secreción de  $TNF\alpha$  e  $IFN\gamma$  (Madsen 2001). Asimismo, la administración oral de *Bifidobacterium infantis* o *Lactobacillus salivarius* disminuye la producción de citoquinas Th1 tanto a nivel local como sistémico (McCarthy 2003). En el mismo

modelo, la ingestión del probiótico *Lactobacillus salivarius ssp salivarius* UCC118 inhibe no sólo el desarrollo de colitis sino la aparición de cáncer de colon (O'Mahony 2001). Otros estudios similares con diferentes modelos o diferentes bacterias han llegado a conclusiones semejantes (Schultz 2002, Dieleman 2003).

Utilizando otro tipo de estrategia, y también en un modelo animal de colitis, se ha utilizado una bacteria (*Lactococcus lactis*) modificada genéticamente para secretar IL-10, una citoquina con propiedades antiinflamatorias (Steidler 2000). La administración intragástrica de la bacteria tras la inducción de la colitis mediante DSS produjo una reducción significativa en la inflamación intestinal comparable a la de otros tratamientos más convencionales como los corticoides. En el modelo de los ratones deficientes en IL-10, la administración diaria de la bacteria previno además el desarrollo espontáneo de colitis. Las ventajas de esta modalidad terapéutica son, por una parte, la necesidad de una dosis efectiva más baja de IL-10 que la requerida por vía parenteral y, en segundo lugar, permite la administración *in situ* evitando los inconvenientes asociados a la exposición sistémica de citoquinas con alta actividad biológica. El estudio es prometedor, ya que introduce un nuevo concepto en la terapéutica de la enfermedad inflamatoria intestinal integrando el tratamiento con citoquinas y la modificación del microambiente local intestinal (Shanahan 2001 c).

Otra posibilidad que se ha explorado es el uso de prebióticos, polisacáridos no absorbibles que administrados por vía oral aumentan la actividad sacarolítica de la flora del colon favoreciendo el sobrecrecimiento de especies autóctonas de

los géneros *Bifidobacteria* y *Lactobacillus*. Un trabajo experimental de nuestro centro demostró que la administración oral de inulina tiene un efecto antiinflamatorio muy significativo en un modelo de colitis distal similar a la colitis ulcerosa humana (Videla 2001). Resultados similares se han obtenido posteriormente en otros modelos de colitis también con inulina (Schultz 2004 a).

Del conjunto de resultados de los experimentos animales se pueden extraer varias conclusiones. Por una parte, el inicio de la inflamación de la mucosa intestinal está probablemente relacionado con una alteración del balance normal de la flora y esta situación puede ser antagonizada manipulando la flora mediante la administración de bacterias "probióticas". En segundo lugar, la variabilidad de la eficacia de los diferentes probióticos según el modelo animal utilizado, sugiere que en el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal humana, caracterizada por su gran heterogenicidad, será preciso establecer indicaciones con bacterias específicas según el subgrupo de pacientes que se quiera tratar.

#### **4.2. Probióticos en la enfermedad inflamatoria intestinal humana**

En los últimos años se ha investigado ampliamente sobre el efecto de los probióticos en la enfermedad inflamatoria, pero los resultados no son del todo concluyentes y todavía faltan datos basados en estudios controlados con número suficiente de pacientes incluidos para determinar su eficacia clínica.

En dos estudios abiertos no controlados realizados en niños con enfermedad de Crohn, el *Lactobacillus* GG demostró tener ciertos efectos beneficiosos.

Administrado a corto plazo (10 días), indujo una estimulación de la respuesta inmune intestinal que se plasmaba en un aumento en las células secretoras de IgA contra lactoglobulina y caseína (Malin 1996). Cuando el probiótico era administrado durante 6 meses, inducía una disminución de la permeabilidad de la mucosa intestinal y una reducción en el índice de actividad clínica (Gupta 2000). Sin embargo, estos resultados preliminares no han podido ser confirmados ya que el *Lactobacillus* GG ha sido ineficaz tanto en prevenir la recurrencia post-quirúrgica (Prantera 2002) como en mantener la remisión inducida farmacológicamente (Schultz 2004b) de pacientes con enfermedad de Crohn. Tampoco en pacientes con pouchitis ha sido eficaz en reducir la inflamación mucosa del reservorio (Kuisma 2003).

La levadura *Saccharomyces boulardii*, eficaz en la prevención y tratamiento de la diarrea asociada al *Clostridium difficile*, también ha sido investigada como tratamiento de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal aunque sólo en estudios pilotos incluyendo un número reducido de pacientes. En pacientes con enfermedad de Crohn, la asociación del *S. Boulardii* al tratamiento convencional mejora la diarrea en la fase aguda (Plein 1993) y reduce la tasa de recidiva a largo plazo en pacientes en remisión (Guslandi 2000). En pacientes con colitis ulcerosa activa, en un estudio piloto con 25 pacientes, la asociación de la levadura al tratamiento con mesalacina inducía la remisión en el 68% (Guslandi 2003).

En pacientes con colitis ulcerosa, se han publicado dos estudios comparando la eficacia de una cepa de *Escherichia coli* no patógena (Nissle 1917) con la mesalacina en la inducción y mantenimiento de la remisión. En un primer

estudio, se incluyeron 120 pacientes con colitis ulcerosa en remisión, a los que de manera randomizada y a doble-ciego se les administró bien mesalacina a la dosis de 1500 mg/día o una preparación vía oral de la *E.coli* Nissle 1917 durante 12 semanas. Al final del periodo de estudio, la tasa de remisión fue similar en ambos grupos (11.3 y 16% respectivamente) lo que sugiere que el tratamiento con probióticos puede suponer una alternativa como mantenimiento de la remisión en pacientes con colitis ulcerosa (Kruis 1997). En un estudio posterior, utilizando la misma bacteria, se investigó la eficacia del probiótico en el mantenimiento a largo plazo, 12 meses, en 120 pacientes con colitis ulcerosa activa. La adición de la bacteria al tratamiento standard de la colitis ulcerosa activa no modificó ni la tasa de remisión ni el tiempo en conseguirla. Por otra parte, el tratamiento con la *E.coli* no patógena mostró una eficacia equivalente al tratamiento con mesalacina (recidiva 67 vs 73% respectivamente) en el mantenimiento de la remisión (Rembacken 1999). Según algunos autores (Faubion 2000), el estudio presenta algunas particularidades que limitan la importancia de los hallazgos, como son la heterogenicidad en la severidad del brote, las diferencias en las pautas de tratamiento con corticoides y la alta tasa de recidiva al final del periodo de estudio.

La experiencia con bifidobacterias es mucho más escasa habiéndose publicado únicamente un estudio en pacientes con colitis ulcerosa. La suplementación con leche fermentada con bifidobacterias mejora las tasas de remisión al año de tratamiento aunque los resultados del estudio no son concluyentes ya que sólo incluía a 21 pacientes (Ishikawa 2003).

Los resultados obtenidos con una mezcla de probióticos en pacientes con pouchitis han resultado más llamativos. La pouchitis es una de las complicaciones a largo plazo más frecuentes de los pacientes con reservorio ileo-anal. Aunque su causa no se conoce, la buena respuesta que presenta al tratamiento con antibióticos y su asociación a una disminución en la concentración en las heces de lactobacilos y bifidobacterias sugiere que probablemente tiene su origen en una alteración en el equilibrio bacteriano. El estudio, doble-ciego controlado contra placebo, incluyó a 40 pacientes con una anastomosis ileo-anal con reservorio con historia de pouchitis crónica recidivante (más de 3 brotes/año) que se encontraban en remisión en el momento de la inclusión (Gionchetti 2000). Los pacientes fueron randomizados para recibir bien la preparación de probióticos o placebo durante 9 meses. La preparación de probióticos (VSL#3) incluía 4 cepas de lactobacilos, 3 de bifidobacterias y una cepa de *Streptococcus salivarius sp thermophilus* en forma de liofilizado conteniendo  $5 \times 10^{11}$  bacterias por gramo. Al final del periodo de estudio, sólo el 15% de los pacientes en el grupo tratado con VSL#3 presentaron una recidiva comparado con el 100% de los pacientes en el grupo placebo. Además, todos los pacientes que respondieron al tratamiento con probióticos, presentaron una recidiva en los 4 meses siguientes tras suspenderlo. Estos resultados han sido confirmados en un estudio posterior utilizando una única dosis diaria del probiótico durante 12 meses (Mimura 2004). La misma mezcla de probióticos ha demostrado ser efectiva además como tratamiento profiláctico del primer episodio de reservoritis en pacientes sometidos a colectomía y anastomosis ileo-anal (Gionchetti 2003) y en el

tratamiento de mantenimiento de la colitis ulcerosa en un estudio abierto con 20 pacientes con colitis ulcerosa en remisión, alérgicos o intolerantes al 5-ASA (Venturi 1999). Los autores justifican el uso de una mezcla de distintas especies bacterias por dos motivos. Por un lado se administran altas concentraciones de bacterias probióticas y, por otro lado, la presencia de diferentes especies bacterianas favorece un efecto sinérgico teórico entre ellas para la inhibición de patógenos. Sin embargo, sería muy conveniente determinar si realmente las distintas cepas de probióticos presentan este efecto sinérgico, si todas las cepas son activas y necesarias para conseguir el efecto antiinflamatorio o si la utilización de la mezcla es superior a la de una única cepa bacteriana (Sartor 2000).

En conclusión, aunque por el momento contamos con pocos estudios clínicos, es probable que en algunos años el uso de probióticos ocupe un lugar importante en el arsenal terapéutico para prevenir y combatir la enfermedad inflamatoria intestinal.

## HIPÓTESIS



**La hipótesis de los estudios que constituyen esta tesis es la siguiente:**

Las bacterias no patógenas interactúan de manera cepa-específica con la mucosa intestinal humana induciendo un cambio o modulación en el patrón de secreción de citoquinas tanto en tejido normal como inflamado.

En el tejido intestinal inflamado, determinadas bacterias ejercen un efecto antiinflamatorio.

## OBJETIVOS

**Los objetivos de los estudios que constituyen esta tesis son los siguientes:**

*Estudio 1:*

Estudiar el efecto "ex vivo" de diferentes bacterias no patógenas sobre la secreción de citoquinas pro y anti-inflamatorias en la mucosa colónica normal.

*Estudio 2:*

Estudiar el efecto antiinflamatorio de diferentes bacterias no patógenas en la mucosa intestinal de pacientes con enfermedad de Crohn.

## ARTICULOS ORIGINALES

**Artículo 1:**

**“Effects of nonpathogenic bacteria on cytokine secretion by human intestinal mucosa.”** N.Borrueal, F.Casellas, M.Antolín, M.Llopis, M.Carol, E.Espín, J.Naval, F.Guarner, J.R.Malagelada. *American Journal of Gastroenterology* 2003;98:865-870.

# Effects of Nonpathogenic Bacteria on Cytokine Secretion by Human Intestinal Mucosa

Natalia Borrueal, Francesc Casellas, María Antolín, Marta Llopis, Monica Carol, Eloy Espín, Javier Naval, Francisco Guarner, and Juan R. Malagelada

*Digestive System Research Unit and Department of Surgery, Hospitals Vall d'Hebron, Universidad Autónoma de Barcelona, Barcelona, Spain*

**OBJECTIVE:** The human intestine harbors a complex microbial ecosystem, and the mucosa is the interface between the immune system and the luminal environment. The aim of this study was to elucidate whether host–bacteria interactions influence mucosal cytokine production.

**METHODS:** Macroscopically normal colonic specimens were obtained at surgery from eight patients with neoplasm, and inflamed ileal specimens were obtained from two patients with Crohn's disease. Mucosal explants were cultured for 24 h with either nonpathogenic *Escherichia coli* ECOR-26, *Lactobacillus casei* DN-114 001, *L. casei* DN-114 056, *L. casei* ATCC-334, or *Lactobacillus bulgaricus* LB-10. Each study included blank wells with no bacteria. Tissue and bacteria viability were confirmed by LDH release and culture. Concentration of tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$ , transforming growth factor  $\beta$ 1, interleukin (IL)-8, and IL-10 was measured in supernatants. In parallel experiments, neutralizing anti-TNF $\alpha$  antibody was added to the culture.

**RESULTS:** Co-culture of mucosa with bacteria did not modify LDH release. Co-culture with *L. casei* strains significantly reduced TNF $\alpha$  release, whereas *E. coli* increased it. These effects were observed both in normal and inflamed mucosa. In combination studies, *L. casei* DN-114 001 prevented TNF $\alpha$  stimulation by *E. coli*. *L. casei* DN-114 001 also reduced IL-8 release via a TNF $\alpha$ -independent pathway. *L. casei* DN-114 056 or *E. coli* increased IL-10 release in the presence of neutralizing anti-TNF $\alpha$ .

**CONCLUSIONS:** Nonpathogenic bacteria interact with human intestinal mucosa and can induce changes in cytokine production that are strain specific. (Am J Gastroenterol 2003; 98:865–870. © 2003 by Am. Coll. of Gastroenterology)

## INTRODUCTION

The large intestine harbors a complex and dynamic microbial ecosystem composed of several hundred species, including both pathogenic and health-promoting microorganisms (1). The microflora has marked influences on the animal host, as observed in experiments comparing the characteristics of germ-free and conventional animals (2). Among other important benefits, host–bacteria cross-talk

appears to play a major role in the development of normal mucosal immunity (3–6).

The intestinal mucosa is the main interface between the immune system and the luminal environment. Intestinal epithelial cells can actively process and transport foreign antigens to the underlying lamina propria (7) and generate signals for communication with mucosal immune and inflammatory cells (8). Interactions between enteropathogenic bacteria and the host mucosa are well documented. Pathogens possess highly specialized adaptive strategies that permit them to colonize and invade the gut mucosa (9, 10). Cytokines and chemokines expressed by epithelial cells in response to invasion attract and activate neutrophils and monocytes in the adjacent intestinal mucosa (11). Thus, antigen processing and signaling by epithelial cells are a primary step of innate and adaptive defense mechanisms in the earliest phases after invasion by pathogens.

The interactions between nonpathogenic bacteria and their intestinal host are less well known. Most of the bacteria that constitute the gut microflora are commensals that coexist with intestinal epithelial cells without harming them. Moreover, both bacteria and host cells benefit from the association. Some studies suggest that a dynamic molecular cross-talk does exist. For instance, it was shown that *Bacteroides thetaiotaomicron* builds up a partnership with its host (12). The host actively provides a nutrient the bacterium needs, and the bacterium actively indicates how much it needs to the host. This symbiotic relationship avoids overproduction of the nutrient that would favor the intrusion of microbial competitors with potential pathogenicity for the host. However, little is known about how nonpathogenic bacteria interact with immuno-inflammatory mechanisms of the intestinal mucosa.

The hypothesis of our study was that nonpathogenic bacteria interact with the intestinal mucosa and can induce different patterns of cytokine production. Our aim was to investigate whether some nonpathogenic bacteria can modulate cytokine responses. To this end, we incubated mucosal explants in the presence of viable bacteria and measured cytokine production after a 24-h period of organ culture.

## MATERIALS AND METHODS

### Specimens

Macroscopically normal colonic tissue was obtained at surgery from eight patients (five men and three women; median age 70 yr, range 58–80 yr) undergoing left hemicolectomy for colonic cancer. Full thickness colonic wall specimens distant from the tumor and without macroscopic or microscopic lesions were collected. Inflamed intestinal tissue was obtained at surgery from two patients with Crohn's disease (two men; age 32 and 37 yr) undergoing ileal resection for ileal stricture unresponsive to conventional medical treatment (prednisolone and azathioprine). The diagnosis of Crohn's disease was established by routine clinical, radiological, and endoscopic criteria and confirmed by histological examination. Preparation for surgery was similar for all patients and included gut lavage with electrolyte–polyethylene glycol solution and broad spectrum antibiotic therapy. The project was approved by the local ethics committee (Comite Etico de Investigacion Clinica, Hospitals Vall d'Hebron).

### Organ Culture

Specimens were rinsed under a jet of saline and gently washed twice in sterile saline. They were immediately transferred to our laboratory in sterile saline at 4°C. Multiple mucosal samples (30–40 per patient) weighing 20–30 mg each were separated from underlying tissue and placed on culture filter plates (15-mm-diameter wells with 500- $\mu$ m bottom mesh, Netwell culture systems, Costar, Cambridge, MA). The epithelial surface was uppermost. Filters were suspended over wells containing 1500  $\mu$ l medium, consisting of RPMI 1640 (CanSera, Rexdale, Ontario, Canada) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco BRL, Eggenstein, Germany), 100 U/ml penicillin (Normon, Madrid, Spain), 100  $\mu$ g/ml streptomycin (Normon), and 50  $\mu$ g/ml gentamycin (Normon). Samples were preincubated with antibiotics for 1 h at 37°C in humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere to eradicate indigenous flora and equilibrate the tissue to the culture conditions. Thereafter, medium was replaced by fresh RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, sodium bicarbonate at 24 mmol/L, and 100 U/ml penicillin. Sodium bicarbonate was added to prevent acidification of the medium by bacterial metabolism, because acidification can modify cytokine release. Penicillin was included to prevent contamination. At this time, selected bacteria strains were added to the incubation at appropriated concentrations, as described below. Each study run included blank wells with no bacteria in the organ culture. In some experiments, simultaneous to the addition of bacteria, neutralizing anti-tumor necrosis factor (TNF) $\alpha$  monoclonal antibody (infliximab [Remicade], Schering-Plough, Kenilworth, NJ) was added to the incubation wells at a final concentration of 4  $\mu$ g/ml (13). After 24 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> chamber, supernatants and tissues were collected and stored at –80°C until analysis.

