

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Efectos del consumo de probióticos y yogures sobre el sistema inmunitario y la microbiota intestinal de adultos sanos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Noemí Redondo Useros

Directoras

**Ascensión Marcos Sánchez
Esther Nova Rebato**

Madrid



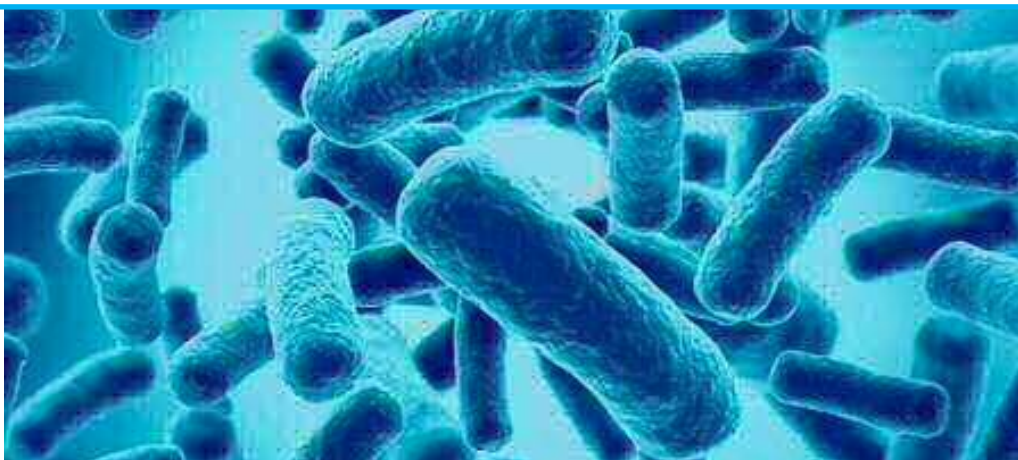
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

TESIS DOCTORAL

Efectos del consumo de probióticos y yogures sobre el sistema inmunitario y la microbiota intestinal de adultos sanos



Noemí Redondo Useros

Directoras

Ascensión Marcos Sánchez

Esther Nova Rebato

Madrid, 2019



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. NOEMÍ REDONDO USEROS,
estudiante en el Programa de Doctorado BIOQUIMICA BIOLOGIA MOLECULAR Y BIOM,
de la Facultad de Farmacía de la Universidad Complutense de
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y
titulada:

"Efectos del consumo de probióticos y yogures sobre el sistema inmunitario y la microbiota intestinal de adultos sanos"

y dirigida por: Ascensión Marcos Sánchez y Esther Nova Rebato

DECLARO QUE:

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 12 de septiembre de 2019

Fdo.: Noemí Redondo Useros

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS Y NUTRICIÓN

La presente tesis doctoral titulada “Efectos del consumo de probióticos y yogur sobre el sistema inmunitario y la microbiota intestinal de adultos sanos” ha sido realizada por Noemí Redondo Useros, y dirigida por la Prof. Ascensión Marcos Sánchez y la Dra. Esther Nova Rebato, en el Departamento de Metabolismo y Nutrición, del Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN), del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Engloba tres proyectos de investigación, el primero financiado por la empresa Biosearch S.A., el segundo por la Fundación Europea de Investigación en Alcohol (ERAB), y el tercero por el Ministerio de Economía y Competitividad, Subprograma de Proyectos de Investigación Fundamental Orientada a los Recursos y Tecnologías Agrarias en coordinación con las Comunidades Autónomas (RTA-2012-00113-C02-C02), co-financiado por el Fondo Europeo de Desarrollo Regional, y con financiación complementaria de la empresa de quesos artesanos Letur S.A.

Opta al grado de doctora

Noemí Redondo Useros

VºBº Directores

VºBº Tutor Académico

Prof. Ascensión Marcos Sánchez

Prof. Fernando Escrivá Pons

Dra. Esther Nova Rebato

A mi padre

Debemos aprender que podemos hacer muchas más cosas de las que CREEMOS poder hacer

Que no importan nuestras circunstancias, lo que importa es CÓMO interpretamos nuestras
circunstancias

Que si no controlo mi actitud, ésta me controlará a mí

Deberíamos aprender que el único momento valioso es AHORA

Deberíamos aprender a no competir con lo mejor de otros, sino a competir con lo mejor de
nosotros

Hoy voy a aprender que hay mucha diferencia entre la perfección y la excelencia

Hoy voy a aprender a no tomarme tan en serio las cosas que me suceden, a relativizarlo todo

Hoy he aprendido que sé muy poco de la vida y que la vida me entrega constantemente
aprendizaje

Hoy voy a aprender a QUERERME y a CUIDARME

Agradecimientos

Para empezar, me gustaría agradecer a mi grupo de investigación todos estos años de trabajo, principalmente por apoyarme e impulsar que yo pueda haber llegado hasta aquí. A Sonia, por estar desde el principio de mi formación ayudándome en todo lo que necesité. A Espe por ser un apoyo en el laboratorio y por estar siempre dispuesta a solucionar cualquier problema que se presente. A aquellas personas que ya no están en el grupo pero que han sido una parte importante de este periodo. A Jorge, por formarme desde el principio y fomentar mi desarrollo autónomo. A Alina, por esa amistad que tenemos y que empezó en horas interminables de trabajo, apoyo y deliraciones. A Belén porque ha sido y es un pilar de desahogo y ayuda enorme, y una gran amiga. A Brenda, sin su ayuda tampoco hubiera podido terminar todo el trabajo que había por delante. Y a la última incorporación del grupo, Natalia, por su disposición y por hacer que todo sea más fácil.

A mis directoras de tesis. Esther por el gran aprendizaje que me llevo de ella, por su capacidad para enseñar y por las horas empleadas en formarme. Por tener siempre un hueco para ayudarme a avanzar en mi desarrollo profesional. A Ascensión por creer en mi, por impulsarme siempre a avanzar, a sacar lo mejor de mi y por darme siempre una oportunidad para crecer. Gracias a las dos por ayudarme a ser la “investigadora” que soy hoy, gran parte es gracias a vosotras.

A aquellas personas que me ayudaron en el camino de mi formación. A Juan Miguel, por darme la oportunidad de formarme en su laboratorio. A todos los centros de investigación que han colaborado para que la tesis saliera adelante, especialmente a mi centro, el ICTAN, seguido del CIB y CNB, que me ayudaron en la búsqueda de voluntarios y me prestaron sus instalaciones para realizar la parte de encuestas. A los doctores del centro médico del Banco Santander, de la empresa General Electrics e Italfármaco que colaboraron con nosotros en el mismo sentido, y a mi amiga Raquel y a Ana por ayudarme a buscar voluntarios y dejarme su espacio para ello. A Amalia, por su amable disposición siempre en el análisis de los datos de citometría, y a Laura Barrios y Belén Garzón por su ayuda e involucración en el análisis estadístico.

A mis compañeros de trabajo del ICTAN que llegaron a ser grandes amigas, como Natalia, horas y horas en el laboratorio juntas poniendo a punto técnicas nuevas tuvieron la culpa y que gracias a su dedicación y apoyo todo fue mejor. A mis amigas del ICTAN que han hecho de días duros días de risas y deliraciones, por su gran apoyo en momentos difíciles y por terminar la semana como se merece con esos viernes de cafés. Por todo lo que me habéis escuchado y aguantado a la estresá de turno: por las eternas conversaciones (Angy), por la motivación constante a valorarme más (Fátima), por hacer que me integrara mejor con vosotras (Isa), por estar siempre ahí y porque las comidas en su compañía y con carne son mucho mejores (verdad Tati) y porque a veces también necesito que me hagan poner los pies en la tierra, aunque siempre dando a la emoción la importancia que se merece (¿no Ailén?). Belén tu estás en todas las frases, y es que sin ti no hubiera podido disfrutar de estos momentos. Mil gracias a todas.

A mis amigos, por aguantar mis “mañana madrugo”, y por saberse de memoria los procesos de tesis. Pero sobre todo, por el gran respeto que han tenido por mí. Paula, Inés, Noe, Laura, Lore, Diana, Raquel, Estela, Dani.

Me gustaría agradecer a toda mi familia materna y paterna por aportar, cada uno de ellos de diferente forma, un granito de arena a que yo culmine este proceso de tesis doctoral. Por que todos procedemos del mismo origen y porque yo no sería así de no ser por cada uno de ellos. En especial, a mi abuela Salomé, por transmitirme esa valentía, coraje y ganas de vivir. A mi hermano pequeño, porque le quiero. Porque me refleja aquello que yo anhelo tener. A mi madre, porque aunque a día de hoy le haya explicado unas mil veces en que consiste mi tesis doctoral, siempre me ha inspirado a avanzar hacia lo que quiero conseguir, porque nunca hay un paso atrás, siempre para adelante, y por recordarme lo importante que es que me cuide y me valore. Sin su gestión emocional y su capacidad para dar siempre lo mejor que tenemos, yo no estaría donde estoy hoy.

A mi padre porque sé que estás aquí conmigo. Porque está más que claro que de no ser así no habría llegado aquí. Por el gasto de energía tan grande que pusiste desde pequeña por impulsarme a que yo sacara mejores notas, porque fuera “alguien con mejores estudios”, porque me mejorara cada día. Por tener siempre un hueco para motivarme a avanzar a pesar de estar en tus peores momentos. Por ayudarme a integrar aquello de avanzar “sin apego al resultado”. Ahora entiendo porqué hiciste todo esto. Me diste aquello que no te pudiste dar a ti. Eternamente agradecida.

A David, porque fuiste la persona que más me ayudó a dar los primeros pasos, comenzando con el Máster. Sin contar con toda tu paciencia esos fines de semana encerrada y por respetar mi espacio. Por tu capacidad para creer en mi, por impulsarme siempre, por ayudarme en todo lo que he necesitado de forma incondicional. Por no poner pegas a pesar de mi cansancio y mis pocas ganas de hacer cosas, en especial, este último año. Mi máxima admiración a ti. Esta tesis tiene mi nombre pero después tiene el tuyo y el de mi padre.

ÍNDICES

ÍNDICE DE CONTENIDO

RESUMEN	11
SUMMARY.....	15
ABREVIATURAS	19
1. INTRODUCCIÓN.....	23
1.1. POBLACIÓN DIANA: ADULTOS SANOS.....	25
1.2. SISTEMA INMUNITARIO DE ADULTOS SANOS.....	26
1.2.1. Sistema inmunitario innato: características.	26
1.2.1.1. La inflamación	26
1.2.1.2. Células y moléculas efectoras del sistema inmunitario innato.....	27
1.2.1.3 Citoquinas: intermediarios entre la inmunidad innata y específica.	27
1.2.2. Sistema inmunitario específico.....	28
1.2.3. Características del sistema inmunitario de adultos sanos: Homeostasis y redundancia inmunitaria.....	29
1.2.4. Biomarcadores en adultos sanos	30
1.2.4.1. Respuesta inmunitaria a la vacunación.....	30
1.2.5. Factores que influyen en la respuesta inmunitaria del organismo.	32
1.3. MICROBIOTA INTESTINAL DE ADULTOS SANOS.....	34
1.3.1. Importancia de la microbiota para la salud	34
1.3.2. Concepto de microbiota intestinal sana: composición y funcionalidad.	34
1.4. INTERACCIÓN DIETA-MICROBIOTA INTESTINAL-SISTEMA INMUNITARIO.....	36
1.5. PROBIÓTICOS.....	39
1.5.1. Historia de los probióticos.	39
1.5.2. Requisitos que debe cumplir un probiótico y formas de administración	40
1.5.3. Principales efectos asociados al consumo de probióticos y mecanismos de acción.....	41
1.5.3.1. Capacidad inmunorreguladora.....	42
a) Inhibición del crecimiento de patógenos.....	42
b) Integridad de barrera intestinal	42
c) Estimulación del sistema inmunitario innato y adaptativo: Mecanismos y evidencia en adultos sanos.....	43

1.5.3.2. Capacidad de modulación sobre la microbiota intestinal: Evidencia en adultos sanos.....	49
1.5.4. <i>Lactobacillus coryniformis</i> CECT5711: evidencia previa.....	54
1.6. YOGURES.....	55
1.6.1. Generalidades	55
1.6.2. Principales beneficios asociados al consumo de yogur	56
1.6.3. Ingredientes del yogur con efectos sobre el metabolismo, la inflamación y la microbiota intestinal	57
1.6.4. Evidencia actual de los efectos del consumo de yogur en adultos sanos.....	59
2. OBJETIVOS.....	63
3. METODOLOGÍA	67
3.1. Estudio Pro-L-cory	69
3.2. Estudio Almicrobhol.....	72
3.3. Estudio O-yogur	75
4. RESULTADOS	79
4. 1. ESTUDIOS REALIZADOS.....	81
4.1.1. <i>Evaluation of Lactobacillus coryniformis</i> CECT5711 strain as a coadjuvant in a vaccination process: a randomised clinical trial in healthy adults.....	81
4.1.2. <i>Associations of Probiotic Fermented Milk (PFM) and Yogurt Consumption with Bifidobacterium and Lactobacillus Components of the Gut Microbiota in Healthy Adults</i>	99
4.1.3. <i>Effects of ewe’s milk yogurt (whole and semi-skimmed) and cow’s milk yogurt on inflammation markers and gut microbiota of subjects with borderline-high plasma cholesterol levels: a crossover study.</i>	127
4.2. DATOS INÉDITOS.....	147
4.2.1. Evaluación de la actividad inmunitaria innata tras el consumo de la cepa probiótica <i>Lactobacillus coryniformis</i> CECT5711.....	147
4.2.2. Funcionalidad de la microbiota y su relación con el consumo de probióticos y yogures.....	147
4.2.2.1. Relación entre el consumo de LFP, los niveles de AGCC y otros parámetros de funcionalidad intestinal.	147
4.2.2.2. Relación entre el consumo de yogures, los niveles de AGCC y otros parámetros de funcionalidad intestinal.	149
.....	152

.....	152
4.2.3. Relación entre el consumo de yogures, el estilo de vida, la composición corporal y el patrón dietético.....	152
4.2.3.1. Consumo de yogures, estilo de vida y composición corporal	152
4.2.3.2. Consumo de yogures y patrón dietético	154
5. <i>DISCUSIÓN INTEGRADORA</i>	165
6. <i>CONCLUSIONES</i>	177
6.1. Conclusiones específicas	179
6.2. Conclusión global.....	180
7. <i>REFERENCIAS</i>	181
ANEXO I.....	199

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Principales tipos de citoquinas.....	28
Tabla 2. Estudios de intervención doble ciego controlados por placebo realizados en adultos sanos con el objetivo de evaluar la capacidad inmunomoduladora derivada del consumo de probióticos.	45
Tabla 3. Estudios de intervención doble ciego controlados por placebo realizados en adultos sanos con el objetivo de evaluar la capacidad coadyuvante de los probióticos en modelos de vacunación.	48
Tabla 4. Estudios de intervención realizados en adultos sanos con el objetivo de evaluar la capacidad moduladora de los probióticos sobre la composición de la microbiota intestinal.....	51
Tabla 5. Estudios de intervención realizados en adultos sanos con el objetivo de evaluar los efectos sobre la inflamación y la microbiota intestinal derivados del consumo de yogur.	61
Tabla 6. Principales características de los estudios incluidos en la presente tesis doctoral.	78
Tabla 7. Actividad fagocítica de granulocitos y monocitos (%) al comienzo de la intervención (V1) y después de 2 semanas (V2) y 6 semanas (V3) de intervención en todos los grupos.	147
Tabla 8. Niveles de AGCC entre grupos según consumo de LFP.....	148
Tabla 9. Niveles de AGCC según el tipo de LFP consumida.	148
Tabla 10. Niveles de AGCC según cantidad de LFP consumida.	148
Tabla 11. Parámetros de funcionalidad intestinal en hombres y mujeres de los diferentes grupos de consumo de LFP.	149
Tabla 12. Niveles de AGCC entre los diferentes grupos de consumo de yogur.....	150
Tabla 13. Parámetros de funcionalidad intestinal en hombres y mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur.....	151
Tabla 14. Características demográficas, antropométricas y de estilo de vida en hombres y mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur.....	153
Tabla 15. Características del patrón dietético en hombres y mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur.	157
Tabla 16. Niveles de especies de <i>Lactobacillus</i> en heces de voluntarios del estudio Almicrobol.....	199

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Factores que influyen en la producción de anticuerpos específicos.....	47
Figura 2. Factores que influyen en la respuesta del sistema inmunitario y la microbiota intestinal al consumo de probióticos y yogures.....	54
Figura 3. Diseño experimental del estudio Pro-L-cory	69
Figura 4. Diagrama de flujo de los participantes del estudio Pro-L-cory	71
Figura 5. Distribución de los sujetos en los diferentes grupos de leches fermentadas con probióticos (LFP) del estudio Almicrobhol	73
Figura 6. Diseño experimental del estudio O-yogur.....	76
Figura 7. Mapa de correlaciones entre bacterias intestinales relacionadas con el consumo de yogur y los parámetros intestinales estudiados	152
Figura 8. Número de yogures consumidos en hombres y mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur.....	154
Figura 9. Contribución de los diferentes tipos de yogur al total de yogures consumidos en hombres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Test de Friedman de muestras relacionadas. *Test de Bonferroni.	155
Figura 10. Contribución de los diferentes tipos de yogur al total de yogures consumidos en mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Test de Friedman de muestras relacionadas. *Test de Bonferroni.....	155
Figura 11. Consumo de lácteos (g/día) en hombres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni.....	159
Figura 12. Consumo de lácteos (g/día) en mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni.....	159
Figura 13. Consumo de yogures (g/día) en hombres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni.....	159
Figura 14. Consumo de yogures (g/día) en mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni.....	159
Figura 15. Consumo de cereales integrales (g/día) en hombres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni.....	160
Figura 16. Consumo de frutas (g/día) en mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni.....	160
Figura 17. Consumo de verduras (g/día) en mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni.....	160
Figura 18. Consumo de embutidos (g/día) en mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni.....	160
Figura 19. Mapa de correlaciones entre los diferentes tipos de yogur con parámetros dietéticos, de funcionalidad intestinal y determinados grupos de la microbiota intestinal en hombres.....	162

Figura 20. Mapa de correlaciones entre los diferentes tipos de yogur con parámetros dietéticos, de funcionalidad intestinal y determinados grupos de la microbiota intestinal en mujeres 163

RESUMEN

RESUMEN

Introducción: La población adulta sana incluye adultos aparentemente sanos sin enfermedades crónicas diagnosticadas, lo cual no implica que en un determinado momento no puedan padecer alteraciones subclínicas e indetectables que vayan asociadas a desórdenes metabólicos y afecten al mantenimiento de su salud a largo plazo. En este sentido, el estilo de vida, y en concreto, la dieta, el ejercicio físico y el estrés pueden conducir a un deterioro en el sistema inmunitario y a la aparición de una disbiosis intestinal, favoreciendo con ello el desarrollo de enfermedades relacionadas, como las alergias, infecciones y alteraciones intestinales, así como desórdenes inflamatorios como las dislipemias. Por este motivo, los estudios nutricionales en población sana se centran en el estudio de nutrientes o ingredientes específicos con un enfoque preventivo frente al desarrollo de enfermedades crónicas y hacia el mantenimiento de la salud a largo plazo, ampliando su espectro de acción más allá de patologías concretas. Existe una amplia evidencia de las propiedades moduladoras de las leches fermentadas y los yogures sobre el sistema inmunitario y la microbiota intestinal. Sin embargo, la gran redundancia y homeostasis que caracteriza el sistema inmunitario de adultos sanos, así como la falta de un consenso claro acerca de cómo debe ser la composición de la microbiota intestinal sana, hace complicado poder extraer conclusiones claras de los estudios nutricionales. **Objetivo:** Evaluación de los efectos del consumo de probióticos y yogures sobre el sistema inmunitario y la microbiota intestinal de adultos sanos. Dicho objetivo se ha estudiado en 3 proyectos diferentes con los siguientes objetivos principales: 1) Estudio Pro-L-cory: Evaluación del efecto de la cepa probiótica *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 sobre el sistema inmunitario de adultos sanos a través del estudio de su capacidad coadyuvante en un modelo de vacunación; 2) Estudio Almicrobhol: Evaluación de la relación del consumo de leches fermentadas con probióticos y de yogures con los grupos bacterianos de la microbiota intestinal relacionados con las bacterias ingeridas en adultos sanos; 3) Estudio O-yogur: Evaluación de los efectos del consumo de yogur de vaca, oveja entero y semidesnatado sobre marcadores de inflamación y la microbiota intestinal de adultos sanos con niveles al límite o ligeramente altos de colesterol plasmático. **Resultados:** El consumo de la cepa probiótica *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 (Lc) dos semanas antes de recibir la vacuna de la Hepatitis A parece preparar de una forma más efectiva al sistema inmunitario que su consumo después de la vacunación, ya que aumenta de forma más significativa los niveles de anticuerpos específicos en sangre en comparación con el grupo placebo, sugiriendo así su posible papel como coadyuvante en un proceso de vacunación. Por otra parte, el consumo de Lc durante 6 semanas se relacionó con una mejora en la memoria inmunológica al observarse niveles más elevados de linfocitos T colaboradores de memoria en comparación con los niveles basales. Por otro lado, el consumo de leches fermentadas con probióticos (LFP) de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* y de yogur clásico no se relacionó con la composición global de la microbiota intestinal ni con parámetros de funcionalidad intestinal de adultos sanos. Sin embargo, los niveles de Bifidobacterias fueron más altos en el grupo de consumidores de LFP en comparación con el grupo de no consumidores. En concreto, el consumo de LFP con *Lactobacillus* se relacionó con niveles más elevados de Actinobacteria, *Bifidobacteriaceae* y *Bifidobacterium* y dos de las especies más abundantes en adultos sanos, *B. longum* y *B. kashiwanohense*, sugiriendo una posible modulación positiva de las bacterias

comensales autóctonas del intestino, mientras que el consumo de LFP con *Bifidobacterium* se relacionó con niveles más elevados de la especie presente en el producto, *B. animalis*. Por otro lado, el consumo de ≥ 5 yogures/semana se relacionó con niveles más elevados de *Streptococcus thermophilus* en comparación con los no consumidores, así como de la familia *Streptococaceae*. Los efectos sobre la microbiota intestinal y marcadores de inflamación derivados del consumo de yogur entero de vaca, oveja entero y semidesnatado no fueron diferentes en adultos sanos con niveles al límite o ligeramente altos de colesterol plasmático. Sin embargo, el yogur de oveja entero produjo una atenuación en los niveles de la molécula de adhesión vascular (ICAM)-1 y P-selectina en el subgrupo de sujetos con los niveles más elevados del cociente colesterol total/HDL en comparación con el yogur de vaca y semidesnatado. Así mismo, se observó el mismo efecto sólo en mujeres de este grupo en los niveles de la proteína quimiotáctica de monocitos (MCP)-1, así como de *Eubacterium rectale-Blautia coccooides* en comparación con el yogur de oveja semidesnatado. Conclusiones: el consumo de probióticos y yogures en población adulta sana no se asocia con grandes cambios en la microbiota intestinal ni en parámetros inmuno-inflamatorios. Sin embargo, en situaciones concretas, tales como la provocación de respuestas específicas como el modelo de vacunación utilizado en la presente tesis doctoral, o el estudio de población adulta sana con un determinado perfil metabólico de riesgo, es posible observar una modulación en ciertos parámetros, como el aumento de anticuerpos específicos observado tras el consumo diario durante 2 semanas de la cepa probiótica *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 (3×10^9 ufc/día) o la atenuación en marcadores de inflamación observada tras el consumo de 2 yogures de oveja entero al día. Los resultados del estudio observacional sugieren que el consumo de leches fermentadas con probióticos, en concreto, de la especie *Lactobacillus*, podría ser beneficioso para la salud inmunitaria e intestinal del huésped al relacionarse con niveles más elevados de Bifidobacterias.

SUMMARY

SUMMARY

The concept of “healthy adults” includes people in an apparently good health situation without diagnosed chronic diseases. However, the absence of clinical symptoms does not imply that metabolic disturbances are not present, affecting health preservation and leading to chronic diseases development in the long term. In this context, the worsening of lifestyle habits worldwide, characterized by poor diets, physical inactivity, lack of sleep or chronic stress, are usually accompanied by immune impairment and intestinal dysbiosis, events related to allergies, infections and certain intestinal alterations, as well as metabolic disturbances such as dyslipidemias. That is why nutritional studies are focused on specific nutrients or ingredients as preventive measures against chronic diseases development and to allow health maintenance in a long term, as well as to broaden the target of action of these products beyond specific pathologies. In this respect, yogurt and fermented milks (FM) consumption have been historically associated to longevity due to their properties in the modulation of the immune system and gut microbiota. However, the fact that the immune system possesses a high redundancy, meaning that the loss of functionality of one component or pathway is compensated by another, as well as the lack of a clear consensus of what a healthy gut microbiota composition should be, complicates to draw clear conclusions derived from nutritional studies. **Objectives:** Evaluation of the effects of probiotic and yogurt consumption on the immune system and the gut microbiota of healthy adults. This objective has been addressed in three different projects with the following primary goals: 1) Pro-L-cory study: To evaluate the effects of the probiotic strain *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 on the immune system of healthy adults, in particular, the analysis of the adjuvant ability in a vaccination model; 2) Almicrobol study: To evaluate the relationship of probiotic fermented milks (PFM) and yogurts intake with the levels of bacterial groups related to the ingested bacteria in healthy adults; 3) O-yogurt study: To evaluate the effects of cow’s milk yogurt and whole and semi-skimmed ewe’s milk yogurts on inflammation and the gut microbiota composition of apparently healthy adults with borderline-high plasma cholesterol levels. **Results:** The intake of the probiotic strain *L. coryniformis* CECT5711 (Lc) 2 weeks before the Hepatitis A vaccine seems to be more effective than its continuous intake 4 weeks after the vaccine, as observed in the increased specific antibody titers compared to the placebo group, suggesting its possible role as a coadjuvant agent. In addition, the intake of Lc during 6 weeks improved the immunological memory as observed in the higher memory T helper lymphocytes levels compared to basal values. On the other hand, the second study revealed that probiotic fermented milks (PFM) and yogurt intake showed a limited effect on the overall gut microbiota composition and functionality of healthy adults. However, the intake of probiotic *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* species in fermented milks was related to higher levels of Bifidobacteria compared to non-PFM consumers. Specifically, the intake of PFM with *Lactobacillus* was related to higher Actinobacteria, *Bifidobacteriaceae* and *Bifidobacterium* levels, as well as with the abundant species *B. longum* and *B. kashiwanohense*, suggesting a positive role in the modulation of commensal bacteria, whereas the intake of PFM with *Bifidobacterium* was positively related to higher levels of *B. animalis*, the specific species present in the product. Regarding yogurt, higher levels of *Streptococcus thermophilus* were observed in high consumers (≥ 5 yogurts/week) compared to

non-consumers, with similar findings for the *Streptococaceae* family. Cow's versus ewe's milk yogurt consumption during 5 weeks did not differentially affect the gut microbiota or inflammatory status of apparently healthy adults with borderline-high cholesterol levels, but subjects with the highest total cholesterol/HDL-c ratio showed an attenuation of vascular adhesion molecule (ICAM)-1 and P-selectin after whole ewe's yogurt intake compared to semi-skimmed yogurt and cow's milk yogurt respectively, as well as lower levels of monocyte chemoattractant protein (MCP-1) and *Eubacterium rectale-Blautia coccoides* compared to semi-skimmed ewe's milk yogurt only in women of this group. Conclusions: Probiotic and yogurt intake in healthy adults is not associated to major changes in the gut microbiota and inflammatory biomarkers. However, under certain situations such as immune challenges as the vaccination model used in the first work, or the study of susceptible healthy adults with a particular metabolic profile, could provide more insights into the role of probiotics and yogurt in this field. Indeed, an increase in specific antibodies titers were observed after the intake of *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 (3×10^9 ufc/d) two weeks before the vaccine, as well as the attenuation of several inflammatory biomarkers after the intake of 2 units of whole ewe's milk yogurt during 5 weeks in subjects with a high total cholesterol/HDL-c ratio. The observational study revealed that the intake of probiotic fermented milk with *Lactobacillus* might be beneficial as observed in the higher Bifidobacteria levels, which are well-known immunomodulatory bacteria.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
AG	Ácidos grasos
AGCC	Ácidos grasos de cadena corta
AGCL	Ácidos grasos de cadena larga
AGCM	Ácidos grasos de cadena media
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
BAL	Bacterias Ácidolácticas
BCR	Receptor de células B
CFCA	Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos
CLA	Ácido linoleico conjugado
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
CPA	Células presentadoras de antígenos
CV	Cardiovascular
DMSO	Dimetil sulfóxido
DHA	Docosahexanoico
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
EPA	Eicosapentanoico
FAO	Organización de las Naciones Unidas para los Alimentación y la Agricultura
FISH	Hibridación fluorescente <i>in situ</i>
GI	Gastrointestinal
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular 1
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulinas
IL	Interleuquina
IL-1ra	Antagonista del receptor para IL-1
IMC	Índice de Masa Corporal
ISAPP	Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos
LBP	Proteína de unión a LPS
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LFP	Leches fermentadas con probióticos
LPS	Lipopolisacárido
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
MCP-1	Proteína quimiotáctica de monocitos
MHC	Moléculas del complejo de histocompatibilidad
NF	Factor nuclear
NK	Natural Killer
OMS	Organización Mundial de la Salud
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHA	Fitohemaglutinina
PMN	Polimorfonucleares
RADP	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
RIQ	Rango Intercuartil

RCP	Proteína C Reactiva
RRP	Receptores de reconocimiento de patrones
TCR	Receptor de células T
TGF	Factor de crecimiento transformante
TLR	Receptores tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
Treg	Células T reguladoras
UFC	Unidades formadoras de colonia
URTI	Infecciones del tracto respiratorio superior
UTO	Unidad taxonómica operativa
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1. POBLACIÓN DIANA: ADULTOS SANOS.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha definido el concepto de salud como “un estado de completo bienestar físico, mental y social y no solo la ausencia de enfermedad” (1). Un estado óptimo de salud conlleva una adecuada conexión entre los diferentes genes, células y tejidos que forman parte de nuestros procesos internos, tales como el metabolismo, el estrés oxidativo, la inflamación y el estrés psicológico, y una adecuada adaptación fisiológica entre ellos con el objetivo de mantener la homeostasis interna, por lo que cualquier desequilibrio entre ellos puede alterar dicha homeostasis y con ello conducir al desarrollo de enfermedades. La nutrición juega un papel fundamental en la modulación de estos procesos (2). En este sentido, el cáncer de colon está determinado en un 5% por mutaciones genéticas (3), pero la mayor parte de los casos se producen por una alteración en la interacción entre los genes y la dieta. Así mismo, la dieta puede modular la interacción entre las bacterias intestinales y las células epiteliales, pudiendo desencadenar un medio intestinal pro-cancerígeno y promover el desarrollo de la enfermedad si la alimentación no es la adecuada (4).

La población adulta sana incluye adultos aparentemente sanos sin enfermedades crónicas diagnosticadas, lo cual no significa que en un determinado momento no puedan padecer enfermedades subclínicas e indetectables que puedan ir asociadas a desórdenes metabólicos y puedan afectar al mantenimiento de su salud a largo plazo (5). Como se ha mencionado anteriormente, el estilo de vida juega un papel fundamental, destacando la dieta, el ejercicio físico y el estrés como factores determinantes relacionados con el desarrollo de enfermedades crónicas no transmisibles (6) y que con frecuencia comienzan con desórdenes metabólicos asintomáticos (7). En concreto, las dietas desequilibradas ricas en azúcares y grasas refinadas, el sedentarismo y el exceso de estrés crónico suelen ir acompañadas de un deterioro en el sistema inmunitario y el desarrollo de una disbiosis, o lo que es lo mismo, un desequilibrio en la proporción de grupos bacterianos presentes en la microbiota intestinal, favoreciendo con ello el riesgo de desarrollar alergias, infecciones, alteraciones a nivel gastrointestinal (GI) como el estreñimiento o el aumento de síntomas intestinales, así como alteraciones metabólicas, destacando la diabetes tipo 2 o las dislipemias, que conducen a un deterioro en la calidad de vida de la población y predisponen al desarrollo de enfermedades crónicas (8). Con todo lo dicho previamente, estudiar la situación del sistema inmunitario y de la microbiota intestinal en adultos sanos y su modulación a través de nutrientes o ingredientes específicos, utilizando los biomarcadores adecuados, puede ser un abordaje muy útil en la prevención de enfermedades relacionadas con los hábitos de estilo de vida, con el objetivo de promover con ello el retraso del envejecimiento, estudiado como la pérdida de la funcionalidad óptima de los sistemas y órganos corporales.

1.2. SISTEMA INMUNITARIO DE ADULTOS SANOS

Desde el nacimiento nos encontramos expuestos a multitud de agentes infecciosos y cancerígenos, a los cuales nos enfrentamos gracias a nuestro sistema inmunitario, formado por células y moléculas capaces de reconocer y eliminar los agentes nocivos mediante el desarrollo de una correcta respuesta mediada a través de la inmunidad innata y adquirida, las cuales a su vez están interconectadas entre sí para trabajar de forma integrada.

1.2.1. Sistema inmunitario innato: características.

El sistema inmunitario innato es el conjunto de células y moléculas con las que primero se encuentra un agente externo al entrar en el organismo tras atravesar las barreras físicas (piel y mucosas), químicas (productos de los epitelios y enzimas) y biológicas (microbiota intestinal). La respuesta inmunitaria innata es la primera respuesta efectora que impide la infección en el hospedador, bien de forma directa ejecutando sus mecanismos efectores, o de forma indirecta estimulando la actividad de las células de la respuesta inmunitaria específica. Las células del sistema inmunitario innato presentan varias características: 1) carecen de especificidad frente al antígeno del agente externo, de ahí el hecho de que se la denomine inespecífica. A pesar de no tener especificidad, sí reconocen los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) de los microorganismos, como el lipopolisacárido (LPS), la flagelina o el peptidoglicano presentes en la pared celular, gracias a sus receptores de reconocimiento de patrones (RRP) como los receptores tipo Toll (TLR), produciéndose así una interacción que parece ser esencial para los mecanismos de regulación inmunitaria (9). En concreto, durante este reconocimiento se desencadenan mecanismos de señalización intracelulares que promueven la producción de mediadores como las citoquinas, por lo que cualquier alteración a este nivel puede conducir al desarrollo de patologías; 2) Es una respuesta rápida que no requiere de expansión clonal y en cuestión de minutos es capaz de haber eliminado al agente infeccioso (10).

1.2.1.1. La inflamación

La primera reacción de la inmunidad innata a un agente externo es la inflamación, caracterizada por enrojecimiento, calor, hinchazón y dolor en el sitio de infección. Esto se produce debido al aumento del flujo vascular, que permite así una mayor entrada de células sanguíneas al foco de infección, a una activación de las células endoteliales y la consiguiente expresión de moléculas de adhesión que facilitan la unión de los leucocitos circulantes, y a la acumulación de fagocitos y macrófagos en el sitio de infección, los cuales, gracias a la liberación de citoquinas y quimioquinas, en concreto de citoquinas de respuesta de fase aguda como la interleuquina (IL)-1, IL-6 y el factor de necrosis tumoral (TNF)- α , favorecen la reacción global coordinada de todo el organismo frente a la infección. También se activa la coagulación de la sangre, impidiendo la diseminación de la infección por el torrente circulatorio. Todos estos factores, junto con las proteínas del complemento, los basófilos y mastocitos, las cuales promueven una mayor activación del resto de células inmunitarias y de las células endoteliales, facilitan que se generen las condiciones idóneas para la erradicación del agente infeccioso.

La respuesta inflamatoria comprende una serie de etapas:

- 1) Interacción inicial: los leucocitos interactúan con las células endoteliales del epitelio, uniéndose mediante selectinas y sus ligandos glicoproteicos.
- 2) Rodamiento: desplazamiento de los leucocitos sobre el endotelio gracias a la interacción de carácter débil que se produce mediante selectinas (L en el caso de los leucocitos y P y E en el caso del endotelio). Las selectinas tienen un dominio extracelular de tipo lectina que es vital para la unión de neutrófilos y linfocitos al endotelio.
- 3) Adhesión: las uniones son más fuertes debido a que se encuentran en el medio ya los marcadores de inflamación, y el endotelio ya activado pasa a expresar otro tipo de moléculas de adhesión en su superficie, como las de tipo inmunoglobulinas (Ig), denominadas molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1 y molécula de adhesión vascular (VCAM)-1. De esta forma los leucocitos quedan firmemente adheridos al epitelio.
- 4) Diapédesis: migración de los leucocitos a través de la monocapa de células epiteliales, durante la cual se producen cambios en su morfología y funcionalidad, como es el caso de los monocitos que se transforman en macrófagos.
- 5) Quimiotaxis: proceso a través del cual los leucocitos atraviesan la lámina basal de las células epiteliales, alcanzando el foco infeccioso.

1.2.1.2. Células y moléculas efectoras del sistema inmunitario innato

El sistema inmunitario innato está formado tanto por células como por moléculas efectoras. Dentro de las células efectoras, se encuentran los fagocitos, que se dividen en polimorfonucleares (PMN) o neutrófilos, y en mononucleares, como los monocitos y macrófagos. Todas ellas se activan de forma inmediata al encontrarse con el antígeno para desarrollar su actividad fagocítica, es decir, la internalización del antígeno en su interior celular y posterior degradación. También se encuentran las células *natural killer* (NK), que presentan la capacidad de destruir un amplio espectro de agentes infecciosos sin necesidad de activación previa, a pesar de que ciertas citoquinas como la IL-12, TNF- α e interferón (IFN)- γ estimulan su activación. Estas citoquinas también son producidas por ellas mismas estimulando así otras células importantes para erradicar tumores y agentes infecciosos, cumpliendo de esta forma no solo una función citotóxica sino también reguladora. El mecanismo que emplean es la liberación de ciertas proteínas como las perforinas y granzimas que actúan produciendo la apoptosis de la célula diana. Las células dendríticas también forman parte de la inmunidad innata y se consideran células presentadoras de antígenos (CPA) profesionales, que gracias a sus dendritas, actúan como sensores en la detección de antígenos proteicos, los cuales integran y presentan a los linfocitos T y B. Dentro de las moléculas efectoras o componentes humorales del sistema inmunitario innato destacan las proteínas del complemento y las citoquinas (10).

1.2.1.3 Citoquinas: intermediarios entre la inmunidad innata y específica.

Las citoquinas son proteínas cuya principal función es estimular la interacción y comunicación entre células mediante procesos de señalización, crecimiento y activación celular. Las citoquinas pueden dividirse en interleuquinas y quimioquinas, siendo estas últimas citoquinas con capacidad de quimiotaxis. Son producidas principalmente por linfocitos T colaboradores y macrófagos, aunque también por otras células como las células NK. Las citoquinas son redundantes en su actividad, lo cual quiere decir que una misma función puede ser llevada a

cabo por diferentes citoquinas. Suelen clasificarse en diferentes perfiles: tipo Th1 o celular, tipo Th2 o humoral y tipo Th17 o regulador. En la respuesta inmunitaria innata se producen citoquinas pro-inflamatorias principalmente por macrófagos, destacando IL-1 β , TNF- α e IFN- γ , y a su vez, con el objetivo de mantener controlada la inflamación frente al agente externo, se liberan citoquinas anti-inflamatorias o reguladoras como la IL-10 o las citoquinas de la familia del factor de crecimiento transformante (TGF)- β (11). En la tabla 1 se especifican las características de cada una de ellas.

Tabla 1. Principales tipos de citoquinas

Citoquina	Origen	Tipo de respuesta
IL-1	Monocitos y macrófagos	Th1
IL-2	Linfocitos T activados, células NK	Th1
IL-4	Linfocitos T activados, mastocitos, basófilos	Th2
IL-5	Linfocitos T activados	Th2
IL-6	Linfocitos T activados, macrófagos, linfocitos B	Th1
IL-8	Monocitos y macrófagos	Th1
IL-10	Linfocitos T activados, monocitos	Th2
IL-12	CPA, monocitos y macrófagos	Th1
IL-13	Linfocitos T activados	Th2
IL-17	Linfocitos T activados	Th17
IFN- γ	Linfocitos T activados, células NK	Th1
TNF- α	Macrófagos activados, linfocitos T activados, células NK	Th1

CPA: Células presentadoras de antígenos; TNF: Factor de necrosis tumoral; IFN: Interferón; IL: Interlequina; NK: Natural killer

Adaptado de (10).

1.2.2. Sistema inmunitario específico.

El sistema inmunitario específico está formado por células efectoras, los linfocitos T y B, y moléculas efectoras, las Igs o anticuerpos producidos por los linfocitos B. Los linfocitos procedentes de los tejidos linfoides primarios (médula ósea o timo) llegan a los tejidos linfoides secundarios (ganglios linfáticos, bazo y tejido linfoide asociado a mucosas [MALT]) donde interactúan a través de sus receptores específicos (receptores TCR y BCR, respectivamente) con los antígenos presentados por las CPA. Los linfocitos T y B reconocen los antígenos presentados por las células dendríticas y los macrófagos, mientras que los linfocitos T también pueden reconocer los antígenos presentados por linfocitos B ya activados.

Linfocitos T

El primer paso en la respuesta inmunitaria es el reconocimiento del antígeno. En el caso de los linfocitos T, se encuentran por un lado los linfocitos T CD4⁺ colaboradores, que reconocen los péptidos antigénicos presentes en las CPA asociados a moléculas del complejo de histocompatibilidad (MHC) de clase II y por otro lado, los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos que reconocen péptidos asociados a MHC de clase I. Este proceso se produce gracias a la acción de ciertas moléculas accesorias co-estimuladoras, como CD8 o CD4 presentes en la membrana del linfocito, que favorecen el proceso de sinapsis inmunitaria, es decir, el contacto entre ambas células. Tras el reconocimiento establecido entre el complejo péptido-MHC y el TCR, se produce

la activación de los linfocitos T y esta información se transmite al interior de la célula, produciendo una adhesión más fuerte entre ellas.

Una vez activados, los linfocitos T se diferencian y proliferan a linfocitos T efectores, de los cuales una parte permanecen como linfocitos T de memoria, que quedan activos por si se produjera una segunda exposición al antígeno de forma que se activaría la respuesta inmunitaria sin necesidad de coestimulación. Los linfocitos T efectores se caracterizan por tener unos determinados marcadores de activación y secretar las moléculas necesarias para ejercer sus funciones como linfocitos colaboradores o citotóxicos. Los linfocitos T CD4⁺ colaboradores tienen como principal función activar a los linfocitos B mediante la secreción de citoquinas, y los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos eliminan células infectadas por virus mediante apoptosis, destruyendo tanto el ADN de la célula infectada como el del propio virus intracelular, evitando con ello la expansión de la infección. En cuanto a los linfocitos T colaboradores, el linfocito parte de un estadio Th0 en su proceso de diferenciación, y se convertirá en tipo Th1 o Th2 en función de las señales recibidas en la fase de reconocimiento antigénico. En este proceso influye: 1) la naturaleza del antígeno, ya que los antígenos intracelulares desencadenan respuestas de tipo Th1, mientras que los extracelulares generan respuestas de tipo Th2; 2) la cantidad de antígeno; 3) el tipo de citoquinas de la inmunidad innata presentes (IFN- γ de las células NK e IL-12 de los macrófagos); 4) el tipo de CPA (los macrófagos inducen respuestas Th1 y los linfocitos B respuestas Th2). Una vez diferenciados en linfocitos Th1 o Th2, se inducirá un tipo de respuesta u otra. La respuesta Th1 es una inmunidad mediada principalmente por células y las citoquinas liberadas activan a macrófagos, células NK y linfocitos T citotóxicos, mientras que la respuesta Th2 es una inmunidad humoral que activa a linfocitos B y eosinófilos.

Linfocitos B

Los linfocitos B son las células que median la inmunidad humoral cuya principal función es producir anticuerpos necesarios para destruir los antígenos extracelulares. La mayoría de las respuestas de anticuerpos requieren también la participación de los linfocitos T colaboradores, induciendo así una respuesta muy específica y la producción de anticuerpos de diferentes isotipos (IgG, IgE, IgM e IgA), explicado en más detalle en el apartado 1.2.4.1.

1.2.3. Características del sistema inmunitario de adultos sanos: Homeostasis y redundancia inmunitaria

El análisis de la funcionalidad del sistema inmunitario de adultos sanos resulta un desafío en los estudios nutricionales debido a la redundancia y homeostasis que le caracteriza. Por un lado, tener redundancia implica que existen diferentes tipos de células inmunitarias que ejercen el mismo efecto, o bien estimulando o inhibiendo ciertas respuestas, por lo que un cambio en la respuesta funcional de una célula puede ser compensado por la actividad de otra célula. Además, el organismo humano presenta una gran resiliencia, o capacidad para volver a la situación basal de equilibrio tras un cambio (12). Esto quiere decir que, mientras que para individuos con respuestas inmunitarias deficitarias, la mejora de un marcador puede conllevar un beneficio clínico, no está claro hasta qué punto un cambio en un marcador inmunitario en sujetos sanos puede ser indicador de una función inmunitaria deteriorada y con ello de un

resultado a nivel clínico (13). Además, ciertos estudios han revelado que existe una gran variabilidad en los biomarcadores del sistema inmunitario de adultos sanos y que varían en un intervalo muy amplio considerado como "normal" (14). Por ejemplo, los linfocitos B varían en un rango de 4-69%, los linfocitos T CD4+ en un rango de 22-90% y los linfocitos T CD8+ en un rango entre 6-65%. Esto sugiere que el sistema inmunitario probablemente emplee mecanismos de homeostasis y redundancia para mantener el equilibrio composicional y funcional, este último incluso en sujetos con valores extremos (15).

1.2.4. Biomarcadores en adultos sanos

Como se ha comentado previamente, la búsqueda de biomarcadores útiles en población sana podría ayudar en la detección de desórdenes metabólicos que podrían ser indicadores del inicio de enfermedades crónicas no transmisibles, cada vez más frecuentes en nuestra sociedad. El principal inconveniente que presentan es que suelen medirse en situación de reposo, y no refleja la situación más adecuada para valorar la capacidad de respuesta a agentes nocivos (2). Esto unido a la gran variabilidad que existe entre individuos sanos en el intervalo de valores "normales", hace que los biomarcadores medidos en situaciones de homeostasis no proporcionen información valiosa y sea aconsejable utilizar aquellos medidos tras someter al organismo a una perturbación externa, como puede ser el test de glucosa oral, o bien la estimulación con LPS bacteriano o con una vacunación para estudiar la funcionalidad del sistema inmunitario.

1.2.4.1. Respuesta inmunitaria a la vacunación

De acuerdo a lo anteriormente expuesto, el estudio de la funcionalidad del sistema inmunitario en adultos sanos en situaciones en las que no existe una infección probablemente no proporcionará información valiosa acerca de biomarcadores que reflejen una mejora de la salud del individuo. Es por ello que la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) ha reconocido el uso de protocolos de vacunación como un método eficaz para evaluar la respuesta inmunitaria de adultos sanos frente a una estimulación externa. En este sentido, el aumento en el título de anticuerpos específicos tras una vacunación puede utilizarse para justificar una declaración de salud relacionada con la defensa frente a patógenos (16). En una vacunación hay un mayor control tanto del tipo como de la cantidad de antígeno a la que nos exponemos, así como de la duración de la exposición, aspectos que durante una infección natural son incontrolables e impredecibles (17).

Como se ha mencionado, la protección aportada por una vacuna es un proceso complejo que requiere tanto el aumento inicial del título de anticuerpos específicos del virus de la vacuna en sangre, como la creación de una memoria inmunológica que ayudará en la protección frente a futuros contactos con el virus. Estos son requisitos que determinarán la eficacia de la vacuna en la protección frente a futuras infecciones (18). En este proceso, las células y moléculas efectoras son principalmente los linfocitos B productores de anticuerpos específicos del antígeno del virus, los cuales neutralizan su acción uniéndose de forma específica a los mismos. Los linfocitos T CD8+ citotóxicos que participan eliminando células ya infectadas, y los linfocitos T CD4+ colaboradores que estimulan la actividad de los linfocitos B gracias a la secreción de citoquinas, ejercen un papel determinante en el proceso de protección de una vacuna (19,20). El

perfil de citoquinas liberado por las células T colaboradoras en un proceso viral suele ser principalmente de tipo Th1, liberando IFN- γ y TNF- α , las cuales inducirán la activación de linfocitos T CD8+ y de linfocitos B. Dentro de los linfocitos T CD4+, se han identificado un subtipo presente en los centros germinales de los nódulos linfáticos, denominadas células T colaboradoras foliculares, que ejercen un papel esencial en la transformación de linfocitos B a células plasmáticas productoras de anticuerpos (21). La actividad de estas células efectoras está controlada por la acción de células T reguladoras que mantienen y regulan la respuesta del sistema inmunitario y son las encargadas de mantener los procesos de tolerancia inmunitaria. Es importante tener en cuenta que la variable que determina la eficacia de una vacuna es la producción de células o anticuerpos específicos del virus por encima de un determinado umbral y que las células intermediarias, como son los linfocitos T, B o las citoquinas, no representan marcadores de protección inmunitaria frente al virus (22).

Más concretamente, la respuesta del sistema inmunitario a una vacuna comienza con una inflamación local, que atrae al foco de inflamación a células dendríticas inmaduras que circulan en la sangre periférica, las cuales, tras reconocer el antígeno de la vacuna a través de los TLR, se activan aumentando la expresión de receptores en su superficie y liberan al medio citoquinas y quimioquinas que atraen al foco de inflamación un gran número de macrófagos y monocitos. Una vez activadas, viajan a los nódulos linfoides para presentar el antígeno viral a los linfocitos T colaboradores o a los linfocitos B presentes en los mismos. Si la estimulación se produce fuera de los centros germinales del nódulo linfoide, en un proceso conocido como reacción extrafolicular, las células dendríticas y los linfocitos T ya activados interactúan con los linfocitos B naïve, activándoles y estos se transforman en células plasmáticas productoras de anticuerpos de baja afinidad (IgM e IgG). En paralelo, algunos de los linfocitos B activados migran a los centros germinales del nódulo, donde al interactuar con las células dendríticas y células T colaboradoras foliculares, comenzarán el proceso de expansión clonal que conlleva, por un lado, el cambio en las IgM de superficie a IgG, IgA o IgE mediante procesos de hipermutación somática en la región variable del gen de las Ig (23), así como un proceso de maduración de afinidad que estimula la producción de anticuerpos con una alta especificidad por el antígeno viral (18). Estos mecanismos de interacción en los centros germinales entre los linfocitos B, las células dendríticas foliculares y los linfocitos T CD4+ foliculares son los responsables de la proliferación, supervivencia y selección de células B de alta afinidad. Estas se diferencian o bien en células plasmáticas productoras de anticuerpos o en células de memoria (18). Por un lado, la aparición en sangre de anticuerpos IgG de baja afinidad se produce a los 10-14 días después de la inmunización (24), y van aumentando junto con los anticuerpos de alta afinidad en las siguientes semanas hasta alcanzar un pico de producción a las 4 semanas después de la vacunación; posteriormente disminuyen hasta alcanzar valores similares a los basales (18). A diferencia de lo que sucede en la respuesta primaria, la exposición al antígeno en una respuesta secundaria reactiva la memoria inmunológica produciendo un rápido aumento (<7 días) de las IgG específicas en sangre, las cuales pueden ser de tipo IgG1 o IgG3, relacionadas con respuestas Th2 y Th1, respectivamente (25). Esto es debido a la existencia de células B de memoria que migran de los centros germinales a la médula ósea en la respuesta primaria donde permanecen hasta una segunda exposición al antígeno (23). Es esencial destacar que la primera vez que se generan estas células es en respuestas inmunitarias primarias dependientes de células T y que no producen anticuerpos específicos, es decir, no generan

protección. Sin embargo, es tras la segunda interacción con el antígeno cuando proliferan rápidamente a células plasmáticas productoras de anticuerpos (26).

Existen diferentes factores que influyen en la respuesta inmunitaria a una vacuna, como puede ser la naturaleza de la misma, es decir, si es viva-atenuada o muerta-inactivada y el tipo de antígeno, si es una proteína o un polisacárido. Una vacuna viva-atenuada contiene el microorganismo vivo atenuado, por tanto la respuesta inmunitaria que se desencadena simula de una forma más “real” lo que sucedería durante una infección, y por tanto es más potente y mantenida en el tiempo. Sin embargo, las vacunas inactivadas o muertas contienen el microorganismo inactivado por calor u otros procesos, o bien fragmentos del mismo. Por otro lado, en el caso de antígenos proteicos, la respuesta inmunitaria se desarrolla en los centros germinales, produciendo con ello una mayor secreción de anticuerpos específicos, mientras que la respuesta inmunitaria a antígenos polisacáridos no se produce en los centros germinales, sino de forma extrafolicular, por tanto, se producen anticuerpos de una menor afinidad al no inducir a las células T foliculares (18). En el caso de la vacuna de la Hepatitis A (HAVRIX 1440), el modelo utilizado en la presente tesis doctoral, es una vacuna inactivada con la proteína del virus de la Hepatitis A, por tanto, la respuesta inmunitaria esperada estaría más localizada en el sitio de inyección del antígeno. Es por ello que, para conseguir una respuesta más eficaz y sistémica, este tipo de vacunas suelen ir formuladas con adyuvantes que potencian la respuesta inmunitaria frente al virus. Los adyuvantes más utilizados suelen ser sales de aluminio, emulsiones de escualeno en agua, virosomas (lípidos de membrana y glicoproteínas víricas) o agonistas de TLR (27). Dada la evidencia del efecto inmunomodulador que ejercen los probióticos sobre la función inmunitaria y su papel en la prevención de infecciones, la EFSA ha reconocido que podrían ser utilizados como posibles adyuvantes en un proceso de vacunación (16), como se explica con más detalle en el apartado 1.5.3.1.

1.2.5. Factores que influyen en la respuesta inmunitaria del organismo.

Existen varios factores que influyen en la respuesta inmunitaria de adultos sanos y que deben ser tenidos en cuenta a la hora de interpretar los resultados de los estudios (28):

1) Estación del año: la expresión de genes de células y moléculas inmunitarias es diferente en función de la época del año en la que nos encontremos, lo cual determina que la incidencia de ciertas enfermedades sea más alta en unas épocas que en otras. Por ejemplo, la IL-6 tiene una mayor expresión en invierno y se relaciona con la mayor incidencia de artritis reumatoide y diabetes encontrada en esta época (29).

2) Ritmo circadiano: nuestras hormonas presentan ritmos circadianos, lo cual influye en algunos procesos dependientes de su producción. Por ejemplo, la frecuencia de aparición del dolor en la artritis reumatoide es más frecuente en horas tempranas del día debido a cambios circadianos en el cortisol. Además, el empeoramiento de los síntomas de esta enfermedad inflamatoria parece coincidir con el pico de niveles más elevados de IL-6 en horas tempranas (30).

3) Género: existe evidencia de las diferencias en el funcionamiento del sistema inmunitario entre hombres y mujeres, ya que los hombres son más susceptibles a padecer infecciones (31), mientras que las mujeres tienen más prevalencia de enfermedades autoinmunes (32). Esto

puede ser debido a varios factores: 1) las diferencias en los niveles hormonales de testosterona, estrógenos y progesterona, las cuales pueden interactuar con las células inmunitarias modulando su actividad (31). En concreto, las hormonas sexuales masculinas como la testosterona se consideran protectoras frente a enfermedades autoinmunes (33); 2) las diferencias genéticas entre sexos también podrían influir, ya que el cromosoma X contiene el mayor número de genes involucrados en la inmunidad del huésped (34); 3) la microbiota intestinal, la cual está separada de las células inmunitarias de la lámina propia únicamente por las células epiteliales, haciendo que permanezcan en estrecho contacto e influyendo en su actividad y viceversa (35). Por ejemplo, la diabetes tipo 1 tiene una mayor prevalencia en mujeres y se ha sugerido que podría depender de la microbiota intestinal (33), demostrando un nexo entre la microbiota, el género y el sistema inmunitario, aunque se desconoce si estas diferencias en la inmunidad son causa o consecuencia de una microbiota intestinal alterada.

4) Genética: existe evidencia de que existe una mayor predisposición genética en el desarrollo de ciertas enfermedades inmunitarias asociadas con alelos genéticos concretos. Además, ciertos polimorfismos en genes de TLRs se asocian con la susceptibilidad a padecer diferentes enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario (36).

5) Estilo de vida: Aparte de los ya mencionados (dieta, ejercicio físico o estrés), el tabaco y el consumo de alcohol, hábitos de vida frecuentes en la población adulta aparentemente sana, ejercen un efecto inmunosupresor sobre el sistema inmunitario (37,38).

6) Microbiota intestinal: los estudios preliminares realizados en ratones libres de gérmenes (*germ-free*) han servido de base para evidenciar la relación existente entre la microbiota intestinal y la función inmunitaria. En concreto, estos animales presentan un peor desarrollo del MALT, el cual parece ser dependiente de la interacción con la microbiota intestinal, así como valores disminuidos de ciertas poblaciones de leucocitos (39). Otro estudio pionero en este campo ha sido la formulación en 1989 de la hipótesis de la higiene, que postuló una relación entre el aumento de enfermedades inmuno-inflamatorias como el asma o eczema en sociedades industrializadas con el exceso de higiene, de antibióticos y de comidas esterilizadas (40). Estos procesos condujeron a una disminución en la diversidad microbiana con reducción en el número de los “viejos amigos”, como los helmintos y bacterias pseudo-comensales presentes en el agua y en la comida, los cuales resultaban fundamentales para el desarrollo de respuestas inmunitarias de carácter regulador. Esto derivó en una incorrecta activación del sistema inmunitario y en la aparición de enfermedades crónicas inflamatorias. En un principio se asoció con las alergias, enfermedades autoinmunes o enfermedades inflamatorias intestinales (EII), pero a día de hoy se está relacionando también con la aparición de otras enfermedades de carácter inmuno-inflamatorio como la arteriosclerosis, enfermedades neurodegenerativas y desórdenes psiquiátricos (40,41).

1.3. MICROBIOTA INTESTINAL DE ADULTOS SANOS

1.3.1. Importancia de la microbiota para la salud

Se estima que el cuerpo humano posee 100 trillones de células microbianas, superando en 10 veces el número de células humanas y con un repertorio de genes 100 veces superior al genoma humano (41). El genoma microbiano o microbioma aporta funciones al organismo humano que él mismo no puede realizar y muchas de ellas dependen de la simbiosis con el huésped. Dicha simbiosis ayuda al mantenimiento de la resistencia frente a posibles cambios que sucedan en el organismo humano. Sin embargo, cuando se produce una disbiosis, o lo que es lo mismo, un desequilibrio en la proporción de grupos bacterianos, debido a factores internos (edad, situación fisiológica) o externos (dieta, actividad física o estrés) pueden aparecer patologías de carácter inmuno-inflamatorio, como la EII, alergias u obesidad, entre otras (42). Por ello, determinar las características que definen una microbiota intestinal sana podría ayudar al diagnóstico de enfermedades relacionadas. En este sentido, los estudios pioneros llevados a cabo en adultos sanos comprenden el Proyecto Metahit, realizado en 124 adultos europeos en 2010 (43), el Human Microbiome Project (HMP) realizado en 242 adultos americanos en 2012 (44) y un estudio en población china realizado en 145 adultos con diabetes tipo 2, de los cuales la mitad eran sanos (45). El análisis metagenómico europeo identificó que cada individuo albergaba una media de 600.000 genes microbianos en el tracto GI, de los cuales 300.000 genes eran comunes al 50% de los individuos. De los genes identificados, el 99% eran bacterianos, y los restantes procedían principalmente de arqueas, y en muy pequeña proporción de organismos eucarióticos y virus. Se describieron entre 1.000 y 1.150 especies bacterianas, con una media por individuo de 160 especies. Firmicutes y Bacteroidetes son los filos más mayoritarios, seguidos por Actinobacteria, Proteobacteria, Fusobacteria y Verrucomicrobia. Dentro de los géneros, *Bacteroides*, *Faecalibacterium* y *Bifidobacterium* son los más prevalentes, aunque en proporción variable entre individuos.

1.3.2. Concepto de microbiota intestinal sana: composición y funcionalidad.

El concepto de microbiota intestinal sana se definió inicialmente como el “conjunto de taxones microbianos universalmente presentes en individuos sanos que no padecen ninguna enfermedad, bajo la hipótesis de que la ausencia de dichos grupos bacterianos podría indicar disbiosis” (44). Sin embargo, los estudios realizados en adultos sanos han demostrado una gran variabilidad inter-individual en la composición de la microbiota intestinal (46), lo cual sugiere que el uso de esta definición para referirse a una microbiota intestinal sana no sea lo más adecuado. En concreto, como se ha mencionado, el proyecto Metahit ha revelado que existe un core de genes compartido por la mayoría de los individuos que pertenece principalmente a los filos Firmicutes y Bacteroidetes (43). Además, también existe un conjunto de genes variables entre individuos y formados por especies bacterianas particulares que constituyen la “huella” microbiana individual (47). Dentro de ellas, existen especies autóctonas que colonizan de forma estable nuestro intestino, y otras alóctonas que proceden principalmente de nuestra alimentación y que colonizan de forma transitoria siendo capaces de integrarse en la microbiota comensal autóctona durante el periodo durante el cual son consumidas (48). Como ejemplos,

cabe destacar *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* en el caso del yogur, y otras bacterias acidolácticas (BAL) y Bifidobacterias en el caso de las leches fermentadas con probióticos (LFP) (49), como *L. casei* y *B. animalis*, objeto de estudio de la presente tesis doctoral (48,50).

La gran variabilidad encontrada a nivel de composición en adultos sanos ha llevado a considerar la funcionalidad de la microbiota, es decir, las funciones ejercidas por los grupos bacterianos, como un mejor criterio para definir las características que debe cumplir una microbiota intestinal sana. En este sentido, se ha propuesto el uso del concepto de “core funcional” o conjunto de genes microbianos relacionados con funciones metabólicas concretas que no necesitan ser realizadas por los mismos grupos bacterianos en personas distintas (51). Dentro de las funciones ejercidas por los genes microbianos, están aquellas que garantizan su propia supervivencia en el intestino, o bien aquellas necesarias para mantener una adecuada homeostasis intestinal y simbiosis con el huésped. El core funcional de genes compartido entre individuos realiza principalmente funciones tales como la degradación de polisacáridos complejos, la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), de aminoácidos esenciales y vitaminas. Los cambios a nivel de funcionalidad parecen ejercer un papel más importante para la salud humana que cambios a nivel de composición, ya que son dichas funciones las que derivarán en un beneficio a nivel metabólico y fisiológico y por último en un beneficio a nivel clínico (43). Por ejemplo, el aumento en la producción de metabolitos como el ácido acético y propiónico, que participan en la regulación del tránsito intestinal, y el ácido butírico, con efecto anti-inflamatorio, conllevará una mejora a nivel intestinal en el progreso de la EII y de los síntomas asociados (52).

Existen dos características que debe cumplir una microbiota intestinal sana: resistencia, definida como la capacidad de permanecer estable frente a factores internos y externos, y resiliencia, o capacidad de recuperar el perfil microbiano basal después de un cambio (12). Entre los factores internos que afectan a la composición microbiana destaca la edad, que parece estar relacionada con la funcionalidad del sistema inmunitario, ya que ambos sistemas evolucionan y maduran de forma paralela (41). La microbiota intestinal comienza a parecerse a la de un adulto al final del primer año de vida y termina de serlo por completo a los 2,5 años de vida (53), permaneciendo estable hasta la vejez (54), momento en el cual aumenta la proporción de bacterias pro-inflamatorias como Enterobacterias y Enterococos, disminuyendo aquellas con propiedades inmunoregulatoras como *Bifidobacterium* y *Clostridium* cluster XIV (55). En la edad adulta, la microbiota se caracteriza por una gran estabilidad, aunque presenta plasticidad frente a factores ambientales (56). En este sentido, la dieta ejerce un papel primordial en la modulación de la microbiota intestinal destacando el efecto de los productos fermentados por su alto contenido en bacterias y entre ellos, los lácteos como los yogures y las LFP, objeto de estudio de la presente tesis doctoral y que se explicará con más detalle en los apartados 1.5 y 1.6.

1.4. INTERACCIÓN DIETA-MICROBIOTA INTESTINAL-SISTEMA INMUNITARIO

El desarrollo del sistema inmunitario y de la microbiota intestinal sucede en paralelo durante los primeros años de vida (57), lo cual ha hecho que ciertas funciones llevadas a cabo por los microorganismos sean esenciales para el funcionamiento de las células inmunitarias (58). Además, la respuesta habitual del sistema inmunitario frente a un agente externo es la inflamación, como se ha explicado en el apartado 1.2.1.1. Sin embargo, los mecanismos homeostáticos del organismo humano han contribuido al desarrollo y establecimiento de las bacterias autóctonas en el intestino sin el desarrollo de una respuesta inflamatoria frente a ellas. Estos mecanismos además promueven el mantenimiento de las bacterias intestinales en su nicho fisiológico, evitando la inflamación y la translocación bacteriana, permitiendo a su vez que desarrollen sus funciones, y con ello promoviendo la integridad y regulación entre ambos sistemas como un conjunto (59). Cabe destacar como elementos de la inmunidad homeostática a nivel intestinal la IgA secretora, el mucus producido por las células de Goblet, los péptidos antimicrobianos producidos por las células epiteliales (60) y las citoquinas reguladoras como IL-10 y TGF- β que contribuyen al balance de citoquinas de tipo Th1 y Th2 (61). Este conjunto de mecanismos es activado por las propias bacterias a través de componentes de su pared celular como se ha mencionado anteriormente, o bien por productos microbianos liberados al medio que interactúan con los receptores de AGCC, los receptores tipo Nod o tipo Toll presentes en las células epiteliales (59). Así pues, los procesos regulatorios del sistema inmunitario intestinal pueden presentarse confinados en los folículos y placas de Peyer o estar distribuidos entre el epitelio intestinal, las zonas secretoras y la mucosa intestinal (62). Cualquier respuesta inmunitaria llevada a cabo en la mucosa GI puede afectar al sistema inmunitario de otras mucosas, como las presentes en el tracto respiratorio, saliva, lagrimal y glándulas mamarias. Por ejemplo, la llegada de un antígeno a nivel intestinal activa los mecanismos de transporte del antígeno del lumen a las placas de Peyer y la presentación a los linfocitos T colaboradores, los cuales viajan a los nódulos linfoides donde inducen la activación de los linfocitos B, y la aparición de linfocitos específicos productores de anticuerpos en sangre a los 2-4 días (63). Esto refleja la conexión entre compartimentos corporales y cómo una reacción inmunitaria iniciada en una zona del organismo puede diseminarse a otras gracias a las conexiones entre células, induciendo así un efecto sistémico.

Los primeros estudios que pusieron en evidencia el impacto de la microbiota intestinal sobre la utilización de los nutrientes de la dieta fueron los modelos con animales libres de gérmenes (*germ-free*). En estos estudios se reveló que el trasplante de la microbiota de individuos obesos a animales *germ-free* alimentados con una dieta rica en fibra y baja en grasas inducía un aumento en la adiposidad y alteraciones metabólicas, a diferencia de los ratones que recibieron el trasplante fecal de individuos delgados. Así mismo, en estos animales se observó que el cambio a una dieta alta en grasas modificaba la composición de la microbiota intestinal en apenas un día (64). Debido a todo lo anteriormente expuesto, parece razonable pensar que el tipo de nutrientes que forman parte de nuestra alimentación, y en concreto, aquellos que

interaccionan en el colon con nuestra microbiota intestinal modulando su actividad son capaces de desencadenar una respuesta inmuno-inflamatoria, debido a la estrecha relación existente entre ambos sistemas. Algunos nutrientes que llegan casi intactos al colon, como la fibra (65) y los polifenoles (66), generan tras su metabolización compuestos con capacidad inmunoreguladora. Es el caso de los AGCC, los principales metabolitos de la fermentación de la fibra por parte de la microbiota, principalmente el ácido acético, propiónico y butírico, siendo este último el principal implicado en el efecto anti-inflamatorio asociado al consumo de fibra, ya que inhibe en las células inmunitarias la expresión del factor nuclear (NF)- κ B que es el principal desencadenante de procesos inflamatorios celulares (67). Además, los AGCC pueden modificar la funcionalidad de las células inmunitarias de forma directa a través de la inhibición de las histonas deacetilasas (HDAC), proceso que induce la estimulación de un fenotipo anti-inflamatorio al disminuir la expresión del gen NF- κ B y la producción de citoquinas pro-inflamatorias en células innatas presentes en la lámina propia. Por otro lado, también participan en la estimulación de células T reguladoras (Treg) (58). La metabolización de los polifenoles por una amplia variedad de especies bacterianas a compuestos fenólicos más sencillos con propiedades anti-inflamatorias también contribuye a su efecto sobre la inflamación y a sus propiedades prebióticas (66).

En el caso de la grasa, otro de los principales nutrientes relacionados con propiedades moduladoras sobre la microbiota intestinal y el sistema inmunitario, la mayor parte de ella es digerida y absorbida en el intestino delgado (68), pero una pequeña parte llega al colon (alrededor de un 7%) en forma de ácidos grasos (AG) libres, obtenidos por la acción de las lipasas en el intestino delgado (69), como se ha evidenciado en adultos sanos consumidores de una dieta con valores medios de grasa dietética (70). Los mecanismos a través de los cuales la grasa ejerce sus efectos sobre la microbiota intestinal no son bien conocidos. Por un lado, se ha postulado que los AG libres que llegan al colon tienen efecto anti-bacteriano al inducir la lisis de la membrana celular de las bacterias o modificación del metabolismo intracelular de las mismas (71), produciendo así disbiosis y daños metabólicos con aumento en la permeabilidad intestinal e inflamación (69). Otro mecanismo que podría estar involucrado se relaciona con la actividad enzimática que llevan a cabo ciertos grupos bacterianos, como *Clostridium* o *Eubacterium*, sobre la pequeña fracción de sales biliares primarias que llegan al colon (5%). En este sentido, las hidrolasas biliares producen una 7α -dehidroxilación en las sales biliares primarias para su transformación en sales biliares secundarias como método de detoxificación (72). Una disbiosis intestinal caracterizada por niveles bajos de bacterias encargadas de este proceso podría conducir a procesos inflamatorios, ya que la metabolización de las sales biliares se vería alterada y con ello los procesos de señalización dependientes de ellas, como la síntesis de glucosa o colesterol (73).

Los efectos derivados del consumo de dietas altas en grasas sobre la microbiota intestinal y la respuesta inflamatoria pueden aparecer incluso previamente al desarrollo de la obesidad (74), lo cual podría sugerir que la cantidad y el tipo de grasa tienen un efecto muy relevante en la composición de la microbiota intestinal además del desarrollo de la obesidad por sí sola. En cuanto a la cantidad, las principales alteraciones que se producen tras la ingesta de altas cantidades de grasa se caracterizan por un aumento de bacterias del filo Firmicutes, en concreto *Clostridium* cluster XVIa, y de bacterias Gram-, como las Proteobacterias, entre ellas

Enterobacteriaceae y *Bifidobacterium*. Además, se produce una disminución de algunas bacterias del filo Actinobacteria, en concreto *Bifidobacterium*, y del filo Verrucomicrobia, como *Akkermansia muciniphila*, cambios que podrían afectar de forma negativa al sistema inmunitario ya que estas bacterias presentan propiedades inmunoregulatoras (74). La calidad de la grasa también es importante, ya que el perfil de AG de la dieta, es decir, la composición en ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGM) y poliinsaturados (AGP) parece ejercer efectos diferentes. A nivel de inflamación, se ha observado en varios estudios que la estimulación con AG de cadena larga (AGCL) saturados como el palmítico aumenta los niveles de citoquinas proinflamatorias, en particular IL-6 y TNF- α , en tejido adiposo y macrófagos, así como en la expresión de genes implicados en rutas de inflamación, como el NF-kB (75). En relación con los AGP omega-6, el ácido araquidónico (AA) parece ser uno de los AG más implicados en los procesos inflamatorios, ya que es el AG mayoritario de las membranas de células inflamatorias y es precursor de mediadores pro-inflamatorios como los eicosanoides, prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos. Sin embargo, existe controversia en este sentido, ya que mientras estudios epidemiológicos en adultos sanos revelan que no existe una relación entre la ingesta de AA y aumento en mediadores inflamatorios, otros sí relacionan su ingesta con un efecto inhibitorio de las propiedades anti-inflamatorias asociadas a los ácidos grasos omega 3, sugiriendo que se necesita más investigación en torno a los mecanismos de interacción entre AG omega 3 y omega 6 (76). A nivel intestinal también se ha puesto de manifiesto que la ingesta de una dieta alta en grasa principalmente saturada conduce a niveles altos de LPS plasmático, proceso denominado "endotaxemia metabólica", ya que el LPS bacteriano de bacterias Gram- es arrastrado por los quilomicrones que transportan los AGS desde el intestino a la sangre. El aumento en LPS y su unión a CD14 de las células inmunitarias parece ser uno de los principales mecanismos involucrados en el aumento de marcadores inflamatorios, ya que estimula la síntesis de citoquinas pro-inflamatorias en tejido adiposo. El origen de dicha inflamación parece asociarse por tanto a cambios en grupos bacterianos tras la ingesta elevada de grasas que producen disbiosis intestinal y con ello elevación de los niveles de LPS bacteriano (77). Sin embargo, existe controversia en la literatura en este campo, ya que dependiendo del tipo de AG y la longitud de la cadena se observan resultados diferentes. En este sentido, mientras que en ratones alimentados con AGCL saturados como el palmítico se observa una disminución de la diversidad bacteriana y de las proporciones de bacterias de Bacteroidetes (Gram-) con un aumento de Firmicutes (78), se han encontrado efectos contrarios tras el consumo de AG de cadena media (AGCM) saturados, observándose niveles disminuidos de bacterias de Firmicutes tales como *Lachnospiraceae* (79). Esto podría estar relacionado con el diferente metabolismo a nivel intestinal de los AGS, ya que los AGCL saturados necesitan unirse a quilomicrones para ser transportados a hígado, mientras que los AGCC y AGCM saturados pasan directamente al hígado donde son metabolizados. La llegada de elevadas cantidades de AGCL al hígado favorece su acumulación, así como en el tejido adiposo (80). La infusión de elevadas cantidades de AGCL al tejido adiposo tiene consecuencias, ya que es un tejido muy activo y desde el punto de vista inmunológico, los adipocitos blancos comparten células progenitoras comunes con las células del sistema inmunitario (81). En concreto, poseen funciones similares, como la producción de citoquinas, que en el caso del tejido adiposo se denominan adipoquinas, destacando la leptina y adiponectina. La leptina participa en la estimulación de monocitos y su diferenciación a macrófagos, la formación y activación de las células NK, y producción de citoquinas pro-inflamatorias, como TNF- α , IL-6 o IL-12. La

adiponectina realiza acciones en sentido contrario, ya que inhibe la producción de TNF- α en macrófagos, la diferenciación de los precursores de monocitos, la producción de moléculas de adhesión endotelial y el anclaje y la formación de células espumosas; además, estimula la producción de citoquinas anti-inflamatorias, como la IL-10 o el antagonista del receptor para IL-1 (IL-1ra) (82). En cuanto a los AGM, se ha observado que el consumo del ácido hidroxioleico, un derivado del ácido oleico, restaura la disbiosis intestinal producida tras la ingesta de una dieta alta en grasas, equilibrando los niveles elevados de Clostridial cluster XIVa y Enterobacterias y la disminución de los niveles de *Bifidobacterium*, produciendo también pérdida de peso y de grasa visceral (83), observándose también un aumento en los niveles de *Bacteroidaceae* tras el consumo de una dieta rica en AGM en comparación con una dieta rica en AGCL saturados. Por otro lado, el consumo de una dieta rica en AGP omega 3 aumentó los niveles de *Bifidobacterium* comparado con una dieta baja en grasa (78). Todo ello sugiere que tanto la calidad como la cantidad de grasa dietética es un factor esencial a tener en cuenta en los estudios nutricionales, y a su vez, que la composición química de cada AG y su ruta de metabolización parecen ser factores relevantes en los efectos que ejercen sobre la microbiota intestinal y con ello en el sistema inmunitario.

Además de los nutrientes que forman parte de nuestra dieta, existen ingredientes alimentarios como las bacterias probióticas presentes en productos lácteos fermentados que puede modular la composición de la microbiota intestinal y con ello el sistema inmunitario. Es por ello que desde hace décadas son objeto de profundo estudio por su amplia evidencia en la modulación de ambos, como se expone en los siguientes apartados.

1.5. PROBIÓTICOS

1.5.1. Historia de los probióticos.

El término probiótico, derivado del griego y con significado “para la vida”, fue usado por primera vez en 1965 por Lilly y Stillwell para describir “substancias secretadas por un microorganismo que estimulan el crecimiento de otro” (84). Esta definición ha ido sufriendo numerosas modificaciones en el tiempo, debido al trabajo de expertos pertenecientes a la Organización de las Naciones Unidas para los Alimentación y la Agricultura (FAO), la OMS y por último a la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos (ISAPP), aceptando como definición más actual que “un probiótico es un microorganismo vivo que, cuando se administra en cantidades adecuadas, produce un beneficio en la salud del huésped”(85). Los primeros descubrimientos acerca de los probióticos datan del año 1905, cuando Elie Metchnikoff, considerado el padre de los probióticos, demostró junto con un estudiante búlgaro llamado Stamen Grigorov, que los yogures contenían la bacteria acidoláctica *Bacillus bulgaricus* (ahora denominada *L. bulgaricus*), una bacteria que era capaz de sobrevivir al tracto GI y que producía elevadas cantidades de ácido láctico. Evidenció que la producción de ácido láctico era importante para combatir los microorganismos patógenos intestinales, asociando la alta tasa de longevidad de países de Europa del Este como Bulgaria a su alto consumo de yogures, y en concreto a su contenido en bacterias acidolácticas (86). En 1906,

Henry Tissier identificó que las heces de niños con diarrea tenían un número bajo de bacterias del género *Bifidobacterium* en comparación con niños sanos, y postuló que podrían ejercer un efecto beneficioso sobre las infecciones y el control de patógenos (87). Ambos descubrimientos promovieron durante los años posteriores el avance en el estudio de bacterias con propiedades beneficiosas para la salud humana. Entre 1922 y 1932 se llevaron a cabo los primeros estudios en humanos en el que se observó una relación positiva entre el consumo de *L. acidophilus* y una mejora en los síntomas de estreñimiento, diarrea y eczema, así como en enfermedad mental (88,89) y en 1930 se demostró que esta bacteria era capaz de colonizar el colon, a diferencia de lo que se había evidenciado con las bacterias del yogur (*L. bulgaricus* y *St. thermophilus*) (90). Desde entonces, los estudios realizados con diferentes cepas probióticas para estudiar sus posibles beneficios se han multiplicado (91).

1.5.2. Requisitos que debe cumplir un probiótico y formas de administración

Para que un microorganismo sea considerado probiótico debe cumplir los siguientes requisitos:

- Estar **viable en cantidad suficiente** en el momento de consumo. En este sentido, aunque parece importante que el probiótico llegue en forma viable al lugar donde ejerce su acción, también se ha evidenciado que ciertos componentes celulares de las cepas probióticas pueden ejercer efectos sobre el sistema inmunitario. Sin embargo, el término probiótico sólo puede emplearse para referirse a cepas bien definidas. La detección de las cepas probióticas en heces representa un buen indicador de su paso por el tracto GI (92).
- Tener evidencia suficiente de sus **beneficios para la salud** del huésped (85), considerando un beneficio para la salud tanto los efectos fisiológicos, medidos a través de biomarcadores, como mediante parámetros clínicos. El uso de declaraciones de salud para un determinado producto sustentadas por la mejora en un biomarcador como puede ser el aumento de la IgA secretora, sin observarse un beneficio a nivel clínico como la reducción en la duración de la diarrea, depende de las regulaciones específicas de cada país (92).

Entre las características deseables que puede cumplir un probiótico se encuentran la capacidad de sobrevivir a las condiciones del tracto GI (pH, enzimas o sales biliares), la adhesión a las células intestinales y la colonización (85). En el caso de cepas probióticas que se vayan a emplear en estudios clínicos, es deseable que sean de origen humano (93), y sean reconocidas como seguras para la salud humana (GRAS) mediante estudios de seguridad de la cepa (92).

Históricamente, los principales microorganismos utilizados como probióticos pertenecen a los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, ya que tradicionalmente se han utilizado en productos fermentados y se han demostrado sus características de inocuidad. En menor medida, se utilizan otras BAL, como *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* y *Enterococcus*, y algunas levaduras como *Saccharomyces boulardii* (85). El panel de expertos de la ISAPP ha sugerido la posibilidad de incluir bajo el término de probiótico ciertas bacterias comensales de la microbiota intestinal con evidencias suficientes de beneficios sobre la inflamación, la regulación del sistema inmunitario o la función de barrera intestinal, como es el caso de *Akkermansia muciniphila* (94),

Faecalibacterium praustnizzi (95) o bacterias productoras de butirato como *Roseburia* spp y *Eubacterium halii* (96). Sin embargo, el hecho de que estas bacterias se puedan usar como probióticos en suplementos nutricionales o medicamentos depende de que dichos efectos sean demostrados bajo criterios de seguridad y eficacia (97). El panel de expertos de la ISAPP establece que los metabolitos bacterianos, las bacterias no viables y los productos derivados de estas no deben ser usados bajo el término probiótico, aunque existe evidencia reciente de las propiedades probióticas de los mismos (9). Así mismo, el contenido en bacterias viables de alimentos fermentados y el trasplante fecal no deben ser considerados dentro del marco de los probióticos, ya que la composición precisa a nivel de cepa y su estabilidad no está bien definida. En el caso de los alimentos fermentados, la matriz alimentaria y la acción sinérgica entre los componentes de la misma dificulta poder identificar los beneficios asociados a las cepas probióticas concretas (97).

Lo forma más común de comercialización de los probióticos es en forma de cápsulas. Sin embargo, los alimentos fermentados con probióticos, especialmente las leches fermentadas, han despertado el interés en los últimos años debido a la buena aceptación que tienen por parte del consumidor gracias a su alta palatabilidad y a su alto valor nutritivo (98).

1.5.3. Principales efectos asociados al consumo de probióticos y mecanismos de acción

El objetivo de estudiar las propiedades de los probióticos en adultos sanos tiene un enfoque preventivo frente a los procesos de deterioro de la función inmunitaria y la disbiosis intestinal asociados al avance de la edad y al empeoramiento del estilo de vida de las sociedades occidentalizadas (8,99). Además, los estudios que existen a día de hoy acerca del efecto del consumo continuado de probióticos a largo plazo sobre el mantenimiento de la salud independientemente de los hábitos dietéticos, la actividad física y otros factores de estilo de vida son muy escasos.

El comité de expertos de la ISAAP ha definido como dos de los principales efectos asociados al consumo de probióticos el mantenimiento de un tracto GI sano y de un sistema inmunitario sano (85). Respecto al tracto GI, el mantenimiento de una microbiota intestinal sana es uno de los beneficios más investigados, aunque no existe una definición clara acerca de cuál debe ser la composición de la misma. Los mecanismos ejercidos por los probióticos parecen estar relacionados con la creación de un ambiente intestinal favorable, como se observa en el gran número de metanálisis realizados con un variado número de objetivos que revelan que los mecanismos parecen ser compartidos por la mayoría de las especies de probióticos (97). En este sentido, la EFSA ha reconocido a nivel de especie y no de cepa que la combinación de los cultivos del yogur *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* mejora la intolerancia a la lactosa gracias a su actividad β -galactosidasa (100), estableciendo así una relación entre probióticos de diferentes géneros y especies y una misma funcionalidad. Mientras que algunas funciones y mecanismos que ejercen los probióticos sobre el sistema GI son genéricos y pueden ser compartidos por varias cepas, como la inhibición de patógenos, existe una mayor especificidad en cuanto a los mecanismos que ejercen en el sistema inmunitario (85). Esto es debido a que el concepto de “sistema inmunitario sano” es muy amplio y abarca efectos

con mecanismos subyacentes muy diversos, que van desde la prevención de alergias a la disminución de la inflamación y prevención de infecciones. Esto determina que no pueda considerarse como un efecto común y genérico a todas las especies de probióticos, siendo más específico de la cepa utilizada (101,102).

1.5.3.1. Capacidad inmunorreguladora

Los probióticos deben atravesar el tracto GI y llegar al colon para ejercer sus efectos sobre el sistema inmunitario, gracias a interacciones directas que establecen con las células epiteliales, con las células inmunitarias de la lámina propia o con las bacterias comensales de la microbiota intestinal, o bien a través de mecanismos intrínsecos propios (9). Uno de los beneficios clínicos más demostrados derivados del consumo de probióticos es la prevención de infecciones, efecto que ejercen a través de diferentes mecanismos como la inhibición del crecimiento de patógenos, la mejora de la integridad de barrera y la estimulación del sistema inmunitario innato y específico.

a) Inhibición del crecimiento de patógenos

Los probióticos inhiben el crecimiento de patógenos a través de la eliminación o competición por sitios de unión a células epiteliales, como se ha observado en especies de *Lactobacillus* frente a los enteropatógenos *E.coli* o *Salmonella* (103). Otro de los mecanismos implicados es la producción de compuestos antimicrobianos, que pueden ser de bajo peso molecular, como los ácidos acético o láctico que presentan un amplio espectro de acción y son capaces de penetrar en el interior de la célula patógena y disgregar el citoplasma, o de alto peso molecular como las bacteriocinas, que actúan a nivel de la pared bacteriana creando poros o inhibiendo su síntesis, como la lactacina B de *L. plantarum* o la nisina de *Lactococcus lactis*, aunque su espectro de acción es más reducido comparado con el de los ácidos orgánicos (104). La utilización de nutrientes esenciales para el crecimiento de los patógenos, la producción de ácidos grasos como el ácido linoleico conjugado (CLA) por cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* con propiedades anticarcinogénicas, así como la producción de ácidos biliares desconjugados con actividad antimicrobiana más fuerte que aquellos producidos por el hospedador, son otros de los mecanismos que inhiben el crecimiento de patógenos (104).

b) Integridad de barrera intestinal

La barrera intestinal es una importante defensa del organismo frente a patógenos, ya que gracias a la producción de mucus y de IgA secretora es capaz de mantener una buena separación entre las bacterias comensales autóctonas del lumen y la mucosa. La IgA secretora es el componente del sistema inmune humoral más importante en superficies mucosas, ya que se une a los microorganismos patógenos bloqueando su unión a los receptores epiteliales, atrapándoles en la mucosa y eliminándoles mediante actividades peristálticas, en un proceso no inflamatorio conocido como “exclusión inmune” (105). En este sentido, los probióticos son capaces de estimular la síntesis de proteínas de unión estrecha de la barrera intestinal, como ocludinas o actininas, favoreciendo así el mantenimiento de la integridad intestinal y con ello bloqueando la adhesión o invasión de patógenos (106). Por otro lado, existe una amplia evidencia que sugiere el efecto modulador de los probióticos sobre la producción de células productoras de IgA en la lámina propia (107).

c) Estimulación del sistema inmunitario innato y adaptativo: Mecanismos y evidencia en adultos sanos.