### Bacteria Strains

*Lactobacillus casei* DN-114 001, *L. casei* DN-114 056, *L. casei* sp *casei* ATCC-334, and *L. bulgaricus* LB-10 were kindly provided by Dr. Puri Relano (Danone Vitapole, Paris, France). A nonpathogenic *Escherichia coli* strain (ECOR-26 or ATCC-35345) from the Ochman-Selander collection of standard reference strains of *E. coli* isolated from natural populations (14) was kindly provided by Prof. Juan Aguilar (Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Barcelona, Spain). The lactobacilli were grown in Man-Rogosa-Sharpe liquid medium (Difco, Detroit, MI) and the *E. coli* strain in Luria Bertani broth (Pharmacy, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona, Spain) at 37°C under aerobic conditions for 24 h. Bacteria were harvested in the stationary phase, cell counts in the bacterial suspension were estimated by optical density at 600 nm absorbance (UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan), and bacteria were added to the tissue culture wells at the appropriated dilution to reach a final concentration of 10<sup>6</sup> colony-forming units (CFU) per ml of incubation medium. Aliquots of the suspensions were incubated in Man-Rogosa-Sharpe liquid medium or blood agar plates to confirm bacterial growth and exclude the presence of contaminant bacteria.

### Analytical Methods

Tissue viability was assessed by the release of LDH into the supernatant. The ratio of LDH activity in the supernatant over total LDH activity in tissue homogenates was calculated and used to estimate the percentage of viable tissue. Tissue samples were homogenized in Tris/HCl (100 mmol/L, pH 7.4), and supernatants were analyzed for LDH using the spectrophotometric method.

Concentration of cytokines in the supernatants were measured using commercially available ELISA systems for human cytokines: TNF $\alpha$  (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, MN); transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1) (Genzyme Diagnostics, Cambridge, MA); and interleukin (IL)-8 and IL-10 (Endogen, Woburn, MA). All samples were analyzed in duplicate. Results of cytokine concentration are expressed as ng or pg per ml of culture medium.

### Statistical Methods

Results are expressed by the mean and the SEM. Statistical differences were determined using overall analysis of variance and Student's *t* test for individual comparisons between groups.

## RESULTS

### Tissue Viability

Table 1 shows tissue viability at the end of the 24-h culture period as assessed by LDH release. Co-culture of the tissue with any of the bacteria studied did not modify tissue viability as compared with blank culture. Final pH was 7.36  $\pm$  0.04 in blank wells, 7.32  $\pm$  0.04 in *L. casei* DN-114 001 wells, 7.34  $\pm$  0.04 in *L. casei* DN-114 056 wells, 7.35  $\pm$

**Table 1.** Tissue Viability After 24-H Organ Culture

Group	n*	% Viability†
Blank	13	67 ± 1.4
<i>L. casei</i> DN-114 001	10	65 ± 2.8
<i>L. casei</i> DN-114 056	10	65 ± 1.2
<i>L. casei</i> ATCC-334	10	63 ± 1.3
<i>L. bulgaricus</i> LB-10	10	62 ± 1.8
<i>E. coli</i> ECOR-26	8	63 ± 0.8

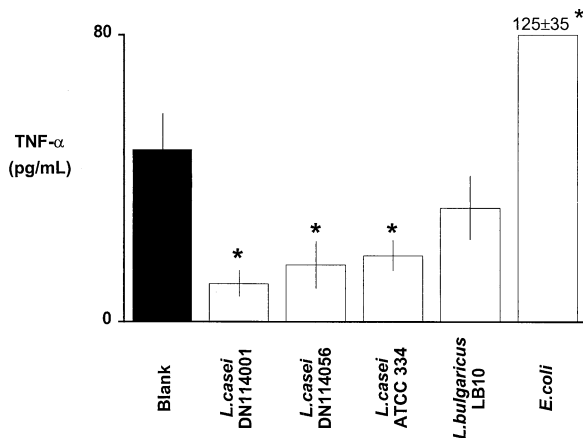
\* Number of organ culture experiments per group.

† The ratio of LDH activity in the supernatant over total LDH activity in tissue homogenates was calculated and used to estimate the percentage of viable tissue.

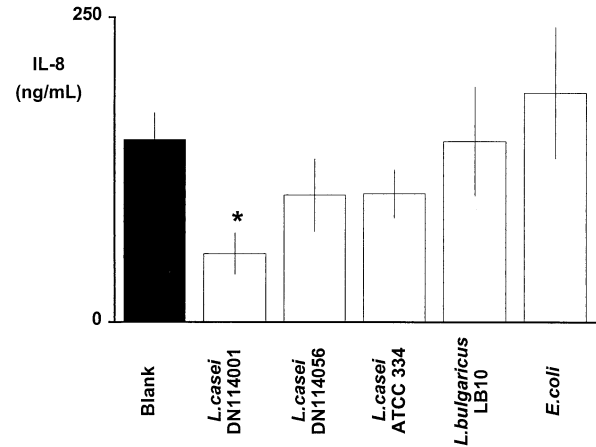
0.06 in *L. bulgaricus* LB-10 wells, and  $7.32 \pm 0.05$  in *E. coli* wells.

### Release of Cytokines by Normal Colonic Mucosa

Concentration of TNF $\alpha$  in the culture wells after 24-h incubation showed significant differences between groups, as depicted in Figure 1. Co-culture of colonic mucosa with *L. casei* DN-114 001, *L. casei* DN-114 056, and *L. casei* ATCC-334 significantly reduced TNF $\alpha$  release as compared with blank culture. However, *L. bulgaricus* LB-10 did not induce significant changes in TNF $\alpha$  release as compared with blank culture. By contrast, the nonpathogenic *E. coli* ECOR-26 strain induced a significant increase in TNF $\alpha$  release to the medium. When the bacteria were harvested during the phase of logarithmic growth and added to the tissue culture, the effects were similar: *L. casei* DN-114 001 significantly inhibited TNF $\alpha$  release, whereas *E. coli* stimulated production of this cytokine (data not shown). The same findings were observed when the bacteria inocula varied in the range of  $10^5$  to  $10^7$  CFU per ml (data not shown).



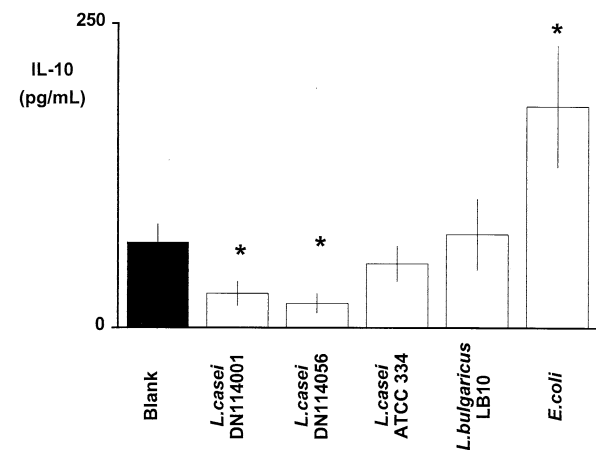
**Figure 1.** Levels of TNF $\alpha$  in the incubation medium after 24-h culture of colonic mucosa. No bacterium was added to blank cultures, whereas lactobacilli or *E. coli* strains were added at  $10^6$  CFU per ml in the corresponding culture wells. Co-culture of colonic mucosa with *L. casei* DN-114 001, *L. casei* DN-114 056, and *L. casei* ATCC-334 significantly reduced TNF $\alpha$  levels, but the nonpathogenic *E. coli* strain significantly stimulated the release of TNF $\alpha$ . Data are mean  $\pm$  SEM (\*  $p < 0.05$  vs blank). Differences between *E. coli* and all the *Lactobacillus* strains were also significant ( $p < 0.05$ ).



**Figure 2.** Levels of IL-8 in the incubation medium in organ culture experiments, as described in Figure 1. The *L. casei* DN-114 001 strain significantly inhibited the release of IL-8 to the incubation medium (\*  $p < 0.05$  vs blank and *E. coli*).

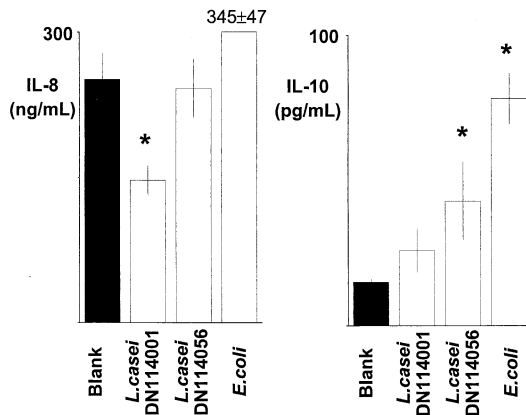
As shown in Figure 2, co-culture experiments with any of the *L. casei* strains showed that release of IL-8 into the medium decreased by comparison with blank culture, but only the DN-114 001 strain induced statistically significant changes. *L. bulgaricus* and *E. coli* had no effect. In addition to effects on IL-8, both *L. casei* DN-114 001 and *L. casei* DN-114 056 induced a decrease in the release of IL-10 as compared with blank culture (Fig. 3). The other two *Lactobacillus* strains produced no significant changes, but co-culture with the *E. coli* strain significantly increase the IL-10 release into the medium.

No changes were found in the release of TGF $\beta$ 1 after co-culture of the mucosa with any of the bacteria studied (Blank:  $1.7 \pm 0.15$  ng/mL; *L. casei* DN-114 001:  $1.8 \pm$



**Figure 3.** Levels of IL-10 in the incubation medium in organ culture experiments, as described in Figure 1. *L. casei* DN-114 001 and *L. casei* DN-114 056 inhibited the release of IL-10 to the incubation medium, whereas the nonpathogenic *E. coli* significantly stimulated its release (\*  $p < 0.05$  vs blank). Differences between *E. coli* and all the *Lactobacillus* strains were also significant ( $p < 0.05$ ).





**Figure 4.** Levels of IL-8 and IL-10 in organ culture experiments with neutralizing anti-TNF $\alpha$  antibody added to the medium. The release of IL-8 (left graph) was significantly inhibited in the presence of *L. casei* DN-114 001 ( $p < 0.05$  vs blank, *E. coli* and *L. casei* DN-114 056). The release of IL-10 (right graph) was higher in the presence of *L. casei* DN-114 056 or *E. coli* than in blank cultures (\*  $p < 0.05$  vs blank). Data are mean  $\pm$  SEM.

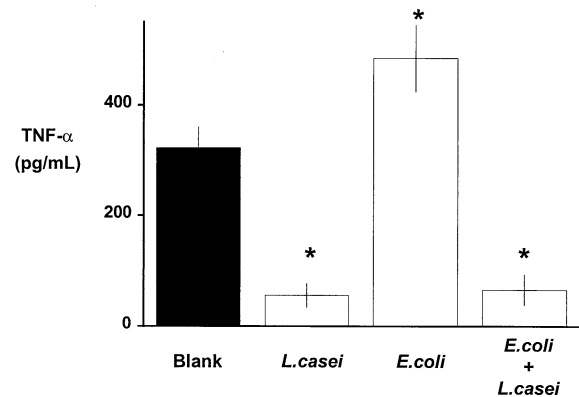
0.20; *L. casei* DN-114 056:  $1.8 \pm 0.20$ ; *L. casei* ATCC-334:  $1.6 \pm 0.15$ ; *L. bulgaricus* LB-10:  $1.8 \pm 0.15$ , and *E. coli*:  $1.7 \pm 0.21$ ).

#### Effect of Neutralizing Anti-TNF $\alpha$ Antibody

The effect of bacteria on cytokine release by colonic mucosa was tested in the presence of neutralizing anti-TNF $\alpha$  antibody added to the incubation medium. The release of TNF $\alpha$  was completely blocked by the antibody ( $< 2.5$  ng/ml in all incubation conditions). In blank wells, IL-8 levels were 2-fold higher in the presence of anti-TNF $\alpha$  as compared with blank wells without anti-TNF $\alpha$  (Fig. 4, left graph, compared with blanks in Fig. 2). Interestingly, the *L. casei* DN-114 001 strain induced a significant reduction in IL-8 release in the presence of the neutralizing antibody, whereas the other strains had no effect. Release of IL-10 was lower when the mucosa was incubated in the presence of the anti-TNF $\alpha$  monoclonal antibody ( $p < 0.05$ , blanks in Fig. 4 compared with blanks in Fig. 3). In this setting, the *L. casei* DN-114 056 strain as well as the *E. coli* strain induced significant increases in mucosal release of IL-10 (Fig. 4, right graph).

#### Release of TNF $\alpha$ by Inflamed Ileal Mucosa

In blank organ culture, the release of TNF $\alpha$  from inflamed ileal tissue of Crohn's disease patients was high ( $323 \pm 38$  pg/ml). As previously observed, co-culture of inflamed tissue with the *L. casei* DN-114 001 strain significantly reduced TNF $\alpha$  release (Fig. 5). The nonpathogenic *E. coli* strain induced an increase in TNF $\alpha$  release by the tissue. Interestingly, combination co-culture experiments with *L. casei* DN-114 001 and *E. coli* showed a reduced release of TNF $\alpha$  as compared with either blank or *E. coli* only wells ( $p < 0.05$ ).



**Figure 5.** Levels of TNF $\alpha$  in the incubation medium after 24-h culture of inflamed ileal mucosa. Blank organ culture (no bacteria in the medium) showed a high release of the cytokine. As shown, *L. casei* DN-114 001 significantly reduced TNF $\alpha$  levels, but the nonpathogenic *E. coli* strain significantly stimulated the release of TNF $\alpha$ . Interestingly, combination experiments with *L. casei* DN-114 001 and *E. coli* showed reduced levels of TNF $\alpha$ , suggesting that *L. casei* can prevent the inflammatory exacerbation induced by the gram negative strain. Data are mean  $\pm$  SEM (\*  $p < 0.05$  vs blank).

## DISCUSSION

Our study investigated the effect of different nonpathogenic bacteria on the spontaneous production of cytokines by human intestinal mucosal specimens. We used whole mucosa explants freshly dissected from surgical specimens and co-cultured the mucosa with bacteria for a 24-h period. Tissue viability was not altered by the presence of live bacteria in the organ culture medium, as shown by the data on LDH release. Our results show that nonpathogenic bacteria can influence the release of cytokines by mucosal explants. Three strains of *L. casei*, a *L. bulgaricus* strain, and a nonpathogenic *E. coli* strain were found to induce different patterns of cytokine production.

Previous studies by other investigators have shown that although human intestinal epithelial cell lines constitutively express IL-8 and TGF $\beta$ 1 (8), other cytokines, such as TNF $\alpha$ , are only expressed after challenge with enteropathogenic bacteria (11). Moreover, expression of TNF $\alpha$  or IL-8 genes in isolated colonic epithelial cells is not altered by incubation with noninvasive bacteria (11). However, Haller and coworkers (15) observed that isolated intestinal epithelial cells could produce TNF $\alpha$  when sensitized with leukocytes. Using intestinal epithelial cells co-cultivated with human blood leukocytes in separate compartments of transwell cultures, they found that some nonpathogenic bacteria strains produce a variable stimulation of cytokine expression, including TNF $\alpha$ , IL-8, IL-10, and TGF $\beta$ . In this model, however, nonstimulated spontaneous production of cytokines was low or negligible, and only up-regulation by bacteria could be detected. In contrast, in our study we have observed that cultured mucosal explants spontaneously secreted measurable quantities of TNF $\alpha$ , IL-8, IL-10, and

TGF $\beta$ 1 proteins. Thus, our model provides an interesting approach for research on the interaction of bacteria with the host, using both the epithelial interface and the immunocompetent cells in their own natural disposition.

The nonpathogenic *E. coli* strain significantly stimulated the release of TNF $\alpha$  by mucosal explants of normal colonic mucosa. Increases in the release of IL-8 were not significant, but the anti-inflammatory cytokine IL-10 was stimulated by a TNF $\alpha$  independent mechanism. A similar pattern of cytokine release (increases in TNF $\alpha$ , IL-8, and IL-10) was observed by Haller and co-workers (15) using the transwell culture system with epithelial cells and leukocytes challenged with another nonpathogenic strain of *E. coli* (LTH 634). Increased expression of TNF $\alpha$  and IL-8 by epithelial cells is consistently observed after challenge by enteropathogenic strains of *E. coli* (11, 16). This effect has been shown to involve the nuclear transcription factor- $\kappa$  B (NF- $\kappa$  B) that binds to specific promoter sequences and activates the transcription and expression of a series of genes that encode proinflammatory cytokines and inducible proinflammatory enzymes (16, 17). Activation of the transcription factor NF- $\kappa$  B is produced by transmembrane signals generated by toll-like receptors in the outer cell surface (18). Intestinal epithelial cells express toll-like receptors that recognize specific microbial components, such as cell wall lipopolysaccharide of gram negative bacteria (19). This pathway appears to be a primary mechanism for innate immune response against infectious agents. Our data suggest that the intestinal mucosa up-regulates this pathway not only when challenged by pathogens but also in the presence of nonpathogenic gram negative bacteria. This reaction to nonpathogenic bacteria could be particularly harmful in specific settings with a background of inflammation, as in inflammatory bowel disease. Our experiments with inflamed ileal mucosa clearly suggest that a nonpathogenic *E. coli* strain may exacerbate inflammation.

In the experiments with *L. casei* strain DN-114 001, the spontaneous mucosal release of TNF $\alpha$ , IL-8, and IL-10 was significantly reduced. Our studies with the anti-TNF $\alpha$  neutralizing antibody suggested that the effect on IL-8 is independent from the effect on TNF $\alpha$ . However, reduction of IL-10 after co-culture with this strain appears to be mediated by the reduction of TNF $\alpha$  release, because the experiments performed in the presence of the neutralizing antibody showed a different trend. As observed in a previous study by our own group (20), co-culture of inflamed ileal mucosa with the *L. casei* DN-114 001 strain markedly reduced the mucosal release of TNF $\alpha$ . In the previous study, we also measured a reduction of the number of mucosal T lymphocytes (CD3 cells) expressing TNF $\alpha$  or the activation marker CD25 after tissue incubation with *L. casei* DN-114 001. Those findings suggested that signals generated at the epithelial level are transduced to the underlying mucosa and induce changes in the activation status of immuno-inflammatory cells. Thus, signals generated by the interaction of *L.*

*casei* DN-114 001 with the epithelium may down-regulate mucosal inflammation. This would explain our current findings in the combination studies with *E. coli* and *L. casei* DN-114 001. Interestingly, the *L. casei* strain was able to prevent the inflammatory over-reaction against the nonpathogenic *E. coli* strain. Our findings may suggest that a "friendly" interaction exists between the *L. casei* strain and the mucosal defense systems.