1. Mecanismos

- Interacción con las células inmunitarias

La estimulación del sistema inmunitario innato se inicia tras el primer contacto que establecen los probióticos o bien con las células epiteliales, las cuales actúan como sensores ejerciendo un diálogo puente entre el huésped y el exterior (108), o bien con las células dendríticas, monocitos y macrófagos presentes en la lámina propia (109), pudiendo incluso llegar a ser internalizados por estas últimas (110). La interacción se produce a través de los RRP presentes en células epiteliales e inmunitarias como los TLR (9), que detectan componentes específicos de las bacterias como el ácido lipoteicoico y el peptidoglicano presentes en su pared celular (9). Por ejemplo, el TLR2 es específico del peptidoglicano presente en bacterias Gram+, como *L. plantarum* CCFM634 y CCFM734, *L. fermentum* CCFM381, *L. acidophilus* CCFM137 o *B. breve* C50 (111), y del ácido lipoteicoico de *L. fermentum* y *L. casei* (112). Esta interacción desencadena mecanismos de regulación inmunitaria, tales como procesos de señalización celular (NF- κ B) o la producción de citoquinas (9,113), ambos dependientes del tipo de cepa probiótica utilizada (114,115). La activación del sistema inmunitario no implica una alteración de la homeostasis intestinal, ya que existen células inmunitarias reguladoras que mantienen los procesos de tolerancia oral, asegurando que el consumo de probióticos de forma continuada no produzca efectos adversos (108). En concreto, se ha evidenciado que el consumo de algunos probióticos, como es el caso de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri*, *B. bifidum* y *St. thermophilus* promueve un aumento de células T reguladoras gracias a la inducción de células dendríticas reguladoras que expresan niveles elevados de IL-10 y TGF- β (116).

- Interacción con la microbiota intestinal

Por otro lado, los probióticos también pueden interaccionar con la microbiota intestinal o bien de forma directa, modulando la expresión del perfil de PAMPs presentes en las bacterias comensales que son presentados a las células inmunitarias del tejido linfoide del intestino, o bien de forma indirecta a través de la producción de metabolitos como los AGCC (113). La producción de AGCC por las bacterias intestinales depende de la expresión de diferentes enzimas que catalizan la fermentación de los hidratos de carbono complejos como la fibra en monosacáridos y otros compuestos, resultando como producto final AGCC y diferentes gases, que a su vez sirven de sustrato en otras rutas metabólicas, proceso denominado cross-feeding (65). Por ejemplo, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* son principalmente productores de ácidos acético y láctico, los cuales sirven de sustrato para la producción de ácido butírico por bacterias de la clase Clostridia como *Roseburia intestinalis* o *Faecalibacterium prausnitzii* (117).

2. Evidencia científica en humanos

Los estudios realizados en adultos sanos se han centrado por un lado, en evaluar la tolerancia y seguridad de las cepas probióticas, así como en contrastar su capacidad inmunomoduladora demostrada previamente *in vitro* o en modelos animales (Tabla 2), y por otro, en el uso de

modelos de vacunación con el objetivo de estudiar la capacidad coadyuvante de los probióticos en condiciones en las que el sistema inmunitario se ve comprometido (Tabla 3).

1) Estudios cuyo objetivo es evaluar la capacidad inmunomoduladora de los probióticos

El efecto común asociado al consumo de probióticos en la mayoría de estudios realizados en adultos sanos es una estimulación positiva del sistema inmunitario, encontrándose también aunque en menor frecuencia efectos neutros, como se observa tras el consumo de *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 y *L. paracasei* ssp. *paracasei* durante 3 semanas (118) (Tabla 2). En los estudios que muestran efectos positivos sobre el sistema inmunitario es necesario destacar dos aspectos: por un lado, mientras unas cepas muestran efectos a nivel tanto del sistema innato como adquirido, otras parecen ejercer un efecto más limitado a uno de los dos sistemas. Por otro, los efectos derivados del consumo de probióticos que se diferencian significativamente del grupo utilizado como control deben considerarse más relevantes a la hora de extraer conclusiones acerca del efecto de los probióticos sobre el sistema inmunitario. En este sentido, el consumo de diferentes cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* a distintas dosis y duración se ha relacionado con un aumento en los niveles y actividad de células del sistema inmunitario innato como células NK (119,120), monocitos y granulocitos en comparación con el grupo placebo (121), así como de niveles más elevados de IL-10 (122). También se encuentran diferencias tras el tratamiento con probióticos en algunos marcadores inmunitarios que a su vez se encuentran modificados en el grupo control, o bien no se modifican en el grupo control pero las diferencias no son significativas entre grupos. Por ejemplo, se ha observado que la actividad fagocítica de monocitos y granulocitos aumenta tras el consumo de *L. coryniformis* CECT5711 y *L. gasseri* CECT5714, así como tras el consumo de yogur clásico (grupo control)(120). Así mismo, los niveles de IL-2 y TNF- α en linfocitos T y células NK aumentaron tras el consumo de *B. animalis* ssp. *lactis* (BB-12) y yogur clásico (123), observándose lo mismo en los niveles de IgA tras el consumo tanto de *L. casei shirota* como de leche acidificada (119). Estos resultados sugieren que existe una mayor evidencia del efecto del consumo de probióticos sobre la inmunidad innata, y es necesario seguir investigando acerca del efecto que ejercen sobre la producción de citoquinas y marcadores de inmunidad específica.

Tabla 2. Estudios de intervención doble ciego controlados por placebo realizados en adultos sanos con el objetivo de evaluar la capacidad inmunomoduladora derivada del consumo de probióticos.

	Tratamientos Probiótico vs Control(C)	Vehículo y dosis	Población	Duración Tratamiento	Resultados Diferencias vs. Punto basal	Resultados Diferencias vs. Control (C)
Christensen y col. 2006 (118)	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> (BB-12) <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> (CRL-431) C: Cápsula de dextrosa, celulosa y almidón (2 unidades)	Cápsula (2x10 ⁸ -10 ¹¹ ufc/día)	71 adultos sanos (46 M/25 H) Edad: 26 años	3 semanas	↔ Actividad fagocítica IL-10 e IFN-γ <i>in vitro</i> IgA, IgG, IgM en plasma IgA en heces	↔ Actividad fagocítica IL-10 e IFN-γ <i>in vitro</i> IgA, IgG, IgM en plasma IgA en heces
Sierra y col. 2010 (122)	<i>L. salivarius</i> CECT5713 C: Maltodextrina (2 unidades)	Cápsula (2x10 ⁸ ufc/día)	40 adultos sanos (20 M/20 H) Edad media: 33 años	4 semanas	↑Células NK y Monocitos ↑TNF-α, IL-10 y TGF-β ↑IgA, IgG, IgM	↑IL-10
Olivares y col. 2006 (120)	<i>L. coryniformis</i> CECT5711 <i>L. gasseri</i> CECT5714 C: Yogur clásico (200 ml)	Leche fermentada (200 ml: 2x10 ⁹ ufc/día)	30 adultos sanos (15 M/15 H) Edad media: 23-43 años	2 semanas	↑Monocitos y granulocitos (% y actividad fagocítica)	↑Células NK (%) ↔ Actividad fagocítica ↔ IL-4, TNF-α, IL-12, IL-10 ↔ Igs plasma
Klein y col. 2008 (121)	<i>L. acidophilus</i> 74-2 <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> DGCC 420 C: Yogur clásico (300 g)	Leche fermentada (300 g/d: 9,3x10 ⁸ + 3x10 ⁸ ufc/g)	26 adultos sanos (13 M/13 H) Edad media: 25 años	5 semanas	--- Estudio cruzado	↑Actividad fagocítica de monocitos y granulocitos (%) ↔ Linfocitos
Shida y col. 2017 (119)	<i>L. casei shirota</i> C: Leche	Leche fermentada (10 ¹¹ ufc/g)	100 adultos sanos (0 M/100 H) Edad media: 40 años	12 semanas	↑IgA salivar	↑Actividad NK (semana 6) ↔ IgA salivar
Meng y col. 2016 (123)	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> (BB-12) C: Yogur batido	Yogur batido (240 g)+ BB-12 antes (PRE) o después de fermentación; Cápsula (CAP) (10 ¹⁰ ufc/día)	36 adultos sanos (25 M/11 H) Edad media: 28 años	4 semanas	↑IL-2 y TNF-α en linfocitos T y células NK tras PRE y CAP ↑Células NK tras PRE y CAP	↔ IL-2 y TNF-α ↔ Células NK

↔: No hay cambios; ---: No hay dato; M: Mujeres; H: Hombres; ufc: unidades formadoras de colonia; Igs: Inmunoglobulinas; NK: Natural Killer; IL: Interleuquina; TNF: Factor de necrosis tumoral; IFN: Interferón; TGF: Factor de crecimiento transformante.

2) Estudios cuyo objetivo es evaluar la capacidad coadyuvante de los probióticos en modelos de vacunación.

Existe evidencia de los efectos positivos derivados del consumo de probióticos sobre la prevención de infecciones (109), en particular del tracto GI y del tracto respiratorio superior (URTI) (124–126). Los parámetros indicadores de la respuesta del organismo frente a la infección engloban por un lado, a nivel de eficacia clínica, la incidencia de la infección, así como la duración y la severidad de los síntomas. Por otro lado, a nivel de biomarcadores, dos de los más relevantes son el título de anticuerpos específicos del virus en sangre y la tasa de seroconversión tras la vacunación (18), que refleja el porcentaje de sujetos serológicamente negativos al virus que pasan a ser seropositivos tras la vacunación, y en concreto, se suele medir como aquellos que superan el título de inhibición de la hemaglutinización por encima de un determinado umbral (habitualmente ≥ 40 se relaciona con una reducción de un 50% en el riesgo de infección) (14). Otros parámetros indicadores de la activación del sistema inmunitario frente a la infección comprenden la respuesta inmunitaria innata, como las células NK o la actividad fagocítica, los niveles de citoquinas o la respuesta inmunitaria específica a través de los niveles de linfocitos CD4+ colaboradores o CD8+ citotóxicos en sangre, los cuales, a pesar de no ser considerados parámetros relacionados con la eficacia de la vacunación, potencian la respuesta del sistema inmunitario frente a una infección (18).

La mayoría de los estudios realizados en adultos sanos para evaluar la capacidad coadyuvante de los probióticos se han realizado con la vacuna del virus de la gripe (Tabla 3). La inclusión de un grupo placebo durante la intervención refleja el efecto de la vacunación sobre el sistema inmunitario, como se comprueba en el estudio de Olivares y col. 2006, en el que se observó un aumento significativo en los niveles de linfocitos T CD4+, CD8+ e IL-12 en el grupo que consumió placebo comparado con sus niveles basales, aunque no se observaron cambios en los niveles de Ig específicas, reflejando así una respuesta débil del sistema inmunitario a la vacunación (127). Se encontraron resultados similares en el estudio de Rizzardini y col. 2012 empleando la misma vacuna, observándose una respuesta muy baja a la vacunación en la medición de los niveles de anticuerpos específicos en sangre, lo cual resulta extraño al tratarse de población sana de la que se espera una respuesta óptima (14). Por otro lado, los cambios observados en el grupo probiótico diferentes al grupo placebo reflejan la capacidad coadyuvante de la cepa probiótica. En este sentido, existen estudios que muestran resultados positivos en marcadores de eficacia clínica, en biomarcadores o en ambos. De acuerdo a esto, el consumo de *B. animalis* ssp. *lactis* (BB-12) y de *L. casei* 431 durante 6 semanas aumentó los niveles de IgG e IgA específicos en comparación con el grupo placebo, reflejando un efecto positivo sobre la inmunidad de memoria sistémica y la inmunidad de mucosas, respectivamente. A su vez, se observó una tasa de seroconversión más alta en el grupo que consumió las cepas probióticas (14). Sin embargo, no se observaron cambios en un estudio posterior con la misma cepa de *Lactobacillus* realizado en un mayor tamaño muestral (1066 adultos sanos). Los autores sugieren que la ausencia de cambios pudo deberse a la alta tasa de seroprotección observada en todos los sujetos (82-99%), esperable al tratarse de individuos sanos, y al efecto de las diferentes campañas de vacunación utilizadas en ambos estudios, mostrando mayor efectividad en este último estudio. Sin embargo, sí se observó una mejora en marcadores de eficacia clínica como la duración de los síntomas de la infección; en particular,

una reducción en los síntomas de resfriado común y gripe (fiebre alta junto con 1 ó 2 síntomas como tos o dolor de garganta) entre las semanas 4 y 6 de consumo del probiótico (128). En este sentido, también se observó una menor incidencia de infecciones respiratorias durante los 5 meses posteriores al consumo de *L. fermentum* CECT5711, el cual también aumentó los niveles de IgA específica y de IgG e IgM totales comparado con el grupo placebo (127). El consumo de *L. rhamnosus* GG no modificó los niveles de anticuerpos específicos aunque sí aumentó la tasa de seroconversión a una de las cepas del virus gripal en comparación con el grupo placebo (84% vs. 55%)(129), observándose resultados contrarios en un modelo de vacunación con la vacuna de la poliomielitis (130). El consumo de *L. acidophilus* La-14 y *B. lactis* BI-04 aumentó los niveles de IgG específicas al virus del cólera en comparación con el grupo placebo, mientras que no se observaron cambios tras el consumo de *B. lactis* Bi-07, *L. acidophilus* NCFM, *L. plantarum* Lp-115, *L. paracasei* Lpc-37 y *L. salivarius* Ls-33, sugiriendo así un efecto dependiente de la cepa utilizada (131).

El hecho de que se observen diferentes respuestas en la tasa de seroconversión y los niveles de anticuerpos en el mismo estudio puede deberse a la presencia de sujetos con niveles detectables de anticuerpos específicos en sangre antes del tratamiento por haber entrado en contacto previamente con el virus (130), los cuales deberían ser excluidos del análisis. En este sentido, el uso de vacunas para infecciones de baja incidencia en la población, como es el caso de la Hepatitis A, el modelo de vacunación utilizado en la presente tesis doctoral, podrían resultar de mayor utilidad para evaluar la capacidad coadyuvante de los probióticos. Así mismo, factores intrínsecos de la propia vacuna, como el tipo de cepa vírica en el caso de vacunas di o trivalentes, el tipo de vacuna (viva o atenuada), el modo de administración (intramuscular u oral), y la estación del año en la que se realice el estudio también pueden afectar a las diferencias entre estudios. Además del tipo de cepa probiótica, la dosis y duración del tratamiento, el tiempo de consumo del probiótico podría ser importante, ya que se ha sugerido que el consumo previo a la vacunación podría preparar al sistema inmunitario de una forma más eficiente antes de exponerse al antígeno del virus (132). El momento temporal en el que se hace la medición de los biomarcadores inmunitarios también es relevante, ya que las células del sistema inmunitario necesitan un determinado número de días para ejercer su acción y esto difiere entre los tipos celulares, como se observa en las respuestas tempranas y tardías de los anticuerpos, o en los parámetros de inflamación y de inmunidad innata que cambian más rápidamente durante los primeros días de la infección (13) (Figura 1).

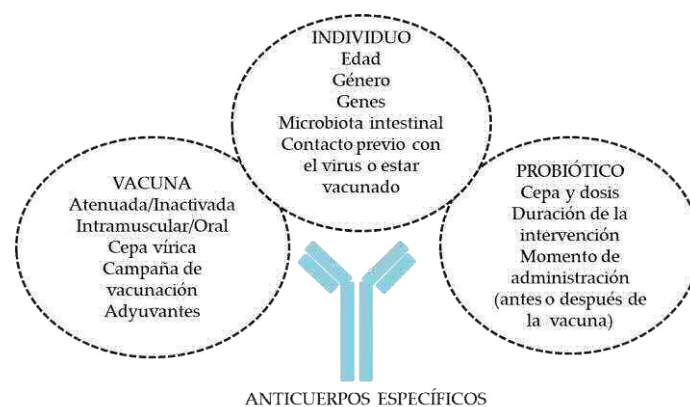


Figura 1. Factores que influyen en la producción de anticuerpos específicos

Tabla 3. Estudios de intervención doble ciego controlados por placebo realizados en adultos sanos con el objetivo de evaluar la capacidad coadyuvante de los probióticos en modelos de vacunación.

	Tratamientos Probiótico vs Control(C)	Vehículo y dosis	Población	Duración Tratamiento	Vacuna	Resultados Diferencias vs. Punto basal	Resultados Diferencias vs. Control (C)
Olivares y col. (127)	<i>L. fermentum</i> CECT5711 C: Metilcelulosa	Cápsula (1x10 ⁷ ufc)	55 Adultos sanos (19 M/31 H) Edad media: 33 años	28 días	Influenza Inactivada, Intramuscular Día 14	↑IgA específica ↑Linfocitos T CD4+ y T CD8+ ↑Células NK ↑TNF-α, IL12; ↔IL-10, IFN-γ	↑IgA específica ↑Células NK ↑TNF-α
Rizzardini y col. (14)	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> (BB-12) <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> (<i>L. casei</i> 431) C: Leche acidificada	Cápsula (BB12: 10 ⁹ ufc) Leche fermentada (<i>L. casei</i> : 10 ⁹ ufc)	211 adultos sanos (118 M/93 H) Edad media: 33 años	6 semanas	Influenza Inactivada, Intramuscular Semana 2	↔Actividad fagocítica ↔Actividad NK ↔IL-10 e IFN-γ ↔Linfocitos T CD4+	<u>Anticuerpos específicos:</u> ↑IgG, IgG1, IgG3 plasma, IgA saliva ↔IgM e IgA plasma, IgM e IgG saliva; ↑seroconversión <u>Totales:</u> ↑ IgG, IgG1 e IgG3 plasma; ↑IgG e IgA saliva
Jespersen y col. (128)	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> (<i>L. casei</i> 431) C: Leche acidificada	Leche acidificada (100 ml: 10 ⁹ ufc)	1066 adultos sanos (613 M/453 H) Edad media: 31 años	6 semanas	Influenza Inactivada, Intramuscular, Semana 3	↔IgA específica salivar	↔Tasa de seroprotección ↔ IgA específica salivar
Davidson y col. (129)	<i>L. rhamnosus</i> GG C: Inulina	Cápsula (2x10 ¹⁰ ufc)	41 adultos sanos (26 M/15 H) Edad media: 33 años	28 días	Influenza Viva atenuada, Nasal, Semana 0	↔Igs específicas	↑Tasa de seroconversión (cepa H3N2)
De Vrese y col. (130)	<i>L. rhamnosus</i> GG <i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CRL431 C: Leche acidificada	Leche acidificada (100 gr: 10 ¹⁰ ufc)	61 adultos sanos Edad: 20-30 años	5 semanas	Poliomielitis Viva atenuada, Oral Día 8	---	↑IgA e IgM específicas ↑Anticuerpos neutralizantes ↔Tasa de seroprotección
Paineau y col. (131)	<i>L. acidophilus</i> La-14; <i>B. lactis</i> Bi-07; <i>B. lactis</i> BI-04; <i>L. acidophilus</i> NCFM; <i>L. plantarum</i> Lp-115; <i>L. paracasei</i> Lpc-37; <i>L. salivarius</i> Ls-33 C: Maltodextrina	Cápsula (2x10 ¹⁰ ufc)	83 adultos sanos (52 M/31 H) Edad media: 37 años	21 días	Cólera Inactivada, Oral Día 7 y 14	<u>Respuesta temprana:</u> ↔ Igs específicas <u>Repuesta tardía:</u> <i>L. acidophilus</i> NCFM: ↑IgA e IgM específica	<u>Respuesta temprana:</u> La-14 y BI-04: ↑IgG e; ↔IgA e IgM específica. Resto: ↔IgG, IgA e IgM <u>Respuesta tardía:</u> ↔IgG, IgA

↔: No hay cambios. ---: No hay dato; M: Mujeres; H: Hombres; ufc: unidades formadoras de colonia; Ig: Inmunoglobulina; NK: Natural Killer; IL: Interleuquina; TNF: Factor de necrosis tumoral, IFN: Interferón.

1.5.3.2. Capacidad de modulación sobre la microbiota intestinal: Evidencia en adultos sanos

El efecto modulador de los probióticos sobre la composición de la microbiota intestinal es dependiente del tiempo de consumo, ya que la mayoría de las cepas presentan colonización transitoria y desaparecen en heces a los días de cesar su consumo (50,133,134), requiriendo por ello una ingesta continuada de los mismos para que ejerzan un efecto sobre la salud. De hecho, la detección en heces de las cepas probióticas refleja su paso activo a través del tracto GI y sugiere una colonización transitoria (50,127,134). Los principales efectos que se han observado sobre la microbiota intestinal derivados del consumo de probióticos en adultos sanos se pueden agrupar en dos bloques (Tabla 4): 1) cambios en los grupos bacterianos asociados a las bacterias probióticas ingeridas; 2) cambios a nivel global de composición como la diversidad bacteriana (diversidad α o β), así como en grupos bacterianos diferentes de las bacterias probióticas ingeridas.

a) Cambios en los grupos bacterianos asociados a las bacterias probióticas ingeridas.

El resultado más frecuente encontrado es el aumento en los niveles de los grupos bacterianos asociados a las bacterias probióticas ingeridas, como *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*. El consumo de probióticos pertenecientes al género *Lactobacillus* se relaciona con un aumento en los niveles de este grupo bacteriano en heces, como se evidencia tras el consumo de *L. salivarius* CECT5713 (122), *L. coryniformis* CECT5711 junto con *L. gasseri* CECT5714 (135), *L. paracasei* ssp. *paracasei* LC01 (136), y *L. acidophilus* LA-5 junto con *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 (137). Por otro lado, algunos estudios muestran una modulación del género *Bifidobacterium* tras el consumo de probióticos de *Lactobacillus* (136–139), lo cual sugiere la posible existencia de mecanismos de cross-feeding entre ellos. En este sentido, la degradación de hidratos de carbono complejos por parte de cepas de *Lactobacillus*, como se observa tras la degradación de inulina en fracciones de cadena corta por *L. paracasei* 8700:2, los cuales sirven de sustrato de fermentación para *B. longum* LMG 11047, modula su actividad y produce la liberación de acetato, lactato, formiato y etanol (140). Además, ciertas cepas de *Lactobacillus* modulan la síntesis y degradación de polisacáridos de mucina que a su vez sirven como fuente de energía y carbono para especies de *Bifidobacterium* (141). Por otro lado, aunque menos frecuente, ciertos estudios evidencian un efecto neutro sobre los niveles de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* tras el consumo de probióticos (142,143). En este sentido, cabe mencionar que la técnica de cultivo tradicional utilizada en algunos estudios podría sobreestimar o subestimar los niveles de bacterias detectados (137,142).

b) Cambios a nivel de diversidad bacteriana y de grupos bacterianos no relacionados con las bacterias ingeridas.

La diversidad bacteriana es una medida del número (riqueza) y abundancia de especies que se encuentra en un ecosistema. La diversidad α se define como la diversidad característica de cada ecosistema, medida a través de los índices Chao1, Shannon o Simpson, y la diversidad β es la diversidad que diferencia un ecosistema de otro, y se calcula mediante las distancias Unifrac, que tiene en cuenta las distancias filogenéticas, o las distancias Bray-Curtis, entre otras (134). Una mayor diversidad bacteriana se ha relacionado con una mayor riqueza de genes bacterianos y con un mejor perfil metabólico, mientras que una pérdida de diversidad bacteriana se relaciona con ciertas enfermedades inflamatorias (144). Es una medida frecuentemente analizada en los estudios de secuenciación del gen 16sRNA con el objetivo de

ver el impacto a nivel global derivado del consumo de probióticos. El resultado más frecuente observado en los estudios en adultos sanos es una ausencia de cambios en la diversidad α tras el consumo de probióticos, de acuerdo a una reciente revisión de estudios de intervención (145). Existen estudios que muestran una ausencia de cambios en la diversidad β , sin encontrarse modificación en los niveles de los grupos analizados (107,146). Sin embargo, el estudio de Kim y col. 2013 sí reveló cambios en especies minoritarias tras el consumo de diferentes especies de probióticos de los géneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* y *Lactococcus*, a pesar de no encontrar cambios en la diversidad bacteriana. En concreto, se observaron cambios en especies del filo Firmicutes tras el consumo de probióticos del género *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, destacando *St. salivarius*, *Eubacterium rectale* o *F. praustnizzi*, mientras que las especies de Bacteroidetes se vieron más afectadas por el consumo de probióticos de *Bifidobacterium* (146). En este sentido, el consumo de *L. rhamnosus* GG se relacionó con niveles más bajos de algunas especies de *Bifidobacterium* en comparación con el grupo control (143). En ambos estudios es esperable la ausencia de cambios en la diversidad bacteriana al observarse únicamente cambios en especies minoritarias. Por el contrario, otros estudios sí han revelado cambios en la diversidad β así como en grupos mayoritarios de la microbiota intestinal (138,139,147). En este sentido, el consumo de *L. paracasei* DG aumentó los niveles de *Coprococcus* y disminuyó los niveles del filo Proteobacterias y del género *Blautia-coccoides* (147). Por otro lado, el consumo de *L. Zhang* aumentó *Prevotella* y *Faecalibacterium* y disminuyó *Enterobacter* (138), y el consumo de *B. animalis* ssp. *lactis* BB-12 aumentó los niveles de *Slackia*, *Streptococcus*, *Catenibacterium*, *Collinsella*, *Adlercreutzia*, y disminuyó los niveles de *Lachnoclostridium*, *Roseburia* y *Acidaminococcaceae* (139). El consumo de *L. paracasei* ssp. *paracasei* LC01 aumentó *Roseburia intestinalis* y disminuyó Enterobacterias, aunque en este estudio no se midió la diversidad ya que los grupos bacterianos se midieron por PCR cuantitativa (136) (Tabla 4).

Tabla 4. Estudios de intervención realizados en adultos sanos con el objetivo de evaluar la capacidad moduladora de los probióticos sobre la composición de la microbiota intestinal

	Tratamientos	Vehículo y dosis	Población	Duración	Técnica de análisis	Resultados	Resultados
	Probiótico vs Control					Diferencias vs. Punto basal	Diferencias vs. Control (C)
Sierra y col. 2010 (122)	<i>L. salivarius</i> CECT5713 C: Maltodextrina	Cápsula (2x10 ⁸ ufc/día)	40 adultos sanos (20 M/20 H) Edad media: 33 años	6 semanas	Cultivo	↑ <i>Lactobacillus</i>	↑ <i>Lactobacillus</i>
Olivares y col. 2006(135)	<i>L. coryniformis</i> CECT5711 <i>L. gasseri</i> CECT5714 C: Yogur clásico	Leche fermentada (2x10 ⁸ ufc/día)	30 adultos sanos (15 M/15 H) Edad media: 23-43 años	2 semanas	Cultivo RADP	↑ <i>Lactobacillus</i>	↑ <i>Lactobacillus</i>
Zhang y col. 2013 (136)	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> LC01 C: Leche semidesnatada	Leche semidesnatada (50 ml: 2x10 ⁸ ufc/ml)	52 adultos sanos (31 M/21 H) Edad media: 24 años	4 semanas	PCR cuantitativa	↑ <i>Lactobacillus</i> , <i>Roseburia intestinalis</i> ↑ <i>Bifidobacterium</i> , <i>Escherichia coli</i>	↑ <i>Lactobacillus</i> , <i>Roseburia intestinalis</i> ↓ <i>Escherichia coli</i>
Savard y col. 2011 (137)	<i>L. acidophilus</i> LA-5 <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12 C: Yogur clásico sin bacterias	Leche fermentada 100 gr (LA: 10 ⁹ ufc/día + BB-12: 10 ⁹ -10 ¹⁰ ufc/día)	58 adultos sanos (38 M/20 H) Edad media: 32 años	4 semanas	PCR cuantitativa Cultivo en placa	↑ <i>Bifidobacterium</i> ↑ <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>Enterococcus</i>	↑ <i>Bifidobacterium</i> ↑ <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>Enterococcus</i>
Larsen y col. 2006 (142)	<i>L. paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> CRL-431 <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12 C: Dextrosa	Cápsulas (10 ¹¹ ufc/día)	71 adultos sanos (46 M/25 H) Edad media: 26 años	3 semanas	Cultivo	↔ <i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Clostridia</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>	↔ <i>Bacteroides</i> , <i>Bifidobacterium</i> , <i>Clostridia</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Lactobacillus</i>
Zhang y col. 2014 (138)	<i>L. Zhang</i> C: No hay grupo control. Comparación con punto basal	Cápsulas (10 ¹⁰ ufc/día)	24 adultos sanos (13 M/11 H) Edad media: 41 años	28 días	Pirosecuenciación gen 16sRNA V5-V6 (Roche) PCR cuantitativa	↑Diversidad β (Unifrac) ↑ <i>Bifidobacterium</i> , <i>Faecalibacterium</i> , <i>Prevotella</i> ↓ <i>Blautia-coccoides</i> , <i>Phascolarctobacterium</i> , <i>Enterobacter</i>	---
Filteau y col. (155)	<i>L. acidophilus</i> LA-5 <i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12 C: Yogur clásico	Leche fermentada (100 gr: LA 10 ⁹ ufc/día + BB-12 10 ⁹ -10 ¹⁰ ufc/día)	58 adultos sanos (38 M/20 H) Edad media: 32 años	4 semanas	T-RFLP PCR cuantitativa	↔ Diversidad β (Bray-Curtis) ↔ <i>Bacteroides-Prevotella</i> , <i>Blautia coccoides</i> , <i>C. leptum</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i>	↔ Diversidad β (Bray-Curtis) ↔ <i>Bacteroides-Prevotella</i> , <i>Blautia coccoides</i> , <i>C. leptum</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Bifidobacterium</i>

	Tratamientos Probiótico vs Control	Vehículo y dosis	Población	Duración	Técnica de análisis	Resultados Diferencias vs. Punto basal	Resultados Diferencias vs. Control (C)
Ferrario y col. 2014 (147)	<i>L. paracasei</i> DG C: Maltodextrina + almidón	Cápsulas (2,4 x 10 ¹³ ufc/día)	34 adultos sanos (19 M/15 H) Edad media: 35 años	4 semanas	Secuenciación gen 16sRNA V3 (Ion Torrent)	↔Diversidad α (Chao1, Shannon) ↑Diversidad β (Unifrac)	↑ <i>Coprococcus</i> ↓ <i>Proteobacterias</i> ↓ <i>Blautia-coccoides</i>
Burton y col. 2017 (143)	<i>L. rhamnosus</i> GG C: Leche acidificada con D-(+)- glucono-δ-lactona (400 gr)	Leche fermentada (400 gr: 2,8 x 10 ⁶ ufc/g)	13 adultos sanos (0 M/13 H) Edad media: 24 años	2 semanas	Secuenciación gen 16sRNA V3-V4 (Illumina)	↔Diversidad α (Shannon, Simpson) ↓ <i>Bilophila wadsworthia</i>	↑ <i>Intestinibacter bartlettii</i> ↓ <i>B. kashiwanohense</i> , <i>B. pseudocatenulatum</i> , <i>Megasphaera</i>
Kim y col. 2013 (146)	<i>L. casei</i> ; <i>L. brevis</i> <i>B. longum</i> + <i>Lactococcus lactis</i> + <i>St. thermophilus</i> <i>L. rhamnosus</i> ; <i>L. delbrueckii</i> + <i>St. thermophilus</i> ; <i>B. animalis</i> + <i>L. delbrueckii</i> + <i>St.</i> <i>thermophilus</i> C: No hay grupo control. Comparación con punto basal	Cápsulas (10 ⁶ -10 ⁸ ufc/día)	18 adultos sanos (12 M/6 H) Edad media: 22 años	8 semanas	Pirosecuenciación gen 16sRNA V1-V2 (Roche)	↔Diversidad β (Unifrac) ↑Especies de Firmicutes tras el consumo de <i>Lactobacillus</i> y <i>Bifidobacterium</i> ↑Especies de Bacteroidetes tras el consumo de <i>Bifidobacterium</i>	---
Volokh y col. 2019 (139)	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> BB-12 C: No hay grupo control. Comparación con punto basal	Leche fermentada (250 ml)	150 adultos sanos Edad: 18-40 años	30 días	Secuenciación gen 16sRNA V4 (Illumina)	↔Diversidad α (Chao1, Shannon) ↑Diversidad β (Bray-Curtis) ↑ <i>Bifidobacterium</i> , <i>Slackia</i> , <i>Streptococcus</i> , <i>Catenibacterium</i> , <i>Collinsella</i> , <i>Adlercreutzia</i> ↓ <i>Lachnospirillum</i> , <i>Roseburia</i> <i>Acidaminococcaceae</i>	---
McNulty y col. 2011 (50)	<i>B. animalis</i> ssp. <i>lactis</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>cremoris</i> , <i>St. thermophilus</i> C: No hay grupo control. Comparación con punto basal	Leche fermentada (2 u/día: 3,2x10 ⁷ +6,3x10 ⁷ GE)	14 adultos sanos (21-32 años)	7 semanas	Pirosecuenciación Gen 16sRNA V2 (454 FLX)	↔Sin cambios significativos en los grupos bacterianos analizados	---

↔: No hay cambios; ---: No aplicable; M: Mujeres; H: Hombres; RADP: Amplificación aleatoria de ADN polimórfico; PCR: Reacción en cadena de la polimerasa; ufc: unidades formadoras de colonias; GE: equivalentes genómicos.

Como se puede observar, la respuesta del sistema inmunitario y de la microbiota intestinal al consumo de probióticos es muy variada, existiendo numerosos factores que pondrían estar afectando (Figura 2). Entre ellos, cabe destacar los siguientes:

1) El tipo de cepa, ya que los efectos derivados del consumo de probióticos son específicos de cepa y no son comparables incluso dentro de la misma especie bacteriana (97). Este factor es considerado el más relevante a la hora de comparar resultados entre estudios de diseño similar.

2) La dosis, ya que una mayor cantidad de bacterias presentes en el producto se relaciona con niveles más elevados en heces (142), sugiriendo con ello una mayor colonización durante el periodo de consumo.

3) La matriz alimentaria donde se encuentran las cepas probióticas, como es el caso de las leches fermentadas, que contienen otros nutrientes como péptidos bioactivos, calcio o ácidos grasos esenciales formando todos una compleja estructura que facilita una mayor biodisponibilidad de los mismos (148). En concreto, parece ser que el momento de adición de las cepas probióticas al yogur, antes o después de la fermentación, influye en sus efectos sobre el sistema inmunitario, sugiriendo la existencia de efectos sinérgicos entre los diferentes ingredientes de la matriz alimentaria (123).

4) La duración del tratamiento, ya que se ha observado una gran variabilidad en la respuesta del sistema inmunitario y de la microbiota intestinal al consumo de probióticos, observándose cambios tanto en periodos cortos de tiempo (135) como en largos (119), con una gran variabilidad en la magnitud de la respuesta (Tablas 2, 3 y 4).

5) El tipo de metodología de análisis: es importante considerar la sensibilidad del método de análisis de los parámetros inmunitarios, principalmente de aquellos que se encuentran a muy baja concentración en sangre. En cuanto a la microbiota intestinal, el gran avance realizado en las técnicas de biología molecular ha permitido evolucionar desde el método tradicional por cultivo, el cual presenta ciertas limitaciones ya que ciertos grupos bacterianos no son cultivables, corriendo el riesgo de una sobreestimación o subestimación en las proporciones de bacterias (137), a técnicas de cuantificación mediante primers específicos de regiones conservadas del gen 16sRNA o mediante sondas marcadas, como la PCR cuantitativa o FISH, y finalmente hasta el desarrollo de las técnicas de secuenciación de alto rendimiento, las cuales han permitido conocer con mayor profundidad la caracterización de la microbiota intestinal, basada en el uso de plataformas de secuenciación (454 pirosecuenciación, Illumina, SOLiD, Ion Torrent) y la posterior identificación taxonómica de los amplicones generados con bases de datos de genes bacterianos (Greengenes, SILVA, entre otras) (149).

6) Existencia de un grupo placebo adecuado: hay que destacar que en varios de los estudios revisados que han empleado la secuenciación del gen 16sRNA para evaluar el impacto de los probióticos sobre la microbiota intestinal no existe un grupo control adecuado, sino que los efectos a final del tratamiento se comparan con los niveles basales de los grupos bacterianos (50,139,146). Esto justifica la importancia de desarrollar estudios de intervención en los que se incluya un grupo placebo apropiado al tipo de matriz en la que se administra la cepa probiótica.

7) La dieta basal, y en concreto, el contenido en fibra, ya que representa el principal sustrato de fermentación para la microbiota intestinal modulando así su composición y funcionalidad (65).

8) El género de los participantes, ya que las diferencias genéticas y hormonales entre hombres y mujeres parecen influir en la diferente composición de la microbiota intestinal y con ello en la respuesta del sistema inmunitario al consumo de probióticos (150,151).

9) Factores intrínsecos del sujeto, como la composición basal de grupos bacterianos (152), así como la secreción de ácidos biliares (153) y la actividad del eje intestino-cerebro (154) podrían ejercer un efecto sobre la respuesta de la microbiota intestinal y del sistema inmunitario al consumo de probióticos.



Figura 2. Factores que influyen en la respuesta del sistema inmunitario y la microbiota intestinal al consumo de probióticos y yogures.

1.5.4. *Lactobacillus coryniformis* CECT5711: evidencia previa.

Lactobacillus coryniformis CECT5711 (Lc) es una cepa probiótica aislada de un queso de cabra artesano (156), cuyo consumo data de hace muchos años atrás, encontrándose en una bebida fermentada tradicional turca llamada Boza hecha con maíz cocido, trigo y arroz (157). Presenta propiedades probióticas tales como la capacidad para sobrevivir en el tracto GI, adhesión a células epiteliales y producción de compuestos antimicrobianos (156). En cuanto a criterios de seguridad, se ha demostrado que no presenta ninguna actividad enzimática perjudicial para el organismo humano, como producción de aminas biógenas o actividad β -glucuronidasa.

Estudios en animales han demostrado que no produce bacteriemia ni resistencia a antibióticos tras su consumo durante 30 días, ni efectos tóxicos en el crecimiento y desarrollo de los animales (158).

Existe evidencia de los efectos probióticos sobre el sistema inmunitario y la microbiota intestinal derivados del consumo de Lc tanto en animales como en humanos. En animales obesos alimentados con una dieta alta en grasa, el consumo de la cepa (10^8 ufc/día) durante 12 semanas produjo importantes cambios, como la reducción de marcadores de inflamación en hígado y mejora de los niveles de glucosa plasmática, aumento de los niveles de *Lactobacillus*, los cuales fueron alterados tras el consumo de la dieta alta en grasa, mejora de la integridad de la barrera intestinal y disminución de los niveles de LPS plasmático, así como de marcadores de estrés oxidativo (159). En niños alérgicos se ha observado que el consumo de la cepa en una leche fermentada con *St. thermophilus* y *L. gasseri* CECT5714 durante 3 meses redujo los niveles de IgE, inmunoglobulina relacionada con procesos alérgicos, y de IgA en heces, al mismo tiempo que aumentó los niveles de células Treg (160). El consumo del mismo producto en niños sanos durante 3 semanas indujo un aumento en los niveles de *Lactobacillus*, así como en IgA secretora en heces y saliva (161). Por otro lado, su consumo durante 2 semanas en adultos sanos aumentó los niveles de neutrófilos y monocitos, así como la actividad fagocítica, observándose resultados similares en el grupo control que consumía yogur clásico. Sin embargo, el grupo probiótico se diferenció del grupo placebo en los niveles más elevados de células NK (135). Estos resultados sugieren que la cepa Lc podría presentar propiedades inmunomoduladoras en adultos sanos, pero no se pueden atribuir tales hallazgos al consumo aislado de Lc. Por este motivo, se planteó el estudio de su capacidad coadyuvante de forma aislada en la presente tesis doctoral utilizando un modelo de vacunación con Hepatitis A en adultos sanos.

1.6. YOGURES

1.6.1. Generalidades

La palabra yogur procede de la palabra turca “yogurtmak” que significa “cuajada”, y es definido por el Códex Alimentarius como el producto obtenido tras la fermentación de la leche gracias a la acción de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*, que deben estar viables en una dosis mínima de 10^7 ufc/g para que el producto pueda ser denominado bajo el término de yogur (CODEX STAN 243–2003). El yogur lleva formando parte de nuestra alimentación desde hace millones de años, y fueron los turcos los primeros que atribuyeron al consumo de yogur beneficios sobre la salud, concretamente sobre síntomas de enfermedades dérmicas e intestinales (162). A partir del descubrimiento en 1905 realizado por Elie Metchnikoff acerca de las propiedades beneficiosas de las bacterias del yogur sobre la salud, cada vez son más numerosos los estudios centrados en evaluar los efectos del yogur sobre la salud humana (163).

El yogur es un alimento con una alta densidad nutritiva que se ha relacionado con una mejora en la calidad global de la dieta (164). Esto es debido a su alto contenido en ingredientes esenciales, como el calcio, fósforo y vitaminas del grupo B, péptidos bioactivos, ácidos grasos esenciales y BAL, que complementan su contenido en proteínas de alto valor biológico y grasas saludables. Todos ellos se encuentran formando parte de una matriz alimentaria en la que se favorece la interacción entre ellos, aumentando así su biodisponibilidad y protegiéndolos de la degradación gracias a la capacidad de formar geles y a su viscosidad. En este sentido, los péptidos bioactivos están asociados en la matriz a oligosacáridos y grasas, mientras que algunas proteínas del suero, la β -lactoglobulina y α -lactalbúmina, interaccionan con los minerales como el calcio favoreciendo su absorción (165). Los beneficios asociados al consumo de yogur parecen asociarse más al efecto de la matriz en su conjunto que al efecto de nutrientes aislados (148).

1.6.2. Principales beneficios asociados al consumo de yogur

- Consumo de yogur y efectos en la salud gastrointestinal

Tradicionalmente, los efectos más conocidos y evidenciados del consumo de yogur se han relacionado con beneficios en la salud GI. En concreto, destaca su papel en el tratamiento de infecciones, relacionándose con una mejora en los síntomas de la diarrea aguda y la disminución de la frecuencia de deposiciones y duración de la infección en niños (166), así como en ciertas enfermedades de carácter inmuno-inflamatorio, como las alergias (167) y las EII (168). Además, la EFSA ha reconocido el uso del término probiótico para las bacterias del yogur gracias a su actividad β -galactosidasa, la cual ayuda a la digestión de la lactosa y produce una mejora en los síntomas intestinales relacionados con su intolerancia (100).

- Consumo de yogur y efectos en el metabolismo

Estudios epidemiológicos y observacionales han revelado una asociación entre el consumo de yogur y beneficios a nivel metabólico, como el control de la diabetes tipo 2 (169) y la mejora del peso corporal y de la adiposidad (170), mientras que sus efectos sobre marcadores de riesgo CV y del perfil lipídico parecen ser neutros (171,172). Cabe destacar que el consumo de otros productos lácteos como la leche no se relaciona con efectos similares sobre el metabolismo a pesar de contener una composición nutricional parecida, sugiriendo así que la matriz láctea del yogur y sus fermentos lácticos contribuyen a potenciar los efectos beneficiosos de los nutrientes del yogur (172). En este sentido, el consumo de yogur se relaciona con una mayor liberación de metabolitos beneficiosos, como aminoácidos y ácidos biliares, en comparación con el consumo de leche (173), sugiriendo que la fermentación es un proceso esencial para la producción de metabolitos con propiedades beneficiosas para la salud humana. En algunos estudios el efecto aislado del consumo de yogur se puede ver enmascarado por la inclusión de otro tipo de productos lácteos en la intervención (leche, queso o mantequilla) o por factores de confusión que van asociados al consumo de yogur, como la práctica de una alimentación equilibrada o de actividad física (172); sin embargo ciertos estudios muestran una asociación positiva incluso tras controlar por dichos factores (174), evidenciando así una relación más fuerte entre el consumo de yogur y beneficios metabólicos.

1.6.3. Ingredientes del yogur con efectos sobre el metabolismo, la inflamación y la microbiota intestinal

- Calcio

Se relaciona con una mejora del perfil lipídico disminuyendo el colesterol LDL y aumentando el colesterol HDL al promover la lipólisis e inhibir la lipogénesis, bloquear la absorción de grasas en el intestino y aumentar la excreción de grasas en heces (175). Por otro lado, se relaciona con un efecto anti-hipertensivo debido a sus efectos sobre la regulación del calcio intracelular a través de la inhibición de la 1,25-dihidroxitamina D (176).

- Proteínas y péptidos

Las proteínas del suero lácteo se relacionan con un mejor control del peso corporal al promover una menor ingesta de energía debido a su efecto saciante, y se relacionan con una mejora en el metabolismo de la glucosa (177). Por otro lado, las caseínas, que son las proteínas mayoritarias del yogur, son precursoras de péptidos inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina, atribuyéndoles el efecto anti-hipertensivo asociado al consumo de yogur (178), aunque se necesitan más estudios en humanos que confirmen tales efectos (179).

- Perfil de ácidos grasos

El contenido en grasa del yogur es a menudo modificado por la industria láctea con el objetivo de conseguir un producto con mejores características nutricionales y organolépticas (180). En este sentido, en contra de lo que se pensaba hace años, la grasa láctea no se relaciona con efectos perjudiciales sobre el perfil lipídico ni marcadores de riesgo CV (172), ni se han observado diferencias en este sentido entre el consumo de yogur entero y desnatado, mostrando efectos similares sobre determinados marcadores metabólicos (181). Esto es debido a que la grasa del yogur presenta características particulares, ya que a pesar de tener un alto contenido en AGS, una parte de ellos son AGCC y AGCM (182). Los AGCC y AGCM se relacionan con efectos positivos sobre el metabolismo debido a su rápida metabolización en el hígado a través de β -oxidación evitando su acumulación en el tejido adiposo, en contra de lo que sucede con los AGCL como el palmítico que se transportan por quilomicrones al hígado y son más fáciles de almacenar en el hígado y en el tejido adiposo (80). El yogur contiene también niveles elevados de CLA, el cual se relaciona con efectos positivos sobre los niveles de colesterol y el peso corporal, aunque la dosis necesaria para conseguir tales efectos es mucho más alta que la que nos pueden aportar las cantidades consumidas de yogur dentro de nuestra dieta habitual (179). Dependiendo del tipo de leche, el perfil graso varía, ya que las leches de oveja y cabra tienen el doble de AGCC y AGCM que la leche de vaca, así como niveles más elevados de CLA y de PUFA, en concreto, de ácido linoleico y α -linolénico (182). En este sentido, parece ser que más que ejercer efectos aislados, es el total de la grasa, con los diferentes tipos de AG presentes, lo que actúa en conjunto para lograr una mejora del balance energético y de la homeostasis de lípidos y glucosa en el organismo (172).

Dada la evidencia existente del efecto de la grasa sobre la microbiota intestinal, como se ha explicado en el apartado 1.4, cabe esperar que el consumo de yogur con un aporte determinado de grasa pueda afectar a las bacterias comensales presentes en la microbiota intestinal. Además, existen estudios en los que se ha sugerido que los cambios en la microbiota intestinal derivados del consumo de yogur no se deben a su contenido en bacterias (152), sugiriendo así un posible papel de otros componentes del yogur. Existen pocos estudios que evalúen el impacto de la grasa láctea sobre la microbiota intestinal. En este sentido, un estudio realizado en ratones alimentados con una dieta alta en grasa saturada láctea ha evidenciado un aumento en *Bacteroidetes* y en *Bilophila wadsworthia* en animales knock-out para IL-10. El mecanismo parece estar relacionado con el efecto que ejerce la grasa láctea sobre la estimulación de los procesos de conjugación de taurina de los ácidos biliares, que son fuente de sulfuro para *Bilophila wadsworthia*. Sin embargo, no se observaron cambios en los animales controles tras la ingesta de grasa láctea, sugiriendo una predisposición a cambios en la microbiota cuando existe una alteración inmunológica (183). En otro estudio realizado en animales sometidos a una intervención con AGCM, se observó una disminución del cociente Firmicutes/*Bacteroidetes*, en concreto debido a una reducción de los niveles de *Allobaculum* y *Lachnospiraceae*, así como una disminución en Proteobacterias (79). Por otro lado, la ingesta de CLA se ha relacionado con un efecto prebiótico al aumentar los niveles de *Bacteroidetes/Prevotella* y de *Akkermansia muciniphila* contrarrestando así los efectos negativos de una dieta alta en grasas (184). Estos resultados sugieren que el perfil de AG del yogur podría ejercer un efecto sobre el metabolismo a través de cambios en la microbiota intestinal. Sin embargo, cabe destacar que los estudios en animales se realizan con dosis muy elevadas de grasas y es necesario realizar estudios con las dosis habituales de yogur para evaluar el impacto de las cantidades de AG aportadas por el yogur dentro de una alimentación equilibrada, objeto de estudio de la presente tesis doctoral.

- Bacterias del yogur: *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus*

Las bacterias del yogur se relacionan con efectos a nivel GI, como la mejora de los hábitos intestinales y de alteraciones funcionales tales como el estreñimiento o la diarrea (168). En concreto, ejercen sus mecanismos en el colon o bien al interactuar directamente con las bacterias comensales de la microbiota intestinal o con las células inmunitarias de la lámina propia, o bien a través de mecanismos indirectos como la producción de metabolitos, tales como los péptidos bioactivos de caseína, los cuales promueven a nivel intestinal la secreción de mucina y mejora de la barrera intestinal (185) fomentando una mayor protección frente a la colonización por patógenos, o bien los AGCC (135). En este sentido, aunque los efectos beneficiosos a nivel metabólico derivados del consumo de yogur no se han atribuido a su contenido en bacterias debido a que no existen suficientes estudios al respecto (172), no es descabellado pensar que podrían contribuir de forma positiva al efecto beneficioso asociado al yogur, ya que tanto los péptidos bioactivos de caseína como los AGCC ejercen beneficios sobre el control de la presión arterial y el metabolismo de la glucosa y lípidos, respectivamente (172). Para ejercer sus efectos, las bacterias deben ser capaces de sobrevivir a las condiciones del tracto GI y llegar al colon donde pueden colonizar de forma transitoria y ejercer sus mecanismos de acción. En este sentido, la detección de las bacterias del yogur en heces podría ser reflejo de su colonización a nivel del colon, como ya se ha mencionado previamente. Los estudios realizados con yogur muestran tanto resultados positivos con aumento en los niveles de las bacterias del

yogur en heces (186,187) como negativos (152,188), lo cual sugiere que factores como el tipo de cepa, la dosis utilizada o la metodología de análisis empleada pueden influir en las diferencias entre estudios (189).

1.6.4. Evidencia actual de los efectos del consumo de yogur en adultos sanos

La modulación de la microbiota intestinal es uno de los efectos más investigados en los estudios de intervención con yogur en adultos sanos, dado la relevancia de su papel sobre la prevención de enfermedades metabólicas y de carácter inmuno-inflamatorio. Existen datos contradictorios al respecto, ya que mientras algunos estudios revelan que el consumo de yogur no se relaciona con cambios en la diversidad bacteriana ni en los grupos bacterianos analizados (146,155), otros sí muestran niveles más altos de los géneros bacterianos relacionados con las bacterias ingeridas, como *Lactobacillus* (190), así como cambios en otros grupos bacterianos, observándose en varios estudios niveles más bajos de *Bacteroides* (152,190) (Tabla 5). Dada la gran estabilidad que presenta la microbiota intestinal frente a factores externos, así como el gran número de bacterias presentes en la microbiota intestinal, del orden de 10^{11} - 10^{12} ufc/g de contenido colónico (191), parece esperable que permanezca inalterada tras el consumo de la dosis de bacterias que aporta el yogur, en torno a 10^7 - 10^8 ufc.

En cuanto a los efectos del yogur sobre la inflamación en adultos sanos, existen muy pocos estudios de intervención con un adecuado diseño, un buen tamaño muestral y controlados con un grupo placebo (171). Además, ante la ausencia de procesos inflamatorios crónicos, los procesos homeostáticos del organismo mantienen los valores de los biomarcadores dentro de unos determinados límites (2). Sin embargo, como se ha mencionado, existen factores de estilo de vida como la práctica de dietas desequilibradas, el sedentarismo y el exceso de estrés crónico, cada vez más frecuentes en nuestra sociedad, así como el sobrepeso, situación que predispone al desarrollo de obesidad y que cada vez presenta mayor incidencia en población aparentemente sana, que pueden ir asociados con procesos inflamatorios subclínicos y conllevar una disbiosis en la microbiota, daños en la barrera intestinal y endotoxemia, promoviendo la difusión de LPS a los tejidos metabólicos del organismo y produciendo una inflamación sistémica (192). En este sentido, los principales marcadores de inflamación cuantificados en los estudios son las citoquinas pro-inflamatorias (IL-1 β , IL-6 y TNF- α), las quimioquinas (proteína quimiotáctica de monocitos: MCP-1), adipoquinas (leptina y adiponectina), la proteína C reactiva (PCR), las moléculas de adhesión (ICAM-1 y VCAM-1) y las selectinas (Tabla 5). Por ello es importante llevar a cabo estrategias de prevención a través del estudio de componentes de nuestra alimentación que pueden determinar beneficios a este nivel.

En este sentido, el consumo de yogur no ejerce efectos perjudiciales sobre marcadores de inflamación en sujetos con obesidad (193), y el consumo de lácteos tanto enteros como desnatados se ha relacionado con un efecto anti-inflamatorio en sujetos con trastornos del metabolismo, incluyendo obesidad y sobrepeso (181). En la tabla 5 se exponen los estudios realizados en adultos sanos que evalúan el efecto del yogur sobre marcadores de inflamación. Es necesario aclarar que en varios de ellos (123,194) no existe un grupo control como tal, sino que se toma el punto basal de inicio del tratamiento con yogur como punto de comparación de los efectos en los biomarcadores medidos al final del tratamiento. Existen resultados contradictorios en la modulación de marcadores de inflamación tras la ingesta de yogur en

adultos sanos. El estudio de Meng y col. 2017 muestra disparidad en sus efectos sobre marcadores de inflamación, ya que el consumo de yogur produce una mejora en algunos marcadores como TLR-2 en células monocíticas (CD4+HLA-DR+), pero no modifica los niveles de TNF- α ni IL-6 en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) estimuladas *in vitro* (123). Por el contrario, el estudio de Meyer y col. 2007 sugiere un posible papel del yogur en la estimulación del sistema inmunitario frente a infecciones, ya que se observa un aumento de los niveles de TNF- α e IL-1 β en CMSP estimuladas *in vitro* con LPS o fitohemaglutinina (PHA)(194), mientras que el estudio de Pei y col. 2017 muestra una reducción de los niveles plasmáticos de TNF- α y mejora de marcadores de endotoxemia (proteína de unión a LPS [LBP]/sCD14) en comparación con el grupo control, sin afectar a los niveles de IL-6 y proteína C reactiva (PCR)(195). Esta gran variabilidad observada hace necesario el diseño de adecuados estudios de intervención para evaluar el efecto que ejerce el consumo continuado de yogur sobre marcadores de inflamación.

Tabla 5. Estudios de intervención realizados en adultos sanos con el objetivo de evaluar los efectos sobre la inflamación y la microbiota intestinal derivados del consumo de yogur.

	Tratamientos Yogur vs Control(C)	Población	Duración tratamiento	Resultados Diferencias vs. Punto basal	Resultados Diferencias vs. Control (C)
Pei y col. 2017(195)	Yogur (339 g/día) C: Pudding de soja (324 g/día)	128 adultos sanos (128 M/0 H) Edad: 30 años	9 semanas	---	↓TNF- α y LBP/sCD14 ↑IgM EndoCAb ↔IL-6 y CRP, CD14 soluble
Meng y col. 2017 (123)	Yogur batido (240 gr) C: No hay grupo control. Se compara con los niveles basales.	30 adultos sanos (17 M/11 H) Edad media: 28 años	4 semanas	↓TLR-2 en células CD14-HLA+ ↔ TNF- α e IL-6 en CMSP	---
Meyer y col. 2007 (194)	Yogur (10 ⁷ ufc/g) Fase 1: 100 g/día Fase 2: 200 g/día C: No hay grupo control. Se compara con los niveles basales	33 adultos sanos (33 M/0 H) Edad media: 23-43 años	Fase 1: 2 semanas Fase 2: 3 semanas	↑TNF- α e IL-1 β en CMSP estimuladas in vitro con LPS o PHA	---
Uyeno y col. 2007 (152)	Yogur(10 ⁸ ufc/g) C: No hay grupo control. Se compara con los niveles basales.	15 adultos sanos (6 M/9 H) Edad: 24-46 años	20 días	↑ <i>C. coccoides</i> - <i>E. rectale</i> group ↓ <i>Bacteroides-Prevotella</i> group	----
García-Albiach y col.2008 (190)	Yogur (10 ⁷ -10 ⁸ ufc/g) C: Yogur pasteurizado	79 adultos sanos (47 M/32 H) Edad media: 24 años	4 semanas	↑ <i>Lactobacillus</i> ↓ <i>Bacteroides-Porphyromonas-Prevotella</i>	↔No hay cambios significativos

↔: No hay cambios; ---: No hay dato; M: Mujeres; H: Hombres; ufc: unidades formadoras de colonia; Ig: Inmunoglobulina; IL: Interleuquina; TNF: Factor de necrosis tumoral, TLR: Receptor tipo Toll; LPS: Lipopolisacárido; PHA: fitohemaglutinina; LBP: Proteína de unión a LPS; HLA: Antígeno leucocitario humano; CMSP: Células mononucleares de sangre periférica.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

La población objeto de estudio de esta tesis doctoral son adultos sanos, los cuales representan un importante grupo diana en el estudio de la relación entre el consumo de probióticos y yogures con beneficios para la salud. La posibilidad de mostrar una mejora en la función inmunitaria o en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal podría ampliar el espectro de acción de los probióticos con fines preventivos y no ser solo empleados en el tratamiento directo de una enfermedad.

La presente tesis doctoral tiene como **objetivo global** evaluar los efectos derivados del consumo de probióticos y yogures sobre el sistema inmunitario y la microbiota intestinal de adultos sanos.

Dicho objetivo se ha abordado en tres proyectos diferentes con los **siguientes objetivos primarios**:

1) Estudio Pro-L-cory: Evaluación del efecto del consumo de la cepa probiótica *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 sobre el sistema inmunitario de adultos sanos, en concreto, el estudio de su capacidad coadyuvante en un modelo de vacunación con Hepatitis A medido a través de los niveles de anticuerpos específicos del virus de la vacuna en sangre.

2) Estudio Almicrobhol: Evaluación de la relación del consumo de leches fermentadas con probióticos y de yogures con los grupos de la microbiota intestinal relacionados con las bacterias ingeridas en adultos sanos. En concreto, la relación entre el consumo de LFP con los niveles de los taxones de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, y de yogures con *Lactobacillus* y *Streptococcus*.

3) Estudio O-yogur: Evaluación de los efectos del consumo de yogur de vaca, oveja entero y semidesnatado sobre marcadores de inflamación y grupos principales de la microbiota intestinal en adultos sanos con niveles al límite o ligeramente altos de colesterol plasmático.

Y como **objetivos secundarios**:

1.1) Estudio Pro-L-cory: Estudiar los efectos inmunomoduladores de la cepa probiótica *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 sobre parámetros de inmunidad innata, niveles de citoquinas plasmáticas y otros parámetros de inmunidad específica.

2.1) Estudio Almicrobhol: Estudiar la relación entre el consumo de LFP y yogures con la composición global de la microbiota intestinal de adultos sanos.

2.2) Estudio Almicrobhol: Estudiar la relación entre el consumo de LFP y yogures con parámetros de funcionalidad intestinal, tales como los niveles de AGCC, la frecuencia e intensidad de diferentes síntomas intestinales y parámetros de hábitos intestinales.

3.1) Estudio O-yogur: Evaluar los efectos del consumo de yogur de vaca entero, oveja entero y semidesnatado sobre marcadores de inflamación y la composición de grupos principales de la microbiota intestinal en un subgrupo de sujetos con los niveles más elevados del cociente colesterol total/HDL en comparación con el resto de sujetos del estudio .

3. METODOLOGÍA

3. METODOLOGÍA

La presente tesis doctoral engloba tres estudios de diferentes características, detallados individualmente en los siguientes apartados y en la Tabla 6.

3.1. Estudio Pro-L-cory

3.1.1. Diseño experimental

Estudio de intervención, aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo llevado a cabo desde mayo de 2012 a abril de 2013. El estudio comprendió un periodo de lavado de 2 semanas, durante el cual los sujetos debían excluir de su alimentación todo tipo de productos fermentados (quesos, yogures y encurtidos), así como probióticos y prebióticos. Al finalizar el periodo de lavado, los sujetos comenzaron la fase de intervención de 6 semanas de duración. La vacuna inactivada de la Hepatitis A (HAVRIX 1440) fue administrada a las dos semanas de intervención (V2) en el servicio médico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), dividiendo así la fase de intervención en dos periodos: un periodo pre-vacunación de 2 semanas y un periodo post-vacunación de 4 semanas. Las muestras de sangre y heces se recogieron en la visita 1 basal (V1), a las 2 semanas de intervención o visita 2 (V2) (vacunación) y a las 6 semanas de intervención o visita 3 (V3) (Figura 3).

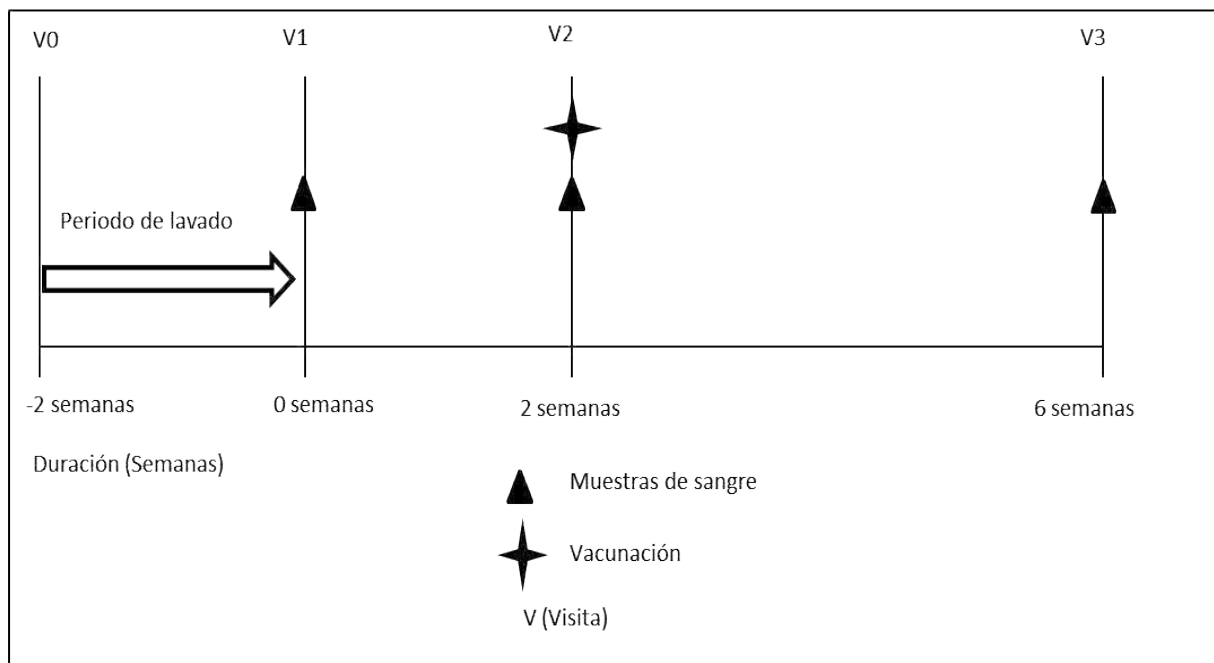


Figura 3. Diseño experimental del estudio Pro-L-cory

3.1.2. Productos

La cepa probiótica utilizada en este estudio, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 (Lc), fue aislada de un queso artesano de cabra (156) y ha sido reconocida por la EFSA como segura para el consumo humano (GRAS). En concreto, tanto su seguridad (158) como sus propiedades probióticas sobre el sistema inmunitario (156) han sido previamente demostradas. Las cápsulas de probiótico contenían 3×10^9 ufc de la cepa probiótica y las capsulas de placebo maltodextrina; ambas fueron mantenidas en frío y consumidas después de cenar.

3.1.3. Sujetos

Un total de 138 adultos sanos de edades comprendidas entre 20-45 años, con un índice de masa corporal (IMC) entre 18,5 y 25 kg/m², y sin haber recibido la vacuna de la Hepatitis A o haber sufrido la enfermedad fueron incluidos en el estudio. Los criterios de exclusión fueron: padecer enfermedades GI, metabólicas o inmunológicas (intolerancias o alergias alimentarias), consumir antibióticos durante los 2 meses previos a la intervención o estar embarazada. El cálculo del tamaño muestral se realizó considerando obtener un 5% de diferencia en la producción de anticuerpos específicos de la Hepatitis A, con un poder del 80% y un nivel de significancia del 0,05 de acuerdo a trabajos previos (196), resultando en un tamaño muestral de 136 adultos sanos. Se reclutó un total de 138 voluntarios de los que solo finalizaron 123, siendo los principales motivos de abandono el tratamiento con antibióticos o motivos personales (Figura 4).

La aleatorización de los voluntarios en los grupos de intervención se realizó utilizando un programa informático considerando el género, la edad y el IMC como factores de ponderación, asignándose a uno de los siguientes grupos:

- 1) Probiótico (PRO1): recibió una cápsula diaria de *Lactobacillus coryniformis* (Lc) con 3×10^9 ufc en el periodo pre y post vacunación.
- 2) Mixto (PRO2): recibió una cápsula diaria de *Lactobacillus coryniformis* (Lc) con 3×10^9 ufc en el periodo pre-vacunación y una cápsula diaria de placebo (maltodextrina) en el periodo post vacunación.
- 3) Control (C): recibió una cápsula diaria de placebo (maltodextrina) en el periodo pre y post vacunación.

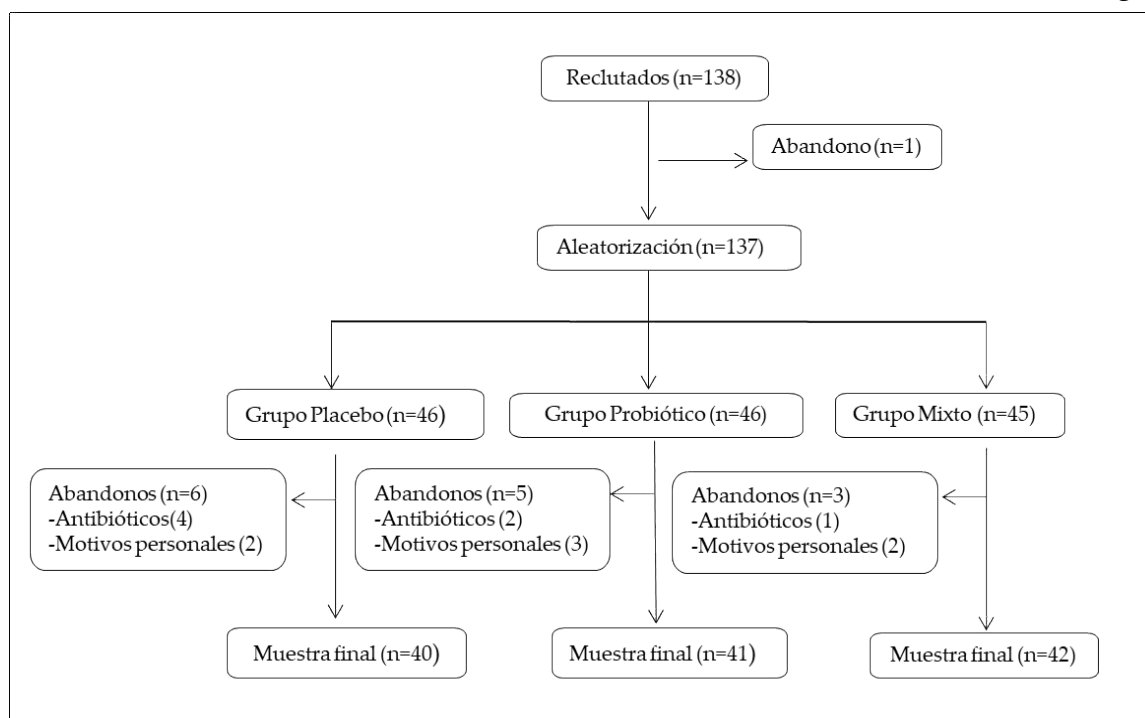


Figura 4. Diagrama de flujo de los participantes del estudio Pro-L-cory

3.1.4. Interrogante principal del estudio

Evaluar la capacidad coadyuvante de la cepa probiótica Lc medida a través de la producción de anticuerpos específicos de la Hepatitis A, en concreto la suma de IgM e IgG. Se comprobó que los sujetos eran negativos en la visita 1 basal, excluyendo aquellos que dieron un resultado positivo (7 sujetos), y posteriormente se cuantificaron los niveles de anticuerpos por kits específicos de ELISA tanto en la V1 como a las 4 semanas después de la vacunación (V3). Así mismo, se calculó la tasa de seroconversión, que es el porcentaje de sujetos negativos a los anticuerpos de la Hepatitis A que se convierten en positivos tras la vacunación (Apartado 4.1.1).

3.1.5. Interrogantes secundarios del estudio

Evaluar la capacidad inmunomoduladora de la cepa probiótica Lc en otros parámetros inmunitarios (Apartado 4.1.1):

- 1) Inmunidad innata: análisis de la actividad fagocítica de granulocitos y monocitos mediante el test *Phagotest*, el cual se basa en determinar el porcentaje total de monocitos y granulocitos que han fagocitado bacterias de *Escherichia coli* marcadas con el fluorocromo FITC y mediante tinción de ADN para visualizar por citometría de flujo las células vivas fagocíticas.
- 2) Citoquinas plasmáticas (IL-4, IL-6, IL-13, IL-10, IL-12, IFN- γ y TNF- α) en muestras de plasma, separadas por centrifugación y mantenidas en congelación a -80°C hasta el análisis mediante tecnología Milliplex (Merck Millipore).
- 3) Inmunidad específica, medida a través de los niveles séricos de Igs (IgA, IgE, IgG e IgM) cuantificadas por inmunoturbidimetría, las subpoblaciones de linfocitos [linfocitos T totales, T colaboradores naïve (CD4+CD45RA+), T colaboradores de memoria (CD4+CD45RO+), T

citotóxicos naïve (CD8+CD45RA+), T citotóxicos de memoria (CD8+CD45RO+), linfocitos B (CD19+) y células NK (CD16+56+) medidos por marcaje con anticuerpos marcados con fluorocromos y análisis mediante citometría de flujo.

3.2. Estudio Almicrobhol

3.2.1. Diseño experimental

Estudio observacional que comprendió dos visitas, en las cuales se realizaron entrevistas con dos nutricionistas cualificadas con el objetivo de obtener datos de estilo de vida de los participantes. En la primera visita se evaluó el estado general de salud, las enfermedades diagnosticadas, el consumo de medicamentos, los hábitos de consumo de tabaco y la calidad del sueño mediante la Encuesta Nacional de Salud. El nivel socioeconómico se estimó teniendo en cuenta todos los bienes materiales de los voluntarios, considerando tres grupos: 1) Bajo <50,000 euros; 2) Medio: 50,000-200,000 euros; 3) Alto: >200,000 euros. La altura (Soechle), la circunferencia de cintura y cadera (SECA), el peso y la composición corporal (Tanita BC601) se midieron descalzos y con ropa ligera. Dado que el IMC [peso/(altura)²] no es un buen indicador de la distribución de la grasa corporal, se consideraron los puntos de corte óptimos de los porcentajes de grasa corporal establecidos por el equipo (Tanita BC601), de forma separada para hombres y mujeres, y se consideraron los siguientes grupos: 1) Normopeso (IMC=18,5-25 kg/m²) o sobrepeso (IMC=25-30 kg/m²) con valores óptimos de grasa corporal (10-20% hombres; 21-32% mujeres); 2) Sobrepeso (IMC=25-30 kg/m²) u obesidad (IMC=30-35 kg/m²) con valores por encima de los valores óptimos de grasa corporal (>20% hombres y >32% mujeres). En esta misma visita los sujetos recibieron instrucciones para la recogida de una muestra de heces en condiciones estériles, la cual debían mantener en congelación y traer al Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN) en condiciones de refrigeración en una segunda visita donde se almacenaron a -80°C hasta su análisis. En esta segunda visita, se completaron los cuestionarios referentes a los hábitos dietéticos mediante un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) (197), en el que se analizaba la frecuencia de consumo referente al último año de 104 alimentos y bebidas de la siguiente forma: Nunca o casi nunca, 1-3 veces al mes, 1-6 veces por semana o número de veces al día. El hábito de consumo de yogures y leches fermentadas con probióticos (LFP) se evaluó mediante un cuestionario en el que se registraba tanto la frecuencia de consumo como la cantidad consumida, obteniendo un consumo semanal de cada uno de ellos. A su vez, también se preguntaba por el tipo de yogur consumido en función de los siguientes criterios: 1) Contenido en grasa: griego, entero, o desnatado; 2) Sabor: natural, de sabores o con trozos de frutas; 3) Contenido en azúcar: azucarado, edulcorado o sin endulzar. Respecto al análisis del consumo de LFP, se clasificaron en No consumidores (n=175) y Consumidores (n=85). Dentro del grupo de consumidores, se tuvieron en cuenta dos criterios: a) Según el número de LFP consumidos, se dividieron en: 1) Bajo consumo (Low-PFM: >0-<2 LFP/semana, n=23); 2) Medio consumo (Medium-PFM: ≥2-4 LFP/semana, n=36); 3) Alto consumo (High-PFM: ≥5 LFP/semana; n=26). b) Según el tipo de LFP: 1) consumidores exclusivos de LFP con *Bifidobacterium* (Bif-PFM, n=33); 2) consumidores exclusivos de LFP con *Lactobacillus* (Lb-PFM, n=14); 3) consumidores mixtos de LFP con

Bifidobacterium y *Lactobacillus* (Mixed-PFM, n=38). Dentro del grupo de no consumidores de LFP, se dividieron en 4 grupos de consumo de yogures: 1) No consumidores (Y-NC, 0 y/semana; n=40); 2) Bajo consumo (Low-YC: >0-2 y/semana; n=41); 3) Medio consumo (Medium-YC: 3-4 y/semana, n=44); 4) Alto consumo (High-YC: ≥5 y/semana; n=50)(Figura 5).

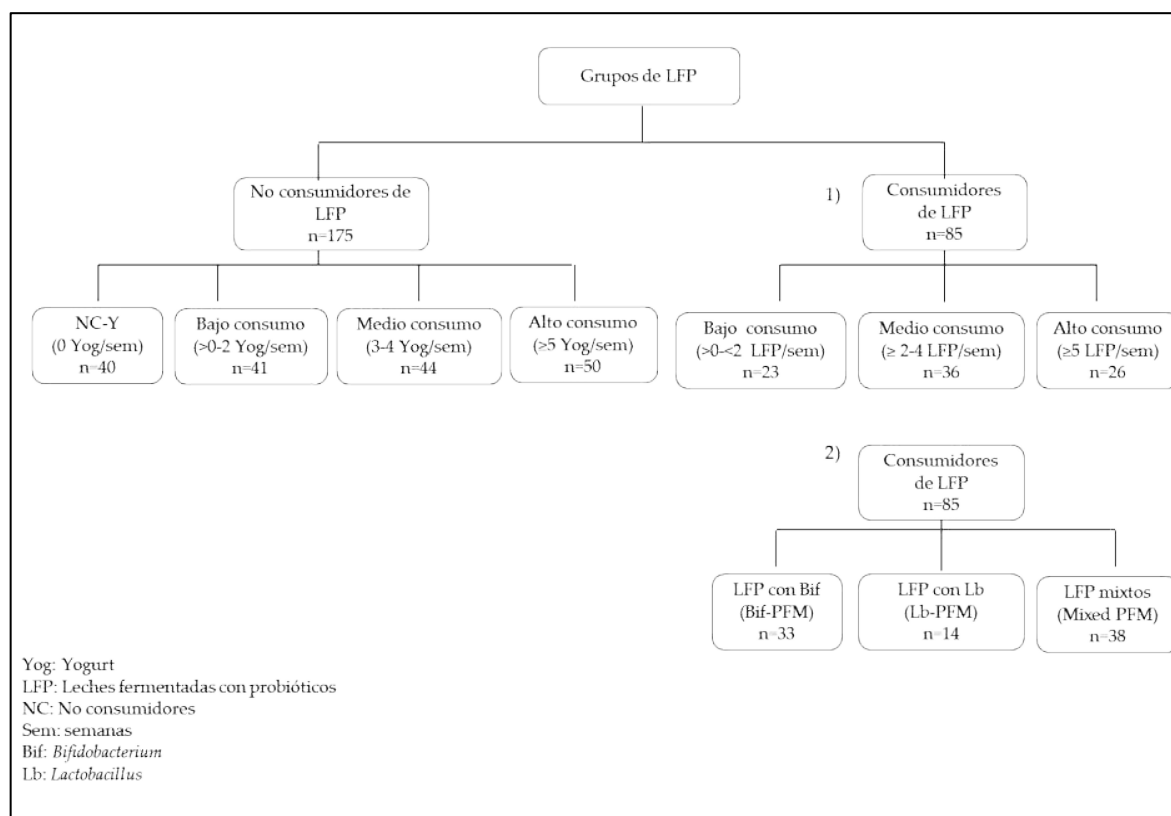


Figura 5. Distribución de los sujetos en los diferentes grupos de leches fermentadas con probióticos (LFP) del estudio Almicrobhol

3.2.2. Sujetos

Se reclutó un total de 272 adultos con edades comprendidas entre 25 y 50 años y con un IMC entre 18,5-35 kg/m² a través de anuncios en la zona universitaria y de campañas de salud promocionadas por empresas entre sus empleados. Los criterios de exclusión fueron: 1) padecer alguna de las siguientes enfermedades: diabetes tipo 1, enfermedades neurológicas, hepáticas, cardíacas, renales, pulmonares o cáncer, enfermedades metabólicas congénitas, enfermedades autoinmunes (incluyendo hipotiroidismo autoinmune), enfermedades inflamatorias intestinales, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), síndrome de Cushing o intolerancias alimentarias; 2) medicación crónica; 3) uso de antibióticos en los dos últimos meses; 4) estar bajo tratamiento dietético; 5) haberse sometido a una operación quirúrgica en el último mes.

El tamaño muestral fue calculado considerando un cambio de un 10% en los niveles de *Bifidobacterias* en heces. En concreto, tomando como valor de *Bifidobacterias* un 9,8 ufc/g de

heces secas y con una desviación estándar (DE) de 0,4 según (198), con un error alfa de 0,05 y una potencia del 80%, se estimó necesario incluir 262 sujetos. Del total de 272 sujetos reclutados, 12 abandonaron el estudio, siendo los principales motivos el consumo de antibióticos o motivos personales, quedando un tamaño muestral final de 260 adultos (134 hombres y 126 mujeres). Todos los sujetos firmaron el consentimiento informado, y el comité ético fue aprobado por el Hospital Puerta de Hierro de Madrid, junto con el comité de bioética del CSIC. El estudio fue llevado a cabo cumpliendo las normas de la declaración de Helsinki (64ª Asamblea General, Fortaleza, Brasil, Octubre 2013) y las de buena práctica clínica.

3.2.3. Interrogante principal del estudio

Evaluar la relación entre el consumo de LFP y yogures con los niveles en heces de los grupos taxonómicos relacionados con las bacterias ingeridas. En concreto, estudiar la asociación entre el consumo de LFP y los niveles de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus*, así como del consumo de yogures y los niveles de *Lactobacillus* y *Streptococcus* presentes en la microbiota intestinal de adultos sanos (Apartado 4.1.2).

3.2.4. Interrogantes secundarios del estudio

1. Evaluar la relación entre el consumo de LFP y yogures con la composición global de la microbiota intestinal de adultos sanos (Apartado 4.1.2).

La composición de la microbiota intestinal fue analizada en muestras de heces tras extracción del ADN bacteriano con el kit de Quiagen (QIAamp DNA Stool Mini Kit) precedido de unos pasos de optimización previa (199) y posterior cuantificación con el espectrofotómetro Nanodrop ND-1000. Previo al proceso de secuenciación, se midió de nuevo la calidad del DNA en Picogreen, y se procedió a diluir las muestras a 0,5 ng/μl previamente a la amplificación de las regiones V3+V4 del gen 16sRNA. Se comprobó la integridad de los amplicones mediante electroforesis en gel de agarosa (1,5%). La secuenciación se llevó a cabo en Illumina Miseq (kit V3; 2x270 pb). La clasificación de los grupos taxonómicos se realizó en el software de Illumina Miseq Reporter con los siguientes pasos: demultiplexing y obtención de archivos Fastq, obteniéndose 37.793.518 secuencias (media de 144.803 secuencias/muestra). Las secuencias se asignaron a las correspondientes UTOs (Unidad taxonómica operativa) mediante clusterización en el programa ClassifyReads, programa derivado del Ribosomal Database Project (RDP) que emplea la base de datos de Greengenes, obteniendo 20 filos, 243 familias, 651 géneros y 1492 especies con una precisión del 100%, 99,97%, 99,65% y 98,65% respectivamente (200). Los taxones con una abundancia relativa <0,002% del total de secuencias y presentes en <10 sujetos fueron eliminados, quedando así 11 filos, 150 familias, 241 géneros y 348 especies para el análisis estadístico.

2. Evaluar la relación entre el consumo de LFP y yogures con parámetros de funcionalidad intestinal de adultos sanos (Apartado 4.2.2 Datos inéditos).

- Ácidos grasos de cadena corta: La producción de AGCC se cuantificó en 0,100 g de muestra congelada, a las cuales se añadió 1 ml ácido fosfórico al 5%. Posteriormente las muestras se congelaron para precipitar la materia seca, se descongelaron y centrifugaron 5 minutos a 13500 rpm (Jouan Centrifuge A14, France) para obtener los

sobrenadantes y cuantificar los siguientes AGCC: acético, propiónico, butírico, isobutírico, valérico e isovalérico por cromatografía de gases. El sistema comprendía un detector FID en llama asociado a una columna específica (DB-WAXtr, 100% polyethylene glycol, 60m, 0.325x0.25) y se utilizó helio como gas conductor a 1.5 ml/min. El volumen inyectado fue de 1µl a una temperatura de 260°C. El patrón interno fue el ácido metilvalérico y la curva estándar se preparó de igual modo que las muestras. La temperatura inicial de la columna fue de 260°C, seguido de un calentamiento a 50°C cada 2 minutos, subiendo 15°C cada minuto hasta 150°C, 5°C cada minuto hasta 200°C y finalmente 15°C cada minuto hasta 240°C. La concentración de los diferentes AGCC se identificó por el tiempo de retención de los compuestos estándar.

- Hábitos intestinales: los hábitos intestinales se analizaron mediante un cuestionario específico adaptado de (201) realizado en la segunda visita del estudio, que incluía el estudio de los siguientes síntomas gastrointestinales: hinchazón, borborrismos, ardor, dolor abdominal y flatulencia, de los cuales se evaluaba la frecuencia de aparición (0=nunca; 1=casi nunca; 2=a veces; 3=a menudo) y la intensidad (0=nada; 1=ligero; 2=moderado; 3=intenso). Se calculó una puntuación para cada síntoma individual, y una puntuación global del total de síntomas sumando las frecuencias y las intensidades de cada uno de ellos. Se estudió el número de deposiciones al día y la consistencia de las mismas mediante la escala de Bristol (1-2=duras; 3-5=normal; 6-7=blandas).

3.3. Estudio O-yogur

3.3.1. Diseño experimental

Estudio de intervención, aleatorizado y cruzado llevado a cabo desde enero a junio de 2015. El estudio consistió en un periodo pre-intervención, durante el cual los sujetos debían continuar con sus pautas dietéticas habituales evitando el consumo de LFP. Tras finalizar este periodo, los sujetos comenzaban la fase de intervención de 5 semanas en la que debían consumir de forma diaria 2 yogures de uno de los siguientes tipos (2x125 g): 1) Yogur de vaca entero (3,0% grasa); 2) Yogur de oveja semidesnatado (2,8% grasa); 3) Yogur de oveja entero (5,8% grasa). Cada fase de intervención estaba separada de la siguiente por un periodo de lavado de 4 semanas, en el que debían seguir las mismas pautas dietéticas que en el periodo pre-intervención (Figura 6). Los sujetos fueron aleatorizados mediante un sistema de aleatorización con un programa informático, controlando para IMC, género y edad. Las muestras de sangre se recogieron a primera de hora de la mañana en ayunas antes y después de cada periodo de intervención y las muestras de heces siguiendo el procedimiento descrito para el estudio Almicrobol. Los registros dietéticos de 3 días previos a cada visita se analizaron mediante el programa "DIAL" con el objetivo de evaluar el patrón dietético de los voluntarios excluyendo la contribución aportada por el consumo de yogures.

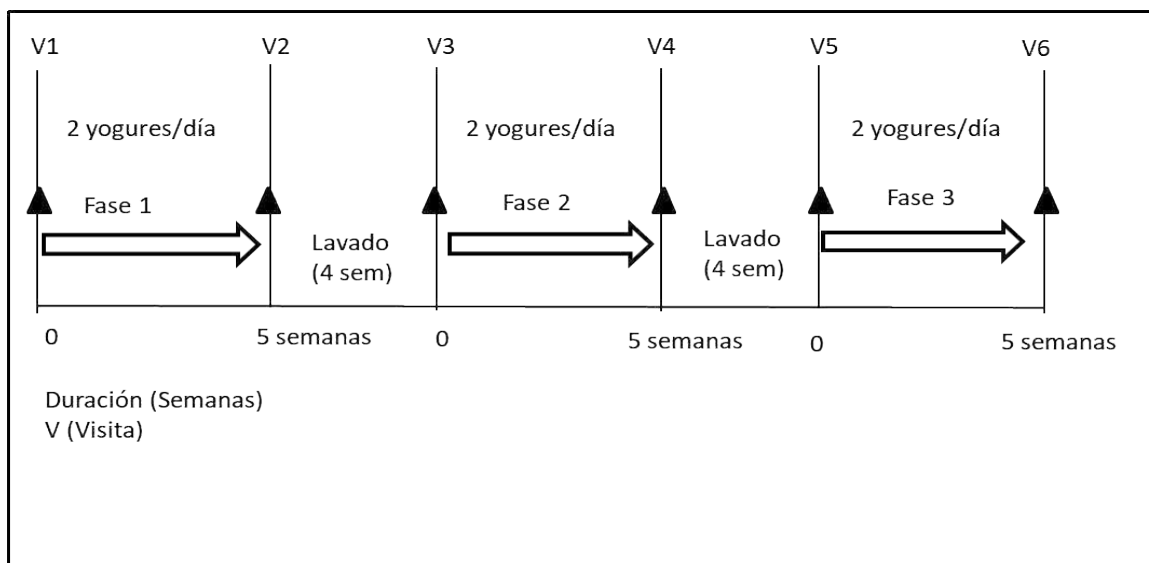


Figura 6. Diseño experimental del estudio O-yogur

3.3.2. Sujetos

La población de estudio comprendió adultos sanos entre 25-65 años de edad, con un IMC entre 19-28 kg/m² y con niveles ligeramente altos de colesterol plasmático (190-240 mg/dl). Los criterios de exclusión fueron: enfermedades crónicas diagnosticadas (inflamatorias, cardiovasculares o endocrinas), consumo crónico de medicamentos antihipertensivos, antiinflamatorios y/o medicamentos para bajar el colesterol (ej: estatinas), padecer alergias o intolerancias alimentarias a productos lácteos, estar bajo un régimen dietético, consumir suplementos nutricionales, consumir una elevada cantidad de alcohol (más de 28 bebidas a la semana para hombres y 16 para mujeres) o practicar ejercicio físico muy intenso. Tras el screening inicial, 30 sujetos (16 mujeres y 14 hombres) fueron seleccionados de los 64 que contactaron para participar en el estudio. La elección de este perfil de población dependió de la principal hipótesis de trabajo del estudio global, que comprendía el estudio de las propiedades hipocolesterolemiantes de los yogures de oveja en comparación con el yogur de vaca (202). Por ello, el tamaño muestral fue calculado utilizando como variable los niveles basales de colesterol LDL (3,23 mmol/L; DE 0,52 mmol/L), con una potencia estadística del 90% y un error alfa del 0,05, resultando en un tamaño muestral de 29 sujetos. Sin embargo, el tamaño muestral obtenido parece ser adecuado también para variables inmunológicas dado que es más alto que en otros estudios con probióticos cuyo objetivo también se centra en analizar cambios en el sistema inmunitario y la microbiota intestinal (119,121). El peso y la composición corporal se midieron mediante bioimpedancia (Tanita BC601) y la altura con el tallímetro (Soehnle). La presión arterial se midió en ambiente tranquilo en el brazo derecho bajo condiciones controladas de temperatura (Omron M6, Intellisense). Todos los sujetos firmaron el consentimiento informado, y el protocolo fue aprobado por el CEI del Hospital Puerta de Hierro de Madrid, junto con el comité bioético del CSIC. El estudio fue llevado a cabo cumpliendo las normas de la declaración de Helsinki (64^a Asamblea General, Fortaleza, Brasil, Octubre 2013) y las de buena práctica clínica.