Experiments with *L. casei* strain DN-114 056 showed a reduction on the release of TNF $\alpha$  similar to that produced by *L. casei* DN-114 001, no changes on IL-8 release, and a stimulation of IL-10 via an independent TNF $\alpha$  pathway. *L. casei* ATCC-334 only reduced TNF $\alpha$  release, and *L. bulgaricus* LB-10 did not induce any significant change on cytokine profile. Our results suggest that each bacteria strain may induce a different pattern of response on mucosal cytokine production. Other strains of *Lactobacillus* have been shown to activate the NF- $\kappa$  B pathway when exposed directly to human macrophages (21).

We conclude that nonpathogenic bacteria interact with normal human colonic mucosa and may induce strain specific changes in innate mechanisms of mucosal defense. Our data show that *L. casei* can antagonize the production of TNF $\alpha$  stimulated by *E. coli* in inflamed intestinal tissue. These findings have interesting implications for future uses of nonpathogenic bacteria to modify immune responses in the human colon.

## ACKNOWLEDGMENTS

This project was supported by a grant from Danone Vitapole (Paris, France) and by Generalitat de Catalunya (RE: 2000SGR 00123). We thank Montserrat Casellas and Milagros Gallart for their expert technical assistance.

---

**Reprint requests and correspondence:** Francisco Guarner, M.D., Hospital General Vall d'Hebron, Digestive System Research Unit, Barcelona 08035, Spain.

Received June 12, 2002; accepted Sep. 30, 2002.

---

## REFERENCES

1. Salminen S, Bouley C, Bouton-Ruault MC, et al. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr* 1998;80(suppl 1):S147-71.
2. Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, et al. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: What we know and need to know from gnotobiology. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998;62:1157-70.
3. Umesaki Y, Setoyama H, Matsumoto S, et al. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology* 1993;79:32-7.
4. Helgeland L, Vaage JT, Rolstad B, et al. Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology* 1996;89:494-501.

5. Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, et al. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): The roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol* 1998;6:13–8.
6. Moreau MC, Gaboriau-Routhiau V. The absence of gut flora, the doses of antigen ingested and aging affect the long-term peripheral tolerance induced by ovalbumin feeding in mice. *Res Immunol* 1996;147:49–59.
7. Shao L, Serrano D, Mayer L. The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. *Semin Immunol* 2001;13:163–75.
8. Eckmann L, Jung HC, Schurer-Maly C, et al. Differential cytokine expression by human intestinal epithelial cell lines: Regulated expression of interleukin 8. *Gastroenterology* 1993;105:1689–97.
9. Bloom PD, Boedeker EC. Mucosal immune responses to intestinal bacterial pathogens. *Semin Gastrointest Dis* 1996;7:151–66.
10. Hecht G, Savkovic SD. Effector role of epithelia in inflammation—interaction with bacteria. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11(suppl 3):64–8.
11. Jung HC, Eckmann L, Yang SK, et al. A distinct array of proinflammatory cytokines is expressed in human colon epithelial cells in response to bacterial invasion. *J Clin Invest* 1995;95:55–65.
12. Hooper LV, Xu J, Falk PG, et al. A molecular sensor that allows a gut commensal to control its nutrient foundation in a competitive ecosystem. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:9833–8.
13. Siegel SA, Shealy DJ, Nakada MT, et al. The mouse/human chimeric monoclonal antibody cA2 neutralizes TNF $\alpha$  in vitro and protects transgenic mice from cachexia and TNF lethality in vivo. *Cytokine* 1995;7:15–25.
14. Ochman H, Selander RK. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* 1984;154:690–3.
15. Haller D, Bode C, Hammes WP, et al. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 2000;47:79–87.
16. Savkovic SD, Koutsouris A, Hecht G. Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am J Physiol* 1997;273:C1160–7.
17. Elewaut D, DiDonato JA, Kim JM, et al. NF-kappa B is a central regulator of the intestinal epithelial cell innate immune response induced by infection with enteroinvasive bacteria. *J Immunol* 1999;163:1457–66.
18. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406:782–7.
19. Abreu MT, Vora P, Faure E, et al. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001;167:1609–16.
20. Borruel N, Carol M, Casellas F, et al. Increased mucosal TNF $\alpha$  production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria. *Gut* 2002;51:659–64.
21. Miettinen M, Lehtonen A, Julkunen I, et al. Lactobacilli and streptococci activate NF-kappa B and STAT signaling pathways in human macrophages. *J Immunol* 2000;164:3733–40.

**Artículo 2:**

**“Increased mucosal tumor necrosis factor  $\alpha$  production in Crohn’s disease can be downregulated ex-vivo by probiotic bacteria.”** N.Borrueal, M.Carol, F.Casellas, M.Antolín, F.De Lara, E.Espín, J.Naval, F.Guarner, J.R.Malagelada. *Gut* 2002;51:659-664.

## INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

# Increased mucosal tumour necrosis factor $\alpha$ production in Crohn's disease can be downregulated ex vivo by probiotic bacteria

N Borrueal, M Carol, F Casellas, M Antolín, F de Lara, E Espín, J Naval, F Guarner, J R Malagelada

*Gut* 2002;51:659–664

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to:  
Dr F Guarner, Digestive System Research Unit, Hospital General Vall d'Hebron, Barcelona 08035, Spain; fguarnera@medynet.com

Accepted for publication 18 March 2002

**Background and aims:** Tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) plays a key role in the pathogenesis of intestinal inflammation in Crohn's disease. The effect of bacteria on TNF- $\alpha$  release by intestinal mucosa was investigated.

**Methods:** Ileal specimens were obtained at surgery from 10 patients with Crohn's disease (ileal stricture) and five disease controls undergoing right hemicolectomy (caecal cancer). Mucosal explants from each specimen were cultured for 24 hours with either non-pathogenic *Escherichia coli*, *Lactobacillus casei* DN-114001, *L bulgaricus* LB10, or *L crispatus* (each study contained blank wells with no bacteria). Tissue and bacterial viability was confirmed by lactate dehydrogenase (LDH) release and culture. Concentrations of TNF- $\alpha$  were measured in supernatants and the phenotype of the intestinal lymphocytes was analysed by flow cytometry.

**Results:** Coculture of mucosa with bacteria did not modify LDH release. Release of TNF- $\alpha$  by inflamed Crohn's disease mucosa was significantly reduced by coculture with *L casei* or *L bulgaricus*; changes induced by *L crispatus* or *E coli* were not significant. The effect of *L casei* and *L bulgaricus* was not prevented by protease inhibitors. Coculture with *L casei* and *L bulgaricus* reduced the number of CD4 cells as well as TNF- $\alpha$  expression among intraepithelial lymphocytes from Crohn's disease mucosa. None of the bacteria induced changes in non-inflamed mucosa.

**Conclusions:** Probiotics interact with immunocompetent cells using the mucosal interface and modulate locally the production of proinflammatory cytokines.

Unrestrained activation of the intestinal immune system appears to be responsible for the characteristic relapsing course of inflammatory bowel disease.<sup>1</sup> The recurrent disease process may be mediated by an abnormal pattern of cytokine release. In Crohn's disease, the potent proinflammatory cytokine tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) seems to play a pivotal role in the pathogenesis of altered mucosal immune function.<sup>2–3</sup> Several lines of evidence support this concept. Firstly, expression of TNF- $\alpha$  in the intestinal mucosa is increased in patients with Crohn's disease.<sup>4–8</sup> Secondly, a number of clinical studies using anti-TNF- $\alpha$  monoclonal antibody therapy have clearly shown a beneficial response associated with clinical, endoscopic, and histological remission.<sup>9–14</sup> Furthermore, failure of anti-TNF- $\alpha$  therapy has been related to early reactivation of TNF- $\alpha$  secretory capacity by immunocompetent cells.<sup>15</sup> These observations together with evidence obtained from in vitro studies<sup>16–17</sup> led to the notion that enhanced function of T helper 1 lymphocytes that secrete TNF- $\alpha$  is a key factor in the pathogenesis of Crohn's disease.<sup>3–18</sup>

The resident flora represent a major challenge to the intestinal immune system and an abnormal immunological reactivity to normal flora has been clearly documented in patients with Crohn's disease.<sup>19–20</sup> Unrestrained activation of the intestinal immune system in Crohn's disease patients may result from lack of tolerance to the resident flora. In experimental studies, non-pathogenic bacteria of the enteric flora have been shown to induce inflammatory responses and mucosal injury.<sup>21–24</sup> Certain genera such as *Bacteroides* and *Clostridium* may be detrimental when dysfunction of the colonic mucosal barrier is present,<sup>22–23</sup> whereas *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* are considered beneficial. Injection of lactobacilli into the rat intestinal wall does not induce an

inflammatory reaction, as opposed to injection of *Bacteroides* and *Clostridium* species.<sup>23</sup> Moreover, *Lactobacillus reuteri* can prevent intestinal inflammation in interleukin 10 (IL-10) deficient mice.<sup>25</sup> Several studies suggest that colonising bacteria play a major role in the growth and differentiation of gut associated lymphoid tissue, and different bacteria may elicit different responses.<sup>26–27</sup> Non-pathogenic bacteria may modify immune responses of the intestinal mucosa by interaction and signalling at mucosal surfaces.<sup>28</sup>

The aim of the current study was to investigate whether bacteria modulate cytokine responses in Crohn's disease. To this end, we incubated mucosal explants from Crohn's disease patients and controls in the presence of different bacteria, including two strains with known probiotic properties.

## METHODS

### Patients

Samples of intestinal mucosa were obtained at surgery from 10 patients with Crohn's disease (six men and four women; median age 32 years (range 20–67)) undergoing ileal resection for ileal stricture unresponsive to conventional medical treatment. All patients had been treated with oral corticosteroids (prednisolone 0.5–1.0 mg/kg/day) and azathioprine (2–2.5 mg/kg/day) up to the time of surgery and tissue sampling. The diagnosis of Crohn's disease was established by routine clinical, radiological, and endoscopic criteria and confirmed by

**Abbreviations:** CFU, colony forming units; IEL, intraepithelial lymphocytes; IL, interleukin; LDH, lactate dehydrogenase; LPL, lamina propria lymphocytes; LB broth, Luria Bertani broth; MRS broth, Man-Rogosa-Sharpe broth; TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor  $\alpha$ .

histological examination. Ileal stricture was diagnosed on the basis of clinical symptoms and imaging studies (small bowel barium studies and computed tomography scan). Macroscopic examination of the surgical specimen confirmed ileal stricture in all patients, and histological examination demonstrated transmural inflammation, intense fibrosis, lymphoid aggregates in the submucosa, and granulomas. Control ileal specimens were obtained from five patients undergoing right hemicolectomy for colonic cancer located at the caecum (three men and two women; median age 67 years (range 45–78)). Preparation for surgery was similar for patients and controls, and included gut lavage with electrolyte-polyethylene glycol solution and broad spectrum antibiotic therapy. The project was approved by the local ethics committee (CEIC, Hospitals Vall d'Hebron).

### Organ culture

Full thickness ileal wall specimens, including areas with and without macroscopic lesions, were collected at surgery. After resection specimens were rinsed under a jet of saline and gently washed twice in sterile saline. They were immediately transferred to our laboratory in sterile saline at 4°C. Multiple mucosal samples weighing 20–30 mg each were separated from underlying tissue and placed on culture filter plates (15 mm diameter wells with 500 µm bottom-mesh; Netwell Culture Systems, Costar, Cambridge, Massachusetts, USA). The epithelial surface was uppermost. Filters were suspended over wells containing 1500 µl medium, consisting of RPMI 1640 (CanSera, Rexdale, Ontario, Canada) supplemented with 10% fetal calf serum (Gibco BRL, Eggenstein, Germany), 100 U/ml penicillin (Normon, Madrid, Spain), 100 µg/ml streptomycin (Normon), and 50 µg/ml gentamycin (Normon). Samples were preincubated with antibiotics for one hour at 37°C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> atmosphere to eradicate indigenous flora and equilibrate the tissue to the culture conditions. Thereafter, medium was replaced by fresh RPMI 1640 supplemented with 10% fetal calf serum, sodium bicarbonate 24 mmol/l, and 100 U/ml penicillin. Sodium bicarbonate was added to prevent acidification of the medium by bacterial metabolism and penicillin to prevent bacterial overgrowth. Selected bacteria strains were added to the incubation at appropriate concentrations, as described below. Each study run included blank wells with no bacteria in the organ culture. After 24 hours at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> chamber, supernatants and tissues were collected and stored at –80°C until analysis. In ancillary experiments, a mix of protease inhibitors including protease inhibitor cocktail for mammalian cells (0.6 µl/ml; P-8340, Sigma-Aldrich, Madrid, Spain) and protease inhibitor cocktail for bacteria extracts (1.3 µl/ml; P8465, Sigma-Aldrich) was added to the incubation medium.

### Bacterial strains

*Lactobacillus casei* DN-114001 and *Lactobacillus bulgaricus* LB10 were provided by Danone Vitapole (Paris, France). Consumption of *L casei* DN-114001 was shown to increase the percentage of children with high counts of lactobacilli in faeces,<sup>29</sup> and to reduce the severity of incident episodes of acute diarrhoea during a six month controlled trial among infants attending day care centres.<sup>30</sup> *L crispatus* was provided by Dr Antonia Andreu (Microbiology Department, Hospital Vall d'Hebron). This strain had been isolated from the human vaginal flora and selected because of its capacity to inhibit the growth of uropathogens.<sup>31</sup> A non-pathogenic *Escherichia coli* strain (ECOR-26) from the Ochman-Selander collection of standard reference strains of *E coli* isolated from natural populations<sup>32</sup> was provided by Professor Juan Aguilar (Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Spain). Lactobacilli were grown in Man-Rogosa-Sharpe liquid medium (MRS broth; Difco, Detroit, Michigan, USA) and the *E coli* strain in Luria Bertani broth (LB, Pharmacy, Hospital Vall d'Hebron) at 37°C

under aerobic conditions for 24 hours. Bacteria were harvested in the stationary phase, cell counts in the bacterial suspension were estimated by optical density at 600 nm absorbance (UV-1601, Shimadzu, Kyoto, Japan), and bacteria were added to the tissue culture wells at the appropriate dilution to reach a final concentration of 10<sup>6</sup> colony forming units/ml of incubation medium. Aliquots of the suspensions were incubated in MRS or blood-agar plates to confirm bacterial growth and exclude the presence of contaminant bacteria.

In ancillary experiments, bacterial concentration in the supernatants of the organ culture was estimated by optical density readings after four and 24 hours of incubation (n=5 per bacteria and per time point). Optical density readings were transformed to bacteria counts by means of a specific conversion factor previously estimated for each strain, and data expressed as per cent of the counts at time 0. Other experiments (n=5 per bacteria and five blanks) assessed bacterial viability at the end of the incubation period by quantitative culture of the supernatant. After 24 hours of incubation, supernatants were spun at 9000 g for one minute using a benchtop Eppendorf centrifuge (Cologne, Germany), and the pellets washed twice in fresh liquid growth medium (MRS or LB). The resuspended pellets were plated on MRS or blood-agar at serial dilutions. Plates were incubated at 37°C for up to four days and colonies counted.

Other organ culture experiments investigated the effect of heat killed bacteria on TNF-α release compared with viable bacteria. For this purpose, aliquots of the bacterial suspensions were incubated for 10 minutes in a bath at 75°C whereas matched aliquots were kept at room temperature. Thereafter, tissue culture wells were inoculated with the suspensions at the appropriate dilution for the organ culture experiments. Aliquots of both suspensions were plated on MRS or blood-agar. No bacterial growth was observed in aliquots subjected to heat treatment whereas the matched aliquots showed growth of the corresponding bacterial strain only.

### Isolation of intestinal lymphocytes

Cell populations were isolated after culture of ileal mucosa for 24 hours at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, as described above. Macroscopically inflamed samples from eight patients with Crohn's disease and normal appearing samples from four controls were included in the study. Intraepithelial lymphocytes (IEL) and lamina propria lymphocytes (LPL) were isolated as previously described.<sup>33</sup> Briefly, mucosal samples were incubated in Iscove medium (Gibco) supplemented with 40 mg/ml gentamycin, 10% fetal calf serum, and 1 mM EDTA (Sigma-Aldrich) for one hour at 37°C under continuous stirring. Thereafter, IEL and epithelial cells were collected in the supernatant. Histological examination of the remaining fragment revealed that the villous and lamina propria structures were still preserved whereas all of the cells within the epithelium had disappeared during the procedure. The remaining fragments were then cut into small pieces and incubated under stirring for one hour at 37°C in Iscove medium containing 1 mg/ml collagenase-dispase (Sigma-Aldrich), and LPL were collected in the supernatant. The numbers of mononuclear cells were counted using a Bürker chamber, and the percentages of CD3+ lymphocytes were estimated by flow cytometry.

### Phenotypic analysis of intestinal T lymphocytes

Phenotypic characterisation of the intestinal lymphocytes was performed by flow cytometry on isolated IEL and LPL. Cell suspensions were directly resuspended in complete Iscove medium at 1×10<sup>6</sup> cells/ml and 100 µl of the cell suspension was incubated with anti-CD3 FITC, anti-CD4 APC, anti-CD8 PerCPE, and anti-CD25 PE mAbs (Becton Dickinson, San Jose, California, USA) at 4°C for 30 minutes in the dark. After staining, cells were washed, and at least 5000 cells were analysed by flow cytometry (FACScan, Becton Dickinson).

**Table 1** Tissue viability after 24 hours of organ culture

	Control	Non-inflamed Crohn's disease	Inflamed Crohn's disease
Blank	81 (4.5)	105 (10.9)	63 (3.9)
<i>L casei</i>	84 (8.6)	94 (7.7)	70 (8.3)
<i>L bulgaricus</i>	76 (4.5)	96 (9.8)	60 (4.6)
<i>L crispatus</i>	82 (4.3)	86 (6.5)	64 (9.5)
<i>E coli</i>	84 (4.7)	99 (6.1)	69 (7.5)

Data are mU of lactate dehydrogenase/mg of tissue protein/hour, as measured in the supernatant after the 24 hour organ culture period (mean (SEM) of 10–14 organ culture experiments per point).

Lymphocytes were gated by forward-sideward scatter light and by gating for CD3+ cells.

The phenotype of TNF- $\alpha$ -producing cells was analysed using flow cytometry by labelling both intracytoplasmic TNF- $\alpha$  and lymphocyte membrane markers. However, because this method lacks sensitivity, cells were first stimulated in vitro with phorbol-12-myristate-13-acetate and the calcium ionophore A23187 (10  $\mu$ g/ml and 100  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich) in the presence of brefeldin A (10  $\mu$ g/ml; Sigma-Aldrich) for 16 hours at 37°C and 5% CO<sub>2</sub>. Intestinal cytokine producing cells were analysed according to the instructions of the manufacturer of the Cytofix/Cytoperm product (Pharmingen, San Diego, California, USA) using monoclonals anti-CD3 FITC, anti-CD4 APC, anti-CD8 PerCP, and anti-TNF- $\alpha$  PE (Becton Dickinson). Results were expressed as percentage of positive cells per CD3+ cell. The cut off point at which a specific signal was considered positive was determined using cells stained with control antibodies of the same isotype.

#### Analytical methods

Concentrations of TNF- $\alpha$  in the supernatants were measured using a commercially available assay system for human TNF- $\alpha$  (DuoSet, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA). All samples were analysed in duplicate. Results of cytokine concentrations are expressed as pg/ml of culture medium.

Supernatants were analysed for lactate dehydrogenase (LDH) using the spectrophotometric method of Krieg and colleagues.<sup>34</sup> Tissue samples were homogenised in Tris/HCl (100 mmol/l, pH 7.4) and protein concentration was determined using the bicinchoninic acid reagent for protein assay (Pierce, Rockford, Illinois, USA). Tissue viability was assessed based on release of LDH/mg of tissue protein, according to Finnie and colleagues.<sup>35</sup>

#### Statistical methods

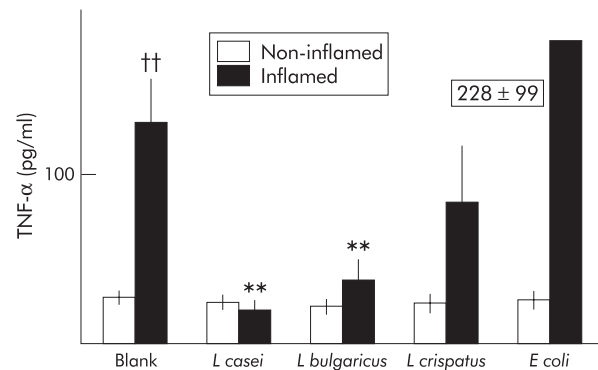
Results are expressed as mean (SEM) or median (range), as indicated. Statistical differences were determined using overall analysis of variance and the Student-Newman-Keuls method as post test for parametric variables, or the Kruskal-Wallis test and Dunn's post test for non-parametric variables (GraphPad Instat, San Diego, California, USA).

## RESULTS

### Organ culture

Table 1 shows mean LDH release, as measured at the end of the organ culture experiments. Interestingly, coculture of the tissue with any of the bacteria did not modify LDH release. Compared with total tissue LDH content, release of LDH into the medium during the 24 hour culture period was below 30% in all experiments.

Concentrations of *L casei* in the organ culture supernatant, as assessed by optical density, decreased after four hours of incubation (75 (9)% of baseline) but were relatively stable up to the end of the experiment (84 (7)% at 24 hours). A similar



**Figure 1** Levels of tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) in the incubation medium after 24 hours of culture of intestinal mucosa from Crohn's disease patients in macroscopically non-inflamed mucosa or inflamed mucosa. No bacterium was added to blank cultures whereas *Lactobacillus casei*, *L bulgaricus*, *L crispatus*, or *Escherichia coli* were added at 10<sup>6</sup> colony forming units/ml in the corresponding culture wells. In blank cultures, levels of TNF- $\alpha$  were significantly higher in inflamed than in non-inflamed mucosa. Coculture of inflamed mucosa with *L casei* or *L bulgaricus* significantly reduced TNF- $\alpha$  levels. Data are mean (SEM): †††† $p$ <0.01 versus non-inflamed; \*\* $p$ <0.01 versus blank.

profile was observed for *L crispatus* (80 (9)% at four hours and 73 (8)% at 24 hours). Concentrations of *L bulgaricus* initially showed a marked drop (52 (8)% at four hours) but remained stable (45 (7)% at 24 hours), and *E coli* concentrations increased over time (206 (84)% at 24 hours). Microbiological culture of the supernatants after the 24 hour incubation period demonstrated growth of the same bacterial strain that had been inoculated previously, and no other bacterium was recovered. In blank incubations, no bacterial growth was found. Quantitative culture demonstrated concentrations of viable bacteria ranging from 9 $\times$ 10<sup>4</sup> to 5 $\times$ 10<sup>5</sup> colony forming units/ml for *L casei*, from 8 $\times$ 10<sup>2</sup> to 9 $\times$ 10<sup>3</sup> for *L bulgaricus*, from 2 $\times$ 10<sup>3</sup> to 2 $\times$ 10<sup>5</sup> for *L crispatus*, and above 1 $\times$ 10<sup>6</sup> for *E coli*.

### Release of TNF- $\alpha$

Concentrations of TNF- $\alpha$  in culture wells after 24 hours of incubation showed significant differences, as depicted in fig 1. In blank organ cultures, release of TNF- $\alpha$  from inflamed tissue of Crohn's disease patients was significantly higher than release measured in non-inflamed tissue from the same patients ( $p$ <0.01). Interestingly, coculture of inflamed tissue with the *L casei* strain significantly reduced TNF- $\alpha$  release, and levels remained similar to those found in non-inflamed tissue. A similar effect was found in coculture experiments with *L bulgaricus*. However, *L crispatus* and the non-pathogenic *E coli* strain did not induce significant changes in TNF- $\alpha$  release by inflamed tissue compared with blank cultures. None of the bacterial strains tested induced changes in non-inflamed tissue from Crohn's disease patients. Likewise, release of TNF- $\alpha$  by ileal tissue from controls was similar in blanks (8 (2) pg/ml), *L casei* (10 (3)), *L bulgaricus* (6 (1.2)), *L crispatus* (6 (1)), and *E coli* (10 (3)).

The effect of bacteria on TNF- $\alpha$  release by inflamed ileal tissue from Crohn's disease patients was tested in the presence of protease inhibitors added to the incubation medium. As shown in table 2, *L casei* and *L bulgaricus* significantly reduced TNF- $\alpha$  levels in the presence of the protease inhibitor cocktail. These data suggest that the effect of the bacteria is not due to TNF- $\alpha$  degradation by bacterial proteases.

Table 3 shows release of TNF- $\alpha$  by inflamed ileal tissue from Crohn's disease patients in coculture experiments with either viable or dead bacteria. As previously observed, coculture of the tissue with both *L casei* and *L bulgaricus* significantly reduced release of TNF- $\alpha$ . A statistically significant effect was only observed when viable bacteria were added to the organ culture.

**Table 2** Effect of bacteria on tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) release by inflamed ileal tissue from Crohn's disease patients in the presence of protease inhibitors

	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
Blank	51 (6.4)
<i>L casei</i>	19 (1.7)**
<i>L bulgaricus</i>	26 (4.4)**

\*\* $p < 0.01$  versus blank.  
Data are mean (SEM) of six organ culture experiments per point. A mix of protease inhibitors was added to the incubation medium of blanks and bacterial cocultures.

**Table 3** Release of tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) by inflamed ileal mucosa from Crohn's disease patients in coculture experiments with either viable or heat killed bacteria

	TNF- $\alpha$ (pg/ml)
Blank	107 (28.9)
<i>L casei</i>	
Viable	8 (3.6)*
Heat killed	60 (9.6)†
<i>L bulgaricus</i>	
Viable	30 (9.3)*
Heat killed	50 (18.6)

\* $p < 0.05$  versus blank; † $p < 0.05$  versus viable bacteria.  
Data are mean (SEM) of 4–6 organ culture experiments per point.

### Phenotypic analysis of intestinal T lymphocytes

Table 4 shows cell counts in normal appearing mucosa from control individuals and in inflamed tissue from Crohn's disease patients after 24 hours of organ culture in the presence of bacteria. Incubation of inflamed tissue with *L casei* significantly decreased the number of CD3+ cells in the epithelial compartment, and also the proportion of CD4+ cells and TNF- $\alpha$  expression among CD3+ cells. Relative changes induced by bacteria in the phenotype of IEL in inflamed tissue from Crohn's disease patients compared with blank incubations are shown in fig 2. Coculture of inflamed tissue with *L casei* or *L bulgaricus* significantly reduced the rate of CD4+ cells. Moreover, TNF- $\alpha$  expression among CD3+ was significantly reduced in inflamed tissue incubated with *L casei* or *L bulgaricus*. Coculture of Crohn's disease tissue with *E coli* had no significant effect. On the other hand, none of the bacteria induced any change in IEL phenotype in intestinal samples from control individuals (table 4).

Phenotypic changes were also observed in LPL from Crohn's disease inflamed tissue. After coculture with *L casei* or *L bulgaricus*, expression of CD25 in CD3+ cells was significantly reduced (*L casei*: median 64% of blank, range 49–86,  $p < 0.05$ ; *L bulgaricus*: 77%, 39–98,  $p < 0.05$ ). Expression of TNF- $\alpha$  in CD3+ cells was also below levels observed in parallel blank cultures in all but one of the patients studied (*L casei*: 77%, 52–103; *L bulgaricus*: 96%, 94–106). No change was induced by coculture with *E coli*. None of the bacteria induced any change in the phenotype of LPL in samples from controls.

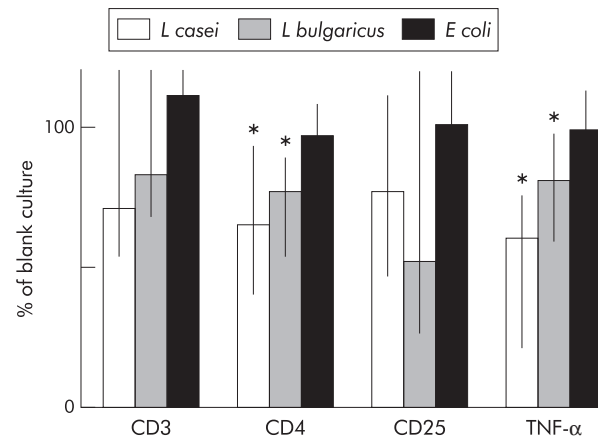
### DISCUSSION

Coculture of human ileal mucosa with bacteria resulted in adequate tissue viability, as shown by release of LDH from

**Table 4** Phenotypic analysis of intestinal intraepithelial T lymphocytes (IEL) after coculture with bacteria

	Control mucosa	Inflamed mucosa Crohn's disease
CD3 (% of cells)		
Blank	15 (3–17)	6 (2–13)
<i>L casei</i>	17 (2–21)	4 (1–7)*†
<i>L bulgaricus</i>	13 (3–17)	4 (1–10)†
<i>E coli</i>	16 (5–19)	6 (1–14)
CD4 (% of CD3)		
Blank	32 (15–69)	50 (31–61)
<i>L casei</i>	33 (14–53)	36 (18–63)*
<i>L bulgaricus</i>	29 (16–57)	40 (24–56)
<i>E coli</i>	29 (27–61)	39 (24–71)
TNF- $\alpha$ (% of CD3)		
Blank	3 (1–17)	49 (4–77)
<i>L casei</i>	3 (2–9)	23 (2–58)*†
<i>L bulgaricus</i>	3 (1–8)	35 (3–75)†
<i>E coli</i>	5 (3–18)	53 (3–73)

\* $p < 0.05$  versus blank; † $p < 0.05$  versus *E coli*.  
Data are median (range) (four control individuals and eight Crohn's disease patients).  
TNF- $\alpha$ , tumour necrosis factor  $\alpha$ .

**Figure 2** Phenotype of intraepithelial lymphocytes from inflamed mucosa of Crohn's disease patients normalised as a percentage of the data in blank cultures of mucosa from the same individual (100%). Coculture with *Lactobacillus casei* or *L bulgaricus* reduced CD4+ cell numbers, as well as expression of tumour necrosis factor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Coculture with *Escherichia coli* had no effect on CD3, CD4, CD25, or TNF- $\alpha$ . Data are median (range): \* $p < 0.05$  versus blank.

specimens in culture over the 24 hour period. Release rates were similar to those reported by Finnie and colleagues<sup>35</sup> using mucosal explants from normal human colon. It must be emphasised that no change in LDH release was induced by the presence of bacteria in the incubation medium, as shown in cocultures with both inflamed and non-inflamed mucosa. In contrast, we observed that bacteria added to the organ culture remained at stable concentrations during the incubation period and viable at the end of the experiment, in agreement with a previous report by other investigators who employed lactic acid bacteria in coculture with human epithelial cell lines.<sup>36</sup> Our estimates of bacterial concentration in the incubation medium by optical density were higher than recoveries of viable bacteria, as assessed by quantitative culture of the supernatants. The discrepancy may be due to either the presence of non-viable bacteria in the incubation medium or to impaired bacterial growth due to traces of penicillin in the samples plated for bacterial culture. Taken together, our data showed that both tissue and bacteria can be cultured together



with adequate viability. Thus our model provides a validated approach for examining interactions between luminal bacteria and the host mucosa using the mucosal interface and the immunocompetent cells in their own natural disposition.

The principal objective of the study was to determine whether certain bacterial strains could modulate spontaneous production of TNF- $\alpha$  by intestinal mucosal specimens from patients with Crohn's disease. Indeed, our results showed that in patients with active Crohn's disease there is increased release of TNF- $\alpha$  by inflamed as compared with non-inflamed ileal mucosa. This finding is in agreement with previous evidence that intestinal production of TNF- $\alpha$  is increased in patients with Crohn's disease, using different methodological approaches,<sup>4-8</sup> including organ culture of intestinal biopsy specimens.<sup>6</sup> Remarkably however when inflamed mucosa was incubated in the presence of *L casei* or *L bulgaricus* there was an impressive reduction in the release of TNF- $\alpha$ .

Our study is the first to report a modulating effect of bacteria on cytokine production by inflamed intestinal mucosa, a finding that we consider of great potential significance. *L casei* and *L bulgaricus* markedly reduced production of TNF- $\alpha$  by inflamed mucosa whereas *L crispatus* and *E coli* had no significant effect. The non-pathogenic *E coli* strain actually increased release of the cytokine in some patients, an observation consistent with the lack of tolerance towards common bacterial antigens that has been described in Crohn's disease<sup>19-20</sup> but the overall effect did not reach statistical significance. The effect of *L casei* and *L bulgaricus* was only observed in cocultures with inflamed mucosa as no change in TNF- $\alpha$  release was found in experiments with non-inflamed Crohn's disease and control mucosa. Interestingly, viable bacteria induced the full effect on TNF- $\alpha$  production whereas heat killed bacteria did not induce statistically significant changes. An effect due to bacteria cell fragments cannot be excluded but our current data suggest that products freshly derived from viable bacteria play a major role on modulation of TNF- $\alpha$  production by inflamed intestinal tissue. Previous in vitro studies with several *Lactobacillus* species including *L bulgaricus* suggested that lactobacilli stimulate the release of TNF- $\alpha$  and IL-6 by macrophages<sup>37</sup> and activate nuclear factor  $\kappa$ B in human leucocytes<sup>38</sup> when bacteria are directly exposed to effector cells. However, oral administration of the strains did not induce changes in ex vivo TNF- $\alpha$  production by cultured leucocytes isolated from mice fed lactobacilli.<sup>39</sup> Taken together, these observations suggest that responses of immunocompetent cells towards interacting bacteria may differ whether the interaction takes place at the mucosal surface or at a systemic level, but this concept has not been demonstrated.

The reduction in TNF- $\alpha$  levels in the incubation medium when inflamed mucosa was cultured with lactobacilli could not be explained by enhanced degradation of TNF- $\alpha$  due to proteases of bacterial origin as bacteria reduced TNF- $\alpha$  levels even in the presence of protease inhibitors. Thus ancillary experiments examined the effector immunocompetent cells within the cultured intestinal mucosa, namely the mucosal lymphocyte populations. In inflamed mucosa from patients with Crohn's disease, increased expression of relevant markers of T lymphocyte activation such as CD25 and TNF- $\alpha$  has been demonstrated in previous investigations.<sup>40-43</sup> Interestingly, coculture of inflamed tissue with *L casei* or *L bulgaricus* significantly reduced the number of CD4+ cells among IEL. Moreover, the number of IEL producing TNF- $\alpha$  was also reduced by coculture of the tissue with *L casei* or *L bulgaricus*. Finally, LPL of inflamed tissues incubated with either bacterial strain showed a reduced display of the CD25 marker. These results suggest that cross talk between bacteria and mucosal cells does exist, and that certain bacteria downregulate the degree of activation of intestinal lymphocytes. It should be emphasised that the anti-inflammatory effect was only recognised in a setting of high immunoinflammatory activity, as is the case with tissue from active Crohn's disease, but not in non-inflamed control tissue.

In summary, in the present study we have established that certain probiotic bacteria are capable of interacting with immunocompetent cells using the mucosal interface and thus can modulate locally the production of proinflammatory cytokines by inflamed tissue. Our findings provide a basis for future clinical trials of probiotic bacteria in the treatment of active Crohn's disease.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Dr Marta P Llopis contributed to this work with considerable participation in the microbiological studies. *Lactobacillus casei* DN114001 and *Lactobacillus bulgaricus* LB10 were kindly provided by Dr Puri Relano (Danone Vitapole, Paris, France). *Lactobacillus crispatus* was kindly provided by Dr Antonia Andreu (Microbiology, Hospital Vall d'Hebron), and the *E coli* strain was provided by Professor Juan Aguilar (Biochemistry, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona). The authors are grateful to Montserrat Casellas and Milagros Gallart for their expert technical assistance. The project was supported by a grant from Danone Vitapole (Paris, France) and by Generalitat de Catalunya (RE: 2000SGR 00123).