3.3.3. Productos

Los yogures de oveja se prepararon con leche fresca de oveja de raza Churra sp (originaria de Castilla y León) proporcionada por la Escuela de Viñalta (Palencia, España) procedente de 162 animales tratados bajo la Directiva 2010/63/EU de protección animal con fines científicos. El cultivo bacteriano utilizando (YF-L903) contenía las bacterias propias del yogur *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* y *Streptococcus thermophilus* y fue proporcionado por Chr.Hansen (Madrid, España). El yogur de vaca utilizado en el estudio era un yogur comercial de extenso consumo elaborado con leche procedente de vacas de raza Holstein. La elaboración de los yogures de oveja se llevó a cabo en la Estación Tecnológica de la Leche (ETL, Palencia) en las dos horas posteriores a la recepción de la leche, la cual fue filtrada y separada en dos lotes. A continuación, fue pasterizada a 80°C durante 30 min y posteriormente refrigerada hasta 42-43°C e inoculada con los cultivo stárter, los cuales estaban originalmente liofilizados y fueron preparados según las condiciones del fabricante. El producto final se envasó en recipientes de plástico (120 ml, Alta Barrera SL, Barcelona, España) e incubados (PortinoxARGBT 700-IP, Sevilla, España) a 42°C hasta alcanzar un pH de 4,6. Los yogures fueron almacenados a 4°C y posteriormente enviados al ICTAN donde se realizó la intervención nutricional. Los análisis microbiológicos mostraron que los tres tipos de yogur contenían la dosis mínima de bacteria (10^7 ufc) establecida (Material suplementario apartado 4.1.3) según la normativa de calidad de yogur (RD 271/2014) (202).

3.3.4. Interrogantes principales del estudio

Evaluar las diferencias tras el consumo de yogur de vaca entero, de oveja semidesnatado y entero en:

1) Grupos principales de la microbiota intestinal (*Bacteroides*, *Blautia coccoides*–*Eubacterium rectale* group, *Clostridium leptum* group, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp. y bacterias totales), tras extracción y cuantificación del ADN bacteriano, y posterior determinación específica por PCR cuantitativa (Apartado 4.1.3).

2) Niveles plasmáticos de marcadores de inflamación: leptina, insulina, IL-8, IL-10, TNF- α , MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 y P-selectina mediante tecnología Milliplex (Luminex Corp., Austin, TX) (Apartado 4.1.3).

3.3.5. Interrogante secundario del estudio

Estudiar los cambios de las variables arriba mencionadas en un subgrupo de sujetos correspondiente al tertil más alto del cociente colesterol total/HDL (10 sujetos: 6 mujeres y 4 hombres) en relación al resto de sujetos del estudio (20 sujetos: 10 mujeres y 10 hombres). El punto de corte del tertil alto referente al cociente colesterol total/HDL fue establecido en $>3,5$ para mujer y $>5,1$ para hombre.

Tabla 6. Principales características de los estudios incluidos en la presente tesis doctoral.

	Estudio Pro-L-cory	Estudio Almicrobhol	Estudio O-yogur
Diseño	Intervención (6 semanas), aleatorizado, doble ciego, controlado por placebo	Observacional	Intervención (5 semanas x 3 brazos), aleatorizado, cruzado
Población	123 adultos sanos (25-45 años) (85 M, 38 H)	260 adultos sanos (25-50 años) (126 M, 134 H)	30 adultos sanos (25-65 años) (14 M, 16 H) Niveles al límite o ligeramente altos de colesterol
Productos de estudio	Cepa probiótica <i>Lactobacillus coryniformis</i> CECT5711 (3x10 ⁹ ufc) administrada en cápsulas Placebo: Maltodextrina Dosis: 1 cápsula/día	Leches fermentadas con probióticos (LFP: LFP con <i>Bifidobacterium</i> y LFP con <i>Lactobacillus</i>) Yogures	Yogur de vaca entero (3,0% grasa), oveja semidesnatado (2,8% grasa) y oveja entero (5,8 % grasa). Dosis: 2 u (2x125 g/día)
Interrogante principal	<u>Efectos en el sistema inmunitario:</u> Capacidad coadyuvante de la cepa probiótica <i>L. coryniformis</i> CECT5711 en un modelo de vacunación con Hepatitis A, medida a través de la producción de anticuerpos específicos frente al antígeno de la vacuna.	<u>Relación con la microbiota intestinal:</u> 1. Consumo de LFP y su relación con los grupos bacterianos de las bacterias ingeridas (<i>Lactobacillus</i> , <i>Bifidobacterium</i>). 2. Consumo de yogures y su relación con los grupos bacterianos de las bacterias ingeridas (<i>Lactobacillus</i> , <i>Streptococcus</i>).	<u>Efectos en inflamación y microbiota intestinal:</u> 1. Hormonas, citoquinas y marcadores de inflamación (leptina, insulina, IL-8, IL-10, TNF- α , MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, P-selectina). 2. <i>Bacteroides</i> , <i>Blautia coccoides</i> - <i>Eubacterium rectale</i> , <i>Clostridium leptum</i> , <i>Bifidobacterium</i> spp., <i>Lactobacillus</i> spp., <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>Faecalibacterium prausnitzii</i> , bacterias totales
Interrogantes secundarias	Tasa de seroconversión Ig séricas Subpoblaciones de linfocitos Citoquinas plasmáticas Inmunidad innata	1. Consumo de LFP y su relación con la composición global de la microbiota intestinal 2. Consumo de yogures y su relación con la composición global de la microbiota intestinal 3. Consumo de LFP y yogures y su relación con parámetros de funcionalidad intestinal: ácidos grasos de cadena corta, síntomas y hábitos intestinales.	Estudio en un subgrupo de sujetos (n=10) con los valores más altos del cociente colesterol total/HDL en relación al resto de sujetos del estudio.

M: Mujeres; H: Hombres; MCP-1: Proteína quimiotáctica de monocitos; ICAM-1: molécula de adhesión intercelular 1; VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1; Ig: Inmunoglobulinas

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4. 1. ESTUDIOS REALIZADOS

4.1.1. Evaluation of Lactobacillus coryniformis CECT5711 strain as a coadjuvant in a vaccination process: a randomised clinical trial in healthy adults

Noemí Redondo¹, Esther Nova¹, Alina Gheorghe¹, Ligia Esperanza Díaz¹, Aurora Hernández¹, and Ascensión Marcos¹

¹ Immunonutrition Group, Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), Jose Antonio Novais, St.10., 28040 Madrid, Spain

Redondo N., *et al.* Nutrition & Metabolism 2017; 14:2. DOI 10.1186/s12986-016-0154-2

RESUMEN

4.1.1. Evaluación de los efectos de *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 como coadyuvante en un proceso de vacunación: un estudio aleatorizado en adultos sanos

Antecedentes y objetivos: Los efectos que ejercen los probióticos sobre el sistema inmunitario se han estudiado de forma extensa en estados de enfermedad. Sin embargo, su papel en adultos sanos no está del todo claro debido a los procesos de homeostasis inmunológica. Por ello, la EFSA ha reconocido el uso de protocolos de vacunación para evaluar el papel de los probióticos en la mejora de la respuesta inmunitaria frente a antígenos. El objetivo del estudio fue evaluar el efecto del consumo de *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 (Lc) en la inmunidad específica de adultos sanos en un modelo de vacunación con el virus de la Hepatitis A. Métodos: Estudio de intervención de 6 semanas de duración llevado cabo en 123 adultos sanos, que recibieron la vacuna intramuscular de la Hepatitis A en la semana 2 de intervención y fueron divididos en los siguientes grupos: 1) PRO1 consumió durante 2 semanas la cepa probiótica (1 cápsula/día; 3×10^9 ufc/cápsula) y placebo durante 4 semanas después de la vacunación; 2) PRO2 consumió probiótico (3×10^9 ufc/cápsula) antes y después de la vacunación; 3) Grupo control (C) consumió placebo antes y después de la vacunación. Las muestras de sangre se recogieron al inicio del tratamiento (visita 1; V1) y después de 2 (V2) y 6 semanas (V3) de intervención. En cada visita, se midieron parámetros de hematología, los niveles de subpoblaciones de linfocitos y citoquinas en sangre. Los anticuerpos específicos de la Hepatitis A se estudiaron en V1 y V3. Las diferencias entre grupos en los niveles de subpoblaciones de linfocitos y anticuerpos específicos se midieron mediante un test de ANOVA de 1 vía y post-hoc de Bonferroni, mientras que las diferencias en los niveles de citoquinas se estudiaron mediante test de Kruskal Wallis y U Mann-Whitney para las comparaciones por pares. Para evaluar diferencias entre visitas en el mismo grupo, se utilizó un modelo de medidas repetidas para las variables paramétricas y el test de Friedman de muestras relacionadas y el coeficiente de concordancia de Kendall para las variables no paramétricas. El test de Chi cuadrado se utilizó para analizar las diferencias en las tasas de seroconversión entre grupos. Resultados: Los niveles de anticuerpos específicos fueron significativamente más altos en el grupo PRO1 ($50,54 \pm 29,57$) comparado con el grupo control ($36,23 \pm 16,45$) ($P=0,017$), mostrando valores intermedios en el grupo PRO2 ($41,61 \pm 15,74$). Las tasas de seroconversión fueron similares entre los 3 grupos (97,3%, 92,3% y 97,4% en C, PRO1 y PRO2 respectivamente). Los niveles de linfocitos T de memoria aumentaron en V3 comparado con V1 en PRO2 ($P=0,032$). Los niveles de citoquinas no fueron diferentes entre grupos. Conclusión: La capacidad coadyuvante de la cepa probiótica Lc relativa a la producción de anticuerpos específicos muestra resultados dispares y parece ser dependiente del tiempo de administración de la cepa.

Contribución del doctorando: Recogida de datos de los voluntarios, metodología de laboratorio (técnicas inmunológicas: actividad fagocítica, cuantificación de citoquinas en plasma mediante Luminex, marcaje de poblaciones de linfocitos mediante fluorocromos y citometría de flujo), realización de las bases de datos, análisis y tratamiento estadístico de los datos y escritura del artículo científico.

RESEARCH

Open Access



Evaluation of *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 strain as a coadjuvant in a vaccination process: a randomised clinical trial in healthy adults

Noemí Redondo, Esther Nova^{*}, Alina Gheorghe, Ligia Esperanza Díaz, Aurora Hernández and Ascensión Marcos

Abstract

Background: Although the effects of probiotics on the immune system have been extensively evaluated under disease states, their role in healthy situations remains unclear, since changes are hardly expected under immunological homeostasis. EFSA indicates that vaccination protocols could be used to evaluate the potential role of probiotics to improve the immune response against antigen challenges. The aim of the study was to evaluate the effect of *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 (Lc) on the specific immunity of healthy volunteers undergoing vaccination with Hepatitis A virus (HAV).

Methods: One hundred twenty-three healthy adults were randomised into three groups to follow a 6-week (wk) intervention and all received an intramuscular HAV vaccine 2 weeks after starting the intervention: 1) PRO1 received Lc for 2 weeks (1 capsule/day; 3×10^9 CFU/capsule) and placebo capsules after vaccination; 2) PRO2 received a daily capsule of Lc (3×10^9 cfu/day) before and after the challenge; 3) Control group (C) received a daily placebo capsule before and after the vaccine. Blood samples were collected at the beginning (visit 1; V1) and after 2 (V2) and 6 weeks (V3) of the intervention. At each visit, lymphocyte subset counts and cytokine levels were analysed. Specific HAV antibodies were analysed at V1 and V3. To evaluate differences between groups, one-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test were used regarding lymphocyte subset counts and specific HAV antibodies production, and Friedman test of related samples and Kendall concordance coefficient for cytokines production. Chi square test was used to analyse seroconversion rates.

Results: Specific HAV antibodies were significantly higher in PRO1 (50.54 ± 29.57) compared to C (36.23 ± 16.45) ($P = 0.017$) and showed an intermediate value in PRO2 (41.61 ± 15.74). Seroconversion rates were similar in the three groups (97.3, 92.3 and 97.4% in C, PRO1 and PRO2 respectively). Memory T-helper lymphocytes increased in V3 vs. V1 ($P = 0.032$) in PRO2. No differences were found in cytokine concentrations.

Conclusion: Mixed results have been found regarding the usefulness of Lc supplementation to increase the antigen-specific antibody response to an immune challenge. Clinical trial registration number: EudraCT Number 2016-000183-42. Registered 19 January 2016. Retrospectively registered.

Keywords: *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, Probiotics, Immune response, Vaccine, Healthy Adults

* Correspondence: enova@ictan.csic.es

Immunonutrition Group (Metabolism and Nutrition Department) – Institute of Food Science, Technology and Nutrition, Spanish National Research Council (ICTAN-CSIC), José Antonio Novais St. 10, 28040 Madrid, Spain



Background

There is wide evidence about how nutrition affects the immune system and modulates the resistance to infection [1, 2]. Currently, there is a vast research about the role of specific food components in enhancing immune responses against a challenge with the aim to improve health and reduce disease risks [3]. In this line, the interest in probiotics has substantially increased over the last two decades, which are well-defined as 'live bacteria that offer a health benefit to the host when administered in adequate amounts' [4]. Probiotics have been shown to exert beneficial effects in health and disease in many studies [5, 6]. In particular, probiotic intake is related to a better control of infectious diseases [7], and in some cases with an improvement of the duration or severity of infections [8, 9]. The mechanism could be related to an interaction between probiotics and intestinal bacteria and thus to the innate and specific host immune cells [10].

The European Food Safety Agency (EFSA) states that vaccination protocols may be allowable in order to evaluate the potential role of probiotic strains on improving the immune response against antigen challenges [11]. In this regard, the stimulation of protective antibody titres could be used under standardized conditions to substantiate a health claim on the function of the immune system related to defence against pathogens [11–13]. In fact, these protocols have been already used in studies with healthy subjects [14, 15]. Lactobacilli are considered potential candidates to develop antigen delivery strategies for immunization [4]; indeed, these bacteria have been included in our diet into many fermented products for centuries. In fact, the main objective of employing lactic acid bacteria as adjuvants in a vaccination process is to gain a more efficient immune response [9].

The strain used in this study, *L. coryniformis* CECT5711, was isolated from an artisan goat milk cheese [16] and it has been recognised as QPS (*qualified presumption of safety*) by EFSA. This strain has been proven to comply with the main safety criteria [17] and the most important properties for probiotics to exert their effects on the immune system [16, 18]. In addition, it has been related to an improvement of both innate and specific immune response in previous studies in healthy subjects when consumed along with *L.gasseri* CECT5714 [19, 20]. Since vaccine-antibody response is mediated by the activation of both responses, the aim of this study was to find out whether the consumption of this single strain, under a Hepatitis A vaccine model, could induce a vaccine-antibody response and thus be used as a coadjuvant in a vaccination process.

Methods

Experimental design

This study is a randomized, double-blinded, placebo-controlled, human intervention trial, which started on

May 2012 and finished on April 2013. A 2-weeks run-in was performed prior to the intervention and followed during all the study. During this time subjects were asked to avoid any fermented food, probiotics or prebiotics consumption. All volunteers were vaccinated at week 2 of the study in the medical service of the "Spanish National Research Council (CSIC)", with a "HAVRIX 1440" inactivated Hepatitis A vaccine. The intervention lasted 6 weeks (wk), which was divided into a pre-vaccination period (2weeks before the intramuscular vaccine), plus a post-vaccination period (4weeks following the vaccine). Although the between-subject variability in response to vaccination is normally quite high, the period between vaccination and the plateau phase of the response starts from about 3 weeks [12]. For this reason, the measurement of antibody production was established after 4 weeks of vaccination. After an overnight fast, blood samples were collected at the start of the intervention or visit 1 (V1), after 2 weeks or visit 2 (V2) and after 6 weeks or visit 3 (V3).

Subjects

Sample size calculation was performed to demonstrate a 5% difference in specific Hepatitis A antibody titers with a power of 80% and a significance level of 0.05. Under these assumptions, based in previous published work [21], a sample size of at least thirty-six subjects per group would be required. In total, 138 healthy adults started the study, but only 123 finished the trial (Fig. 1). The main dropout reasons were antibiotic treatment or personal issues. The recruitment of the volunteers was carried out through advertisement and on-line services. The exclusion criteria were frequent gastrointestinal, metabolic and immunological disorders (lactose intolerance or food allergies), antibiotic treatment during two months prior to the intervention or pregnancy. All volunteers were young adults (aged 20–45 years), showing a normal body mass index (BMI) (between 18.5 and 24.9 kg/m²) [22], who reported not to have been vaccinated or had suffered from Hepatitis A.

Volunteers included in the study were randomly allocated into one of the three groups established: 1) PRO1 received a daily capsule of Lc for 2weeks (3×10^9 colony forming units ([cfu]/capsule) and after vaccination received placebo capsules with maltodextrin; 2) PRO2 received a daily capsule of Lc (3×10^9 cfu/day) before and after the vaccine; 3) Control group (C) received a daily placebo capsule with maltodextrin before and after the vaccine. A stratified randomization procedure was followed using a random number generator with an informatics program and sex, age and BMI as potential covariates. The capsules were kept in the fridge and ingested after dinner. Baseline characteristics of the volunteers are described in Table 1.

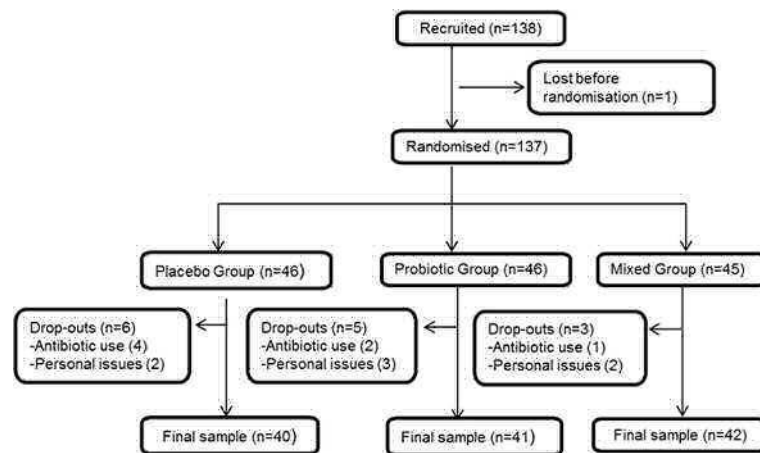


Fig. 1 Flowchart of participating subjects

Endpoints

Primary efficacy variable was vaccine-specific antibody titers, including specifically IgG and IgM antibodies.

Secondary variables were seroconversion rate, serum immunoglobulins (Ig A, IgE, IgG and IgM), lymphocytes subsets (total T, naïve and memory T helper and naïve and memory T cytotoxic lymphocytes, B lymphocytes, Natural Killer (NK) cells) and cytokines production (interleukin (IL)-4, IL-6, IL-13, IL-10, IL-12, interferon (IFN)- γ and tumour necrosis factor (TNF)- α).

Blood analysis

Specific immunity

White blood cell (WBC) counts and differential were determined with automated blood cell counters (ADVIA-2120, Siemens, Madrid). Major lymphocyte subset phenotypes were assessed in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)-treated whole blood samples. For this purpose, blood aliquots were incubated for 30 min at room temperature in the dark with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies with a quadruple immunostaining procedure (CD3/CD8/CD45/CD4, CD45RA/CD45RO/CD8/CD3, CD45RA/CD45RO/CD4/CD3 and CD3/CD16

+56/CD45/CD19) in order to identify and quantify the following lymphocyte subsets: total T lymphocytes (CD3+), cytotoxic T lymphocytes (CD3+CD8+), helper T lymphocytes (CD3+CD4+), B lymphocytes (CD19+), Natural Killer (NK) cells (CD3-CD16+CD56+), naïve cytotoxic T lymphocytes (CD8+CD45RA+), memory cytotoxic T lymphocytes (CD3+CD8+CD45RO+), naïve helper T lymphocytes (CD4+CD45RA+), and memory helper T lymphocytes (CD3+CD4+CD45RO+) (BD Biosciences, San José, CA, USA). After lysing red blood cells, lymphocytes were analyzed by flow cytometry on a FACScalibur system (BD Biosciences, San José, CA, USA). The lympho-gate was defined on the forward and side scatter patterns of lymphocytes. The analysis protocol gated on lymphocytes stained with PerCP (Peridinin chlorophyll) and/or APC (Allophycocyanin) and the selected population was then analysed with the two remaining colours FITC (Fluorescein isothiocyanate) and PE (Phycoerythrin) to obtain percentages of cell expressing the specific antigens. For memory and naïve subsets, the anchor marker used was annotated in the first place. The results were expressed as the percentage and cell number of mononuclear cells positively stained.

Table 1 Baseline characteristics of the volunteers in each group in the immune general assessment (A) and in the Hepatitis A-specific antibody analysis (B)

	Control		PRO2		PRO1	
	A (n = 40)	B (n = 38)	A (n = 41)	B (n = 38)	A (n = 42)	B (n = 37)
Men	13	13	12	11	13	10
Women	27	25	29	27	29	27
Age (mean \pm SD, years)	26.7 \pm 5.8	26.2 \pm 5.2	27.1 \pm 6.0	26.8 \pm 5.8	25.8 \pm 3.6	25.7 \pm 3.8
Body Mass Index (mean \pm SD, kg/m ²)	22.1 \pm 1.9	22.1 \pm 1.9	22.4 \pm 1.7	22.4 \pm 1.7	21.9 \pm 1.9	21.7 \pm 1.8

Serum immunoglobulins (Ig) A, IgE, IgG and IgM levels were measured in EDTA-treated whole blood samples by immunoturbidometry.

Specific HAV antibodies were assessed with a competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) kit (DIA.PRO, Italy), both before (V1) and after (V3) the intervention [23]. A cut-off value (negative control + positive control/3) was used to confirm negative or positive Hepatitis A results. The kit detects total anti-HAV IgM and IgG levels (mUI/ml). Seroconversion was defined as the proportion of subjects that change from a negative to a positive result after vaccination, after exclusion of those with positive results before the challenge.

Cytokine analysis

Blood was collected in Vacutainer tubes (BD Biosciences) and allowed to clot. Within an hour, plasma was separated by centrifugation at 3500 rpm for 15 min and aliquots were stored at -80°C . At the end of the study, multiplex magnetic bead array (Merck-Millipore) was performed for the quantification of immune and inflammation-related cytokines: interleukin (IL)-4, IL-6, IL-13, IL-10, IL-12, interferon (IFN)- γ and tumour necrosis factor (TNF)- α . In the case of IL-4 and IL-13, there were 18.03 and 62.5% of undetectable data respectively, which were not included into the statistical analysis.

Statistical analysis

Kolmogorow-Smirnov test was performed to evaluate the normality of the variables. For the variables fitting Gaussian distribution, data were expressed as mean and Standard Deviation (SD), and for the non-Gaussian variables data were expressed as median and Interquartile Range (IQR, percentile 25, percentile 75). Logarithmic transformation was used for the following variables not fitting a normal distribution: CD19+ and CD16 + CD56+ lymphocyte subset percentages and CD19+, CD8 + CD45RA+, CD4 + CD45RA+, CD3 + CD8 + CD45RO+, CD3 + CD4 + CD45RO+, and CD16 + CD56+ counts. One-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test were performed for normally-distributed variables to evaluate the “group effect” within each visit, and a lineal mixed model of repeated measures was performed to analyse the “visit effect” in the different groups (fixed factor “visit” and random factor “sex”). For those variables not fitting normal distribution (all cytokine variables and IgE levels), non-parametric Kruskal-Wallis test and Mann-Whitney U test were performed for group comparisons within visits and Friedman’s test for paired samples was used for between visit comparisons within the same group. The Chi square test was used to assess seroconversion rates. Data analysis was performed using SPSS v.19 Software. *P* values <0.05 were considered significant.

Results

Regarding white blood cells counts and differential, no differences were found between groups in each visit, nor within each group along the intervention (Additional file 1: Table S1).

Effects on specific immunity

Inter-group comparisons showed no significant effect of treatment on lymphocyte subset percentages (Additional file 1: Table S2), but a significant increase in memory T helper lymphocyte counts (CD3 + CD4 + CD45RO+) was found in PRO2 at the end of the intervention (V3) compared to basal values (V1) ($P = 0.032$) (Table 2).

Although there were no changes regarding plasma immunoglobulin levels (Additional file 1: Table S3), PRO1 showed significantly higher values of specific HAV antibodies compared to the control group after 6 weeks of intervention ($P = 0.017$) (Table 3). PRO1 HAV-antibody levels were 39% higher compared to the control group titres, while those of PRO2 were only 14.8% higher. Seven volunteers (5.7%) showed positive HAV Ab levels at V1, probably due to an ignored previous contact with the virus, and were thus excluded from the analysis. In addition, there were 5 volunteers with negative titers against HAV specific antibodies after four weeks of vaccination (4.3%); more days might be necessary for these volunteers to produce enough antibodies for a positive response. Therefore, seroconversion rates were 97.3, 92.3 and 97.4% in C, PRO1 and PRO2 respectively, values that were not significantly different.

Effects on cytokine levels

No significant differences were found among the different groups at any visit. In addition, serum cytokine levels did not change along the study in the treated groups. However, C group showed an increase in TNF- α values from V1 to V2 ($P = 0.052$) and reaching statistical significance after 6 weeks of intervention ($P = 0.011$ V1 vs. V3). Similarly, IL-10 values showed a marginal increase from V1 to V2 ($P = 0.058$), reaching statistical significance compared with V3 ($P = 0.016$; V1 vs. V3). However, IFN- γ values decreased during the first two weeks of the intervention V1 to V2 ($P = 0.037$) in this group (Table 4).

Discussion

Specific strains of probiotics interact with host cells and intestinal microbiota, and could thus have a role as immune modulators not only in patients with disease but also in healthy subjects under specific circumstances, such as an immune challenge as performed in this study. In fact, our findings showed that the consumption of Lc during two weeks before vaccination seems to be associated with an enhanced antibody response. However, the

Table 2 Lymphocytes subsets (cells/ μ L) at the beginning (V1), after 2 (V2) and 6 weeks (V3) of intervention

	V1		V2		V3		P [#]
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
CD3+ Lymphocytes							
Control	1851	589	1817	626	1865	507	NS
PRO2	1660	522	1695	496	1861	558	NS
PRO1	1812	494	1802	422	1876	401	NS
CD8+ Lymphocytes							
Control	611	229	608	250	605	191	NS
PRO2	512	217	519	236	576	239	NS
PRO1	543	193	536	194	553	171	NS
CD4+ Lymphocytes							
Control	1073	382	1034	420	1104	387	NS
PRO2	992	345	1007	315	1132	395	NS
PRO1	1111	323	1099	280	1160	278	NS
CD19+ Lymphocytes							
Control	248	102	248	98	250	123	NS
PRO2	234	101	251	89	261	105	NS
PRO1	273	104	289	120	285	114	NS
CD3-CD16+ CD56+ Cells							
Control	299	154	272	164	278	169	NS
PRO2	275	138	281	144	236	105	NS
PRO1	328	196	311	172	305	165	NS
CD8 + CD45RA+ Lymphocytes							
Control	336	158	326	170	337	138	NS
PRO2	282	158	290	137	327	159	NS
PRO1	304	136	290	132	309	309	NS
CD3 + CD8 + CD45RO+ Lymphocytes							
Control	291	147	269	113	274	109	NS
PRO2	232	108	235	126	211	133	NS
PRO1	263	110	251	115	256	104	NS
CD4 + CD45RA+ Lymphocytes							
Control	443	245	413	242	451	246	NS
PRO2	405	218	405	204	454	247	NS
PRO1	483	224	452	174	513	205	NS
CD3 + CD4 + CD45RO+ Lymphocytes							
Control	581	195	562	193	630	217	NS
PRO2	551^a	213	594^{ab}	215	660^b	223	0.032
PRO1	565	221	583	196	616	200	NS

Data are expressed as mean \pm SD. [#]Differences among visits within each group, also highlighted in bold. Repeated measures ANOVA with "visit" as fixed factor and "sex" as randomized factor ($P < 0.05$). Different superscripts mean significant differences between visits; Bonferroni test ($P < 0.05$)

regular intake of this strain prior and following the challenge did not increase antibody titres but led to an increase in memory T helper lymphocytes.

Table 3 Specific HAV antibodies (mIU/mL) at the beginning (V1) and after 6 weeks (V3) of intervention

	Control (n = 38)	PRO2 (n = 38)	PRO1 (n = 37)	P [#]
V1	Neg	Neg	Neg	-
V3	36.23 \pm 16.45^a	41.61 \pm 15.74^{ab}	50.54 \pm 29.57^b	0.017

Data are expressed as mean \pm SD. [#]Differences among groups by one-way ANOVA ($P < 0.05$), also highlighted in bold. Different superscripts mean significant differences between visits; Bonferroni test ($P < 0.05$)

L. coryniformis CECT5711 intake did not change the percentage and number of total T lymphocytes, including helper and cytotoxic T cells, B lymphocytes and NK cells. On the contrary, *L. coryniformis* CECT5711 in combination with *L. gasseri* CECT5714 consumed in a dose of 10^6 cfu/g each during three months, led to an enhancement of NK cells in allergic children [24]. The effect of this combination on NK cells was also observed in healthy subjects after two weeks of treatment [25]. In agreement with the lack of effect on lymphocyte subsets in our results, several studies with different *Lactobacillus* strains supplementation in healthy individuals have also shown no significant effects on CD3+, CD4+, CD8+ and CD19+ percentages [25, 26]. Therefore, probiotics may affect the activity of certain immune cell types and not others, being the differences due to probiotic strain specificity.

There was an increase in memory T helper lymphocytes (CD3 + CD4 + CD45RO+) after the vaccine challenge in the group that consumed the probiotic strain during 6 weeks (PRO2), which might be linked to the establishment of immunological memory against the viral antigen. However, further research should be aimed to confirm the production of HAV specific memory CD4 + T cell clones, since specific memory cells can be reactivated after a secondary microbial exposure and are related to a long term protection [27]. The effect on lymphocyte subsets of a vaccination protocol against influenza virus while consuming *L. fermentum* CECT5716 (10^{10} cfu/d) was found to increase the percentage of helper and cytotoxic T cells after a two week challenge both in the placebo and treated groups [15]. The different timing in lymphocyte subset analysis between studies might explain why we did not observe the same increase in T cells, since we measured it after four weeks of vaccination. In addition, the nature of the vaccine antigen (bacterial or protein/ live or non live vaccines) and its administration could be main determinants in the immune response elicited after a vaccine shot [8] and thus relevant to evaluate differences between studies.

The specific production of antibodies in response to vaccination is considered as a useful measure which directly correlates with specific protection and the 'gold-standard' to determine the influence of probiotics on immunity [28]. In this regard, studies in animals and

Table 4 Cytokines (pg/mL) at the beginning (V1), after 2 (V2) and 6 weeks (V3) of intervention

	V1		V2		V3		P [#]
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	
TNF-α							
Control	3.43^a	2.56–4.97	3.83^{ab}	2.98–4.76	4.03^b	2.80–4.98	0.019
PRO2	4.20	3.38–5.41	4.63	3.66–5.79	4.07	3.22–6.28	NS
PRO1	4.23	3.77–5.43	4.35	3.34–5.79	4.60	3.08–6.28	NS
IFN-γ							
Control	6.26^a	2.96–10.75	6.11^b	3.24–12.02	5.97^{ab}	3.31–12.75	0.049
PRO2	9.47	2.91–17.46	9.28	4.68–15.94	8.51	5.05–13.77	NS
PRO1	7.55	3.73–16.36	7.75	4.10–21.40	9.15	4.95–15.72	NS
IL-4							
Control	6.65	3.03–25.23	9.04	2.04–24.57	9.12	2.34–22.38	NS
PRO2	2.95	0.21–14.60	4.93	0.61–22.78	3.75	1.46–22.42	NS
PRO1	6.96	1.08–21.74	6.11	1.29–29.09	10.22	2.16–15.38	NS
IL-13							
Control	3.47	0.39–8.46	2.57	0.52–9.57	2.73	1.28–6.18	NS
PRO2	2.73	0.19–5.44	2.50	0.70–8.77	3.24	0.33–8.55	NS
PRO1	2.79	0.93–8.50	2.33	0.96–7.21	1.22	0.10–4.73	NS
IL12p70							
Control	3.66	1.22–5.07	4.35	1.85–7.04	4.41	2.41–7.91	NS
PRO2	5.09	1.40–10.07	5.33	2.72–8.17	4.46	3.03–9.37	NS
PRO1	5.00	2.67–9.88	4.96	2.17–13.51	5.41	2.79–12.86	NS
IL-10							
Control	21.85^a	11.87–32.52	24.77^{ab}	16.26–35.42	25.23^b	16.74–42.47	0.030
PRO2	27.07	13.44–44.61	29.29	19.16–53.47	30.37	19.37–40.75	NS
PRO1	31.53	20.13–48.29	33.90	16.39–49.96	34.23	16.97–57.00	NS
IL-6							
Control	1.10	0.46–1.81	1.15	0.57–2.70	1.17	0.56–2.10	NS
PRO2	2.11	0.76–3.30	2.66	0.63–3.72	1.87	0.68–3.86	NS
PRO1	1.70	0.79–3.46	1.31	0.79–3.46	1.82	0.97–2.97	NS

Data are expressed as median and interquartile range (IQR, percentile 25–percentil 75). # Differences among visits within each group by Friedman's test for related samples, also highlighted in bold. Different superscripts mean significant differences between visits (Friedman's test; $P < 0.05$)

humans have shown the potential of probiotics to act as immune adjuvants [9], with an effect on specific vaccine antibody production in susceptible population groups such as children [29–32] and elderly people [33, 34].

The current study is the first to use a vaccine challenge to assess the immune modulation exerted by the *L. coryniformis* CECT5711 strain in healthy adults. The effect of probiotics as vaccine adjuvants has previously been shown with other strains. The oral administration of the *L. fermentum* CECT5716 strain has been found to enhance the immune response of an anti-influenza vaccine and provide systemic protection from infection by increasing antigen specific IgA, but not IgG levels in 50 subjects [15]. In addition, the intake of *B. animalis* ssp. *lactis* and *L. paracasei* ssp. *paracasei* for 6 weeks

have been shown to increase influenza vaccine-specific serum IgG measured 4 weeks after vaccination compared to placebo in 211 adults [10]. However, no effects in influenza A-specific IgG1 and IgG3 seroconversion measured three weeks after the vaccine were observed after the consumption of *L. paracasei* subsp. *Paracasei* 431 in 1066 healthy subjects. Protection rate after a seasonal influenza vaccine varies from year to year and these studies were performed in different campaigns, so the differences in the viral challenges between campaigns could also contribute to the different results found among these studies. Since rates up to 99% seroprotection were observed in Jespersen's et al. study, the authors hypothesized that it might be difficult to observe a further increase in protection rates due to the

probiotic intake [35]. In the current study, the consumption of the probiotic strain during 2 weeks in PRO1 induced an increase in Hepatitis A-specific antibodies after the vaccine, compared to the control group ($P = 0.017$). The immunological mechanism elicited after a vaccine challenge involves the activation of immature dendritic cells (DCs) by local inflammation, which take up the vaccine antigens and migrate to draining lymph nodes where the activation of T and B lymphocytes will take place. T cell help induces B cell differentiation into Ig secreting plasma cells that produce low-affinity IgG antibodies during this primary antibody response. Therefore, *L. coryniformis* CECT5711 might act as a coadjuvant of the antibody response in a vaccination protocol in healthy subjects when consumed before the vaccine challenge. This improvement in vaccine response could be relevant, since there is a low percentage of supposedly healthy individuals who exhibit an impaired response to the immune challenge of this vaccine and sometimes it needs an extra booster. In addition, EFSA states that “the stimulation of protective antibody titers in response to vaccination could be used to substantiate a health claim on the function of the immune system related to defence against pathogens” [11].

The fact that the increase of specific antibodies was not significant in PRO2 compared to placebo is difficult to explain. It might suggest that the probiotic consumption two weeks before vaccination works better as adjuvant of the humoral response than the continuation of *L. coryniformis* administration after vaccination; however, the level of specific HAV antibodies in PRO2 was at an intermediate level between the other two groups. In this sense, the continuous intake of this strain during 6 weeks in PRO2 could induce a higher T cell expansion, which is the main determinant of memory T cell responses and a weaker antibody response compared to the response induced when the strain was consumed only during 2 weeks in PRO1. In addition, regulatory T cell responses should be further evaluated in another study since an inverse relationship was observed between Tregs and antibody responses [36]. In fact, an enhancement of anti-cancer vaccine responses was observed in healthy adults following Tregs depletion [37]. No effects in inflammatory cytokines were seen when consuming the probiotic strain, in contrast to the placebo group, which showed higher levels of the pro-inflammatory TNF- α cytokine and the anti-inflammatory IL-10 four weeks after the vaccine, probably as an on-going reaction to the challenge [38]. In this context, the probiotic intake might have modulated the cytokine response to the vaccine. Although the early cytokine response after the shot was not evaluated, we could speculate that the probiotic intake might favour an early recovery of immunological homeostasis. On this basis, since mixed results were found depending

on the timing and length of supplementation with the probiotic in relation to the viral challenge, we consider that one limitation of this study was the lack of certain additional times and immune measurements, such as innate immunity 2 weeks after vaccination and regulatory T cells at 4 weeks post-vaccination, in order to ascertain the role of the lactobacillus strain as an adjuvant for HAV vaccine.

Conclusions

L. coryniformis CECT5711 strain consumed two weeks before the vaccine led to an increase of total HAV antibody titres compared to placebo. This supports the hypothesis that the consumption of this strain might have a clinical benefit in protection from future infections. However, an independent study is warranted to clarify the adjuvant effects obtained with specific protocols of Lc supplementation and the mechanisms involved.

Additional file

Additional file 1: Table S1. White blood cells (cells/ μ L) expressed as mean \pm SD at the beginning (V1), after 2 weeks (V2) and after 6 weeks (V3) of intervention in all groups. **Table S2** Lymphocyte subsets (%) in blood samples expressed as mean \pm SD at the beginning (V1), after 2 weeks (V2) and after 6 weeks (V3) of intervention in all groups. **Table S3** Immunoglobulin levels in plasma samples expressed as mean \pm SD at the beginning (V1), after 2 weeks (V2) and after 6 weeks (V3) of the intervention in all groups. Description of data: Data from analyses which did not show statistical significance. (DOCX 36 kb)

Abbreviations

APC: Allophycocyanin; BMI: Body Mass Index; CFDA-SE: Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester; cfu: Colony forming units; DCs: Dendritic cells; DMSO: Dimethyl sulfoxide; EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid; EFSA: European Food Safety Agency; ELISA: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay; FITC: Fluorescein isothiocyanate; HAV: Hepatitis A virus; IFN: Interferon; Ig: Immunoglobulins; IL: Interleukin; IQR: Interquartile Range; Lc: *Lactobacillus coryniformis*; NK: Natural killer; PBMCs: Peripheral blood mononuclear cells; PE: Phycoerythrin; PerCP: Peridinin chlorophyll; QPS: Qualified Presumption of Safety; RPMI: Roswell Park Memorial Institute; SD: Standard deviation; TGF: Transforming growth factor; TNF: Tumour necrosis factor; V: Visit; WBC: White blood cells; WHO: World Health Organization; wk: Week

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge Ms. Laura Barrios, from the Department of Computer Science at CSIC (SGAI), for her assistance in the statistical analysis of data, Biosearch Life S.A. for their financial support to the study and to the CSIC Open Access Publication Support Initiative through its Unit of Information Resources for Research (URIC) for their support of the publication fee of the study.

Funding

We are grateful to Biosearch Life S.A. for their financial support to the study and the delivery of the bacteria strain assessed. Research related to this work was funded by Biosearch SA in the framework of the POSTBIO project granted by the Agency of Innovation and Development of Andalusia (IDEA).

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article (and its supplementary information files).

Authors' contributions

AM and EN designed the research; NR, AG, LED and AH conducted the experiments; EN and NR performed the data analysis; NR, EN and AM wrote the paper; AM has the primary responsibility for final content. All authors have read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication

No applicable.

Ethics approval and consent to participate

The current project was approved by the "Puerta de Hierro" University Hospital Ethics Committee, together with the CSIC Bioethics Committee. The study was carried out according to the Declaration of Helsinki (59th General Assembly, Seoul, Korea, October 2008) and the Good Clinical Practices. Signed informed consent was obtained from all volunteers.