## Authors' affiliations

**N Borruel, M Carol, F Casellas, M Antolín, F Guarner, J R Malagelada,** Digestive System Research Unit, Hospitals Vall d'Hebron, Autonomous University, Barcelona, Spain  
**F de Lara, E Espín, J Naval,** Department of Surgery, Hospitals Vall d'Hebron, Autonomous University, Barcelona, Spain

## REFERENCES

- Podolsky DK. Inflammatory Bowel Disease. *N Engl J Med* 1991;**325**:928-37.
- Van Deventer SJ. Tumour necrosis factor and Crohn's disease. *Gut* 1997;**40**:443-8.
- Targan SR. Biology of inflammation in Crohn's disease: Mechanisms of action of anti-TNF- $\alpha$  therapy. *Can J Gastroenterol* 2000;**14**(suppl C):13-6C.
- Reinecker HC, Steffen M, Witthoef T, et al. Enhanced secretion of tumour necrosis factor- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993;**94**:174-81.
- Breese EJ, Michie CA, Nicholis SW, et al. Tumour necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1994;**106**:1455-66.
- Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S, et al. Increased production of tumour necrosis factor- $\alpha$ , interleukin-1 $\beta$ , and interleukin-6 by morphologically normal intestinal biopsies from patients with Crohn's disease. *Gut* 1996;**39**:684-9.
- Dionne S, Hiscott J, D'Agata I, et al. Quantitative PCR analysis of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA levels in pediatric IBD mucosal biopsies. *Dig Dis Sci* 1997;**42**:1557-66.
- Woywodt A, Ludwig D, Neustock P, et al. Mucosal cytokine expression, cellular markers and adhesion molecules in inflammatory bowel disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999;**11**:267-76.
- Stack WA, Mann SD, Roy AJ, et al. Randomised controlled trial of CDP571 antibody to tumour necrosis factor- $\alpha$  in Crohn's disease. *Lancet* 1997;**349**:521-4.
- Targan SR, Hanauer SB, van Deventer SJ, et al. A short-term study of chimeric monoclonal antibody cA2 to tumor necrosis factor- $\alpha$  for Crohn's disease. Crohn's Disease cA2 Study Group. *N Engl J Med* 1997;**337**:1029-35.
- Baert FJ, D'Haens GR, Peeters M, et al. Tumour necrosis factor alpha antibody (infliximab) therapy profoundly down-regulates the inflammation in Crohn's ileocolitis. *Gastroenterology* 1999;**116**:22-8.
- D'Haens G, Van Deventer S, Van Hogezaand R, et al. Endoscopic and histological healing with infliximab anti-tumour necrosis factor antibodies in Crohn's disease: A European Multicenter Trial. *Gastroenterology* 1999;**116**:1029-34.
- Rutgeerts P, D'Haens G, Targan S, et al. Efficacy and safety of retreatment with anti-tumour necrosis factor antibody (infliximab) to maintain remission in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1999;**117**:761-9.
- Ricart E, Panaccione R, Loftus EV, et al. Successful management of Crohn's disease of the ileoanal pouch with infliximab. *Gastroenterology* 1999;**117**:429-32.
- Nikolaus S, Raedler A, Kuhbacker T, et al. Mechanisms in failure of infliximab for Crohn's disease. *Lancet* 2000;**356**:1475-9.
- Plevy SE, Landers CJ, Prehn J, et al. A role for TNF-alpha and mucosal T helper-1 cytokines in the pathogenesis of Crohn's disease. *J Immunol* 1997;**159**:6276-82.
- Ina K, Itoh J, Fukushima K, et al. Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance. *J Immunol* 1999;**163**:1081-90.
- Fiocchi C. Inflammatory bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;**115**:182-206.

- 19 **Pirzer U**, Schönhaar A, Fleischer B, *et al*. Reactivity of infiltrating T lymphocytes with microbial antigens in Crohn's disease. *Lancet* 1991;**338**:1238-9.
- 20 **Macpherson A**, Khoo UY, Forgacs I, *et al*. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 1996;**38**:365-75.
- 21 **Videla S**, Vilaseca J, Guarner F, *et al*. Role of intestinal microflora in chronic inflammation and ulceration of the rat colon. *Gut* 1994;**35**:1090-7.
- 22 **García-Lafuente A**, Antolín M, Guarner F, *et al*. Incrimination of anaerobic bacteria in the induction of experimental colitis. *Am J Physiol* 1997;**272**:G10-15.
- 23 **Mourelle M**, Salas A, Guarner F, *et al*. Stimulation of transforming growth factor- $\beta$ 1 by enteric bacteria in the pathogenesis of rat intestinal fibrosis. *Gastroenterology* 1998;**114**:519-26.
- 24 **Kühn R**, Löhler J, Rennick D, *et al*. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;**75**:263-74.
- 25 **Madsen KL**, Doyle JS, Jewell LD, *et al*. Lactobacillus species prevents colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 1999;**116**:1107-14.
- 26 **Umesaki Y**, Setoyama H, Matsumoto S, *et al*. Expansion of alpha beta T-cell receptor-bearing intestinal intraepithelial lymphocytes after microbial colonization in germ-free mice and its independence from thymus. *Immunology* 1993;**79**:32-7.
- 27 **Helgeland L**, Vaage JT, Rolstad B, *et al*. Microbial colonization influences composition and T-cell receptor V beta repertoire of intraepithelial lymphocytes in rat intestine. *Immunology* 1996;**89**:494-501.
- 28 **Haller D**, Bode C, Hammes WP, *et al*. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 2000;**47**:79-87.
- 29 **Guerin-Danan C**, Chabanet C, Pedone C, *et al*. Milk fermented with yogurt cultures and Lactobacillus casei compared with yogurt and gelled milk: influence on intestinal microflora in healthy infants. *Am J Clin Nutr* 1998;**67**:111-17.
- 30 **Pedone CA**, Bernabeu AO, Postaire ER, *et al*. The effect of supplementation with milk fermented by Lactobacillus casei (strain DN-114 001) on acute diarrhoea in children attending day care centres. *Int J Clin Pract* 1999;**53**:179-84.
- 31 **Osset J**, Bartolome RM, Garcia E, *et al*. Assessment of the capacity of Lactobacillus to inhibit the growth of uropathogens and block their adhesion to vaginal epithelial cells. *J Infect Dis* 2001;**183**:485-91.
- 32 **Ochman H**, Selander RK. Standard reference strains of Escherichia coli from natural populations. *J Bacteriol* 1984;**154**:690-3.
- 33 **Carol M**, Lambrechts A, Van Gossum A, *et al*. Spontaneous secretion of interferon  $\gamma$  and interleukin 4 by human intraepithelial and lamina propria gut lymphocytes. *Gut* 1998;**42**:643-9.
- 34 **Krieg AF**, Gorton S, Henry JB. Effect of temperature on activity and lactate optima of LDH isoenzymes. *Clin Chim Acta* 1967;**17**:363-6.
- 35 **Finnie IA**, Dwarakanath AD, Taylor BA, *et al*. Colonic mucin synthesis is increased by sodium butyrate. *Gut* 1995;**36**:93-9.
- 36 **Baricault L**, Denariatz G, Houiri JJ, *et al*. Use of HT-29, a cultured human colon cancer cell line, to study the effect of fermented milks on colon cancer cell growth and differentiation. *Carcinogenesis* 1995;**16**:245-52.
- 37 **Marin ML**, Tejada-Simon MV, Lee JH, *et al*. Stimulation of cytokine production in clonal macrophage and T-cell models by Streptococcus thermophilus: comparison with Bifidobacterium sp. and Lactobacillus bulgaricus. *J Food Prot* 1998;**61**:859-64.
- 38 **Miettinen M**, Lehtonen A, Julkunen I, *et al*. Lactobacilli and streptococci activate NF- $\kappa$ B and STAT signaling pathways in human macrophages. *J Immunol* 2000;**164**:3733-40.
- 39 **Tejada-Simon MV**, Ustunol Z, Pestka JJ. Ex vivo effects of lactobacilli, streptococci, and bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model. *J Food Prot* 1999;**62**:162-9.
- 40 **Pallone F**, Fais S, Squarcia O, *et al*. Activation of peripheral blood and intestinal lamina propria lymphocytes in Crohn's disease. In vivo state of activation and in vitro response to stimulation as defined by the expression of early activation antigens. *Gut* 1987;**28**:745-53.
- 41 **Choy MY**, Walker-Smith JA, Williams CB, *et al*. Differential expression of CD25 (interleukin-2 receptor) on lamina propria T cells and macrophages in the intestinal lesions in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut* 1990;**31**:1365-70.
- 42 **Schreiber S**, MacDermott RP, Raedler A, *et al*. Increased activation of isolated intestinal lamina propria mono-nuclear cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991;**101**:1020-30.
- 43 **Mariani P**, Bacheloni A, D'Alessandro M, *et al*. Effector Th-1 cells with cytotoxic function in the intestinal lamina propria of patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;**45**:2029-35.

## DISCUSION

Nuestros estudios han investigado el efecto de diferentes bacterias no patógenas sobre la producción espontánea de citoquinas por la mucosa intestinal normal e inflamada, usando un método de co-cultivo por un periodo de 24 horas. Usamos explantes de mucosa extraídos en fresco de piezas de resección quirúrgica ya que, con este modelo, la estructura del epitelio y su relación con las células inmunocompetentes se mantiene en su natural disposición. La viabilidad del tejido, tanto de colon e ileon normal como de ileon inflamado por enfermedad de Crohn se mantuvo a lo largo de todo el estudio y no se alteró por la presencia de las bacterias en el medio de cultivo. Además, las bacterias añadidas al medio permanecen a concentraciones estables durante el periodo de incubación y viables al final del experimento. En nuestro modelo, en contraste con otros modelos publicados como los que utilizan células epiteliales aisladas, los explantes de mucosa secretan espontáneamente cantidades medibles de citoquinas lo que permite su modulación.

Los resultados demuestran que determinadas bacterias no patógenas pueden modificar la liberación de citoquinas por la mucosa intestinal y que cada cepa bacteriana induce un patrón diferente de producción de citoquinas.

Así, la *E.coli* no patógena ECOR-26 estimula la liberación de  $\text{TNF}\alpha$ , IL-8 e IL-10, esta última mediante un mecanismo  $\text{TNF}\alpha$  -independiente, con un patrón similar al producido por otras cepas de *E.coli* patógenas y no-patógenas en otros modelos de co-cultivo. Diversos estudios han demostrado que este efecto estimulador de la producción de citoquinas por algunas bacterias depende del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$  B, que activa la transcripción de genes que codifican citoquinas y moléculas proinflamatorias (Jobin 2000, Haller 2000,

Haller 2002). La activación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$  B se realiza a través de señales transmembrana que se originan mediante la unión de componentes bacterianos a receptores específicos de la membrana externa celular como los Toll-like receptors. Los TLR que expresan las células epiteliales reconocen componentes específicos de los microorganismos, como el LPS de las bacterias Gram negativas, y su activación constituye el mecanismo inicial principal en la respuesta inmune innata a los microorganismos patógenos. Nuestros estudios sugieren que la mucosa intestinal pone en marcha la vía innata de la inmunidad no sólo ante bacterias patógenas sino ante determinadas bacterias no patógenas. Esta reacción ante las bacterias no patógenas puede ser particularmente dañina en situaciones concretas en las que ya existe un grado de inflamación como en la enfermedad inflamatoria intestinal. En los experimentos con mucosa de pacientes con enfermedad de Crohn activa, la liberación de TNF $\alpha$  por la mucosa inflamada está aumentada si se compara con la mucosa macroscópicamente no inflamada o con la mucosa ileal de pacientes control. Estos hallazgos son consistentes con evidencias previas extraídas de diferentes estudios y utilizando diversas metodologías que señalan que en la enfermedad de Crohn la producción intestinal de TNF $\alpha$  está aumentada. En esta situación, la cepa de *E.coli* no patógena inducía un aumento en la producción de TNF $\alpha$ , lo que sugiere que en la enfermedad inflamatoria intestinal, la estimulación de los TLR por las bacterias de la flora comensal pueden exacerbar la inflamación preexistente de la mucosa. Por el contrario, la incubación del tejido con *L.casei* DN-114 001 reduce de manera muy marcada la liberación espontánea de TNF $\alpha$  e IL-8 tanto en la

mucosa colónica normal como en la mucosa ileal inflamada por enfermedad de Crohn, siendo el efecto sobre la IL-8, TNF $\alpha$ -independiente tal como se demuestra con los experimentos realizados con anticuerpo neutralizante anti-TNF $\alpha$ . El estudio del fenotipo de los linfocitos de la mucosa mediante citometría de flujo demostró un aumento en la expresión de marcadores de activación linfocitaria, TNF $\alpha$  y CD25, en la mucosa inflamada por enfermedad de Crohn. La incubación del tejido inflamado con *L.casei* DN-114 001 y también con *L.bulgaricus* inducía una disminución del número de linfocitos CD3<sup>+</sup> del compartimento intraepitelial, de la proporción de células CD4<sup>+</sup> y de las que expresaban TNF $\alpha$ , es decir, de los linfocitos activados. Además, estos cambios fenotípicos también se observaban en los linfocitos de lámina propia (disminución de la expresión de CD25 y TNF $\alpha$ ) lo que sugiere que las señales generadas en el epitelio alcanzan la mucosa subyacente y provocan cambios en el estado de activación de las células inmunocompetentes. Estos resultados demuestran que existe un diálogo entre las bacterias y las células de la mucosa y que algunas bacterias pueden desactivar los linfocitos intestinales ejerciendo un efecto antiinflamatorio, efecto patente en las muestras con una gran actividad inflamatoria basal y no en el tejido control no inflamado. La desactivación de los linfocitos intestinales podría explicar el efecto del *L.casei* DN-114 001 en los estudios de combinación con *E.coli* en los que antagoniza y previene el efecto proinflamatorio de la *E.coli* inhibiendo la liberación de TNF cuando las muestras de mucosa son cultivadas con ambas bacterias. Por otra parte, para que dicho efecto antiinflamatorio se lleve a cabo es necesaria la presencia de las bacterias vivas en el cultivo ya que la inhibición de la liberación

de TNF $\alpha$  no se produce cuando se añaden al cultivo bacterias muertas mediante calor.

Posteriormente a la publicación de nuestras investigaciones, varios estudios han confirmado que determinadas cepas de bacterias no patógenas pueden tener un efecto modulador de la respuesta inmune innata a nivel de la mucosa intestinal. Así, el *Bacteroides thetaiotaomicron*, bacteria comensal anaerobia de la flora intestinal humana, ha demostrado ejercer un efecto antiinflamatorio mediante la inhibición de la activación del factor de transcripción NF- $\kappa$ B en células epiteliales (Kelly 2004). Durante el último año algunos investigadores han apuntado la posibilidad de que el DNA bacteriano sea el responsable de parte de los efectos inmunomoduladores de los probióticos y que no sea necesaria la presencia de los microorganismos vivos para ser efectivos. En un estudio con voluntarios sanos, la exposición de células mononucleares de sangre periférica al DNA de una cepa de *Bifidobacterium* inducía la secreción de la citoquina antiinflamatoria IL-10. Además, el DNA total extraído de las heces recogidas tras la ingestión del probiótico inducía, también en las células mononucleares, una reducción de la IL-1 $\beta$  y un aumento de la IL-10 (Lammers 2003). En el modelo animal de colitis por DDS (Rachmilewitz 2004), el tratamiento de los animales con el DNA de la mezcla probiótica VSL#3 atenúa la severidad de la colitis. La hipótesis de los autores es que la actividad antiinflamatoria de los probióticos es consecuencia de la estimulación de la inmunidad innata por ciertas secuencias del DNA bacteriano, llamadas DNA inmunoestimulador (ISS-DNA ó CpG-DNA) a través de un receptor específico, en este caso el Toll-like receptor 9 (TLR9). Sin embargo, este efecto

demostrado con el DNA de la mezcla de probióticos VSL#3 no parece específico ya que los mismos autores lo habían descrito ya tanto con un análogo sintético del DNA inmunoestimulador como con el DNA de una cepa de *Escherichia coli* (Rachmilewitz 2002). Además, el efecto antiinflamatorio observado en la colitis experimental, sólo aparece cuando el DNA se administra previamente a la inducción de la misma. Por el contrario, si el DNA se administra tras la instauración de la colitis, se produce un empeoramiento de la enfermedad y un incremento muy importante de la liberación de citoquinas proinflamatorias (Obermeier 2003). Otro estudio utilizando también el DNA de la mezcla probiótica VSL#3 en monocapas de células epiteliales, segmento de colon aislado y en el modelo de colitis en ratones deficientes en IL-10 demuestra que el epitelio responde de manera diferente ante las distintas especies bacterianas y plantea la posibilidad de que existan receptores en la célula epitelial, diferentes del TLR9, responsables de esta respuesta discriminativa frente al DNA de las distintas bacterias (Jijon 2004). No todos los investigadores comparten la teoría del DNA como responsable de los efectos inmunomoduladores y algunos autores relevantes en el área de los probióticos plantean problemas metodológicos y de interpretación en los estudios reseñados anteriormente como inconsistencias en aspectos del modelo animal de colitis o falta de especificidad de una mezcla de probióticos de la que se desconoce su composición exacta (Reid 2004). Nuestros estudios demuestran también la existencia de diferentes perfiles, pro y anti-inflamatorios, inducidos por bacterias no patógenas, pero, al contrario que en los estudios con DNA, el efecto inmunomodulador necesita la presencia de las bacterias viables en el



cultivo. Estudios con otras bacterias como el *Lactobacillus reuteri* demuestran también que es necesario que las bacterias estén vivas para que ejerzan su efecto antiinflamatorio (Ma 2004).

Otra posibilidad factible es que el efecto inmunomodulador de los probióticos dependa de otros factores como de la secreción de algún metabolito producido por las bacterias. Así, el medio condicionado de *Lactobacillus rhamnosus* GG inhibe la producción de TNF $\alpha$  inducida por LPS en macrófagos murinos (Pena 2003). Igualmente, en un estudio con células mononucleares de sangre periférica, el medio condicionado de dos probióticos (*Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterium breve*) era capaz de inhibir la secreción de TNF $\alpha$  inducida por LPS. Los autores de este último estudio determinaron además que el metabolito responsable de este efecto era capaz de atravesar la barrera intestinal, ser resistente a los enzimas digestivos y poseía un tamaño de <3000 Da (Menard 2004). De la misma manera, en un estudio en células epiteliales aisladas, el medio condicionado de la mezcla probiótica VSL#3 induce un efecto antiinflamatorio y citoprotector mediante la inhibición del proteasoma, que secundariamente inhibe el factor de transcripción NF- $\kappa$ B y estimula la producción de "heat shock proteins" (Petrov 2004).

En cuanto al resto de las bacterias utilizadas, los experimentos realizados con *L.casei* DN114 056 mostraban una reducción en la liberación de TNF $\alpha$  similar a la producida por *L.casei* DN114 001, ningún cambio en la IL-8 y un aumento TNF $\alpha$ -independiente de la IL-10. Por su parte, *L.casei* ATCC-334 sólo redujo la liberación de TNF $\alpha$  sin cambios en el resto de citoquinas. *L.bulgaricus* no produjo cambios en la secreción de citoquinas en el colon normal pero sí una

importante inhibición de  $\text{TNF}\alpha$  en la mucosa ileal inflamada por enfermedad de Crohn y, como ya he comentado previamente, cambios fenotípicos en los linfocitos intraepiteliales y de lámina propia.

Por último, *L.crispatus* no indujo ningún cambio en la secreción de  $\text{TNF}\alpha$  en la mucosa de paciente con enfermedad de Crohn.

Nuestros estudios sugieren, por una parte, que cada cepa bacteriana induce un patrón de respuesta diferente en la producción de citoquinas por la mucosa intestinal, probablemente mediante la interacción con los mecanismos innatos de defensa inmune. Por otra parte, algunas cepas bacterianas pueden modular la producción de citoquinas proinflamatorias por el tejido intestinal inflamado ejerciendo un efecto antiinflamatorio.

Según las investigaciones más recientes, el punto clave en la toma de la decisión sobre qué tipo de respuesta inmune, proinflamatoria o reguladora-antiinflamatoria, se activará ante una determinada bacteria es la célula presentadora de antígeno. En el contexto del sistema inmune intestinal, la célula presentadora de antígeno más importante es la célula dendrítica que puede, bien activar al linfocito T naïve para la generación de linfocitos efectores o, por el contrario, inducir mecanismos reguladores para mantener la situación de no-respuesta (Stagg 2004). Los mecanismos reguladores dependen de la supresión activa de la respuesta inmune mediante las células T reguladoras que pueden ser del tipo Tr1, Th3 y  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$  y que interactúan con la célula dendrítica ante la exposición del antígeno liberando las citoquinas antiinflamatorias IL-10,  $\text{TGF}\beta$  etc...(Allez 2004). Las células dendríticas expresan en su superficie receptores como los TLR y responden de manera

diferente según la naturaleza del estímulo. Por este motivo, es factible que pudiera modificarse la función de las células dendríticas mediante bacterias probióticas y utilizarlas en condiciones patológicas como la enfermedad inflamatoria intestinal. Ciertos probióticos, como la mezcla VSL#3 modulan el fenotipo y la liberación de citoquinas por células dendríticas derivadas de médula ósea (Drakes 2004). En células dendríticas de lámina propia intestinal humana, ciertas bifidobacterias inducen la producción de IL-10, disminuyen la expresión de moléculas coestimuladoras e inhiben la producción de IFN $\gamma$  por las células T(Hart 2004).

El conocimiento profundo de los mecanismos por los que las bacterias no patógenas, y en concreto los probióticos, interactúan con el sistema inmune intestinal y sus sistemas de regulación permitirá la aplicación más refinada de estas bacterias en patologías con una disregulación inmune como la enfermedad inflamatoria intestinal.

## CONCLUSIONES

- Las bacterias no patógenas interactúan con la mucosa colónica normal e inducen cambios en la secreción de citoquinas.
- Los cambios inducidos por diferentes bacterias no patógenas en la secreción de citoquinas por la mucosa colónica normal son cepa-específicos. Así:
  - *Lactobacillus casei* DN 114 001 induce una disminución de la liberación de TNF $\alpha$  e IL-8.
  - *Lactobacillus casei* DN 114 056 induce una disminución de la liberación de TNF $\alpha$ , ningún cambio en la liberación de IL-8 y una estimulación TNF $\alpha$ -independiente de la IL-10.
  - *Lactobacillus casei* ATCC 334 induce una disminución de la liberación de TNF $\alpha$  sin cambios en el resto de citoquinas.
  - *Lactobacillus bulgaricus* LB10 no induce cambios en la liberación de citoquinas
  - *Escherichia coli* ECOR-26 induce un incremento en la liberación de TNF $\alpha$  y un estímulo de la liberación de IL-10 TNF $\alpha$ -independiente.
- La mucosa ileal inflamada de pacientes con enfermedad de Crohn presenta una producción aumentada de TNF $\alpha$  cuando se compara con ileon normal o no inflamado.
- *Lactobacillus casei* DN 114 001 y *Lactobacillus bulgaricus* LB10 inducen un potente efecto antiinflamatorio en la mucosa ileal inflamada mediante la inhibición de la liberación de TNF $\alpha$ .
- *Lactobacillus casei* DN 114 001 y *Lactobacillus bulgaricus* LB10

producen una inhibición de la liberación de TNF  $\alpha$  sólo cuando las bacterias están viables y no cuando están muertas por calor.

- La incubación de la mucosa ileal inflamada con *L.casei* DN114 001 y *L. bulgaricus* LB10 induce una disminución del número de linfocitos intraepiteliales y de la proporción de linfocitos activados tanto en el compartimiento intraepitelial como en la lámina propia.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Abreu MT, Arnold ET, Thomas LS, Gonsky R, Zhou Y, Hu B, Ardit M. TLR4 and MD2 expression are regulated by immune-mediated signals in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 2002;227:20431-20437.
2. Abreu MT, Vora P, Faure E, Thomas LS, Arnold ET, Arditi M. Decreased expression of Toll-like receptor-4 and MD-2 correlates with intestinal epithelial cell protection against dysregulated proinflammatory gene expression in response to bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol* 2001;167:1609-1616.
3. Aderem A, Ulevitch RJ. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000;406:782-787.
4. Ahmad T, Armuzzi A, Bunce M, Mulcahy-Hawes K, Marshall SE, Orchard TR et al. The molecular classification of the clinical manifestations of Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;122:854-866.
5. Allen S, Okoko B, Martinez E, Gregorio G, Dans L. Probiotics for treating infectious diarrhoea. *Cochrane Database Syst Rev* 2004;2:CD003048.
6. Allez M, Mayer L. Regulatory T cells :peace keepers in the gut. *Inflammatory bowel diseases* 2004;10:666-676.
7. Anderson AD, Mc Naught CE; Jain PK, MacFie J. Randomised clinical trial of synbiotic therapy in elective surgical patients. *Gut* 2004;53:241-245.
8. Armuzzi A, Ahmad T, Ling KL, de Silva A, Cullen S, van Heel D, Orchard TR, Welsh KI, Marshall SE, Jewell DP. Genotype-phenotype analysis of the Crohn's disease susceptibility haplotype on chromosome 5q31. *Gut* 2003;52:1133-1139.



9. Arunachalam K, Gill HS, Chandra RK. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* HN019. *Eur J Clin Nutr* 2000;54:263-267.
10. Arvola T, Isolauri E, Rantala I, Kaila M, Majamaa H, Virtanen E, Arvilommi H. Increased in vitro intestinal permeability in suckling rats exposed to cow milk during lactation. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993;16:294-300.
11. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, Schutz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schurmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in Crohn's disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med* 2000;6:583-588.
12. Boirivant M, Pica R, DeMaria R, Testi R, Pallone F, Strober W. Stimulated human lamina propria T cells manifest enhanced Fas-mediated apoptosis. *J Clin Invest* 1996;98:2616-2622.
13. Boirivant M, Marini M, Di Felice G, Pronio AM, Montesani C, Tersigni R, Strober W. Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis. *Gastroenterology* 1999;116:557-565.
14. Borgaonkar MR, MacIntosh DG, Fardy JM. A meta-analysis of antimycobacterial therapy for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2000;95:725-729.

15. Boudeau J, Glasser AL, Masseret E, Joly B, Darfeuille-Michaud A. Invasive ability of an *Escherichia coli* strain isolated from the ileal mucosa of a patient with Crohn's disease. *Infect Immun.* 1999;67:4499-509.
16. Braun J. Unsettling facts of life: bacterial commensalism, epithelial adherence and inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:228-229.
17. Brullet E, Bonfill X, Urrutia G, Ruiz Ochoa V, Cueto M, Clofent J, Martinez Salmeron JF, Riera J, Obrador A. Epidemiological study on the incidence of inflammatory bowel disease in 4 Spanish areas. Spanish Group on the Epidemiological Study of Inflammatory Bowel Disease. *Med Clin* 1998 ;110(17):651-6.
18. Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P, Rhodes G, Pickup R, Hermon-Taylor J. Detection and verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in fresh ileocolonic mucosal biopsy specimens from individuals with and without Crohn's disease. *J Clin Microbiol* 2003;41:2915-2923.
19. Burke DA, Axon AT, Clayden SA, Dixon MF, Johnston D, Lacey RW. The efficacy of tobramycin in the treatment of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1990;4:123-129.
20. Butler JE, Sun J, Weber P, Navarro P, Francis D. Antibody repertoire development in fetal and newborn piglets, III. Colonization of the gastrointestinal tract selectively diversifies the preimmune repertoire in mucosal lymphoid tissues. *Immunology.* 2000 May;100:119-30.

21. Campieri M, Gionchetti P. Bacteria as the cause of ulcerative colitis. *Gut* 2001;48:132-135.
22. Card T, Logan RF, Rodrigues LC, Wheeler JG. Antibiotic use and the development of Crohn's disease. *Gut* 2004;53:246-250.
23. Cario E, Podolsky DK. Differential alteration in intestinal epithelial cell expression of toll-like receptor 3 and TLR4 in inflammatory bowel disease. *Infect Immun* 2000;68:7010-7017.
24. Casellas F, Borrueal N, Papo M, Guarner F, Antolin M, Videla S, Malagelada JR. Antiinflammatory effects of enterically coated amoxicillin-clavulanic acid in active ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 1998;4:1-5.
25. Cebra JJ, Periwal SB, Lee G, Lee F, Shroff KE. Development and maintenance of the gut-associated lymphoid tissue (GALT): the roles of enteric bacteria and viruses. *Dev Immunol.* 1998;6(1-2):13-8.
26. Chapman RW, Selby WS, Jewell DP. Controlled trial of intravenous metronidazole as adjunct to corticoids in severe ulcerative colitis. *Gut* 1986;27:1210-1212.
27. Chen T, Isomaki P, Rimpilainen M, Toivanen P. Human cytokine responses by gram-positive cell walls of normal intestinal microbiota. *Clin Exp Immunol* 1999;118:261-267.
28. Chiang BL, Sheih YH, Wang LH, Liao CK, Gill HS. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. *Eur J Clin Nutr.* 2000;54(11):849-55.

29. Chiodini RJ, Kruiningen HJV, Thayer WR, Merkal RS, Coutu JA. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. I. An unclassified mycobacterium species isolated from patients with Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1984;29:1073-1079.
30. Colombel JF, Lemman M, Cassagnou M, Bouhnik Y, Duclos B, Dupas JL, Nottenghem B, Mary JY. A controlled trial comparing ciprofloxacin with mesalazine for the treatment of active Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94:674-678.
31. Colombel J-F, Cortot A, van Kruiningen HJ. Antibiotics in Crohn's disease. *Gut* 2001;48:647.
32. Cremonini F, Di Caro S, Nista EC, Bartolozzi F, Capelli G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Meta-analysis: the effect of probiotic administration on antibiotic associated diarrhoea. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16:1461-1467.
33. Cross ML. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2002;34:245-253.
34. Cruickhank SM, Mc Vay LD, Baumgart DC, Felsburg PJ and Carding SR. Colonic epithelial cell mediated suppression of CD4T cell activation. *Gut* 2004;53:678-684.
35. Cummings JH, Antoine JM, Azpiroz F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Calder PC, Gibson GR, Guarner F, Isolauri E, Pannemans D, Shortt C, Tuitjelaars S, Watzl B. PASSCLAIM. Gut health and immunity. *European Journal of Nutrition* 2004(Suppl 2)43:118-173.

36. Cuthbert AP, Fisher SA, Mirza MM, King K, Hampe J, Croucher PJP et al. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:867-874.
37. D'Haens G, Geboes K, Peeters M, Baert F, Penninckx F, Rutgeerts P. Early lesions caused by infusion of intestinal contents in excluded ileum in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;114:262-267.
38. D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ* 2002;324:1361-1364.
39. Darfeuille-Michaud A, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P, Gambiez L, Joly B, Cortot A, Colombel JF. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998;115:1405-1413.
40. Darfeuille-Michaud A, Boudeau J, Bulois P, Neut C, Glasser AL, Barnich N, Bringer M, Swidsinski A, Beaugerie L, Colombel JF. High prevalence of adherent-invasive *E. coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2004;412-421.
41. Dickinson RJ, O'Connor HJ, Pinder I, Hamilton I, Johnston D, Axon AT. Double blind controlled trial of oral vancomycin as adjunctive treatment in acute exacerbations of idiopathic colitis. *Gut* 1985;26:1380-1384.
42. Dieleman LA, Goerres MS, Arends A, Sprengers D, Torrice C, Hoentjen F, Grenther WB, Sartor RB. Lactobacillus GG prevents recurrence of colitis in HLA-B27 transgenic rats after antibiotic treatment. *Gut* 2003;52:370-376.

43. Donnet-Hughes A, Rochat F, Serrant P, Aeschlimann JM, Schiffrin EJ. Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J Dairy Sci* 1999;82:863-869.
44. Drakes M, Blanchard T, Czinn S. Bacterial probiotic modulation of dendritic cells. *Infection and Immunity* 2004;72:3299-3309.
45. Duchmann R, Kaiser I, Hermann E, Mayet W, Ewe K, Meyer zum Buschenfelde KH. Tolerance exists towards resident intestinal flora but is broken in active inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 1995;102:448-455.
46. Duchmann R, Schmitt E, Knolle P, Meyer zum Buschenfelde KH, Neurath M. Tolerance towards resident intestinal flora in mice is abrogated in experimental colitis and restored by treatment with interleukin-10 or antibodies to interleukin -12. *Eur J Immunol* 1996;26: 934-938.
47. Ehrhardt RO, Ludviksson BR, Gray B, Neurath M, Strober W. Induction and prevention of colonic inflammation in IL-2-deficient mice. *J Immunol* 1997;158:566-573.
48. Ekbohm A, Wakefield AJ, Zack M, Adami HO. Perinatal measles infection and subsequent crohn's disease. *Lancet* 1994;334:508-510.
49. Elson OC, Cong Y, Iqbal N, Weaver CT. Immuno-bacterial homeostasis in the gut: new insights into an old enigma. *Semin Immunol* 2001;13(S):187-194.
50. Elson CO. Genes, microbes, and T cells-new therapeutic targets in Crohn's disease. *N Eng J Med* 2002;346:614-616.

51. Fabia R, Ar'Rajab A, Johanssib ML, Willen R, Andersson R. The effect of exogenous administration of *Lactobacillus reuteri* R2LC and oat fiber on acetic-acid induced colitis in the rat. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:155-162.
52. Fagarasan S, Kinoshita K, Muramatsu M, Ikuta K, Honjo T. In situ class switching and differentiation to Ig-A producing cells in the gut lamina propria. *Nature* 2001;413:639-643.
53. Fagarasan S, Honjo T. Intestinal IgA synthesis: regulation of front-line body defences. *Nature Reviews Immunology* 2003;3:63 -72.
54. Fang H, Elina T, Heikki A, Seppo S. Modulation of humoral immune response through probiotic intake. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2000;29:47-52.
55. Faubion WA, Sandborn WJ. Probiotic therapy with *E.coli* for ulcerative colitis : take the good with the bad. *Gastroenterology* 2000;118:630-631.
56. Fiocchi C. Inflammatory Bowel disease: etiology and pathogenesis. *Gastroenterology* 1998;115:182-205.
57. García-Lafuente A, Antolín M, Guarner F, Crespo E, Salas A, Forcada P, Laguarda M, Gavaldá J, Baena JA, Vilaseca J, Malagelada JR. Incrimination of anaerobic bacteria in the induction of experimental colitis. *Am J Physiol* 1997; 272: G10-G15.
58. Garside P, Mowat Mcl. Oral tolerance. *Semin Immunol* 2001;13:177-185. *Gastroenterology* 1998;115:1405-1413.
59. Gent AE, Hellier MD, Grace RH, Swarbrick ET, Coggon D. Inflammatory bowel disease and domestic hygiene in infancy. *Lancet* 1994;343:766-7.