Received: 13 September 2016 Accepted: 6 December 2016

Published online: 05 January 2017

References

- Chandra RK. 1990 McCollum Award Lecture: Nutrition and immunity: lessons from the past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr.* 1991;53:1087–101.
- Scrimshaw NS, SanGiovanni JP. Synergism of nutrition, infection and immunity: an overview. *Am J Clin Nutr.* 1997;66:464S–77.
- Kemgang TS, Kapila S, Shanmugam VP, Kapila R. Cross-talk between probiotic lactobacilli and host immune system. *J Appl Microbiol.* 2014; 117(2):303–19. doi:10.1111/jam.12521.
- Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. October 1–4. 2001.
- Marcos A, Wärnberg J, Nova E, Gómez S, Alvarez A, Álvarez R, Mateos JA, et al. Fermented milk containing yogurt bacteria plus *Lactobacillus casei* DN-114 001 modulates immunological responses associated with academic examination stress. *Eur J Nutr.* 2004;43(6):381–9.
- Núñez IN, Galdeano CM, de LeBlanc AM, Perdígón G. Evaluation of immune response, microbiota, and blood markers after probiotic bacteria administration in obese mice induced by a high-fat diet. *Nutrition.* 2014; 30(11–12):1423–32. doi:10.1016/j.nut.2014.03.025.
- Rijkers GT, Bengmark S, Enck P, Haller D, Herz U, Kalliomaki M, et al. Guidance for substantiating the evidence for beneficial effects of probiotics: current status and recommendations for future research. *J Nutr.* 2010;140(3): 671S–6. doi:10.3945/jn.109.113779.
- Lomax AR, Calder PC. Probiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence from studies conducted in humans. *Curr Pharm Des.* 2009;15:1428–518.
- de Vrese M, Rautenberg P, Laue C, Koopmans M, Herremans T, Schrezenmeir J. Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination. *Eur J Nutr.* 2005;44:406–13.
- Rizzardini G, Eskesen D, Calder PC, Capetti A, Jespersen L, Clerici M. Evaluation of the immune benefits of two probiotic strains *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*, BB-12[®] and *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, L. casei 431[®] in an influenza vaccination model: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr.* 2012;107(6):876–84. doi:10.1017/S000711451100420X.
- EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA), European Food Safety Authority. Guidance on the scientific requirements for health claims related to gut and immune function. *EFSA J.* 2011;9(4):1984. doi:10.2903/j.efsa.2011.1984.
- Albers R, Antoine JM, Bourdet-Sicard R, Calder PC, Gleeson M, Lesourd B, et al. Markers to measure immunomodulation in human nutrition intervention studies. *Br J Nutr.* 2005;94(3):452–81.
- Cummings JH, Antoine JM, Azpiroz F, Bourdet-Sicard R, Brandtzaeg P, Calder PC, et al. PASSCLAIM—gut health and immunity. *Eur J Nutr.* 2004;43 Suppl 2:118–73.
- Boge T, Rémygny M, Vaudaine S, Tanguy J, Bourdet-Sicard R, van der Werf S. A probiotic fermented dairy drink improves antibody response to influenza vaccination in the elderly in two randomised controlled trials. *Vaccine.* 2009;27:5677–84. doi:10.1016/j.vaccine.2009.06.094.
- Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S, Lara-Villoslada F, Fonollá J, Navas M, Rodríguez JM, et al. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition.* 2007;23(3):254–60.
- Martín R, Olivares M, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *Int J Food Microbiol.* 2005;104(3):267–77.
- Lara-Villoslada F, Sierra S, Martín R, Delgado S, Rodríguez JM, Olivares M, et al. Safety assessment of two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714. *J Appl Microbiol.* 2007;103(1):175–84.
- Lu L, Walker WA. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(6):1124S–30.
- Olivares M, Paz Díaz-Ropero M, Gómez N, Sierra S, Lara-Villoslada F, Martín R, et al. Dietary deprivation of fermented foods causes a fall in innate immune response. Lactic acid bacteria can counteract the immunological effect of this deprivation. *J Dairy Res.* 2006;73(4):492–8.
- Olivares M, Díaz-Ropero MP, Gómez N, Lara-Villoslada F, Sierra S, Maldonado JA, et al. The consumption of two new probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT 5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT 5711, boosts the immune system of healthy humans. *Int Microbiol.* 2006;9(1):47–52.
- Joines RW, Blatter M, Abraham B, Xie F, De Clercq N, Baine Y, Reisinger KS, Kuhnen A, Parenti DL. A prospective, randomized, comparative US trial of a combination hepatitis A and B vaccine (Twinrix) with corresponding monovalent vaccines (Havrix and Engerix-B) in adults. *Vaccine.* 2001;19(32):4710–9.
- SEEDO. Consenso para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. *Rev Esp Obes.* 2007;128(5):7–48.
- Centers for Disease Control Prevention. Prevention of hepatitis A through active or passive immunization: recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR.* 2006;55:1–23.
- Martínez-Cañavate A, Sierra S, Lara-Villoslada F, Romero J, Maldonado J, Boza J, et al. A probiotic dairy product containing L. gasseri CECT5714 and L. coryniformis CECT5711 induces immunological changes in children suffering from allergy. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009;20(6):592–600. doi:10.1111/j.1399-3038.2008.00833.x.
- Sierra S, Lara-Villoslada F, Sempere L, Olivares M, Boza J, Xaus J. Intestinal and immunological effects of daily oral administration of *Lactobacillus salivarius* CECT5713 to healthy adults. *Anaerobe.* 2010;16(3):195–200. doi:10.1016/j.anaerobe.2010.02.001.
- Klein A, Friedrich U, Vogelsang H, Jahreis G. *Lactobacillus acidophilus* 74-2 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. *Eur J Clin Nutr.* 2008;62(5):584–93.
- Siegrist C. Vaccine immunology. In: Plotkin SA, Orenstein WA, Offit PA editors. *Vaccines. Section 1: General aspects of vaccination.* 6th ed. China: Saunders; 2013. p. 14–32.
- MacDonald TT, Bell I. Probiotics and the immune response to vaccines. *Proc Nutr Soc.* 2010;69(3):442–6.
- Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine.* 1995;13:310–2.
- Hatakka K, Savilahti E, Pönkä A, Meurman JH, Poussa T, Näse L, et al. Effect of long term consumption of probiotic milk on infections in children attending day care centres: double blind, randomised trial. *BMJ.* 2001;322:1327.
- Soh SE, Ong DQ, Gerez I, Zhang X, Chollate P, Shek LP, et al. Effect of probiotic supplementation in the first 6 months of life on specific antibody responses to infant Hepatitis B vaccination. *Vaccine.* 2010;28(14):2577–9. doi:10.1016/j.vaccine.2010.01.020.
- Hojsak I, Snovak N, Abdovic S, Szajewska H, Misak Z, Kolacek S. *Lactobacillus* GG in the prevention of gastrointestinal and respiratory tract infections in children who attend day care centers: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Clin Nutr.* 2010;29(3):312–6. doi:10.1016/j.clnu.2009.09.008.
- 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(6):833–9.
- Turchet P, Laurenzano M, Auboirn S, Antoine JM. Effect of fermented milk containing the probiotic *Lactobacillus casei* DN-114001 on winter infections in free-living elderly subjects: a randomised, controlled pilot study. *J Nutr Health Aging.* 2003;7(2):75–7.
- Jespersen L, Tarnow I, Eskesen D, Morberg CM, Michelsen B, Bügel S, et al. Effect of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, L.casei 431 on

immune response to influenza vaccination and upper respiratory tract infections in healthy adult volunteers: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Am J Clin Nutr.* 2015;101(6):1188–96. doi:10.3945/ajcn.114.103531.

36. Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest.* 2005;115(12):3623–33.
37. West NP, Cripps AW. Are vaccination models suitable to determine whether probiotics have beneficial health effects in the general population? *Hum Vaccin Immunother.* 2013;9(3):621–4.
38. Calder PC. Immunological parameters: what do they mean? *J Nutr.* 2007;137(3 Suppl 2):773S–80.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Additional files

Table S1. White blood cells (cells/ μ L) expressed as mean \pm SD at the beginning (V1), after 2 weeks (V2) and after 6 weeks (V3) of intervention in all groups.

	V1		V2		V3		P#
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Leucocytes (cells/μL)							
Control	6548	1329	6806	1780	6609	1849	NS
PRO2	6521	1417	6450	1266	6863	1888	NS
PRO1	6388	1346	6305	1085	6389	1336	NS
Lymphocytes (%)							
Control	37.82	8.56	36.82	11.17	38.77	9.85	NS
PRO2	35.26	9.22	35.94	7.79	36.34	7.93	NS
PRO1	39.27	7.63	38.76	6.28	39.48	6.98	NS
Lymphocytes (cells/μL)							
Control	2470	702	2395	713	2455	619	NS
PRO2	2283	610	2255	542	2446	663	NS
PRO1	2441	591	2419	545	2501	537	NS
Monocytes (%)							
Control	6.37	1.40	6.16	1.58	6.63	1.76	NS
PRO2	6.38	1.44	6.21	1.30	6.11	1.18	NS
PRO1	6.29	1.40	6.37	1.27	6.71	1.28	NS
Monocytes (cells/μL)							
Control	420	1212	419	148	439	176	NS
PRO2	408	115	396	121	420	143	NS
PRO1	392	91.23	402	96.01	427	111	NS
Neutrophils (%)							
Control	52.61	8.87	53.77	11.50	51.45	9.85	NS
PRO2	54.13	8.8	51.76	7.57	53.99	8.1	NS
PRO1	50.99	7.56	51.43	6.39	50.19	7.28	NS
Neutrophils (cells/μL)							
Control	3502	999	3796	1712	3512	1682	NS
PRO2	3564	1121	3472	940	3770	1572	NS
PRO1	3279	959	3273	721	3265	951	NS
Eosinophils (%)							
Control	2.63	1.70	2.81	1.70	2.59	1.53	NS
PRO2	2.80	1.92	2.81	1.99	2.70	2.22	NS
PRO1	3.08	1.61	3.13	1.48	3.05	1.55	NS
Eosinophils (cells/μL)							
Control	168	106	194	147	167	101	NS
PRO2	184	149	182	148	190	183	NS
PRO1	199	125	200	109	201	123	NS
Basophils (%)							
Control	0.64	0.24	0.63	0.26	0.58	0.24	NS
PRO2	0.58	0.24	0.69	0.29	0.56	0.22	NS
PRO1	0.64	0.25	0.67	0.23	0.59	0.22	NS
Basophils (cells/μL)							
Control	41.26	15.06	42.05	16.80	37.35	15.34	NS
PRO2	37.49	16.63	43.73	19.41	37.81	16.39	NS
PRO1	40.65	17.51	42.11	15.53	37.21	14.90	NS

#General Mixed Model or Friedman's test were used to assess differences between visits within the same group for normal and non-normally distributed variables, respectively.

Table S2. Lymphocyte subsets (%) in blood samples expressed as mean \pm SD at the beginning (V1), after 2 weeks (V2) and after 6 weeks (V3) of intervention in all groups.

	V1		V2		V3		P
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
CD3+ Lymphocytes							
Control	75.22	6.71	75.03	7.72	75.86	7.17	NS
PRO2	73.45	7.41	73.69	6.73	76.20	5.59	NS
PRO1	73.20	7.58	72.95	6.25	74.46	6.61	NS
CD8+ Lymphocytes							
Control	24.97	6.08	25.06	6.42	24.8	5.92	NS
PRO2	22.57	6.68	22.34	6.83	23.47	6.58	NS
PRO1	21.90	5.25	21.51	5.17	21.80	4.70	NS
CD4+ Lymphocytes							
Control	43.39	6.39	42.38	7.67	44.53	7.36	NS
PRO2	43.77	7.26	43.91	7.37	46.23	7.00	NS
PRO1	44.85	6.45	44.48	6.07	46.12	6.82	NS
CD19+ Lymphocytes							
Control	10.34	3.70	10.72	3.97	10.16	3.72	NS
PRO2	10.39	3.13	11.03	2.96	10.73	3.14	NS
PRO1	10.99	3.50	11.64	3.88	11.26	3.73	NS
CD3- CD16+CD56+ NK cells							
Control	12.13	5.48	11.61	6.45	11.41	6.26	NS
PRO2	12.88	6.62	12.48	6.21	10.20	5.09	NS
PRO1	13.13	6.49	12.42	5.51	11.79	5.34	NS
CD8+CD45RA+ Lymphocytes							
Control	54.78	11.29	52.60	11.58	55.36	12.55	NS
PRO2	54.83	11.30	55.56	9.87	56.24	11.62	NS
PRO1	55.53	13.45	54.08	12.53	55.48	12.52	NS
CD3+CD8+CD45RO+ Lymphocytes							
Control	12.55	6.93	15.32	5.33	14.95	5.20	NS
PRO2	14.05	5.20	13.87	4.66	13.72	5.17	NS
PRO1	14.86	5.53	14.11	6.02	13.92	5.48	NS
CD4+CD45RA+ Lymphocytes							
Control	39.78	10.65	38.16	9.40	39.54	11.58	NS
PRO2	39.22	12.73	39.36	10.25	38.97	10.81	NS
PRO1	42.81	12.88	41.09	12.17	43.56	12.99	NS
CD3+CD+CD45RO+ Lymphocytes							
Control	31.98	6.95	31.7	6.31	34.22	8.23	NS
PRO2	33.36	8.28	34.97	6.94	35.75	7.51	NS
PRO1	31.61	9.98	32.32	7.46	33.07	8.96	NS

#General Mixed Model or Friedman's test were used to assess differences between visits within the same group for normal and non-normally distributed variables, respectively.

Table S3. Immunoglobulin levels in plasma samples expressed as mean \pm SD at the beginning (V1), after 2 weeks (V2) and after 6 weeks (V3) of the intervention in all groups.

	V1		V2		V3		<i>P</i>
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
IgG (mg/dl)							
Control	1096	171	1070	162	1075	176	NS
PRO2	1109	206	1099	203	1088	179	NS
PRO1	1084	224	1049	206	1069	207	NS
IgA (mg/dL)							
Control	221	84.54	212	79.89	214	79.02	NS
PRO2	202	76.98	199	74.73	202	72.54	NS
PRO1	215	99.97	203	85.63	203	85.86	NS
IgM (mg/dL)							
Control	157	84.06	148	69.67	153	79.66	NS
PRO2	148	53.13	140	47.01	144	53.88	NS
PRO1	160	84.21	159	88.25	165	89.42	NS
	Median	IQR	Median	IQR	Median	IQR	
IgE total (UI/mL)							
Control	16	(8-77)	17	(6-77)	17	(7-76.5)	NS
PRO2	34	(11-100)	31	(10.5-115)	35	(12.5-105)	NS
PRO1	34.5	(11-98.5)	33.5	(10.5-95.5)	37	(9-72.75)	NS

Interquartile range (IQR)

#General Mixed Model or Friedman's test were used to assess differences between visits within the same group for normal and non-normally distributed variables, respectively.

4.1.2. Associations of Probiotic Fermented Milk (PFM) and Yogurt Consumption with Bifidobacterium and Lactobacillus Components of the Gut Microbiota in Healthy Adults

Noemí Redondo-Useros¹, Alina Gheorghe¹, Ligia E. Díaz-Prieto¹, Brenda Villavisencio¹, Ascensión Marcos¹ and Esther Nova¹

¹ Immunonutrition Group, Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), Jose Antonio Novais, St.10., 28040 Madrid, Spain

Redondo-Useros N., *et al.* Nutrients. 2019; 11(3). pii: E651. doi: 10.3390/nu11030651.

RESUMEN


4.1.2. Asociación entre el consumo de leches fermentadas con probióticos (LFP) y yogur con los niveles de *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* en adultos sanos

El objetivo del presente trabajo es estudiar si el consumo de leches fermentadas con probióticos (LFP) y de yogur se relaciona con los niveles en heces de los grupos bacterianos relacionados con las bacterias ingeridas, así como con la composición global de la microbiota intestinal de adultos sanos. El consumo de LFP y yogures se estudió en 260 adultos sanos (51% hombres) mediante cuestionarios específicos, dividiendo a la población en los siguientes grupos: (1) Grupos de consumo de LFP: No consumidores (LFP-NC, n=175) y consumidores (LFP, n=85), los cuales se dividieron en: consumidores de LFP con *Bifidobacterium* (Bif-LFP; n=33), consumidores de LFP con *Lactobacillus* (Lb-LFP; n=14), y consumidores mixtos de LFP con *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* (Mixed-LFP; n=38); (2) LFP-NC se clasificaron en: No consumidores de yogur (Y-NC; n = 40) y consumidores de yogur (n = 135). La microbiota intestinal fue analizada mediante secuenciación del gen 16S rRNA. Los consumidores de LFP presentaron niveles más elevados de Bifidobacterias comparado con los no consumidores, desde el nivel taxonómico de filo hasta especies. En concreto, el consumo de LFP con *Bifidobacterium* se relacionó con niveles más elevados de *B. animalis* ($p<0,001$), mientras que el consumo de LFP con *Lactobacillus* se asoció con niveles más elevados del género *Bifidobacterium* ($p=0,045$) y de *B. longum* ($p=0,011$). El consumo de yogur se relacionó con niveles más elevados del cultivo del yogur *Streptococcus thermophilus* ($p<0.001$). Los niveles de Lactobacilli y la composición global de la microbiota intestinal no se relacionaron con el consumo de yogur ni de LFP. De acuerdo a estos resultados, el consumo de LFP podría resultar beneficioso en adultos sanos al relacionarse con niveles más altos de *Bifidobacterium*.

Contribución del doctorando: Recogida de datos de los voluntarios y realización de las encuestas del estudio mediante entrevista personal, metodología de laboratorio (extracción y cuantificación del ADN bacteriano y preparación de muestras para secuenciación), realización de las bases de datos, análisis y tratamiento estadístico de los datos y escritura del artículo científico.

Article

Associations of Probiotic Fermented Milk (PFM) and Yogurt Consumption with *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* Components of the Gut Microbiota in Healthy Adults

Noemí Redondo-Useros, Alina Gheorghe, Ligia E. Díaz-Prieto, Brenda Villavisencio, Ascensión Marcos and Esther Nova * 

Immunonutrition Group, Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN), Spanish National Research Council (CSIC), Jose Antonio Novais, St.10., 28040 Madrid, Spain; noemi_redondo@ictan.csic.es (N.R.-U.); draguta1@hotmail.com (A.G.); ldiaz@ictan.csic.es (L.E.D.-P.); brendavi@ucm.es (B.V.); amarcos@ictan.csic.es (A.M.)

* Correspondence: enova@ictan.csic.es; Tel.: +34-91-549-23-00

Received: 29 January 2019; Accepted: 12 March 2019; Published: 18 March 2019



Abstract: The current study investigates whether probiotic fermented milk (PFM) and yogurt consumption (YC) are related to both the ingested bacteria taxa and the overall gut microbiota (GM) composition in healthy adults. PFM and YC habits were analyzed in 260 subjects (51% male) by specific questionnaires, and the following groups were considered: (1) PFM groups: nonconsumers (PFM-NC, n = 175) and consumers (PFM, n = 85), divided as follows: *Bifidobacterium*-containing PFM (Bif-PFM; n = 33), *Lactobacillus*-containing PFM (Lb-PFM; n = 14), and mixed *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*-containing PFM (Mixed-PFM; n = 38); (2) PFM-NC were classified as: yogurt nonconsumers (Y-NC; n = 40) and yogurt consumers (n = 135). GM was analyzed through 16S rRNA sequencing. PFM consumers showed higher Bifidobacteria taxa levels compared to NC, from phylum through to species. Specifically, Bif-PFM consumption was related to higher *B. animalis* levels ($p < 0.001$), whereas Lb-PFM consumption was associated to higher levels of *Bifidobacterium* ($p < 0.045$) and *B. longum* ($p = 0.011$). YC was related to higher levels of the yogurt starter *Streptococcus thermophilus* ($p < 0.001$). Lactobacilli and the overall GM were not related either to YC or PFM consumption. According to these results, healthy adults might benefit from PFM intake by increasing *Bifidobacterium* levels.

Keywords: probiotic fermented milk; yogurt; healthy adults; gut microbiota; Bifidobacteria

1. Introduction

The definition of what is a healthy gut microbiota composition has been the subject of intense debate during recent years. On one side, current evidence has supported that healthy individuals share a common core of gut microbial genes, mainly belonging to the Firmicutes and Bacteroidetes phyla [1]. On the other side, a high variability in the gut microbiota composition among healthy individuals has been reported [2], revealing that in addition to prevalent species, each individual harbors a particular and variable number of bacterial species which are rare among individuals, defined as the “variable” gut microbiota [3]. Some of them appear to be autochthonous species that stably colonize the intestine, while others are allochthonous species, which have shown the ability to transiently integrate into the resident gut microbiota communities [4]. These transient bacteria are ingested as dietary ingredients, with yogurts and probiotic fermented milk (PFM) products being some of the main sources [5]. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

from yogurt and other lactic acid bacteria (LAB) used in milk souring and Bifidobacteria strains from PFM products are mainly involved [6]. In this regard, gut microbiota analyses on ileum, colon mucosa, and fecal samples have revealed that some of the *Lactobacillus* species most commonly added to fermented dairy products, such as *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. paracasei*, and *Lb. casei*, appear to be transient microbes [4], as well as *Bifidobacterium animalis*, whose presence in feces increases during the PFM intake period, but decreases after one week of PFM cessation [7].

Despite their “transient” feature, ingested bacteria from dietary sources are believed to impact the composition and activity of the commensal gut communities, which is a known target for probiotic strains [6]. However, this assumption must not be generalized to all ingested species, since it mainly depends on bacterial species’ survival through the gastrointestinal tract and their persistence at high amounts in the intestine [8]. In this sense, while several studies have failed to show a good recovery of the yogurt starters in feces of healthy adults [9–11], others have shown the opposite [12,13]; differences which might be explained by the type of strain, the dose of ingested cells, or the different methodologies employed to assess the gut microbiota composition [14]. Despite these controversies, the most common effect observed after yogurt intake in healthy adults is an unaltered gut microbiota [9,15,16]; only one study has evidenced increased *Lactobacillus* levels [11], so the use of the term “probiotic” for yogurt starters based on their ability to beneficially affect the gut microbiota composition remains unclear. In this sense, the addition of probiotic strains along with yogurt bacteria during fermentation could facilitate a better colonization of the host intestinal environment [17]. Probiotic-based studies in healthy adults have shown a wide variety of findings, ranging from a lack of any significant change in the overall gut microbiota structure [18–20] to increases in the taxa level of the fed bacteria, mainly *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* genera or species levels [21–23], or even changes in other bacterial groups [23,24]. The modulation of beneficial gut bacteria, whether by increases in *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, or other bacterial groups, seems to be desirable in order to achieve a good balance of the gut microbial communities at the expense of more harmful bacteria [25]. Consequently, beneficial effects in some gastrointestinal functions related to the stability of gut microbiota can be observed, such as the regulation of the intestinal transit time, which in turn might give improvements in the occurrence of constipation and intestinal symptoms [22,26], as well as in the gut immune system, protecting the host from infections, inflammatory processes, and other immune-related disorders [27]. Thus, given the importance of these effects for health maintenance and disease prevention in healthy populations [28], coupled with the fact that commensal microbes are highly sensitive to environmental factors such as dietary changes [29], the consumption of yogurt and PFM products might be a key strategy by which to achieve a beneficial gut microbiota composition, which is even more important nowadays, as lifestyle habits (e.g., diet, physical activity) have progressively become more unhealthy worldwide [30]. Therefore, we hypothesized that the consumption of PFM and yogurt is related to the taxa level of ingested bacteria in the gut microbiota of healthy adults. Thus, specifically, the main objective of this study is to evaluate the associations of PFM consumption with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* levels, as well as yogurt consumption with *Lactobacillus* and *Streptococcus* levels in healthy adults. As secondary objectives, the relationship between PFM and yogurt consumption with the overall gut microbiota composition was also investigated.

2. Materials and Methods

2.1. Subjects

A total of 272 adults aged between 25 and 50 years and with body mass index (BMI) between 18.5 and 35 kg/m² were recruited for the study through advertisements in the university area and from several enterprises which disseminated the study among their employees as health-promoting campaigns. Exclusion criteria were: (1) suffering any of the following chronic diseases: type 1 diabetes; cancer; hepatic, cardiac, renal, pulmonary, or neurological diseases; congenital metabolic diseases; autoimmune diseases (including thyroid diseases); inflammatory bowel diseases;

human immunodeficiency virus (HIV) and Cushing's syndrome; or diagnosed food intolerances; (2) prescription of chronic medication; (3) antibiotic use in the last two months; (4) following a dietary regimen; (5) having undergone a surgical procedure in the last month.

Sample size was calculated taking Bifidobacteria as the outcome variable, with a difference of $\pm 10\%$ in Bifidobacteria levels being counted as significant. For this purpose, considering a mean of 9.8 log colony-forming units (cfu)/g dry weight feces and a standard deviation (SD) of 0.4 according to [31], for an alpha error of 0.05 and 80% power, 262 volunteers were necessary. From the total 272 recruited volunteers, 12 subjects dropped out from the study due to personal issues, resulting in a final sample size of 260 subjects (134 men and 126 women). Informed consent was obtained from each subject, and ethical approval was obtained from the Ethics Committee from Puerta de Hierro University Hospital (Madrid, Spain), together with the CSIC Bioethics Committee. The study was carried out according to the Declaration of Helsinki (64^a Asamblea General, Fortaleza, Brasil, October 2013) and Good Clinical Practices.

2.2. Experimental Design

The study design of this observational study involved two visits, during which trained nutritionists collected data about lifestyle habits in face-to-face interviews with the participants. In the first visit, overall health status, diagnosed diseases, drug administration, smoking habits, and sleep quality were evaluated through the Spanish National Health Survey questionnaire. Interviewer-assisted self-estimation of the total capital owned was used for the socioeconomic status (SES) classification as follows: (1) "low-intermediate": income between 10,000 to 50,000 €/year; (2) "intermediate-high": between 50,000 to 200,000 €/year; and (3) "high": above 200,000 €/year. Height (Soehnle), waist circumference (Seca), body weight, and bioimpedance analysis (Tanita BC 601) without shoes and with light clothing were also measured in this first visit. Since the body mass index ($\text{BMI} = \text{weight (kg)}/\text{height (cm)}^2$) does not represent an accurate measurement of body fat, optimal body fat percentage ranges were considered separately for men and women and subjects were divided into two groups: (1) normal weight ($\text{BMI} < 25 \text{ kg/m}^2$) or overweight ($\text{BMI} = 25\text{--}30 \text{ kg/m}^2$) plus normal body fat percentages (21–32% for women and 10–20% for men); (2) overweight ($\text{BMI} = 25\text{--}30 \text{ kg/m}^2$) or obese ($\text{BMI} = 30\text{--}35 \text{ kg/m}^2$) plus high body fat percentages (>32% for women; >20% for men). Cutoff criteria for body fat percentages were taken from the Tanita bioimpedance equipment user manual.

Subjects were instructed to collect a stool sample in sterile conditions and bring it frozen to the study center in a second visit, during which questionnaires about intestinal and dietary habits were also completed. In particular, intestinal symptoms were evaluated by a gastrointestinal symptom rating scale (GSRS) [32]. Subjects were asked about the frequency (0 = never, 1 = hardly ever, 2 = sometimes, and 3 = many times) and intensity (0 = none, 1 = light, 2 = moderate, and 3 = severe) of bloating, borborygmi, abdominal pain, burning, and flatulence. An individual score for each symptom and a total score of intestinal symptoms were subsequently calculated as the sum of both frequency and intensity scores. In addition, a validated food frequency questionnaire, which estimates the amounts and frequency of consumption of 104 items including both foods and beverages over the past one-year period, was completed with an interviewer-administration method [33], as well as an ad-hoc questionnaire on PFM and yogurt consumption. The type of products separately quantified included PFM containing *Bifidobacterium* species, PFM containing *Lactobacillus* species, and yogurt. The frequency of consumption was registered as never or almost never, 1 to 3 times per month, 1 to 6 times per week or (x) number of times per day. For group classification, PFM and yogurt consumption habits were analyzed on a weekly basis, considering the number of units reported separately for both PFM and yogurt groups. For PFM consumption, subjects were classified as nonconsumers (PFM-NC; n = 175) and PFM consumers (n = 85). Furthermore, two criteria were considered within PFM consumers: (1) Depending on the number of PFM products consumed, consumers were classified into three groups: (a) Low PFM (>0 to <2 PFM products/week; n = 23); (b) Medium PFM (≥ 2 to

4 PFM products/week; n = 36); (c) High PFM (≥ 5 PFM products/week; n = 26); (2) Depending on the type of PFM product, consumers were subclassified into three categories: (a) exclusive consumers of *Bifidobacterium*-containing PFM (Bif-PFM; n = 33); (b) exclusive consumers of *Lactobacillus*-containing PFM (Lb-PFM; n = 14); (c) consumers of both *Bifidobacterium* and *Lactobacillus*-containing PFM (Mixed-PFM; n = 38). Regarding PFM-NC, they were divided into 4 groups of yogurt consumption: Nonconsumers (Y-NC) (0 yogurts/week; n = 40), Low YC (>0 to 2 yogurts/week; n = 41), Medium YC (3 to 4 yogurts/week; n = 44), and High YC (≥ 5 yogurts/week; n = 50) (Figure 1).

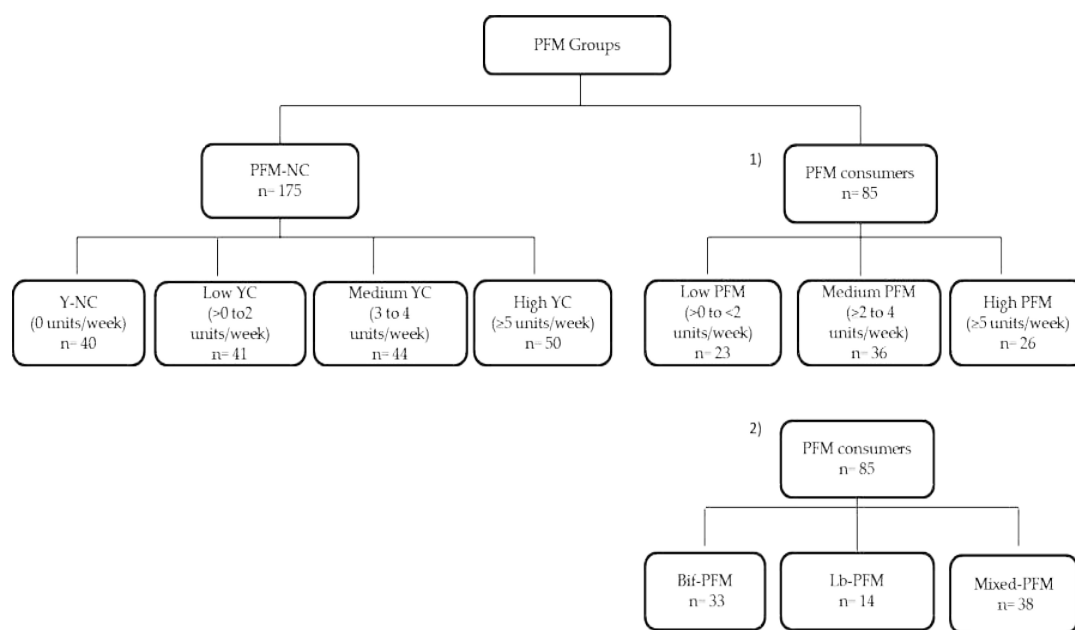


Figure 1. Subjects' distribution into PFM groups. Y: yogurt; YC: yogurt consumption; PFM: probiotic fermented milk; NC: nonconsumers; Bif-PFM: Bifidobacterium-containing PFM; Lb-PFM: Lactobacillus-containing PFM; Mixed-PFM: mixed Bifidobacterium and Lactobacillus-containing PFM.

2.3. Microbiota Analysis

The fecal samples were collected in sterile containers at home, immediately frozen at -20 °C, and transported on the next day in refrigerated conditions to the study center where they were stored at -80 °C until analysis. Bacterial DNA was extracted from 180–220 mg of each fecal sample using an optimized protocol [34], and DNA was finally recovered with the commercial kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen N.V., Venlo, The Netherlands) following the manufacturer's instructions and frozen at -80 °C until further use. DNA concentration was measured by UV absorbance at 260 nm and the DNA quality was also assessed by the 260 nm/280 nm ratio using a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Subsequently, Picogreen analysis of double-stranded DNA was performed by a QuantiFluor ST fluorometer (Promega, Madison, WI, USA), and all samples were diluted to 0.5 ng/ μ L to be used in the amplification of the V3–V4 variable regions of the 16S RNA gene. DNA amplicon integrity was checked by 1.5% agarose gel electrophoresis (Pronadisa, Madrid, Spain), and libraries were normalized and pooled. Sequencing was performed by the MiSeq Illumina system (Illumina, San Diego, CA, USA) using the V3 kit on a 2×270 paired-end run. The taxonomy classification was performed with the MiSeq Reporter software (v2.3, Illumina) in several steps, including demultiplexing and FASTq file generation, obtaining a total of 37,793,518 pass-filter reads (144,803 mean reads/sample). Sequences were then clustered into operational taxonomic units (OTUs) with Classify Reads, a high-performance implementation of the Ribosomal Database Project (RDP) based on the Greengenes database, obtaining 20 phyla, 243 families, 651 genera, and 1492 species (Classify Reads accuracy was 100%, 99.97%, 99.65%, and 98.65%,

respectively) [35]. Taxa with relative abundance <0.002% of total reads and also those with a prevalence of <10 subjects were removed, leaving a total of 11 phyla, 150 families, 241 genera, and 348 species for the statistical analysis. All sequence data were deposited in the Sequence Research Archive (SRA) under BioProject PRJNA523967.

2.4. Statistical Analysis

The Kolmogorov–Smirnov test was used to check the normality of the variables, and logarithmic transformation was applied for data normalization (variables: fiber (g/day), Actinobacteria, *Bifidobacteriaceae*, and *Bifidobacterium*). In this sense, variables fitting a normal distribution were expressed as mean \pm standard deviation (SD), while variables not fitting a normal distribution were expressed as medians \pm interquartile range (Q1–Q3). To assess differences in anthropometric and lifestyle characteristics between PFM groups, general linear models adjusted by BMI–fat groups and the covariables of age and energy when necessary were used for parametric variables, and the Mann–Whitney U test (MWU) for nonparametric variables and Chi-square test for categorical variables were also employed. Depending on the distribution of the data, the statistical analysis used to approach the primary hypothesis of the study included: (1) Generalized linear models to evaluate the relationship between PFM consumption and the phylum Actinobacteria and the *Bifidobacteriaceae* and *Bifidobacterium* groups using PFM groups, gender, and BMI–fat groups as fixed factors, and energy, total score of intestinal symptoms, and age as covariables; (2) Mann–Whitney U tests to assess the relationship between PFM consumption and *Bifidobacterium* species, *Lactobacillaceae* family, and *Lactobacillus* genus and species, and the Kruskal–Wallis (KW) test with Bonferroni correction to assess the relationship between YC and *Lactobacillaceae*, *Streptococaceae*, *Lactobacillus*, and *Streptococcus* genus and species. Previously, gender and BMI–fat effects were also assessed by MW U test and taken into account when necessary by splitting data before the analysis of the PFM effect. A false discovery rate (FDR) of 0.10 using the Benjamini–Hochberg procedure was used to control the false positive rate [36], considering as significant only those statistical tests whose *p* values were lower than their FDR critical value. The Chi-square test and z test were used for species-occurrence analysis of those *Bifidobacterium* species showing significantly different abundance between PFM groups. Spearman correlation was used to evaluate if the number of PFM products was related to Bifidobacteria taxa. In addition, the KW test with Bonferroni adjustment was conducted among the three levels of PFM consumption (low, medium, and high) for those variables showing a positive correlation with the number of PFM products consumed. On the other hand, the effect of the type of PFM product consumed was assessed by general linear models including the type of PFM (Bif-PFM, Lb-PFM, and Mixed-PFM), gender, and BMI–fat groups as fixed factors and age, energy, and total score of intestinal symptoms as covariables, with Bonferroni adjustment. *p* values < 0.05 were considered significant.

As the secondary hypothesis, the relationship of PFM and yogurt consumption with the overall gut microbiota composition (phyla, families, genus, and species), was assessed by MWU tests and the KW test with Bonferroni correction, respectively. Gender or BMI–fat groups were also taken into account whenever any of these factors showed a significant effect on a given taxa, considering a FDR of 0.10 as relevant. Data analysis was performed using SPSS v.23 Software (IBM Corp., Armonk, NY, USA).

3. Results

3.1. Subjects' Distribution and Demographics, and Anthropometric and Lifestyle Characteristics of PFM Groups

The analysis of the subject distribution among PFM groups revealed that PFM consumers included both exclusive PFM consumers (*n* = 33) and mixed consumers (*n* = 52) who consumed both PFM and yogurts. This group included a similar proportion of subjects consuming more PFM units than subjects consuming more yogurt units (both, *n* = 20).

Regarding demographic characteristics, a higher proportion of women were PFM consumers compared to men (52/126 vs. 33/134, respectively; $p = 0.004$) (Table 1). The economic status as well as anthropometric and lifestyle characteristics were similar between male nonconsumers and male PFM consumers. Female PFM consumers did not differ in lifestyle and economic status compared to female nonconsumers, but showed lower BMI ($p = 0.009$), body fat ($p = 0.001$), and visceral fat ($p = 0.032$) and a trend to lower levels of waist circumference ($p = 0.062$) compared to female nonconsumers (Table 1).

Table 1. Demographic, anthropometric, and lifestyle characteristics in men and women stratified according to PFM groups.

	Nonconsumers	PFM Consumers			
Men	n = 101	n = 33	<i>p</i> [*]	<i>p</i> [#]	<i>p</i> [†]
Age (years)	37.31 (5.895)	35.84 (5.957)	–	–	–
Energy (kcal/day)	2204 (547.4)	2268 (619.6)	–	0.779	–
Carbohydrates (%)	40.3 (5.810)	39.53 (5.570)	0.371	–	–
Proteins (%)	17.44 (2.661)	17.89 (3.119)	0.370	–	–
Fat (%)	39.37 (5.068)	39.56 (4.26)	0.759	–	–
Fiber (g/day) [‡]	23.73 (10.15)	22.55 (6.520)	0.361	–	–
Sleep hours	7.285 (0.827)	7.355 (0.755)	–	0.820	–
BMI (kg/m ²)	25.91 (3.201)	25.43 (3.570)	–	0.733	–
Body fat (%)	19.55 (5.616)	18.10 (5.914)	–	0.373	–
Waist circumference (cm)	88.12 (8.838)	86.80 (8.451)	–	0.815	–
Visceral fat index	6.0 (4.0–9.0)	6.0 (4.0–7.5)	–	–	0.284
Total score of intestinal symptoms	7.0 (4.0–11.0)	9.0 (6.0–11.0)	–	–	0.345
Smoking habits (%)					
Current smokers	77.8	22.2	–	–	
Former smokers	83.3	16.7	–	–	0.634
Nonsmokers	73.0	27.0	–	–	
Income (%)					
Low (<50,000 euros/year)	34.7	30.3	–	–	
Medium (50,000–200,000 euros/year)	45.5	45.5	–	–	0.807
High (>200,000 euros/year)	19.8	24.2	–	–	
Women	n = 74	n = 52			
Age (years)	34.73 (6.623)	34.54 (6.592)	–	–	–
Energy (kcal/day)	2018 (470.9)	1992 (506.3)	–	0.721	–
Carbohydrates (%)	39.82 (7.853)	40.77 (6.750)	0.946	–	–
Proteins (%)	16.90 (2.941)	16.89 (2.618)	0.802	–	–
Fat (%)	41.01 (6.457)	40.26 (5.747)	0.913	–	–
Fiber (g/day) [‡]	23.03 (10.64)	22.58 (8.845)	0.623	–	–
Sleep hours	7.517 (0.841)	7.566 (0.624)	–	0.737	–
BMI (kg/m ²)	23.41 (3.312)	22.02 (2.279)	–	0.009	–
Body fat (%)	28.85 (7.261)	25.04 (4.770)	–	0.001	–
Waist circumference (cm)	74.87 (8.442)	72.44 (5.475)	–	0.062	–
Visceral fat index	3.0 (2.0–4.13)	2.5 (1.0–3.0)	–	–	0.032
Total score of intestinal symptoms	11.0 (7.0–15.0)	12.0 (6.0–16.0)	–	–	0.546
Smoking habits (%)					
Current smokers	66.7	33.3	–	–	
Former smokers	45.5	54.5	–	–	0.194
Nonsmokers	61.9	38.1	–	–	
Income (%)					
Low (<50,000 euros/year)	64.9	55.8	–	–	
Medium (50,000–200,000 euros/year)	32.4	32.7	–	–	0.120
High (>200,000 euros/year)	2.70	11.5	–	–	

* # † PFM consumption effect between PFM groups in both men and women by generalized linear models for parametric variables (* Model 1: adjusted by BMI–fat groups, age, and energy; # Model 2: adjusted by age), † Mann–Whitney U test for nonparametric variables and Chi-square test for categorical variables. Statistical significance was set at *p* < 0.05. Significant differences are marked in bold. ‡ Variables were logarithmically transformed.

3.2. Relationship of PFM Consumption with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* Levels

Lactobacillaceae and *Lactobacillus* genus and species levels were not different in PFM consumers compared to PFM-NC (data not shown). However, the phylum Actinobacteria ($p = 0.011$), the family *Bifidobacteriaceae* ($p = 0.012$), and the genus *Bifidobacterium* ($p = 0.027$) were higher in PFM consumers compared to PFM-NC (Table 2).

Despite 135 yogurt consumers being included in the PFM-NC group (Figure 1), no differences were found in Actinobacteria ($p = 0.428$), *Bifidobacteriaceae* ($p = 0.392$), and *Bifidobacterium* ($p = 0.594$) levels among YC groups (data not shown).

Table 2. Relative abundance (%; mean (SD)) of Actinobacteria, *Bifidobacteriaceae*, and *Bifidobacterium* between PFM groups.

% Relative Abundance	PFM Groups		<i>p</i> Value *
	Nonconsumers (n = 175)	Consumers (n = 85)	
Actinobacteria #	2.945 (2.984)	4.089 (4.090)	0.011
<i>Bifidobacteriaceae</i> #	2.368 (2.885)	3.358 (3.794)	0.012
<i>Bifidobacterium</i> #	2.399 (2.869)	3.307 (3.773)	0.027

* PFM consumption effect by generalized linear models with PFM groups, gender, and BMI–fat groups as fixed factors and age, energy, and total score of intestinal symptoms as covariables. Significance was set at $p < 0.05$. # Variables were logarithmically transformed.

In this line, the higher *Bifidobacterium* levels found in PFM consumers could be attributed to the higher values observed in nine *Bifidobacterium* species, including *B. animalis*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, *B. merycicum*, *B. magnum*, *B. kashiwanohense*, *B. dentium*, *B. longum*, and *B. bombi* (Table 3). In addition, *B. animalis*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, *B. merycicum*, and *B. magnum* (the last one found only in men) were not only more abundant, but also showed higher occurrence in PFM consumers, whereas the number of positive subjects for *B. kashiwanohense*, *B. dentium*, *B. longum*, and *B. bombi* did not differ between PFM-NC and PFM consumers.

Table 3. Relative abundance (% , median (IQR)) and occurrence (number and % of positive subjects) of *Bifidobacterium* species showing significant differences between PFM groups.

	PFM Groups						FDR Critical Value
	Nonconsumers (n = 175)		Consumers (n = 85)		<i>p</i> Value [†] Occurrence	<i>p</i> Value * Abundance	
% Relative Abundance	Occurrence (n, %)	Median (IQR)	Occurrence (n, %)	Median (IQR)			
<i>Bifidobacterium animalis</i>	41 (23.4)	0.000 (0.000–0.000)	49 (66.2)	0.011 (0.000–0.187)	<0.001	<0.001	0.027
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	29 (16.6)	0.000 (0.000–0.000)	48 (64.2)	0.001 (0.000–0.007)	<0.001	<0.001	0.009
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	15 (8.6)	0.000 (0.000–0.000)	36 (50.7)	0.000 (0.000–0.007)	<0.001	<0.001	0.018
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	102 (58.3)	0.001 (0.000–0.002)	66 (77.5)	0.005 (0.001–0.030)	0.002	<0.001	0.036
<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i>	160 (91.4)	0.012 (0.002–0.043)	83 (97.6)	0.017 (0.005–0.061)	0.057	0.016	0.045
<i>Bifidobacterium dentium</i>	71 (40.6)	0.000 (0.000–0.001)	44 (52.1)	0.001 (0.000–0.001)	0.088	0.045	0.054
<i>Bifidobacterium longum</i>	170 (97.1)	0.175 (0.043–0.356)	79 (92.9)	0.176 (0.050–0.658)	0.114	0.050	0.063
<i>Bifidobacterium bombi</i>	170 (97.1)	0.009 (0.003–0.018)	84 (98.8)	0.012 (0.004–0.022)	0.397	0.059	0.072
<i>Bifidobacterium magnum</i> [#]							
Men (n = 134: 101 NC/33 C)	55 (54.5)	0.001 (0.000–0.001)	26 (78.8)	0.001 (0.001–0.007)	0.013	<0.001	0.010
Women (n = 126: 74 NC/52 C)	49 (66.2)	0.001 (0.000–0.002)	42 (80.8)	0.002 (0.001–0.007)	0.073	<0.001	0.005

NC: Nonconsumers; C: Consumers. [†] Differences in species occurrence (number of positive and negative subjects) between PFM groups according to Chi-square test. Significance was set at $p < 0.05$. * PFM consumption effect according to Mann–Whitney U test. Those variables whose p values were lower than their false discovery rate (FDR) critical value were considered significant. [#] Gender significantly affected the taxa relative abundance.

At this point, we aimed to evaluate whether both the amount and the type of PFM consumed were driving the higher levels observed for Bifidobacteria taxa in PFM consumers. Thus, the number of PFM consumed was not significantly associated to the relative abundance of Actinobacteria ($r = -0.002$; $p = 0.984$), *Bifidobacteriaceae* ($r = -0.003$; $p = 0.981$), and *Bifidobacterium* ($r = 0.005$; $p = 0.967$), but did positively correlate to *B. animalis* ($r = 0.405$; $p < 0.001$), *B. pseudolongum* ($r = 0.373$; $p < 0.001$), *B. thermophilum* ($r = 0.331$; $p = 0.002$), *B. merycicum* ($r = 0.247$; $p = 0.028$), and *B. magnum* (men: $r = 0.514$; $p = 0.002$). As expected, the high consumption group showed greater levels of *B. animalis* ($p = 0.002$; Figure 2A), *B. pseudolongum* ($p = 0.004$; Figure 2B), and *B. thermophilum* ($p = 0.015$; Figure 2C) compared to the low-consumption group, but no differences were observed between the medium- and low-consumption groups. On the other hand, *B. magnum* and *B. merycicum* abundance did not differ among PFM groups of different consumption levels, despite the positive correlation found with the number of PFM products consumed. The different behavior observed in *Bifidobacterium* species in the three categories of PFM consumption might be dependent on the relative abundance found in the low-consumption group, since *B. animalis*, *B. pseudolongum*, and *B. thermophilum* were nearly absent in this group (Figure 2A–C), whereas abundance of *B. magnum* and *B. merycicum* in the low-consumption group was similar to those of the medium-consumption group (*B. magnum*, men: 0.001 (0.000–0.001) vs. 0.002 (0.002–0.007); *B. merycicum*: 0.002 (0.000–0.006) vs. 0.002 (0.000–0.021)).

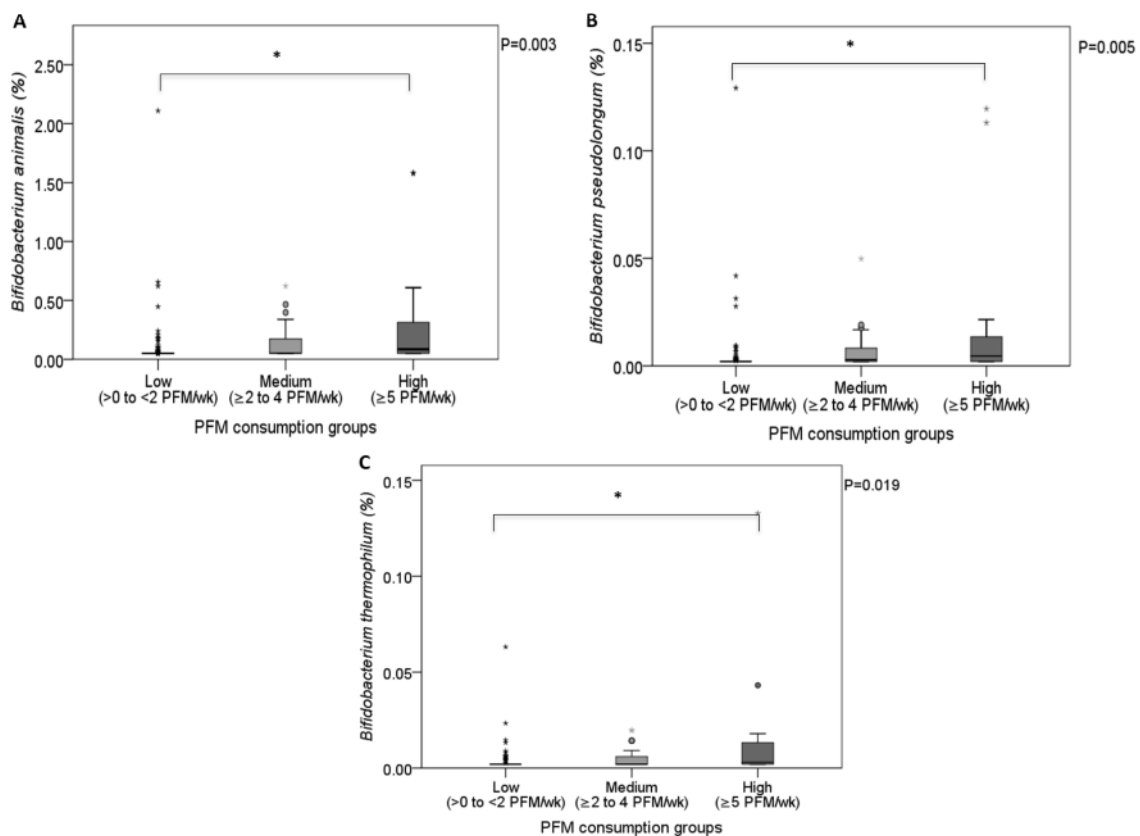


Figure 2. Relative abundance (%) of *B. animalis* (A), *B. pseudolongum* (B), and *B. thermophilum* (C) among PFM consumption groups. PFM consumption effect by KW test. * Pairwise comparisons with Bonferroni correction. Significance was set at $p < 0.05$.

Regarding the type of PFM consumed, Lb-PFM consumers presented the higher levels found of *Bifidobacteriaceae* ($p = 0.045$ vs. PFM-NC; Figure 3B), with a trend towards higher levels of Actinobacteria and *Bifidobacterium* levels compared to PFM-NC ($p = 0.069$ and $p = 0.056$; Figure 3A,C, respectively).

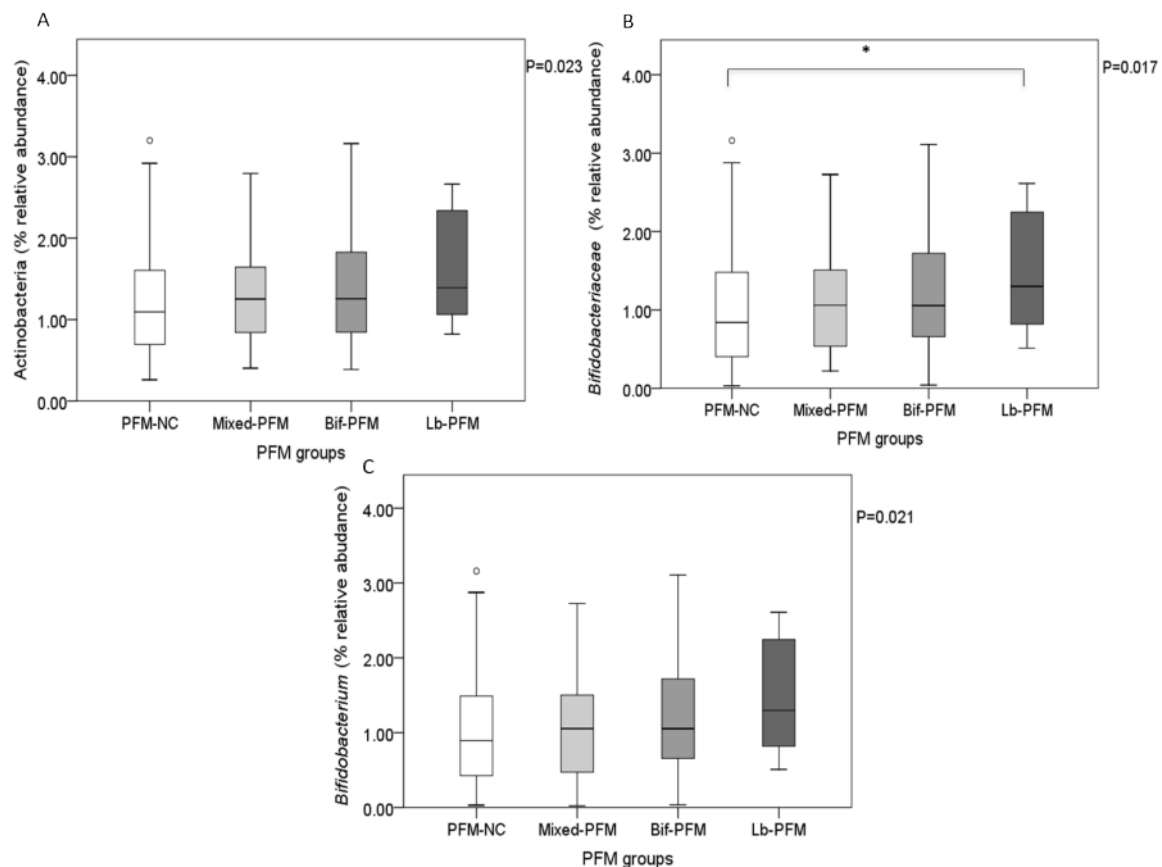


Figure 3. Relative abundance (%) of Actinobacteria (A), Bifidobacteriaceae (B), and Bifidobacterium (C) depending on the type of PFM product consumed. Effect of the type of PFM on Bifidobacteria taxa by generalized linear models. * Pairwise comparisons with Bonferroni correction. Significance was set at $p < 0.05$.

This could be attributed to the higher levels found in Lb-PFM consumers of some of the most abundant species of *Bifidobacterium*, such as *B. longum* and *B. kashiwanohense*, compared to the rest of the groups (Supplementary Figure S1), reaching statistical significance compared to PFM-NC ($p = 0.011$ and $p = 0.008$, respectively; Table 4). In addition, the Mixed-PFM and Bif-PFM groups showed higher levels of *B. animalis*, *B. pseudolongum*, and *B. thermophilum* compared to PFM-NC and Lb-PFM consumers, and higher *B. merycicum* and *B. magnum* levels compared to PFM-NC. On the other hand, *B. bombi* and *B. dentium* abundance were not different among PFM groups (Table 4).

Table 4. Relative abundance (% , median (IQR)) of *Bifidobacterium* species showing significant differences among PFM groups.

% Relative Abundance	PFM Groups				<i>p</i> Value *
	PFM-NC n = 175	Bif-PFM n = 33	Lb-PFM n = 14	Mixed-PFM n = 38	
<i>Bifidobacterium animalis</i>	0.000 ^a (0.000–0.000)	0.018 ^b (0.001–0.241)	0.000 ^a (0.000–0.000)	0.002 ^b (0.000–0.157)	<0.001
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	0.000 ^a (0.000–0.000)	0.001 ^b (0.000–0.012)	0.000 ^a (0.000–0.000)	0.001 ^b (0.000–0.006)	<0.001
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	0.000 ^a (0.000–0.000)	0.001 ^b (0.000–0.011)	0.000 ^a (0.000–0.000)	0.000 ^b (0.000–0.006)	<0.001
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	0.001 ^a (0.000–0.002)	0.005 ^b (0.001–0.034)	0.001 ^{ab} (0.001–0.425)	0.004 ^b (0.001–0.028)	<0.001
<i>Bifidobacterium kashiwanohense</i>	0.012 ^a (0.003–0.043)	0.018 ^{ab} (0.006–0.049)	0.067 ^b (0.029–0.143)	0.016 ^{ab} (0.004–0.069)	0.009
<i>Bifidobacterium dentium</i>	0.000 (0.000–0.001)	0.001 (0.000–0.004)	0.000 (0.000–0.003)	0.001 (0.000–0.001)	0.184
<i>Bifidobacterium longum</i>	0.175 (0.043–0.357)	0.194 (0.042–0.982)	0.467 (0.141–1.300)	0.169 (0.069–0.515)	0.071
<i>Bifidobacterium bombi</i>	0.009 (0.003–0.018)	0.011 (0.005–0.027)	0.016 (0.008–0.036)	0.012 (0.004–0.018)	0.213
<i>Bifidobacterium magnum</i> [#]					
Men	0.001 ^a (0.000–0.001)	0.002 ^b (0.001–0.011)	0.001 ^{ab} (0.000–0.001)	0.003 ^b (0.001–0.007)	<0.001
Women	0.001 ^a (0.000–0.002)	0.002 ^b (0.001–0.009)	0.001 ^{ab} (0.001–0.003)	0.004 ^b (0.000–0.009)	0.004

* PFM consumption effect by Kruskal–Wallis test of those species showing significant differences between PFM-NC and PFM consumers. Different superscripts mean that differences between PFM groups were found with post-hoc Bonferroni test ($p < 0.05$)[#] Gender significantly affected the taxa relative abundance.

3.3. Relationship of YC with *Lactobacillus* and *Streptococcus* Levels

YC was not associated with *Lactobacillus* levels at any of the taxonomic levels analyzed (data not shown). However, *Streptococcaceae* levels tended to be higher in the high YC group compared to the low and Y-NC groups (median: 0.351 (0.152–0.623) vs. 0.161 (0.097–0.278) and 0.145 (0.074–0.452); $p = 0.054$ and $p = 0.059$, respectively). At the species level, significantly higher levels were observed in *S. thermophilus* levels between the high YC group and the low and Y-NC groups (median: 0.022 (0.007–0.065) vs. 0.0022 (0.001–0.008) and 0.000 (0.000–0.003) respectively; both $p < 0.001$), as well as in *S. fryi* and *S. milleri* levels between the high and the low YC groups (median: 0.011 (0.004–0.026) vs. 0.005 (0.002–0.013), $p = 0.012$; median: 0.030 (0.000–0.006) vs. 0.001 (0.000–0.005), $p = 0.042$, respectively).

3.4. Relationship of PFM and Yogurt Consumption with the Overall Gut Microbiota Composition

Regarding PFM consumption, PFM consumers showed lower levels of the Tenericutes phylum ($p < 0.001$; Supplementary Table S1) and the *Butyricimonas* genus ($p < 0.001$; Supplementary Table S2) compared to PFM-NC. There were no differences in families and species abundance between PFM groups (Supplementary Tables S3 and S4, respectively). In addition, YC was not related to any phyla, family, genus, or species analyzed (data not shown), except for those described in Section 3.3.

4. Discussion

The results of this study have shown that the relationship of probiotic fermented milk and yogurt consumption with the gut microbiota composition of healthy adults seems to be highly specific towards the bacterial genus and species that are present in the product, which is in agreement with a recent meta-analysis of randomized clinical trials performed in healthy adults [37]. In this sense, *Lactobacilli* taxa did not show differences irrespective of consumption habits, whereas *Bifidobacteria* abundance was higher at all taxonomic levels analyzed in PFM consumers compared to nonconsumers. In this regard, a higher presence of several *Bifidobacterium* species was observed in PFM consumers. However, those species were among the lowest-abundance species out of all *Bifidobacterium* species found in the study subjects. Thus, *B. animalis*, *B. pseudolongum*, and *B. thermophilum*, which were nearly absent in low-amount PFM consumers, appear to have a dose-dependent relationship with the ingested probiotic strains. In this sense, a large number of studies have reported dose-dependent effects of probiotic bacteria on fecal recovery of the strains [38], whereas a less clear evidence exists in healthy adults about the effects of increased doses of probiotic bacteria on the modulation of gut microbial groups different from those administered [39,40]. A deeper study showed that the different probiotic strains present in the PFM products seem to be differently related to the *Bifidobacteria* taxa. In this line, the upper taxonomic levels, such as Actinobacteria, *Bifidobacteriaceae*, and *Bifidobacterium*, were more associated to the consumption of *Lactobacillus* containing PFM, which usually contain *L. casei* strains. Similar results regarding the *Bifidobacterium* genus have been found after the consumption of both *L. casei* Zhang and *L. casei shirota* over one month in healthy adults [22,24]. Furthermore, in the current study, the higher *Bifidobacterium* levels found in *Lactobacillus*-PFM consumers seem to be attributable to the greater levels of both *B. longum* and *B. kashiwanohense*, which represent the most abundant *Bifidobacterium* species out of those significantly related to PFM consumption. Since *B. longum* is the most abundant *Bifidobacterium* species in the intestinal niche of healthy adults [41], we suggest that *Lactobacillus*-containing PFM intake might modulate the autochthonous bacteria, which could represent a better health outcome than changes in allochthonous and transient bacteria [42]. Specifically studying the effect of *Lactobacillus*-containing PFM on gut *Bifidobacterium* species seems relevant according to the evidence mentioned above. The mechanisms involved might include bacterial crossfeeding through the breakdown of dietary carbohydrates [43] and the modulation of mucin polysaccharides synthesis and degradation [44,45] by *Lactobacillus* strains and their subsequent use by *Bifidobacterium* species. On the other hand, at the species level, the higher levels found of the low-abundance *B. animalis*, *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, *B. merycicum*, and *B. magnum* in PFM consumers seem to be due

to the intake of *Bifidobacterium*-containing PFM, probably *B. animalis* strains, which are the most common species found in PFM products. Therefore, it seems that the intake of *B. animalis* strains might modulate phylogenetically close species almost absent in the study subjects and *B. animalis* levels itself, agreeing with other studies [9,18]. Despite *B. animalis* being considered a transient microorganism due to the low recovery in both fecal and mucosal samples [9,41], current evidence has pointed out its beneficial effects on the immune and gastrointestinal systems of healthy adults when administered in probiotic products [46,47]. However, the lack of evidence available about the presence and function of *B. pseudolongum*, *B. thermophilum*, *B. merycicum*, and *B. magnum* in humans [48], along with the nonzero probability of Illumina sequencing errors in base-calling as well as in reads alignment [49], which indeed might lead to OTU allocation errors between phylogenetically close species, impels us to be cautious about the association found between these species and the intake of PFM that contain *B. animalis*. Likewise, the consumption of yogurt was also associated to higher levels of the yogurt starter *S. thermophilus*, which has been related to probiotic properties in lactose intolerance conditions due to its β -galactosidase activity [50], as well as possibly to the reduction of gastrointestinal and allergy symptoms [51]. However, it should be kept in mind that these effects might be transient and return to baseline if the intake of probiotic and yogurt bacteria is discontinued [37], or even if the consumption is not frequent enough, as derived from our results showing that the consumption of more than five PFM products per week is associated with higher levels of certain *Bifidobacterium* species, while the consumption of more than 0 to 2 PFM products per week did not relate to higher levels of these species.

On the other hand, one of the main foci in probiotic-based studies is the evaluation of Lactobacilli changes, with evidence showing either positive [11,24,52] or neutral effects [15,16,18]. *Lactobacillus* species account for a very small proportion in the gut microbiota composition of our subjects, agreeing to previous works suggesting that Lactobacilli levels are very low in the colon and predominate in the small intestine [4,53]; thus, it is not surprising the lack of findings related to both probiotics containing fermented milks and yogurt intake in this respect. The limited outcomes observed in our study regarding the overall gut microbiota composition agrees to a recent systematic review of randomized clinical trials in healthy adults, which concluded that probiotic intake does not affect the α -diversity and richness of the gut microbiota of healthy adults [38], in accordance to other interventional studies showing no effects in the bacterial groups analyzed [7,18,54]. On the contrary, Ferrario et al. reported changes in the β -diversity of the gut microbiota after the consumption of *L. paracasei* DG compared to placebo [55], and studies by both Zhang et al. and Kim et al. revealed that probiotic consumption changed several bacterial groups distinct from the fed bacteria [19,24]. In our study, although the majority of the main bacterial groups were not related with the consumption of probiotic strains, some minor bacterial groups were lower in PFM consumers, such as *Tenericutes* and *Butyrivimonas*, which have been previously related to adverse physiological situations, such as higher levels of the proatherogenic metabolite trimethylamine-*N*-oxide (TMAO) [56] and alcoholism [57], respectively. However, these assumptions must be made with caution due to the lack of evidence in healthy adults. One of the main factors possibly influencing the differences observed among studies might be the type of probiotic strain used, since specificity is a well-known feature of probiotics when referring to immune and intestinal health effects [58]. In addition, other factors should be taken into account when comparing data from different probiotic-based studies: (1) the methodology used to assess the 16S RNA gene, ranging from traditional molecular approaches to next-generation sequencing technologies providing a deeper analysis of gut microbial communities [59]; (2) the food matrix containing the probiotic strains [7,18,19]; (3) the diet composition of the host, and particularly the carbohydrate content, which represent one of the main energy sources for commensal bacteria [60]; (4) the gender of the study subjects [61,62] and their different dietary habits, as observed in the higher number of women consumers of PFM who showed a better anthropometric profile compared to women PFM-NC; and finally, (5) host intrinsic factors such as the basal gut microbiota composition [9], and several metabolic pathways affecting the host gut microbiota such as bile acid secretion [63] and

the gut–enteric nervous system interaction mechanisms [64] might also influence the gut microbiota response to probiotics. Therefore, interventional studies performed separately in both healthy men and women investigating through metagenomics the effects of defined probiotic strains not only on gut microbiota changes, but also in the gut functionality and metabolic outcomes are warranted.

In conclusion, probiotic fermented milk and yogurt intake was associated with higher levels of the ingested bacteria. In particular, those pertaining to Bifidobacteria were positively associated with PFM intake and seem to be dependent on the type of probiotic strain present. However, further research is necessary to confirm whether *Lactobacillus*-containing PFM products promote the growth of specific *Bifidobacterium* species.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/3/651/s1>, Figure S1: Proportion of *Bifidobacterium* species showing significant differences among PFM groups depending on the type of product (scale relative to the relative abundance of the species shown); Table S1: Relative abundance [%; median (IQR)] of bacterial phyla between PFM groups; Table S2: Relative abundance [%; median (IQR)] of the main bacterial genus (>0.5%), and those low-abundance genera (below 0.5%) showing significant differences between PFM groups; Table S3: Relative abundance [%; median (IQR)] of the main bacterial families (>0.5%) between PFM groups; Table S4: Relative abundance [%; median (IQR)] of the main bacterial species (>0.5%), and those low-abundance species (below 0.5%) showing significant differences between PFM groups.

Author Contributions: Conceptualization, A.M. and E.N.; Methodology, N.R.-U., A.G., L.E.D.-P., B.V. and E.N.; Formal analysis, N.R.-U. and E.N.; Investigation, N.R.-U.; Writing—original draft preparation, N.R.-U.; Supervision, E.N.; Project administration, A.M. and E.N.; Funding acquisition, A.M.

Funding: This research was part of a large project aimed to evaluate the effects of alcohol consumption on the gut microbiota of healthy adults, funded by ERAB (The European Foundation for Alcohol Research), whose secondary outcomes included the analysis of the effects of lifestyle factors, such as dietary habits, yogurt and probiotic consumption, and physical activity, among others, on the gut microbiota composition of healthy adults.

Acknowledgments: We want to thank Juan Miguel Rodríguez Gómez and the Genomics services from Parque Científico de Madrid for their support in the gut microbiota analysis (bacterial DNA extraction and 16s RNA gene sequencing), as well as Laura Barrios and Belén Garzón for their statistical support.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analysis, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, K.S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Levenez, F.; Yamada, T.; et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **2010**, *464*, 59–65. [[CrossRef](#)]
2. Lozupone, C.A.; Stombaugh, J.I.; Gordon, J.I.; Jansson, J.K.; Knight, R. Diversity, stability and resilience of the human gut microbiota. *Nature* **2012**, *489*, 220–230. [[CrossRef](#)]
3. Tap, J.; Mondot, S.; Levenez, F.; Pelletier, E.; Caron, C.; Furet, J.P.; Ugarte, E.; Muñoz-Tamayo, R.; Paslier, D.L.; Nalin, R.; et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ. Microbiol.* **2009**, *11*, 2574–2584. [[CrossRef](#)]
4. Reuter, G. The *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* microflora of the human intestine: Composition and succession. *Curr. Issues Intest. Microbiol.* **2001**, *2*, 43–53.
5. Kok, C.R.; Hutkins, R. Yogurt and other fermented foods as sources of health-promoting bacteria. *Nutr. Rev.* **2018**, *76*, 4–15. [[CrossRef](#)]
6. Derrien, M.; van Hylckama Vlieg, J.E. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends Microbiol.* **2015**, *23*, 354–366. [[CrossRef](#)]
7. McNulty, N.P.; Yatsunenkov, T.; Hsiao, A.; Faith, J.J.; Muegge, B.D.; Goodman, A.L.; Henrissat, B.; Oozeer, R.; Cools-Portier, S.; Gobert, G.; et al. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*, 106ra106. [[CrossRef](#)]
8. Bezkorovainy, A. Probiotics: Determinants of survival and growth in the gut. *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, *73*, 399S–405S. [[CrossRef](#)]
9. Uyeno, Y.; Sekiguchi, Y.; Kamagata, Y. Impact of consumption of probiotic lactobacilli-containing yogurt on microbial composition in human feces. *Int. J. Food Microbiol.* **2008**, *122*, 16–22. [[CrossRef](#)]

10. Del Campo, R.; Bravo, D.; Cantón, R.; Ruiz-Garbajosa, P.; García-Albiach, R.; Montesi-Libois, A.; Yuste, F.J.; Abraira, V.; Baquero, F. Scarce Evidence of Yogurt Lactic Acid Bacteria in Human Feces after Daily Yogurt Consumption by Healthy Volunteers. *Appl. Environ. Microb.* **2005**, *71*, 547–549. [[CrossRef](#)]
11. García-Albiach, R.; Pozuelo de Felipe, M.; Angulo, S.; Morosini, M.I.; Bravo, D.; Baquero, F.; del Campo, R. Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, *87*, 91–96. [[CrossRef](#)]
12. Elli, M.; Callegari, M.L.; Ferrari, S.; Bessi, E.; Cattivelli, D.; Soldi, S.; Morelli, L.; Goupil Feuillerat, N.; Antoine, J.M. Survival of yogurt bacteria in the human gut. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 5113–5117. [[CrossRef](#)]
13. Mater, D.D.; Bretigny, L.; Firmesse, O.; Flores, M.J.; Mogenet, A.; Bresson, J.L.; Corthier, G. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiol. Lett.* **2005**, *250*, 185–187. [[CrossRef](#)]
14. Morelli, L. Yogurt, living cultures, and gut health. *Am. J. Clin. Nutr.* **2014**, *99*, 1248S–1250S. [[CrossRef](#)]
15. Lisko, D.J.; Johnston, G.P.; Johnston, C.G. Effects of Dietary Yogurt on the Healthy Human Gastrointestinal (GI) Microbiome. *Microorganisms* **2017**, *5*, 6. [[CrossRef](#)]
16. Redondo, N.; García-González, N.; Diaz-Prieto, L.E.; Olmedilla-Alonso, B.; Martín-Diana, A.B.; Asensio-Vegas, C.; Nova, E. Effects of ewe's milk yogurt (whole and semi-skimmed) and cow's milk yogurt on inflammation markers and gut microbiota of subjects with borderline-high plasma cholesterol levels: A crossover study. *Eur. J. Nutr.* **2018**. [[CrossRef](#)]
17. Farhana Fazilaha, N.; Ariffac, A.; Khayatbc, M.E.; Rios-Solis, L.; Hali, D. Influence of probiotics, prebiotics, synbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. *J. Funct. Foods* **2018**, *48*, 387–399. [[CrossRef](#)]
18. Filteau, M.; Matamoros, S.; Savard, P.; Roy, D. Molecular monitoring of fecal microbiota in healthy adults following probiotic yogurt intake. *Pharma Nutr.* **2013**, *1*, 123–129. [[CrossRef](#)]
19. Kim, S.W.; Suda, W.; Kim, S.; Oshima, K.; Fukuda, S.; Ohno, H.; Morita, H.; Hattori, M. Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res.* **2013**, *20*, 241–253. [[CrossRef](#)]
20. Burton, K.J.; Rosikiewicz, M.; Pimentel, G.; Bütikofer, U.; von Ah, U.; Voirol, M.J.; Croxatto, A.; Aeby, S.; Draai, J.; McTernan, P.G.; et al. Probiotic yogurt and acidified milk similarly reduce postprandial inflammation and both alter the gut microbiota of healthy, young men. *Br. J. Nutr.* **2017**, *117*, 1312–1322. [[CrossRef](#)]
21. Tanaka, Y.; Takami, K.; Nishijima, T.; Aoki, R.; Mawatari, T.; Ikeda, T. Short- and long-term dynamics in the intestinal microbiota following ingestion of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505. *BMFH* **2015**, *34*, 77–85. [[CrossRef](#)]
22. Matsumoto, K.; Takada, T.; Shimizu, K.; Moriyama, K.; Kawakami, K.; Hirano, K.; Kajimoto, O.; Nomoto, K. Effects of a probiotic fermented milk beverage containing *Lactobacillus casei* strain *Shirota* on defecation frequency, intestinal microbiota, and the intestinal environment of healthy individuals with soft stools. *J. Biosci. Bioeng.* **2010**, *110*, 547–552. [[CrossRef](#)]
23. Savard, P.; Lamarche, B.; Paradis, M.E.; Thiboutot, H.; Laurin, É.; Roy, D. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *Int. J. Food Microbiol.* **2011**, *149*, 50–57. [[CrossRef](#)]
24. Zhang, J.; Wang, L.; Guo, Z.; Sun, Z.; Gesudu, Q.; Kwok, L.; Menghebilige; Zhang, H. 454 pyrosequencing reveals changes in the faecal microbiota of adults consuming *Lactobacillus casei* Zhang. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2014**, *88*, 612–622. [[CrossRef](#)]
25. Fooks, L.J.; Gibson, G.R. Probiotics as modulators of the gut flora. *Br. J. Nutr.* **2002**, *88*, S39–S49. [[CrossRef](#)]
26. Eales, J.; Gibson, P.; Whorwell, P.; Kellow, J.; Yellowlees, A.; Perry, R.H.; Edwards, M.; King, S.; Wood, H.; Glanville, J. Systematic review and meta-analysis: The effects of fermented milk with *Bifidobacterium lactis* CNCM I-2494 and lactic acid bacteria on gastrointestinal discomfort in the general adult population. *Ther. Adv. Gastroenterol.* **2017**, *10*, 74–88. [[CrossRef](#)]
27. Delcenserie, V.; Martel, D.; Lamoureux, M.; Amiot, J.; Boutin, Y.; Roy, D. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. *Curr. Issues Mol. Biol.* **2008**, *10*, 37–54.
28. Lemon, K.P.; Armitage, G.C.; Relman, D.A.; Fischbach, M.A. Microbiota-targeted therapies: An ecological perspective. *Sci. Transl. Med.* **2002**, *4*, 137rv5. [[CrossRef](#)]

29. David, L.A.; Maurice, C.F.; Carmody, R.N.; Gootenberg, D.B.; Button, J.E.; Wolfe, B.E.; Ling, A.V.; Devlin, A.S.; Varma, Y.; Fischbach, M.A.; et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **2014**, *505*, 559–563. [[CrossRef](#)]
30. World Health Organization (WHO). *Global Strategy on Diet, Physical Activity and Health, 57th World Health Assembly (WHA)*; WHO: Geneva, Switzerland, 2004.
31. Vulevic, J.; Juric, A.; Tzortzis, G.; Gibson, G.R. A mixture of trans-galactooligosaccharides reduces markers of metabolic syndrome and modulates the fecal microbiota and immune function of overweight adults. *J. Nutr.* **2013**, *143*, 324–331. [[CrossRef](#)]
32. Revicki, D.A.; Wood, M.; Wiklund, I.; Crawley, J. Reliability and validity of the Gastrointestinal Symptom Rating Scale in patients with gastroesophageal reflux disease. *Qual. Life Res.* **1998**, *7*, 75–83. [[CrossRef](#)]
33. Martin-Moreno, J.M.; Boyle, P.; Gorgojo, L.; Maisonneuve, P.; Fernandez-Rodriguez, J.C.; Salvini, S.; Willett, W.C. Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int. J. Epidemiol.* **1993**, *22*, 512–519. [[CrossRef](#)]
34. Dore, J.; Ehrlich, S.D.; Levenez, F.; Pelletier, E.; Alberti, A.; Bertrand, L.; Bork, P.; Costea, P.I.; Sunagawa, S.; Guarner, F.; et al. IHMS_SOP 06 V1: Standard operating procedure for faecal samples DNA extraction, Protocol, Q. International Human Microbiome Standards. 2015. Available online: <http://www.microbiome-standards.org> (accessed on 13 May 2016).
35. Illumina. Available online: https://support.illumina.com/help/BaseSpace_App_16S_Metagenomics_help/16S_Metagenomics_App_Help.htm#Vault/Informatics/Sequencing_Analysis/Apps/swSEQ_mAPP_16S_Read_Classification.htm%3FToc (accessed on 20 December 2018).
36. Benjamini, Y.; Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate—a practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Meth.* **1995**, *57*, 289–300. [[CrossRef](#)]
37. Khalesi, S.; Bellissimo, N.; Vandelanotte, C.; Williams, S.; Stanley, D.; Irwin, C. A review of probiotic supplementation in healthy adults: Helpful or hype? *Eur. J. Clin. Nutr.* **2019**, *73*, 24–37. [[CrossRef](#)]
38. Ouwehand, A.C. A review of dose-responses of probiotics in human studies. *Benef. Microbes* **2017**, *8*, 143–151. [[CrossRef](#)]
39. Larsen, C.N.; Nielsen, S.; Kaestel, P.; Brockmann, E.; Bennedsen, M.; Christensen, H.R.; Eskesen, D.C.; Jacobsen, B.L.; Michaelsen, K.F. Dose-response study of probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CRL-341 in healthy young adults. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2006**, *60*, 1284–1293. [[CrossRef](#)]
40. Kristensen, N.B.; Bryrup, T.; Allin, K.H.; Nielsen, T.; Hansen, T.H.; Pedersen, O. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: A systematic review of randomized controlled trials. *Genome Med.* **2016**, *8*, 52. [[CrossRef](#)]
41. Turrone, F.; Foroni, E.; Pizzetti, P.; Giubellini, V.; Ribbera, A.; Merusi, P.; Cagnasso, P.; Bizzarri, B.; de’Angelis, G.L.; Shanahan, F.; et al. Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 1534–1545. [[CrossRef](#)]
42. Ventura, M.; Turrone, F.; van Sinderen, D. Bifidobacteria: General Overview on Ecology, Taxonomy, and Genomics. In *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, 4th ed.; Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Von wright, A., Eds.; CRC Press: New York, NY, USA, 2012; p. 149.
43. Moens, F.; Verce, M.; De Vuyst, L. Lactate- and acetate-based cross-feeding interactions between selected strains of lactobacilli, bifidobacteria and colon bacteria in the presence of inulin-type fructans. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *241*, 225–236. [[CrossRef](#)]
44. Mack, D.R.; Michail, S.; Wei, S.; McDougall, L.; Hollingsworth, M.A. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. *Am. J. Physiol.* **1999**, *276*, G941–G950.
45. Turrone, F.; Bottacini, F.; Foroni, E.; Mulder, I.; Kim, J.H.; Zomer, A.; Sánchez, B.; Bidossi, A.; Ferrarini, A.; Giubellini, V.; et al. Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19514–19519. [[CrossRef](#)]
46. Marteau, P.; Cuillerier, E.; Meance, S.; Gerhardt, M.F.; Myara, A.; Bouvier, M.; Bouley, C.; Tondou, F.; Bommelaer, G.; Grimaud, J.C. *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: A double-blind, randomized, controlled study. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2002**, *16*, 587–593. [[CrossRef](#)]
47. Meng, H.; Ba, Z.; Lee, Y.; Peng, J.; Lin, J.; Fleming, J.A.; Furumoto, E.J.; Roberts, R.F.; Kris-Etherton, P.M.; Rogers, C.J. Consumption of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in yogurt reduced expression of

- TLR-2 on peripheral blood-derived monocytes and pro-inflammatory cytokine secretion in young adults. *Eur. J. Nutr.* **2017**, *56*, 649–661. [[CrossRef](#)]
48. Lugli, G.A.; Milani, C.; Turrone, F.; Duranti, S.; Ferrario, C.; Viappiani, A.; Mancabelli, L.; Mangifesta, M.; Taminiau, B.; Delcenserie, V.; et al. Investigation of the evolutionary development of the genus *Bifidobacterium* by comparative genomics. *Appl. Environ. Microbiol.* **2014**, *80*, 6383–6394. [[CrossRef](#)]
 49. Schirmer, M.; Ijaz, U.Z.; D'Amore, R.; Hall, N.; Sloan, W.T.; Quince, C. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, e37. [[CrossRef](#)]
 50. Rizkalla, S.W.; Luo, J.; Kabir, M.; Chevalier, A.; Pacher, N.; Slama, G. Chronic consumption of fresh but not heated yogurt improves breath hydrogen status and short-chain fatty acid profiles: A controlled study in healthy men with or without lactose maldigestion. *Am. J. Clin. Nutr.* **2000**, *72*, 1474–1479. [[CrossRef](#)]
 51. Guarner, F.; Perdigon, G.; Corthier, G.; Salminen, S.; Koletzko, B.; Morelli, L. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *Br. J. Nutr.* **2005**, *93*, 783–786. [[CrossRef](#)]
 52. Plaza-Díaz, J.; Fernández-Caballero, J.Á.; Chueca, N.; García, F.; Gómez-Llorente, C.; Sáez-Lara, M.J.; Fontana, L.; Gil, Á. Pyrosequencing analysis reveals changes in intestinal microbiota of healthy adults who received a daily dose of immunomodulatory probiotic strains. *Nutrients* **2015**, *7*, 3999–4015. [[CrossRef](#)]
 53. Stolaki, M.; De Vos, W.M.; Kleerebezem, M.; Zoetendal, E.G. Lactic Acid Bacteria in the gut. In *Lactic Acid Bacteria. Microbiological and Functional Aspects*, 4th ed.; Lahtinen, S., Ouwehand, A.C., Salminen, S., Von wright, A., Eds.; CRC Press: New York, NY, USA, 2012; pp. 385–390.
 54. Lahti, L.; Salonen, A.; Kekkonen, R.A.; Salojärvi, J.; Jalanka-Tuovinen, J.; Palva, A.; Orešič, M.; de Vos, W.M. Associations between the human intestinal microbiota, *Lactobacillus rhamnosus* GG and serum lipids indicated by integrated analysis of high-throughput profiling data. *PeerJ* **2013**, *1*, e32. [[CrossRef](#)]
 55. Ferrario, C.; Taverniti, V.; Milani, C.; Fiore, W.; Laureati, M.; De Noni, I.; Stuknyte, M.; Chouaia, B.; Riso, P.; Guglielmetti, S. Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *J. Nutr.* **2014**, *144*, 1787–1796. [[CrossRef](#)]
 56. Koeth, R.A.; Wang, Z.; Levison, B.S.; Buffa, J.A.; Org, E.; Sheehy, B.T.; Britt, E.B.; Fu, X.; Wu, Y.; Li, L.; et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat. Med.* **2013**, *19*, 576–585. [[CrossRef](#)]
 57. Fan, Y.; Ya, E.Z.; Ji-Dong, W.; Yu-Fan, L.; Ying, Z.; Ya-Lun, S.; Meng-Yu, M.; Rui-Ling, Z. Comparison of Microbial Diversity and Composition in Jejunum and Colon of the Alcohol-dependent Rats. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2018**, *28*, 1883–1895. [[CrossRef](#)]
 58. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G.R.; Merenstein, D.J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R.B.; Flint, H.J.; Salminen, S.; et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 506–514. [[CrossRef](#)]
 59. Claesson, M.J.; O'Sullivan, O.; Wang, Q.; Nikkilä, J.; Marchesi, J.R.; Smidt, H.; de Vos, W.M.; Ross, R.P.; O'Toole, P.W. Comparative analysis of pyrosequencing and a phylogenetic microarray for exploring microbial community structures in the human distal intestine. *PLoS ONE* **2009**, *4*, e6669. [[CrossRef](#)]
 60. Pokusaeva, K.; Fitzgerald, G.F.; van Sinderen, D. Carbohydrate metabolism in Bifidobacteria. *Genes Nutr.* **2011**, *6*, 285–306. [[CrossRef](#)]
 61. Haro, C.; Rangel-Zúñiga, O.A.; Alcalá-Díaz, J.F.; Gómez-Delgado, F.; Pérez-Martínez, P.; Delgado-Lista, J.; Quintana-Navarro, G.M.; Landa, B.B.; Navas-Cortés, J.A.; Tena-Sempere, M.; et al. Intestinal microbiota is influenced by gender and body mass index. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0154090. [[CrossRef](#)]
 62. Fransen, F.; van Beek, A.A.; Borghuis, T.; Meijer, B.; Hugenholtz, F.; van der Gaast-de Jongh, C.; Savelkoul, H.F.; de Jonge, M.I.; Faas, M.M.; Boekschoten, M.V.; et al. The impact of gut microbiota on gender-specific differences in immunity. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 754. [[CrossRef](#)]
 63. Wahlström, A.; Sayin, S.I.; Marschall, H.U.; Bäckhed, F. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism. *Cell Metab.* **2016**, *24*, 41–50. [[CrossRef](#)]
 64. Hyland, N.P.; Cryan, J.F. Microbe-host interactions: Influence of the gut microbiota on the enteric nervous system. *Dev. Biol.* **2016**, *417*, 182–187. [[CrossRef](#)]



Supplementary Materials

Associations of probiotic fermented milk (PFM) and classic yogurt consumption with *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* components the gut microbiota in healthy adults

Table S1. Relative abundance (%; median (IQR)) of bacterial phyla in PFM groups.

% Relative abundance	PFM groups		<i>p</i> value*	FDR critical value
	Nonconsumers (175)	Consumers (85)		
Firmicutes [#]				
Men	60.21 (54.09–67.66)	63.87 (57.65–72.29)	0.089	0.075
Women	58.97 (53.12–64.46)	56.45 (48.59–61.69)	0.057	0.037
Bacteroidetes	24.16 (18.05–30.70)	23.32 (15.49–34.07)	0.787	0.085
Proteobacteria [#]				
Men	4.898 (3.903–5.750)	4.274 (3.132–5.489)	0.065	0.050
Women	5.332 (4.240–6.480)	4.782 (4.079–6.580)	0.269	0.100
Actinobacteria	1.987 (0.988–3.989)	2.575 (1.380–5.190)	0.017	0.028
Cyanobacteria	0.298 (0.195–0.498)	0.284 (0.168–0.671)	0.579	0.057
Verrucomicrobia	0.190 (0.011–0.938)	0.156 (0.008–1.213)	0.899	0.100
Tenericutes	0.115 (0.069–0.228)	0.075 (0.053–0.129)	<0.001	0.014
Synergistetes	0.077 (0.038–0.125)	0.0723 (0.038–0.097)	0.282	0.042
Spirochaetes [#]				
Men	0.006 (0.003–0.013)	0.009 (0.005–0.019)	0.045	0.025
Women	0.008 (0.005–0.017)	0.016 (0.006–0.020)	0.026	0.012
Acidobacteria	0.007 (0.001–0.006)	0.003 (0.001–0.006)	0.770	0.070
Fusobacteria [#]				
Men	0.002 (0.001–0.005)	0.002 (0.007–0.003)	0.073	0.062
Women	0.003 (0.001–0.005)	0.004 (0.002–0.008)	0.097	0.087

*PFM consumption effect according to Mann–Whitney U test. Those variables whose *p* values were lower than their FDR critical value were considered significant.

[#] Gender significantly affected the taxa relative abundance.

Table S2. Relative abundance (%; median (IQR)) of the main bacterial genera (>0.5%), and those low-abundance genera (below 0.5%) showing significant differences between PFM groups.

% Relative abundance	PFM groups			
	Nonconsumers (175)	Consumers (85)	<i>p</i> value*	FDR critical value
<i>Bacteroides</i>	12.67 (7.790-19.73)	13.75 (6.947-19.60)	0.894	0.089
<i>Blautia</i>	7.956 (6.199-9.767)	7.746 (6.085-9.618)	0.452	0.057
<i>Faecalibacterium</i>	7.408 (5.619-9.985)	8.169 (5.163-9.755)	0.756	0.079
<i>Ruminococcus</i>	4.624 (3.661-5.860)	4.516 (3.085-5.964)	0.438	0.050
<i>Clostridium</i>	4.114 (3.294-5.341)	3.974 (2.686-5.685)	0.274	0.036
<i>Alkaliphilus</i> [#]				
Men	1.901 (1.178-3.882)	2.070 (1.060-3.668)	0.953	0.094
Women	0.885 (1.950-3.430)	1.372 (0.738-2.474)	0.123	0.017
<i>Roseburia</i> [#]				
Men	2.027 (1.194-3.103)	2.005 (0.573-3.588)	0.782	0.081
Women	1.575 (0.860-2.957)	1.878 (0.714-2.861)	0.921	0.092
<i>Lachnospira</i>	1.877 (0.944-2.861)	1.820 (0.966-3.210)	0.709	0.081
<i>Bifidobacterium</i>	1.442 (0.509-3.488)	1.876 (0.887-4.506)	0.0	0.009
<i>Coproccoccus</i>	1.892 (1.234-2.935)	1.623 (0.978-2.682)	0.191	0.031
<i>Flavobacterium</i> [#]				
Men	1.629 (0.792-2.706)	1.104 (0.527-1.847)	0.031	0.009
Women	2.126 (1.018-3.554)	2.046 (1.226-2.488)	0.375	0.047
<i>Parabacteroides</i>	1.267 (0.725-1.981)	1.141 (0.599-1.813)	0.155	0.027
<i>Collinsella</i>	1.019 (0.581-2.013)	1.068 (0.461-1.918)	0.560	0.062
<i>Slackia</i>	0.749 (0.416-1.381)	0.701 (0.303-1.475)	0.243	0.034
<i>Sutterella</i>	0.601 (0.271-1.188)	0.477 (0.217-0.944)	0.162	0.026
Others (<0.5%)				
<i>Butyricimonas</i>	0.233 (0.118-0.388)	0.142 (0.049-0.265)	<0.001	<0.001

*PFM consumption effect by Mann–Whitney U test. Those variables whose *p* values were lower than their FDR critical value were considered significant. [#]Gender significantly affected the taxa relative abundance.