60. Ghosh S, Armitage E. Detection of persistent measles virus infection in Crohn's disease: current status of experimental work. *Gut* 2001;48:748-752.
61. Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML, Gopal PK. Enhancement of immunity in the elderly by dietary supplementation with the probiotic *Bifidobacterium lactis* HN019. *Am J Clin Nutr* 2001;74:833-839
62. Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. Dietary probiotic supplementation enhances natural killer cell activity in the elderly: an investigation of age-related immunological changes. *J Clin Immunol* 2001; 21:264-271.
63. Gionchetti P, Rizzello F, Ferrieri A, Venturi A, Brignola C, Ferretti M, et al. Rifaximin in patients with moderate or severe ulcerative colitis refractory to steroid-treatment: a double blind, placebo-controlled trial. *Dig Dis Sci* 1999;44:1220-1221.
64. Gionchetti P, Rizzello F, Venturi A, Brigidi P, Matteuzzi D, Bazzocchi G, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Oral bacteriotherapy as maintenance treatment in patients with chronic pouchitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000;119:305-309.
65. Gionchetti P, Rizzello F, Helwig U, Venturi A, Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Poggioli G, Miglioli M, Campieri M. Prophylaxis of pouchitis onset with probiotic therapy: a double blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2003;124:1202-1209.
66. Glasser AL, Boudeau J, Barnich N, Perruchot MH, Colombel JF, Darfeuille-Michaud A. Adherent invasive *Escherichia coli* strains from patients with Crohn's disease survive and replicate within macrophages without



- inducing host cell death. *Infect Immun.* 2001;69:5529-37.
67. Greenbloom SL, Steinhart AH, Greenberg GR. Combination ciprofloxacin and metronidazole for active Crohn's disease. *Can J Gastroenterol* 1998;12:53-56.
68. Guandalini S, Pensabene L, Zikri MA, Dias JA, Casali LG, Hoekstra H, Kolacek S, Massar K, Micetic-Turk D, Papadopoulou A, de Sousa JS, Sandhu B, Szajewska H, Weizman Z. *Lactobacillus* GG administered in oral rehydration solution to children with acute diarrhea: a multicenter European trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;30:214-216.
69. Guarino A, Canani RB, Spagnuolo MI, Albano F, Di Benedetto L. Oral bacterial therapy reduces the duration of symptoms and of viral excretion in children with mild diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;25:516-519.
70. Guarner F, Schaafsma G. Probiotics. *Int J Food Microbiol* 1998;39:237-238.
71. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *Lancet* 2003;361:512-519.
72. Gupta P, Andrew H, Kirschner BS, Guandalini S. Is *Lactobacillus* GG helpful in children with Crohn's disease? Results of a preliminary, open-label study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2000;31:453-457.
73. Guslandi M, Mezzi G, Sorghi M, Testoni PA. *Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 2000;45:1462-1464.

74. Guslandi M, Giollo P, Testoni PA. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2003;15:697-698.
75. Ha CL, Lee JC, Zhou HR, Ustunol Z, Pestka JJ. Effects of yogurt ingestion on mucosal and systemic cytokine gene expression in the mouse. *J Food Prot* 1999;62:181-188.
76. Haller D, Bode C, Hammes WP, Pfeifer AMA, Schiffrin EJ, Blum S. Non-pathogenic bacteria elicit a differential cytokine response by intestinal epithelial cell/leucocyte co-cultures. *Gut* 2000;47:79-87.
77. Haller D, Russo MP, Sartor RB, Jobin C. IKK beta and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt participate in non-pathogenic Gram-negative enteric bacteria-induced RelA phosphorylation and NF-kappa B activation in both primary and intestinal epithelial cell lines. *J Biol Chem* 277;41:38168-38178.
78. Hampe J, Cuthbert A, Croucher PJP, Mirza MM, Mascheretti S, Fisher S et al. Association between insertion mutation in NOD2 gene and Crohn's disease in german and british population. *Lancet* 2001;357:1925-1928.
79. Hampe J, Frenzel H, Mirza HM, Croucher PJ, Cuthbert A, Masche S et al. Evidence for a NOD2-independent susceptibility locus for inflammatory bowel disease on chromosome 16. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:321-326.
80. Hampe J, Grebe J, Nikolaus S, Solberg C, Croucher PJ, Mascheretti S et al. Association of NOD2 (CARD 15) genotype with clinical course in Crohn's disease: a cohort study. *Lancet* 2002;359:1661-1665.

81. Hart AL, Lammers K, Brigidi P, Vitali B, Rizzello F, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA, Knight SC, Stagg AJ. Modulation of human dendritic cell phenotype and function by probiotic bacteria. *Gut* 2004;53:1602-1609.
82. Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, Meurman JH, Poussa T, Näse L, Saxelin M, Korpela R. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ* 2001;322:1327-1329.
83. Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S, Webb G, Spottl T, Andus T, Scholmerich J, Herfarth H, Ray K, Falk W, Rogler G. Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002 ;122:1987-2000.
84. Hessle C, Hanson LA, Wold AE. Lactobacilli from human gastrointestinal mucosa are strong stimulators of IL-12 production. *Clin Exp Immunol* 1999;116:276-282.
85. Hisamatsu T, Suzuki M, Reinecker HC, Nadeau WJ, McCormick BA, Podolsky DK. CARD15/NOD2 functions as an antibacterial factor in human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 2003;124:993-1000.
86. Huang JS, Bousvaros A, Lee JW, Diaz A, Davidson EJ. Efficacy of probiotic use in acute diarrhea in children. A meta-analysis. *Digestive Diseases and Sciences* 2002;47:2625-2634.
87. Hugot JP, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Olson JM, Lee JC, Beaugerie L, Naom I et al. Mapping of a susceptibility locus for Crohn's disease on chromosome 16. *Nature* 1996;379:821-823.

88. Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cezard JP, Belaiche J et al. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:599-603.
89. Hugot JP, Alberti C, Berrebi D, Bingen E, Cézard JP. Crohn's disease: the cold chain hypothesis. *Lancet* 2003;362:2012-2015.
90. Inohara N, Ogura Y, Nuñez G. Nods: a family of cytosolic proteins that regulate the host response to pathogens. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:76-80.
91. Ishikawa I, Akedo I, Umesaki Y, Tanaka R, Imaoka A, Otani T. Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J Am Coll Nutr* 2003;22:56-63.
92. Isolauri E, Juntunen M, Rautanen T, Sillanauke P, Koivula T. A human lactobacillus strain (*Lactobacillus casei* sp strain GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics* 1991;88:90-97.
93. Isolauri E, Majamaa H, Arvola T, Rantala I, Virtanen E, Arvilommi H. *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. *Gastroenterology* 1993;105:1643-1650.
94. Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T. Improved immunogenicity of oral D $\times$ RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* 1995;13:310-312.
95. Isolauri E, Arvola T, Sutas Y, Moilanen E, Salminen S. Probiotics in the management of atopic eczema. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1604-1610.

96. Isolauri E, Sutas Y, Kankaanpaa P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr* 2001;73(S):444-450.
97. Jakobovits J, Schuster MM. Metronidazole therapy for Crohn's disease and associated fistulae. *Am J Gastroenterol* 1984;79:533-540.
98. Jijon H, Backer J, Diaz H, Yeung H, Thiel D, McKaigney C, De Simone C, Madsen K. DNA from probiotic bacteria modulates murine and human epithelial and immune function. *Gastroenterology* 2004;126:1358-1373.
99. Jobin C, Sartor RB. The I kappa B/NF-kappa B system: a key determinant of mucosal inflammation and protection. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000;278:C451-462.
100. Kaila M, Isolauri E, Saxelin M, Arvilommi H, Vesikari T. Viable versus inactivated lactobacillus strain GG in acute rotavirus diarrhea. *Arch Dis Child* 1995;72:51-53.
101. Kaila M, Isolauri E, Soppi E, Virtanen E, Laine S, Arvilommi H. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. *Pediatr Res* 1992;32:141-144.
102. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2001;357:1076-1079.
103. Kalliomaki M, Isolauri E. Pandemic of atopic diseases: a lack of microbial exposure in early infancy?. *Curr Drug targets Infect Disord* 2002;2:193-199.

104. Kalliomäki M, Salminen S, Poussa T, Arvilommi H, Isolauri E. Probiotics and prevention of atopic disease:4-year follow-up of a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2003;361:1869-1871.
105. Kato I, Tanaka K, Yokokura T. Lactic acid bacterium potently induces the production of IL-12 and IFN $\gamma$  by mouse splenocytes. *Int J Immunopharmacol* 1999;21:121-131.
106. Kelly D, Campbell J, King T, Grant G, Jansson E, Coutts A, Pettersson S, Conway S. Commensal anaerobic gut bacteria attenuate inflammation by regulating nuclear-cytoplasmic shuttling of PPAR- $\gamma$  and RelA. *Nat Immunol* 2004;5:104-12.
107. Kobayashi K, Brown WR, Brennan PL, Blaser MJ. Serum antibodies to mycobacterial antigens in active Crohn's disease. *Gastroenterology* 1988;94:1401-1411.
108. Kobayashi K, Blaser MJ, Brown WR. Immunohistochemical examination for mycobacteria in intestinal tissues from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1989;96:1009-1015.
109. Kruis W, Schütz E, Fric P, Fixa B, Judmaier G, Stolte M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1997;11:853-858.
110. Kruis W. Antibiotics and probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20 (Suppl 4):75-78.
111. Kuhn R, Lohler J, Rennick D, Rajewsky K, Muller W. Interleukin-10 deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* 1993;75:263-274.

112. Kuisma J, Mentula S, Jarvinen H, Kahri A, Saxelin M, Farkkila M. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* GG on ileal pouch inflammation and microbial flora. *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:509-515.
113. Lala S, Ogura Y, Osborne C, Hor SY, Bromfield A, Davies S, Ogunbiyi O, Nunez G, Keshav S. Crohn's disease and the NOD2 gene: a role for paneth cells. *Gastroenterology* 2003;125:47-57.
114. Lammers KM, Helwig U, Swennen E, Rizzello F, Venturi A, Caramelli E, Kamm MA, Brigidi P, Gionchetti P, Campieri M. Effect of probiotic strains on interleukin 8 production by HT29/19A cells. *Am J Gastroenterol* 2002;97:1182-1186.
115. Lammers KM, Brigidi P, Vitali B, Gionchetti P, Rizzello F, Caramelli E, Matteuzzi D, Campieri M. Immunomodulatory effects of probiotic bacteria DNA: IL-1 and IL-10 response in human peripheral blood mononuclear cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2003;38:165-172.
116. Landers CJ, Cohavy O, Misra R, Yang H, Lin Y, Braun J, Targan SR. Selected loss of tolerance evidenced by Crohn's disease-associated immune responses to auto and microbial antigens. *Gastroenterology* 2002;123:689-699.
117. Leiper K, Morris AI, Rhodes JM. Open label trial of oral clarithromycin in active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2000;14:801-806.
118. Lesage S, Zouali H, Cezard JP, Colombel JF, Belaiche J, Almer S et al. CARD15/NOD2 mutational analysis and genotype-phenotype correlation in 612 patients with inflammatory bowel disease. *Am J Hum*

- Genet 2002:845-857.
119. Lien E, Ingalls RR. Toll-like receptors. Crit Care Med 2002;30:S1-S11.
120. Link-Amster H, Rochat F, Saudan KY, Mignot O, Aeschlimann JM. Modulation of a specific humoral immune response and changes in intestinal flora mediated through fermented milk intake. FEMS Immunol Med Microbiol 1994;10:55-63.
121. Lobo AJ, Burke DA, Sobala GM, Axon AT. Oral tobramycin in ulcerative colitis: effect on maintenance of remission. Aliment Pharmacol Ther 1993;7:155-158.
122. Lu Lei, Walker A. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. Am J Clin Nutr 2001;73(S):1124-1130.
123. Ma D, Forsythe P, Bienenstock J. Live *Lactobacillus reuteri* is essential for the inhibitory effect on tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 expression. Infect Immun 2004;72(9):5308-14.
124. Mccarthy J, O'Mahony, O'Callaghan L, Sheil B, Vaughan E, Fitzsimons N, Fitzgibbon J, O'Sullivan G, Kiely B, Collins J, Shanahan F. Double blind, placebo controlled trial of two probiotics strains in interleukin 10 knockout mice and mechanistic link with cytokine balance. Gut 2003;52:975-980.
125. MacDonald TT. The reaction of the immune system to pathogens but not food antigens and commensal bacteria. Semin Immunol 2001;13:159-161.



126. MacDonald TT. The mucosal immune system. *Parasite Immunology* 2003;25:235-246.
127. Macpherson A, Khoo UY, Forgacs I, Philpott-Howard J, Bjarnason I. Mucosal antibodies in inflammatory bowel disease are directed against intestinal bacteria. *Gut* 1996;38:365-375.
128. Macpherson A, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science* 2004;303:1662-1665.
129. Madsen KL, Doyle JS, Jewell LD, Tavernini MM, Fedorak RN. *Lactobacillus* species prevents colitis in Interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 1999;116:1107-1114.
130. Madsen KL, Doyle JS, Tavernini MM, Jewell LD, Rennie RP, Fedorak RN. Antibiotic therapy attenuates colitis in interleukin 10 gene-deficient mice. *Gastroenterology* 2000;118:1094-1105.
131. Madsen K, Cornish A, Soper P, Mc Kaigney C, Jijon H, Yachimec C, Doyle J, Jewell J, De Simone C. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology* 2001;121:580-591.
132. Majmaa H, Isolauri E, Saxelin M, Vesikari T. Lactic acid bacteria in the treatment of acute rotavirus gastroenteritis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995;20:333-338.
133. Malin M, Soumalainen H, Saxelin M, Isolauri E. Promotion of Ig A immune response in patients with Crohn's disease by oral bacteriotherapy with *Lactobacillus* GG. *Ann Nutr Metab* 1996;40:137-145.

134. Mantzaris GJ, Hatzis A, Kontogiannis P, Triadaphyllou G. Intravenous tobramycin and metronidazole as an adjunct to corticosteroids in acute, severe ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1994;89:43-46.
135. Mantzaris GJ, Archavlis E, Christoforidis P, Kourtessas D, Amberiadis P, Florakis N, Petraki K, Spiliadi C, Triantafyllou G. A prospective randomised controlled trial of oral ciprofloxacin in acute ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 1997;92:454-456.
136. Mantzaris GJ, Petraki K, Archavlis E, Amberiadis P, Kourtessas D, Christidou A, Triantafyllou G. A prospective randomized controlled trial of intravenous ciprofloxacin as an adjunct to corticosteroids in acute, severe ulcerative colitis. *Scand J Gastroenterol* 2001;36:971-974.
137. Mao Y, Nobaek S, Kasravi B, Adawi D, Stenram U, Molin G, Jeppsson B. The effects of *Lactobacillus* strains and oat fiber on methotrexate-induced enterocolitis in rats. *Gastroenterology* 1996;111:334-344.
138. Marteau P, Lepage P, Mangin I, Suau A, Dore J, Pochart P, Seksik P. Gut flora and inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;20 (Suppl4):18-23.
139. Mate-Jimenez J, Munoz S, Vicent D, Pajares JM. Incidence and prevalence of ulcerative colitis and Crohn's disease in urban and rural areas of Spain from 1981 to 1988. *J Clin Gastroenterol.* 1994 Jan;18(1):27-31.
140. Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T. The effect of

- oral feeding of *Lactobacillus casei* strain Shirota on immunoglobulin E production in mice. J Dairy Sci 1998;81:48-53.
141. Ménard S, Candalh C, Bambou JC, Terpend K, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Lactic acid bacteria secrete metabolites retaining anti-inflammatory properties after intestinal transport. Gut 2004;53:821-828.
142. Miettinen M, Matikainen S, Vuopio-Varkila J, Pirhonen J, Varkila K, Kurimoto M, Julkunen I. Lactobacilli and streptococci induce IL-12, IL-18 and IFN $\gamma$  production in human peripheral blood mononuclear cells. Infect Immun 1998;66:6058-6062.
143. Mimura T, Rizzello F, Helwig U, Poggioli G, Schreiber S, Talbot IC, Nicholls RJ, Gionchetti P, Campieri M, Kamm MA. Once daily high dose probiotic therapy (VSL#3) for maintaining remission in recurrent or refractory pouchitis. Gut 2004;53:108-114.
144. Monteleone I, Vavassori P, Biancone G, Monteleone G, Pallone F. Immunoregulation in the gut: success and failures in human disease. Gut 2002;50(Suppl 3):60-64.
145. Monteleone G, Holloway J, Salvati V, Pender S, Fairclough P, Croft N, MacDonald T. Activated STAT4 and a functional role of IL-12 in human Peyer's patches. Journal of Immunology 2003;170:300-307.
146. Moreau MC, Gaboriau-Routhiau V. The absence of gut flora, the doses of antigen ingested and age affect the long-term peripheral tolerance induced by ovalbumin feeding in mice. Res Immunol 1996;147:49-59.

147. Mourelle M, Salas A, Guarner F, Crespo E, García-Lafuente A, Malagelada JR. Stimulation of transforming growth factor- $\beta$ 1 by enteric bacteria in the pathogenesis of rat intestinal fibrosis. *Gastroenterology* 1998;114:519-526.
148. Nowak-Wegrzyn A. Future approaches to food allergy. *Pediatrics*. 2003;111:1672-80
149. O'Mahony, Feeney M, O'Halloran S, Murphy I, Kiely B, Fitzgibbon J, Lee G, O'Sullivan G, Shanahan F, Collins JK. Probiotic impact on microbial flora, inflammation and tumour development in IL-10 knockout mice. *Aliment Pharmacol Ther* 2001;15:1219-1225.
150. Obermeier F, Dunger N, Strauch U, Grunwald N, Herfarth H, Schölmerich J, Falk W. Contrasting activity of cytosin-guanosin dinucleotide oligonucleotides in mice with experimental colitis. *Clin Exp Immunol* 2003;134:217-224.
151. Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R et al. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001;411:537-539.
152. Oláh A, Belágyi T, Iseekutz A, Gamal ME, Bengmark S. Randomized clinical trial of specific lactobacillus and fibre supplement to early enteral nutrition in patients with acute pancreatitis. *British Journal of Surgery* 2002;89:1103-1107.
153. Orholm M, Munkholm P, Langholz E, Nielsen OH, Sorensen IA, Binder V. Familial occurrence of inflammatory bowel disease. *N Engl J Med* 1991;324:84-88.

154. Orholm M, Fonager K, Sorensen HT. Risk of ulcerative colitis and Crohn's disease among offspring of patients with chronic inflammatory bowel disease. *Am J Gastroenterol* 1999;94:3236-3238.
155. Orholm M, Binder V, Sorensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* 2000;35:1075-1081.
156. Ott SJ, Musfeldt M, Wenderoth DF, Hampe J, Brant O, Fölsch UR, Timmis KN, Schreiber S. Reduction in diversity of the colonic mucosa associated bacterial microflora in patients with active inflammatory bowel disease. *Gut* 2004;53:685-693.
157. Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA, Amos CI, Huang Q, Gu X, Newman B, Van Oene M, Cescon D, Greenberg G, Griffiths AM, St George-Hyslop PH, Siminovitch KA. Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004;36:471-475.
158. Pelto L, Isolauri E, Lilius EM, Nuutila J, Salminen S. Probiotic bacteria down-regulate the milk-induced inflammatory response in milk-hipersensitive subjects but have an immunostimulatory effect in healthy subjects. *Clin Exp Allergy* 1998;28:1474-1479.
159. Pena JA, Versalovic J. *Lactobacillus rhamnosus* GG decreases TNF- $\alpha$  production in lipopolysaccharide-activated murine macrophages by a contact-independent mechanism. *Cell Microbiol.* 2003;5:277-85.

160. Pessi T, Sutas Y, Hurme M, Isolauri E. Interleukin-10 generation in atopic children following oral *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Clin Exp Allergy* 2000;30:1804-1808.
161. Petrof EO, Kojima K, Ropeleski MJ, Musch MW, Tao Y, De Simone C, Chang EB. Probiotics inhibit nuclear factor-kappaB and induce heat shock proteins in colonic epithelial cells through proteasome inhibition. *Gastroenterology* 2004;127(5):1474-87.
162. Plein K, Hotz J. Therapeutic effect of *Saccharomyces boulardii* on mild residual symptoms in a stable phase of Crohn's disease with special respect to chronic diarrhea-a pilot study. *Z Gastroenterol* 1993;31:129-134.
163. Prantera C, Kohn A, Mangiarotti R, Andreoli A, Luzi C. Antimycobacterial therapy in Crohn's disease: results of a controlled, double-blind trial with a multiple antibiotic regimen. *Am J Gastroenterol* 1994;89:513-518.
164. Prantera C, Zannoni F, Scribano ML, Berto E, Andreoli A, Kohn A, Luzi C. An antibiotic regimen for the treatment of active Crohn's disease: a randomized, controlled trial of metronidazole plus ciprofloxacin. *Am J Gastroenterol* 1996;91:328-332.
165. Prantera C, Scribano ML, Falasco A, Andreoli A, Luzi C. Ineffectiveness of probiotics in preventing recurrence after curative resection for Crohn's disease: a randomised controlled trial with *Lactobacillus* GG. *Gut* 2002;51:405-409.

166. Rachmilewitz D, Karmeli F, Takabayashi K, Hayashi T, Leider-Trejo L, Lee J, Leoni LM, Raz E. Immunostimulatory DNA ameliorates experimental and spontaneous murine colitis. *Gastroenterology*. 2002;122:1428-41.
167. Rachmilewitz D, Katakura K, Karmeli F, Hayashi T, Reinus C, Rudensky B, Akira S, Takeda K, Lee J, Takabayashi K, Raz E. Toll-like receptor 9 signaling mediates the anti-inflammatory effects of probiotics in murine experimental colitis. *Gastroenterology* 2004;126:520-528.
168. Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118:229-241.
169. Rautava S, Kalliomaki M, Isolauri E. Probiotics during pregnancy and breast-feeding might confer immunomodulatory protection against atopic disease in the infant. *J Allergy Clin Immunol* 2002;109:119-121.
170. Rayes N, Seehofer D, Hansen S, Boucsein K, Müller AR, Serke S, Bengmark S, Neuhaus P. Early enteral supply of *Lactobacillus* and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients. *Transplantation* 2002;74:123-128.
171. Reid G, Guarner F, Gibson G, Tompkins T, Gill H, Rowland I, Rastall B, Pot B, Sanders M; International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics. *Gastroenterology* 2004;127:366-367.
172. Rembacken BJ, Snelling AM, Hawkey PM, Chalmers DM, Axon AT. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: a randomised trial. *Lancet* 1999;354:635-639.

173. Rosenfeldt V, Michaelsen KF, Jakobsen M, Larsen CN, Moller PL, Tvede M, Weyrehter H, Valerius NH, Paerregaard A. Effect of probiotic Lactobacillus strains on acute diarrhea in a cohort of nonhospitalized children attending day-care centers. *Pediatr Infect Dis J.* 2002;21(5):417-9.
174. Rosenfeldt V, Michaelsen KF, Jakobsen M, Larsen CN, Moller PL, Pedersen P, Tvede M, Weyrehter H, Valerius NH, Paerregaard A. Effect of probiotic Lactobacillus strains in young children hospitalized with acute diarrhea. *Pediatr Infect Dis J.* 2002;21(5):411-6.
175. Rozen P, Zonis J, Yekutieli P, Gilat T. Crohn's disease in the Jewish population of Tel-Aviv-Yafo. Epidemiologic and clinical aspects. *Gastroenterology* 1979;76:25-30.
176. Rutgeerts P, Geboes K, Peeters M, Hiele M, Penninckx F, Aerts R, Kerremans R, Vantrappenn G. Effect of faecal stream diversion on recurrence of Crohn's disease in the neoterminal ileum. *Lancet* 1991;2:771-774.
177. Rutgeerts P, Hiele M, Geboes K, Peeters M, Penninckx F, Aerts R, Kerremans R. Controlled trial of metronidazole treatment for prevention of Crohn's recurrence after ileal resection. *Gastroenterology* 1995;108:1617-1621.
178. Saavedra JM, Bauman NA, Oung I, Perman JA, Yolken RH. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhea and shedding of rotavirus. *Lancet* 1994;344:1046-1049.



179. Saavedra JM, Abi-Hanna A, Moore N, Yolken RH. Long-term consumption of infant formulas containing live probiotic bacteria: tolerance and safety. *AM J Clin Nutr* 2004;79:261-267.
180. Saito H, Kanamori Y, Takemori T, et al. Generation of intestinal T cells from progenitors residing in gut cryptopatches. *Science* 1998;280:275-278.
181. Sanderson JD, Moss MT, Tizard MLV, Hermon-Taylor J. *Mycobacterium paratuberculosis* DNA in Crohn's disease tissue. *Gut* 1992;33:890-896.
182. Sands BE. Therapy of inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2000;118:S68-S82.
183. Saro C, Riestra S, Milla A, Sanchez R, Lacort M, Arguelles G, Chovac Z, Florido JI, Anton JL, Altadill Arregui A, Vizoso F, Pineda E, Fernandez de Ocariz E, Albert J, Garcia J, Lopez L, Lombrana JL. Incidence and prevalence of inflammatory bowel disease. Asturian study in 5 areas (EIICEA). Spain. *An Med Interna*. 2003 Jan;20(1):3-9.
184. Sartor RB. Probiotics in chronic pouchitis: restoring luminal microbial balance. *Gastroenterology* 2000;119:584-586.
185. Sartor RB. Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics and prebiotics. *Gastroenterology* 2004;126:1620-1633.
186. Schiffrin EJ, Rochat F, Link-Amster H, Aeschlimann JM and Donnet-Hughes. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J Dairy Sci* 1995;78:491-497.

187. Schultz M, Veltkamp C, Dieleman LA, Grenther WB, Wyrick PB, Tonkonogy SL, Sartor RB. Lactobacillus plantarum 299V in the treatment and prevention of spontaneous colitis in interleukin-10-deficient mice. *Inflamm Bowel Dis* 2002;8:71-80.
188. Schultz M, Munro K, Tannock GW, Melchner I, Gottl C, Schwietz H, Scholmerich J, Rath HC. Effects of feeding a probiotic preparation (SIM) containing inulin on the severity of colitis and on the composition of the intestinal microflora in HLA-B27 transgenic rats. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:581-587.
189. Schultz M, Timmer A, Herfarth HH, Sartor RB, Vanderhoof JA, Rath HC. Lactobacillus GG in inducing and maintaining remission of Crohn's disease. *BMC Gastroenterol* 2004;4:5.
190. Seegers JF. Lactobacilli as live vaccine delivery vectors: progress and prospects. *Trends Biotechnol.* 2002;20:508-15.
191. Sellon RK, Tonkonogy SL, Schultz M, Dieleman LA, Grenther W, Balish E, Rennick D, Sartor RB. Resident enteric bacteria are necessary for development of spontaneous colitis and immune system activation in interleukin-10 deficient mice. *Infect Immun* 1998;66:5224-5231.
192. Shanahan F. Probiotics and inflammatory bowel disease: is there a scientific rationale? *Inflamm Bowel Dis* 2000;6:107-115.
193. Shanahan F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecomtherapeutics. *Gastroenterology* 2001;120:622-635.

194. Shanahan F. Probiotics in inflammatory bowel disease. *Gut* 2001;48:609.
195. Shanahan F. Turbo probiotics for IBD. *Gastroenterology* 2001;120:1297-1298.
196. Shanahan F. Crohn's disease. *Lancet* 2002;359:62-69.
197. Shanahan F. Host-flora interactions in inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* 2004;10(Suppl 1):16-24.
198. Shao L, Serrano D, Mayer LL. The role of epithelial cells in immune regulation in the gut. *Semin Immunol* 2001;13:163-175.
199. Sheih YH, Chiang BL, Wang LH, Liao CK, Gill HS. Systemic immunity-enhancing effects in healthy subjects following dietary consumption of the lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *J Am Coll Nutr* 2001;20:149-156.
200. Shornikova AV, Casas IA, Isolauri E, Mykkanen H, Vesikari T. *Lactobacillus reuteri* as a therapeutic agent in acute diarrhea in young children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1997;24:399-404.
201. Shornikova AV, Casas IA, Mykkanen H, Salo E, Vesikari T. Bacteriotherapy with *Lactobacillus reuteri* in rotavirus gastroenteritis. *Pediatr Infect Dis J* 1997;16:1103-1107.
202. Spanhaak S, Havenaar R, Schaafsma G. The effect of consumption of milk fermented by *Lactobacillus casei* strain Shirota on the intestinal microflora and immune parameters in humans. *Eur J Clin Nutr* 1998;52:899-907.

203. Stagg AJ, Hart AL, Knight SC, Kamm MA. Microbial-gut interactions in health and disease. Interactions between dendritic cells and bacteria in the regulation of intestinal immunity. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 2004;18:255-270.
204. Steidler L, Hans W, Schotte L, Neiryck S, Obermeier F, Falk W, Fiers W, Remaut E. Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting Interleukin-10. *Science* 2000;289:1352-1355.
205. Steinhart AH, Feagan BG, Wong CJ, Vandervoort M, Mikolainis S, Croitoru K, Seidman E, Leddin DJ, Bitton A, Drouin E, Cohen A, Greenberg GR. Combined budesonide and antibiotic therapy for active Crohn's disease: a randomized controlled trial. *Gastroenterology*. 2002;123:33-40.
206. Strobel S, Mowat AM. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. *Immunol Today* 1998;19:173-181.
207. Strobel S. Immunity induced after a feed of antigen during early life: oral tolerance versus desensitisation. *Proc Nutr Soc* 2001;60:437-442.
208. Strober W, Kelsall B, Marth T. Oral tolerance. *J Clin Immunol* 1998;18:1-30.
209. Stoll M, Corneliussen B, Costello CM, Waetzig GH, Mellgard B, Koch WA, Rosenstiel P, Albrecht M, Croucher PJ, Seegert D, Nikolaus S, Hampe J, Lengauer T, Pierrou S, Foelsch UR, Mathew CG, Lagerstrom-Fermer M, Schreiber S. Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004;36:476-480.

210. Sutherland L, Singleton J, Sessions J, Hanauer S, Krawitt E, Rankin G, Summers R, Mekhijran H, Greenberger N, Kelly M, Levine J, Thomson A, Alpert E. Double blind, placebo controlled trial of metronidazole in Crohn's disease. *Gut* 1991;32:1071-1075.
211. Swidsinski A, Ladhoff A, Pernhaler A, Swidsinski S, Loening-Baucke V, Ortner M, Weber J, Hoffmann U, Schreiber S, Dietel M, Lochs H. Mucosal flora in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2002;122:44-54.
212. Szajewska H, Kotowska M, Mrukowicz JZ, Armanska M, Mikolajczyk W. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. *J Pediatr* 2001;138:361-365.
213. Tabaqchali S, O'Donoghue DP, Bettleheim KA. *Escherichia coli* antibodies in patients with inflammatory bowel disease. *Gut* 1978;19:108-113.
214. Tejada-Simon MV, Pestka JJ. Proinflammatory cytokine and nitric oxide induction in murine macrophages by cell wall and cytoplasmic extracts of lactic acid bacteria. *J Food Prot* 1999;62:1435-1444.
215. Tejada-Simon MV, Ustunol Z, Pestka JJ. Effects of lactic acid bacteria ingestion of basal cytokine mRNA and immunoglobulins levels in the mouse. *J Food Prot* 1999;62:287-291.
216. Tejada-Simon MV, Ustunol Z, Pestka JJ. Ex vivo effects of lactobacilli, streptococci and bifidobacteria ingestion on cytokine and nitric oxide production in a murine model. *J Food Prot* 1999;62:162-169.

217. Tejada-Simón MV, Lee JH, Ustunol Z, Pestka JJ. Ingestion of yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* to potentiate immunoglobulin A responses to cholera toxin in mice. *J Dairy Sci* 1999;82:649-660.
218. Thayer WR, Coutu JA, Chiodinni RJ, Kruiningen HJV, Merkal RS. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. II. Mycobacterial antibodies in Crohn's disease. *Dig Dis Sci* 1984;29:1080-1085.
219. Thomas GA, Swift GL, Green GT, Newcombe RG, Braniff-Mathews C, Rhodes J, Wilkinson S, Strohmeyer G, Kreuzpainter G. Controlled trial of antituberculous chemotherapy in Crohn's disease: a five year follow up study. *Gut* 1998;42:497-500.
220. Thompson NP, Montgomery SM, Pounder RE, Wakefield AJ. Is measles vaccination a risk factor for inflammatory bowel disease? *Lancet* 1995;345:1071-1074.
221. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* 1996;312:95-96.
222. Turunen UM, Farkkila MA, Hakala K, Seppala K, Sivonen A, Ogren M, Vuoristo M, Valtonen VV, Miettinen TA. Long-term treatment of ulcerative colitis with ciprofloxacin: a prospective, double-blind, placebo-controlled study. *Gastroenterology* 1998;115:1072-1078.
223. Tysk C, Lindberg E, Jarnerot G, Fliederus-Myrhed B. Ulcerative colitis and Crohn's disease in an unselected population of monozygotic

- and dizygotic twins. A study of heritability and the influence of smoking. *Gut* 1998;29:990-996.
224. Van der Waaij LA, Limburg PC, Mesander G, Van der Waaij D. In vivo IgA coating of anaerobic bacteria in human faeces. *Gut* 1996;38:348-354.
225. Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA. Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* 2002;109:678-684.
226. Van Niel G, Mallegol J, Bevilacqua C, Candalh C, Brugiere S, Tomaskovic-Crook E, Heath JK, Cerf-Bensussan N, Heyman M. Intestinal epithelial exosomes carry MHC class II/peptides able to inform the immune system in mice. *Gut*. 2003 Dec;52:1690-7.
227. Venturi A, Gionchetti P, Rizzello F, Johansson R, Zucconi E, Brigidi P, Matteuzzi D, Campieri M. Impact on the faecal flora by a new probiotic preparation: preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* 1999;13:1103-1108.
228. Vermeire S, Louis E, Rutgeers P, De Mos P, Van Gossum A, Belaic S et al. NOD2/CARD15 does not influence response to infliximab in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2002;123:106-111.
229. Vezys V, Olson S, Lefrancois L. Expression of intestine-specific antigen reveals novel pathways of DC8 T cell tolerance induction. *Immunity* 2000;12:505-514.
230. Videla S, Vilaseca J, Guarner F, Salas A, Treserra F, Crespo E, Antolín M, Malagelada JR. Role of intestinal microflora in chronic

- inflammation and ulceration of the rat colon. *Gut* 1994; 35: 1090-1097.
231. Videla S, Vilaseca J, Guarner F, Salas A, González G, Antolín M, Malagelada JR. Stimulation of mucosal inflammatory activity by the normal fecal flora in a rat model of colitis. *Inflammatory Bowel Dis* 1997; 3: 191-197.
232. Videla S, Vilaseca J, Antolín M, García-Lafuente A, Guarner F, Crespo E, Casalots J, Salas A, Malagelada JR. Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 1486-1493.
233. Von der Weid T, Bulliard C, Schiffrin EJ. Induction by a lactic acid bacterium of a population of CD4<sup>+</sup> T cells with low proliferative capacity that produce transforming growth factor  $\beta$  and interleukin-10. *Clin Diagn Lab Immunol* 2001;8:695-701.
234. Wakefield AJ, Sankey EA, Dhillon AP, Sawyer AM, More L, Sim R, Pittilo RM, Rowles PM, Hudson M, Lewis AAM, Pounder RE. Granulomatous vasculitis in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1991;100:1279-1287.
235. Wakefield AJ, Pittilo RM, Sim R, Cosby SL, Stephenson JR, Dhillon AP, Pounder RE. Evidence of persistent measles virus infection in Crohn's disease. *J Med Virol* 1993;39:345-353.
236. Watts DA, Satsangi J. The genetic jigsaw of inflammatory bowel disease. *Gut* 2002;50(suppl 3):31-36.
237. Yamanaka T, Helgeland L, Farstad IN, Fukushima H, Midtvedt T, Brandtzaeg P. Microbial colonization drives lymphocyte accumulation and



differentiation in the follicle-associated epithelium of Peyer's patches.

Immunol. 2003 Jan 15;170:816-22.