Table S3. Relative abundance (%; median (IQR)) of the main bacterial families (>0.5%) in PFM groups.

% Relative abundance	PFM groups			
	Nonconsumers (175)	Consumers (85)	<i>p</i> value	FDR critical value
<i>Lachnospiraceae</i>	17.47 (14.80-21.61)	17.56 (6.082-17.13)	0.357	0.043
<i>Ruminococcaceae</i>	15.62 (13.41-18.61)	15.86 (12.71-19.40)	0.935	0.093
<i>Bacteroidaceae</i>	12.90 (7.809-19.73)	13.76 (6.947-19.60)	0.799	0.079
<i>Clostridiaceae</i>	9.665 (6.406-12.77)	8.486 (5.610-12.01)	0.100	0.020
<i>Coriobacteriaceae</i>	2.373 (1.548-4.051)	2.647 (1.167-4.101)	0.937	0.094
<i>Veillonellaceae</i>	1.991 (1.067-4.381)	2.057 (1.027-4.453)	0.766	0.076
<i>Flavobacteriaceae</i> [#]				
Men	1.677 (0.915-2.816)	1.307 (0.573 -1.972)	0.044	0.005
Women	2.281 (1.289-3.722)	2.229 (1.436-2.678)	0.472	0.055
<i>Porphyromonadaceae</i>	1.804 (1.191-2.669)	1.508 (0.836-2.496)	0.040	0.012
<i>Bifidobacteriaceae</i>	1.316 (0.487-3.397)	1.923 (0.918-4.529)	0.014	0.007
<i>Erysipelotrichaceae</i>	0.831 (0.442-1.466)	0.775 (0.448-1.643)	0.997	0.100
<i>Alcaligenaceae</i>	0.617 (0.276-1.191)	0.502 (0.243-0.993)	0.253	0.037
<i>Sphingobacteriaceae</i> [#]				
Normal body fat levels	0.719 (0.355-1.366)	0.617 (0.324-1.449)	0.573	0.070
High body fat levels	0.436 (0.250-0.760)	0.353 (0.223-1.637)	0.982	0.982

[#]Gender or BMI–fat groups significantly affected the taxa relative abundance.

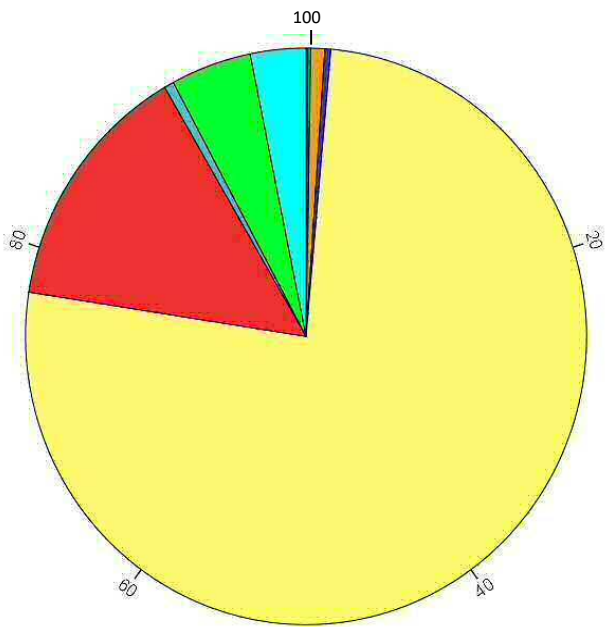
Table S4. Relative abundance (%; median (IQR)) of the main bacterial species (>0.5%), and those low-abundance species (below 0.5%) showing significant differences between PFM groups.

% Relative abundance	PFM groups			
	Nonconsumers (175)	Consumers (85)	<i>p</i> value	FDR critical value
<i>Blautia coccooides</i>	1.991 (1.543-2.589)	1.856 (1.347-2.612)	0.315	0.038
<i>Bacteroides vulgatus</i>	1.488 (0.560-3.387)	1.269 (0.355-3.064)	0.305	0.036
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	1.513 (0.924-2.160)	1.431 (0.611-2.172)	0.287	0.033
<i>Alkaliphilus peptidifermentans</i>	0.653 (0.228-1.309)	0.560 (0.240-1.692)	0.947	0.094
<i>Bacteroides uniformis</i>	0.877 (0.386-1.709)	0.822 (0.165-1.634)	0.302	0.034
<i>Collinsella aerofaciens</i>	0.760 (0.469-1.577)	0.836 (0.364-1.577)	0.624	0.065
<i>Alkaliphilus crotonatoxidans</i>	0.773 (0.301-1.730)	0.576 (0.241-1.079)	0.049	0.009
<i>Lachnospira pectinoschiza</i> [#]				
Normal body fat levels	1.227 (0.818-1.781)	0.939 (0.648-1.408)	0.021	0.012
High body fat levels	0.855 (0.533-1.238)	0.906 (0.432-1.615)	0.476	0.050
<i>Roseburia faecis</i>	0.751 (0.321-1.463)	0.758 (0.254-1.338)	0.624	0.065
<i>Bacteroides rodentium</i>	0.703 (0.343-1.356)	0.753 (0.191-1.325)	0.440	0.047
<i>Ruminococcus bromii</i>	0.657 (0.014-1.440)	0.120 (0.004-1.350)	0.113	0.016
<i>Clostridium alkalicellulosi</i>				
Men	0.724 (0.497-0.949)	0.774 (0.540-1.036)	0.655	0.070
Women	0.620 (0.470-0.970)	0.496 (0.383-0.663)	0.021	0.005
<i>Oscillospira</i>	0.673 (0.396-0.918)	0.602 (0.403-0.818)	0.403	0.044
<i>Bacteroides xylanisolvens</i>	0.601 (0.330-0.983)	0.557 (0.230-0.953)	0.943	0.094
<i>Parabacteroides distasonis</i>	0.527 (0.204-0.955)	0.413 (0.154-0.840)	0.161	0.021
Others (<0.5%)				
<i>Bifidobacterium thermophilum</i>	0.000 (0.000-0.000)	0.000 (0.000-0.004)	<0.001	0.001
<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>	0.000 (0.000-0.000)	0.001 (0.000-0.005)	<0.001	0.001
<i>Bifidobacterium merycicum</i>	0.001 (0.000-0.002)	0.003 (0.001-0.024)	<0.001	0.001
<i>Bifidobacterium animalis</i>	0.000 (0.000-0.000)	0.001 (0.000-0.147)	<0.001	<0.001
<i>Bifidobacterium magnum</i> [#]				
Men	0.001 (0.000-0.001)	0.002 (0.001-0.007)	<0.001	0.002
Women	0.001 (0.000-0.002)	0.002 (0.001-0.007)	<0.001	0.001

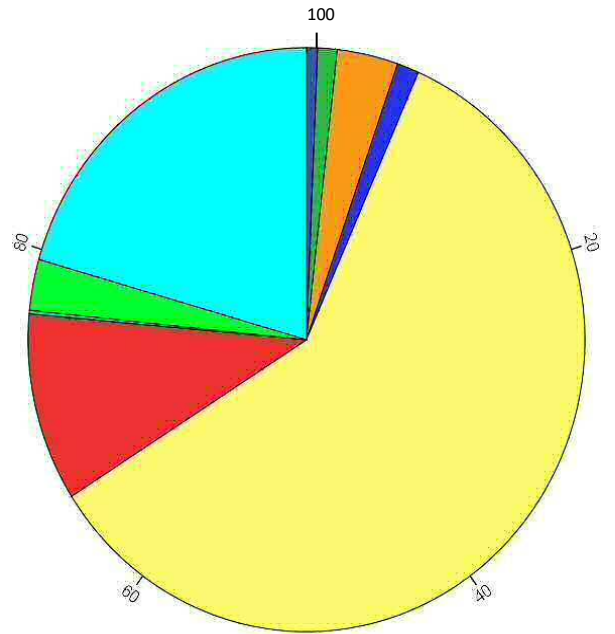
*PFM consumption effect by Mann–Whitney U test. Those variables whose *p* values were lower than their FDR critical value were considered significant.

Gender or BMI–fat groups significantly affected the taxa relative abundance.

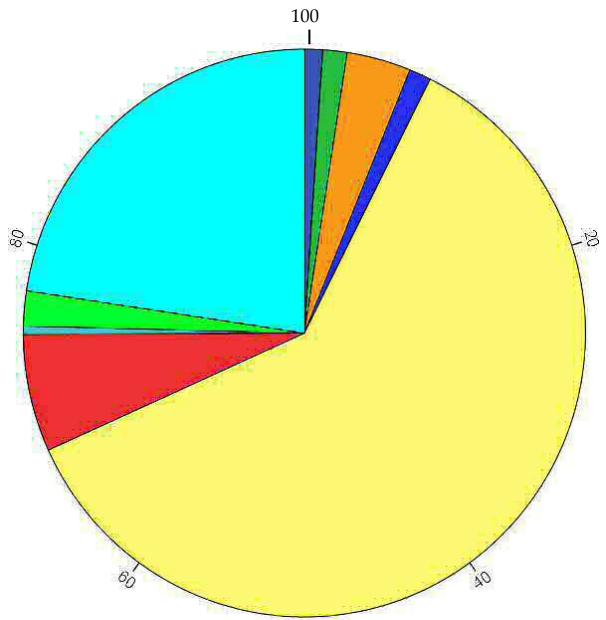
- *Bifidobacterium thermophilum*
- *Bifidobacterium pseudolongum*
- *Bifidobacterium merycicum*
- *Bifidobacterium magnum*
- *Bifidobacterium longum*
- *Bifidobacterium kashiwanohense*
- *Bifidobacterium dentium*
- *Bifidobacterium bombi*
- *Bifidobacterium animalis*



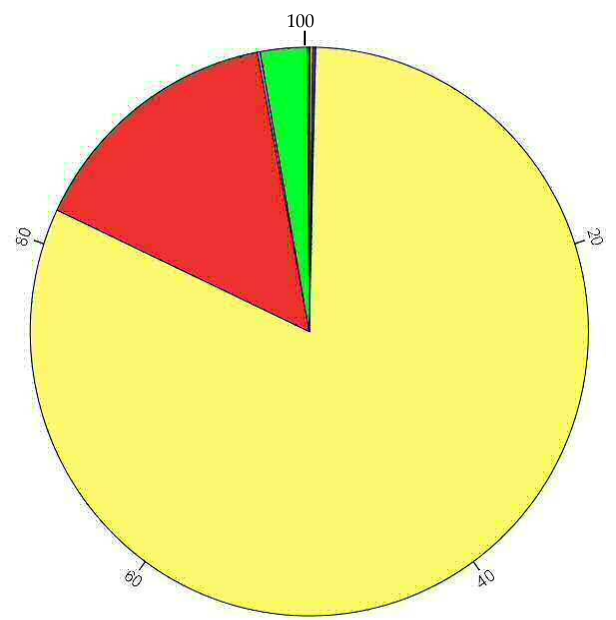
PFM-NC



Mixed-PFM



Bif-PFM



Lb-PFM

4.1.3. Effects of ewe's milk yogurt (whole and semi-skimmed) and cow's milk yogurt on inflammation markers and gut microbiota of subjects with borderline-high plasma cholesterol levels: a crossover study.

Redondo N¹, García-González N², Diaz-Prieto LE¹, Olmedilla-Alonso B¹, Martín-Diana AB³, Asensio-Vegas C², Nova E¹.

¹Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN)-CSIC, C/ Jose Antonio Novais, 10, 28040, Madrid, Spain.

²Agro Technological Institute, Deputy Directorate of Research and Technology, Dairy Technological Station, Avda. Viñalta s/n, 34071, Palencia, Spain.

³Agro Technological Institute, Deputy Directorate of Research and Technology, Area of Innovation and Process Optimisation, Ctra. de Burgos Km. 119, 47071, Valladolid, Spain.

Redondo N., *et al.* Eur J Nutr. 2019; 58(3):1113-1124. doi: 10.1007/s00394-018-1626-0.

RESUMEN

4.1.3. Efectos del consumo de yogur de oveja (entero y semidesnatado) y yogur entero de vaca sobre marcadores de inflamación y la composición de la microbiota intestinal de adultos sanos con niveles al límite o ligeramente altos de colesterol plasmático: un estudio cruzado.

Antecedentes y objetivos: El yogur de oveja presenta en su composición niveles más elevados de proteínas, minerales y ácidos grasos saturados de cadena corta y media en comparación con el yogur de vaca. En este sentido, el objetivo del estudio fue analizar los efectos del consumo de yogur de vaca entero (CW; 3,0% grasa), yogur de oveja semidesnatado (ES; 2,8% grasa) y yogur de oveja entero (EW; 5,8% grasa) sobre marcadores de inflamación y la composición de la microbiota intestinal de adultos con niveles al límite o ligeramente altos de colesterol plasmático. Metodología: Estudio cruzado realizado en 30 adultos (16 mujeres) que consumieron de forma aleatoria 250 g de cada tipo de yogur al día durante un periodo de 5 semanas, separadas por un periodo de lavado de 4 semanas. Los niveles de insulina plasmática, leptina, moléculas de adhesión y citoquinas se midieron mediante tecnología Luminex, mientras que la composición de la microbiota intestinal se analizó mediante PCR cuantitativa antes y después de cada periodo de intervención. Se calcularon tasas de cambio de cada parámetro analizado para evaluar el efecto de cada tratamiento, tanto en el grupo global de sujetos como en un subgrupo de sujetos que presentaban el cociente más elevado de colesterol total/HDL (Cho-I): 1) Grupo Cho-I A (6 mujeres y 4 hombres con los niveles más elevados del cociente); 2) Grupo Cho-I B (resto de sujetos). Resultados: El efecto del consumo de yogur de oveja entero y semidesnatado y el yogur de vaca sobre los parámetros analizados no fue diferente en el grupo global de sujetos. Sin embargo, las tasas de cambio de ICAM-1 y P-selectina mostraron niveles más bajos tras el consumo de EW en comparación con CW y ES, respectivamente, en el grupo Cho-I A ($P=0,047$ y $P=0,020$, respectivamente). A su vez, las mujeres de este grupo mostraron niveles más bajos de tasas de cambio de MCP-1 tras el consumo de EW comparado con ES y CW ($P=0,028$ ambos), así como de *Blautia coccooides*–*Eubacterium rectale* tras el consumo de EW en comparación con ES ($P=0,028$). Conclusión: El consumo de yogures de oveja no produjo efectos diferentes al consumo de yogur de vaca, aunque la atenuación observada en algunos marcadores de inflamación tras el consumo de yogur de oveja entero en sujetos con alto cociente colesterol total/HDL sugiere la necesidad de seguir estudiando a mayor profundidad los efectos del yogur de oveja en este tipo de población.

Contribución del doctorando: Metodología de laboratorio, realización de las bases de datos, análisis y tratamiento estadístico de los datos y escritura del artículo científico.



Effects of ewe's milk yogurt (whole and semi-skimmed) and cow's milk yogurt on inflammation markers and gut microbiota of subjects with borderline-high plasma cholesterol levels: a crossover study

Noemí Redondo¹ · Natalia García-González² · Ligia E. Díaz-Prieto¹ · Begoña Olmedilla-Alonso¹ · Ana B. Martín-Diana³ · Carmen Asensio-Vegas² · Esther Nova¹

Received: 11 October 2017 / Accepted: 26 January 2018
© Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2018

Abstract

Purpose Ewe's milk yogurt is richer in proteins, minerals and short- and medium-chain fatty acids compared to cow's milk yogurt. We aimed to evaluate the effects of cow's milk yogurt (CW, 3.0% fat), semi-skimmed (ES, 2.8% fat) and whole ewe's milk yogurts (EW, 5.8% fat) on inflammatory markers and gut microbiota in subjects with borderline-high plasma cholesterol.

Methodology 30 adults (16 women) were randomized into a crossover study to consume 250 g/yogurt/day during three 5-week periods (4-week washouts). Plasma insulin, leptin, adhesion molecules, cytokines and gut microbiota composition (qPCR) were analysed. Rates of change were used to assess treatment effects both in the whole group and in subgroups of subjects with different cholesterol/HDL-c ratio (Cho-I group A: the top 6 women and 4 men values; Cho-I group B: remaining subjects).

Results The yogurts showed no different effects on the inflammatory biomarkers or the microbiota of the whole group. However, ICAM-1 and P-selectin rates of change were lower after EW compared to CW and ES, respectively, in subjects of the Cho-I group A ($P=0.047$ and $P=0.020$). Women of this group showed lower MCP-1 rates of change after EW compared to ES and CW ($P=0.028$, both). *Blautia coccooides*–*Eubacterium rectale* decreased in women of the Cho-I group A during EW vs. ES ($P=0.028$).

Conclusion Ewe's yogurt effects on inflammatory markers and microbiota were not different from those after cow's yogurt, but the attenuation of some inflammatory biomarkers with ewe's whole-milk yogurt in subjects with the highest TC/HDL-c deserves further study.

Keywords Ewe's milk yogurts · Healthy adults · Gut microbiota · Inflammation

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00394-018-1626-0>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Esther Nova
enova@ictan.csic.es

¹ Department of Metabolism and Nutrition, Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN)-CSIC, C/ Jose Antonio Novais, 10, 28040 Madrid, Spain

² Agro Technological Institute, Deputy Directorate of Research and Technology, Dairy Technological Station, Avda. Viñalta s/n, 34071 Palencia, Spain

³ Agro Technological Institute, Deputy Directorate of Research and Technology, Area of Innovation and Process Optimisation, Ctra. de Burgos Km. 119, 47071 Valladolid, Spain

Abbreviations

LAB	Lactic acid bacteria
CVR	Cardiovascular risk
SFA	Saturated fatty acids
SCFA	Short-chain fatty acids
MCFA	Medium-chain fatty acids
LDL	Low-density lipoprotein
	LCFA Long-chain fatty acids
BMI	Body mass index
qPCR	Quantitative (or real-time) polymerase chain reaction
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
IL	Interleukin
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1

TC/HDL-c Total cholesterol/HDL-c ratio
TLR Toll-like receptors

Background

Yogurt is considered an integral food component of a healthy well-balanced diet [1]. It has been associated with an overall better diet quality [2, 3] since it provides valuable nutrients and the microorganisms *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*. Moreover, traditional yogurt and those that additionally include other specific lactic acid bacteria (LAB) have been considered health-promoting foods, due to their potential anti-inflammatory effects in immunological diseases such as allergy or inflammatory bowel disease, and their beneficial effects in the preservation of intestinal health, including modulation of the gut microbiota composition [4]. In addition, yogurt consumption (including both, traditional and with probiotic LAB) has also been associated with cardiometabolic health benefits in observational studies, in particular on adiposity and diabetes markers, and neutral effects on cardiovascular risk (CVR) [5]. Regarding intervention studies, findings have shown mainly neutral effects of yogurt consumption on lipid profile [6, 7], as well as in inflammation markers such as C-reactive protein, adiponectin or pro-inflammatory cytokines [8].

On the other hand, the composition of the milk used in yogurt manufacture results in relevant differences in fat quality and quantity in the final product [9]. Thus, despite all yogurts being relatively rich in saturated fatty acids (SFA), ewe's milk yogurt contains a higher amount of medium-chain fatty acids (MCFA) and short-chain fatty acids (SCFA) compared to cow's milk yogurt (20% in ewe's milk compared to 12% in cow's milk) [10]. Dietary strategies modifying the relative proportion of the different types of fatty acids are usually carried out to try to control plasma lipids and CVR factors, as well as inflammation [11]. In this sense, high levels of the low-density lipoprotein (LDL) cholesterol promote an inflammatory response in the artery wall, which drives the process of atherosclerosis [12] and the development of a low-grade chronic inflammation [13]. As a part of the inflammatory process, several chemoattractants are increased in the site of inflammation for leucocyte recruitment, such as MCP-1, together with the up-regulation of adhesion molecules on the endothelium, namely ICAM-1, VCAM-1 and P-selectin. In addition, pro and anti-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-8 and IL-10 are released to control the inflammatory response to injury [14]. Overall, the increased levels of inflammatory biomarkers, including leptin, which is associated to satiety and adipose tissue dysfunction, have been considered good markers of CVR [15]. In fact, the link between cardiometabolic disturbances and higher levels of inflammatory markers has been shown

even in adolescents [16]. On the other hand, the influence of diet–microbiota interactions on human metabolism and inflammatory status is receiving increased attention [17]. Thus, the richest content of ewe's milk yogurt in SCFA and MCFA, calcium and protein, which have all been related to metabolic and physiological effects, such as immunomodulation [18], lipids metabolism [18–20], and blood pressure [5, 20], suggest that this type of yogurt might have different effects on inflammation markers than conventional cow's yogurt. In addition, since changes in the gut microbiota of healthy adults have not been associated with probiotic *Lactobacilli* intake after yogurt interventions [21, 22], it seems that other yogurt components may be responsible for specific microbial changes.

For this purpose, the aim of this study was to evaluate the different effects after the intake of cow's whole-milk yogurt, ewe's semi-skimmed milk yogurt and ewe's whole-milk yogurt on inflammatory biomarkers and gut microbiota composition of apparently healthy adults with borderline-high plasma cholesterol levels. On a second place, since the total cholesterol/HDL-c ratio (TC/HDL-c) has been recognized as a good marker of CVR [23], the study aimed to discriminate if a relatively high basal level of this ratio had an influence on the effects of yogurts on the biomarkers studied.

Methods

Experimental design

This study is a randomized, crossover nutritional intervention study, which started in January 2015 and finished in July 2015. Every arm of the intervention had a 5-wk duration with a daily consumption of 2 \times 125 g of any of the following products: (1) cow's whole-milk yogurt (CW) (3.0% fat); (2) ewe's semi-skimmed-milk yogurt (ES) (2.8% fat); (3) ewe's whole-milk yogurt (EW) (5.8% fat). The 5-wk duration of the experimental periods was chosen according to similar studies with probiotics published previously [24, 25]. A 2-week run-in period with probiotic yogurt exclusion while maintaining their habitual diet was performed prior to the first study period. In addition, a 4-week wash-out period with similar dietary guidelines was included between the different treatment periods. A systematic random allocation controlling for balanced sex, age and body mass index (BMI) distribution among the six sequence groups was performed. Blood samples were obtained after at least 9 h of fasting in the early morning hours (8 am–10 am) at the beginning and at the end of each intervention period. One stool sample and a 72-h dietary register were also collected at these time points. DIAL software was used to analyze the nutrients composition of volunteer's habitual diet, excluding the experimental products intake (Online Resource 2).

Experimental products

Yogurts were prepared using fresh raw ewe's milk from Churra sp. (traditional breeds in Castilla y León, Spain) kindly provided by the School of Viñalta (Palencia, Spain), where the 162 animals were handled in accordance with Directive 2010/63/EU for the protection of animals used for scientific purposes. A commercial yogurt culture YF-L903, widely used in cow's milk, which contains a mixture of *S. thermophilus* and *L. bulgaricus* was used. Starters used for direct batch inoculation were provided by Chr. Hansen, Madrid, Spain. Control yogurt was a commercial brand with a high market share in Spain which is prepared with cow's milk from Holstein breed [26].

Twelve manufacturing rounds were carried out. The milk was processed in Estación Tecnológica de la Leche (ETL, Palencia), in northern Spain, within 2 h after reception. Milk base was strained using a cloth filter and divided into two batches of 30 L. Ewe's milk was standardized and pasteurized at 80 °C for 30 min. Then, the milk was cooled to 42–43 °C and inoculated with starters. The lyophilized cultures were prepared individually and used according to commercial recommendations. Both mixtures were transferred to tightly closed plastic cups (120 mL, Alta Barrera SL, Barcelona, Spain) and incubated (PortinoxARGBT 700-1P, Sevilla, Spain) at 42 °C until pH value reached 4.6. Then, samples were stored at 4 °C and sent to Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN) (Madrid) to be used in the intervention study.

Microbiological analyses of yogurts are described elsewhere [26]. The results showed that cow's milk, semi-skimmed and whole ewe's milk yogurts contain more than 10^7 cfu/gr of both *L. bulgaricus* and *S. thermophilus*, which is the minimum required content of live bacteria according to the national law of yogurt quality (RD 271/2014) (Online resource 1).

Subjects

Adult subjects (25–65 age range) with cholesterol serum levels between 190 and 240 mg/dl, and a BMI between 19 and 28 kg/m² were eligible for the study. Exclusion criteria included the following: the use of antihypertensive, anti-inflammatory, lipid-lowering medication (i.e. statins), allergies and intolerance to dairy foods, the clinical use of nutritional/food supplements (i.e. phytosterols), following a weight-reduction diet, high alcohol intake (more than 28 drinks/week for men and 16 for women), heavy exercise, and any diagnosed endocrine, gastrointestinal, cardiovascular, or inflammatory disease. A total of 30 participants meeting all inclusion criteria (14 men and 16 women) were selected from 64 subjects who were interested and contacted through advertisements. Sample size calculation was performed on the basis of a mean value for baseline LDL-cholesterol of 3.23 mmol/L (SD 0.52 mmol/L). A sample size of 29 subjects is necessary to obtain a 10% difference in the LDL-cholesterol with 90% power and an alpha error of 0.05. Changes in lipid profile were the main outcome of this trial, as published previously [26], but the number of subjects is similar or higher than in other published crossover studies with probiotic products assessing immune function and microbiota changes [24, 25]. The study protocol was fully explained to all participants, who gave written informed consent at the time of enrollment. All participants completed the study. Body weight (kg) was estimated without shoes and with light clothing (Tanita BC 601), and height was recorded to the nearest cm. (Soehnle). Blood pressure was taken in quiet and temperature-controlled conditions using an automatic blood pressure monitor (Omron M6, Intellisense). The cuff was placed on the right upper arm. Baseline characteristics of the volunteers are described in Table 1.

Table 1 Demographic characteristics and lipid profile of volunteers at baseline

	Men (n = 14)	Women (n = 16)	P [#]	Cho-I group A (n = 10)	Cho-I group B (n = 20)	P [#]
Age (years)	43.43 ± 13.35	41.12 ± 14.54	0.656	45.7 ± 14.32	40.45 ± 13.57	0.335
BMI (kg/m ²)	27.03 ± 2.88	23.67 ± 2.77	0.003	26.13 ± 3.052	24.78 ± 3.337	0.291
Systolic blood pressure (mmHg)	133.2 ± 20.32	116.4 ± 15.74	0.016	125.4 ± 13.02	123.6 ± 22.54	0.823
Diastolic blood pressure (mmHg)	84.5 ± 12.35	74.50 ± 11.50	0.029	81.5 ± 10.48	78.00 ± 13.84	0.488
Total cholesterol (mg/dl)	199.4 ± 26.97	212.2 ± 27.51	0.209	225.8 ± 25.10 ^b	196.5 ± 23.66 ^a	0.004
Triacylglycerides (mg/dl)	117.8 ± 62.72	76.38 ± 18.39	0.017	91.20 ± 30.95	90.65 ± 30.89	0.728
HDL-cholesterol (mg/dl)	46.21 ± 6.74	64.88 ± 6.94	0.000	52.1 ± 13.22	58.20 ± 10.49	0.179
LDL-cholesterol (mg/dl)	129.6 ± 29.63	132.1 ± 27.32	0.816	155.5 ± 18.01 ^b	118.7 ± 23.76 ^a	0.000
Total cholesterol/HDL-cho index	4.41 ± 0.95	3.30 ± 0.52	0.000	4.56 ± 0.999 ^b	3.46 ± 0.664 ^a	0.009

Mean ± SD. [#]Significant differences ($P < 0.05$) between men and women and between Cho-I groups, respectively. Student's *T* test for independent samples

Microbiota analysis

The fecal samples were collected in sterile containers at home prior to and on the last day of each intervention period. Samples were immediately frozen at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ and transported on the next day in refrigerated conditions to the study center where they were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analyses. Bacterial DNA was extracted from 180 to 220 mg of each fecal sample with the commercial kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN GmbH), following the manufacturer's instructions and quantified using Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, USA).

SYBR-Green real-time PCR (qPCR) was performed for the detection of 16S rRNA genes with specific primers (Table 2) targeted to the following bacterial groups: *Bacteroides*, *Blautia coccooides*–*Eubacterium rectale* group, *Clostridium leptum* group, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp., *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* spp. and total bacteria. A standard curve for each qPCR assay was used for the quantification of target bacterial DNA in fecal DNA preparations. Microbial cultures of predominant bacteria (*Bacteroides fragilis* DSMZ 2151, *Clostridium coccooides/Blautia coccooides* DSMZ 935, *Clostridium leptum* DSMZ753, *Faecalibacterium prautnizzi* A2-165, *Bifidobacterium bifidum* DSMZ 20215, *Lactobacillus acidophilus* CECT 903, *Escherichia coli* K12 CECT 433, *Enterococcus faecium* CECT 410) were grown using standard techniques and appropriate media,

and after 24–48 h in culture, bacterial concentrations were assayed in plate cultures and a known amount (cell numbers ranging from 6×10^6 to 1.5×10^8 cells/ml) was used to obtain DNA with the same extraction kit. Standard curves were performed with serial dilutions of genomic DNA, by plotting DNA concentrations (ng) against their respective Ct value, which is defined as the number of cycles which cross the basal line or threshold, after which the fluorescence released is proportional to the original DNA of the sample.

qPCR experiments were carried out with a Stratagene Mx3000P (Agilent Technologies), using Mx3000Pw ninety-six-well non-skirted PCR plates (Agilent Technologies) covered with PCR adhesive films (Eppendorf AG). Each qPCR, with a final volume of 20 μl was composed of 10 μl of 2XBrilliant III ultra-fast SYBR Green QPCR Master Mix (Agilent Technologies), appropriate amounts of forward and reverse primer, the diluted reference dye ROX (30 nM final concentration), nuclease-free PCR-grade water and an optimized dilution of extracted DNA (1–50 ng/ μL) from fecal samples or a serial dilution series of bacterial reference genomic DNA for standard curves. The amplification program started with an initial step of 3 min at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by thirty-five to forty cycles of 15 s at $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, 20 s of annealing at the appropriate temperatures for each primer, and a final extension step at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for those primers with a high amplicon size. Melt curve analysis after each qPCR assay was carried out by slow heating from 55 to $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ with fluorescence measurements taken at every $1\text{ }^{\circ}\text{C}$ increase in temperature. The quality of the qPCR assays was assessed by

Table 2 Primer sets used in the quantitation of 16S rRNA genes by qPCR

Target organism	Primer set	Sequence (5–3)	Product size (bp)	Annealing temp ($^{\circ}\text{C}$)	References
<i>Bacteroides</i> spp.	Bfra-F	ATAGCCTTTCGAAAGRAAGAT	495	50	[27]
	Bfra-R	CCAGTATCAACTGCAATTTTA			
<i>Blautia coccooides</i> – <i>Eubacterium rectale</i> group	gCcoc-F	AAATGACGGTACCTGACTAA	440	50	[27]
	gCcoc-R	CTTTGAGTTTCATTCTTGCGAA			
<i>Clostridium leptum</i> group	sg-Clept-F	GCACAAGCAGTGGAGT	239	50	[27]
	sg-Clept-R3	CTTCTCCGTTTTGTCAA			
<i>Bifidobacterium</i> spp.	Lm26-F	GATTCTGGCTCAGGATGAACG	211	60	[28]
	Bif228-R	CTGATAGGACGCGACCCCAT			
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	Fprau223F	GATGGCCTCGCGTCCGATTAG	199	58	[29]
	Fprau420R	CCGAAGACCTTCTTCCTCC			
<i>Lactobacillus</i> spp.	LbF	AGCAGTAGGGAATCTTCCA	341	56	[30]
	LbR	CACCGCTACACATGGAG			
<i>Enterobacteriaceae</i>	Eco1457F	CATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGC	195	63	[29]
	Eco1652R	CTCTACGAGACTCAAGCTTGC			
<i>Enterococcus</i> spp.	Enteroc_F	CCCTTATTGTTAGTTGCCATCATT	123	61	[31]
	Enteroc_R	ACTCGTTGTA CTCCATTGT			
Total bacteria	F_Bact 1369	CGGTGAATACGTTCCCGG	146	60	[32]
	R_Prok1492	TACGGCTACCTTGTACGACTT			

the reaction efficiency, measured by the slope of the standard curve ($r=3.3-3.6$), as well as with a non-template control.

Hormones and inflammatory biomarkers

Fasting plasma levels of hormones, cytokines and soluble adhesion molecules including insulin, leptin, monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), interleukin (IL)-8, (IL-10), tumor necrosis factor α (TNF α), intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) and P-selectin were measured by Multiplex immunobead assay technology according to the manufacturer's protocols (Human Metabolic Hormone Magnetic Bead Panel, Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, and Human Cardiovascular Disease Panel respectively, from Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) and Magpix analytical test instrument (Luminex Corp., Austin, TX).

Concentrations were determined on the basis of the fit of a standard curve for mean fluorescence intensity vs. standard concentrations. Two quality controls (high and low concentrations, respectively) were run within each assay. The minimum detectable concentration for each analyte was as follows: insulin, 87 pg/mL; leptin, 41 pg/mL; MCP-1, 14 pg/mL; IL-10, 1.1 pg/mL; IL-8, 0.4 pg/mL; TNF- α , 0.07 pg/mL; ICAM-1, 0.016 ng/mL; P-selectin, 0.051 ng/mL; VCAM-1, 0.024 ng/mL. All analyses were performed in different aliquots to avoid freeze-thawing repetitions.

Statistical analysis

The Kolmogorov–Smirnov test was performed to check the normality of the variables. To evaluate the effect of each intervention, rates of change were calculated for each bacterial group and inflammatory biomarkers [(Post-treatment – Pre-treatment)/Pre-treatment]. To evaluate the effect of the interventions on rates of change, linear mixed models with post hoc Bonferroni tests with “treatment” as fixed factor and “visit” as a subject's repetition random factor were performed for the variables with normal distribution, and Friedman test for related samples for those not fitting a normal distribution. For inflammatory biomarkers, “age” was included as covariable. Since variability was observed among subjects regarding their individual cholesterol index (Cho-I: total cholesterol/HDL-cholesterol), the top tertile, including the six women and four men with the highest values for this index before the intervention was started (Cho-I group A), was compared with the remaining 20 individuals (the intermediate and low tertiles together) (Cho-I group B). The cut-off points for the highest tertile were ≥ 5.1 for men and ≥ 3.5 for women. Then, Cho-I groups and sex were added in a second model as fixed factors. When significant interactions between two or more factors were found, Wilcoxon tests were used to compare treatment effects within

the relevant groups of subjects. Data analysis was performed using SPSS v.23 Software. P values < 0.05 were considered significant.

Results

Dietary intake, BMI and blood pressure

Treatment had no effects neither in dietary intake, nor in BMI or blood pressure values (Online Resource 2).

Hormones and inflammatory biomarkers

Treatment did not change hormones and inflammatory biomarker levels (Table 3). However, when subjects were divided depending on their Cho-I values, ICAM-1 levels tended to change ($P=0.067$) in the Cho-I group A, with a decreasing effect on ICAM-1 observed after EW intervention compared to the change after CW ($P=0.047$; Fig. 1a) [rates of change (medians): -0.150 vs. 0.086 , after EW and CW interventions, respectively]. The same effect was observed for P-selectin levels in Cho-I group A ($P=0.020$), with a decrease after EW intervention as compared to ES intervention ($P=0.022$; Fig. 1b) [rates of change (medians): -0.140 vs. 0.000]. MCP-1 also showed a trend for the interaction among treatment, Cho-I and sex ($P=0.095$). A deeper analysis showed differences in MCP-1 levels among treatments ($P=0.018$) in women of the Cho-I group A. While MCP-1 decreased after EW, levels were increased after ES and CW interventions ($P=0.028$ both; Fig. 1c) (rates of change [medians]: -0.126 vs. $+0.154$ and $+0.065$, respectively).

An almost significant interaction among treatment, Cho-I and sex was observed in leptin levels ($P=0.052$). Differences among treatments were observed in women of the Cho-I group A ($P=0.014$), between the change observed after ES and the change after CW ($P=0.043$; Fig. 2). While leptin level increased after ES it decreased after CW intervention (rates of change [medians]: $+0.507$ and -0.289 , respectively). Since EW yogurt did not increase leptin levels, the increase after ES could be more related to the lower pre-intervention values observed in these women before the ES period compared to the EW period.

Microbiota analysis

A simple analysis with treatment as the only factor showed no differential effects of the three types of yogurts on the intestinal microbiota. However, when Cho-I and sex were included in the statistical model, some differences were observed. A triple interaction was found among treatment, Cho-I and sex in *Blautia coccoides*–*Eubacterium*

Table 3 Hormones and inflammatory biomarkers in plasma samples of study participants and rates of change [(Post-Tr) – (Pre-Tr)/Pre-Tr]

Mean (SD)	Cow's whole-milk yogurt (<i>n</i> = 30)		Ewe's semi-skimmed-milk yogurt (<i>n</i> = 30)		Ewe's whole-milk yogurt (<i>n</i> = 30)		<i>P</i> [#]	<i>P</i> [*]		
	Pre-tr.	Post-tr.	Rate of change	Pre-tr.	Post-tr.	Rate of change			Pre-tr.	Post-tr.
Insulin (pg/ml)	248 (181)	246 (146)	0.156 (0.472)	239 (161)	268 (218)	0.170 (0.650)	243 (136)	261 (180)	0.130 (0.697)	0.794 NS
Leptin (pg/ml)	14,505 (18,682)	11,872 (14,471)	-0.013 (0.385)	11,102 (11,820)	16,375 (23,249)	0.375 (0.904)	15,155 (17,267)	16,067 (24,046)	0.067 (0.447)	0.065 (Tr* C *S) 0.052
VCAM-1 (ng/ml)	361 (94)	368 (100)	0.051 (0.308)	376 (92)	377 (86)	0.060 (0.404)	404 (128)	359 (92)	-0.087 (0.229)	0.331 NS
MCP-1 (pg/ml)	66.0 (36.0)	58.9 (23.2)	-0.024 (0.278)	58.4 (21.5)	59.5 (27.5)	0.041 (0.335)	65.6 (34.7)	59.7 (27.6)	-0.058 (0.260)	0.196 (Tr* C *S) 0.095
IL-8 (pg/ml)	3.39 (4.83)	2.55 (1.22)	0.057 (0.490)	2.44 (1.19)	2.74 (31.33)	0.177 (0.688)	2.65 (1.66)	2.66 (1.42)	0.157 (0.557)	0.611 NS
TNF-α (pg/ml)	3.98 (3.07)	3.22 (1.47)	-0.056 (0.396)	3.50 (1.48)	3.59 (1.34)	0.105 (0.334)	3.44 (1.43)	3.41 (1.26)	0.067 (0.420)	0.109 NS
Median (IQR)	Pre-tr	Post-tr	Rate of change	Pre-tr	Post-tr	Rate of change	Pre-tr	Post-tr	Rate of change	<i>P</i> [§]
ICAM-1 (ng/ml)	40.0 (33.5,46.2)	40.9 (33.2,47.4)	0.034 (-0.188,0.203)	42.2 (35.9,55.4)	39.7 (35.4, 52.7)	-0.039 (-0.173,0.113)	44.2 (36.6,50.1)	38.2 (30.1,46.0)	-0.118 (-0.214, -0.021)	0.166
P-selectin (ng/ml)	39.9 (26.5, 54.7)	39.9 (26.5, 55.5)	-0.060 (-0.265, 0.402)	43.1 (29.9, 49.3)	39.9 (29.9, 46.2)	-0.082 (-0.316, 0.203)	43.1 (29.9, 63.0)	33.3 (22.9, 49.3)	-0.126 (-0.483, 0.000)	0.218
IL-10 (pg/ml)	1.53 (1.05, 3.67)	2.01 (0.99, 3.44)	0.000 (-0.47, 0.89)	2.01 (0.05, 4.03)	2.96 (0.31, 4.38)	0.000 (-0.30, 0.59)	1.53 (0.05, 3.91)	1.29 (0.07, 3.14)	-0.062 (-0.52, 0.99)	0.407

[#] Treatment effect by linear mixed model applied to rates of change with treatment (Tr), Cho-I (C) and sex (S) as fixed factors, visit as repeated measure factor with random effect and age as covariable factor

^{*}Significant factor interactions in the linear mixed model

[§] Friedman test applied to rates of change of variables not fitting a normal distribution

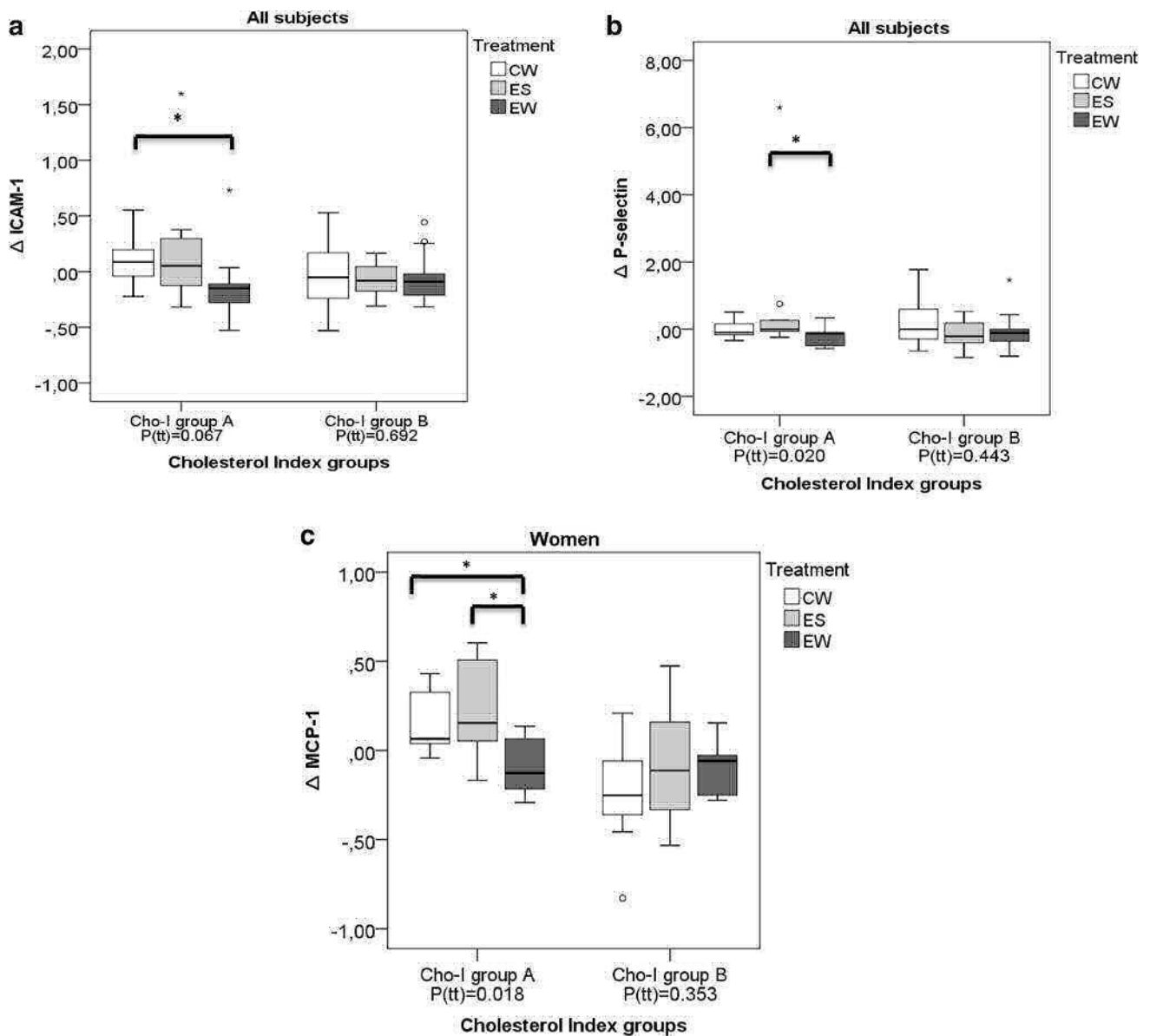


Fig. 1 Rates of change of inflammatory biomarkers with each treatment (CW cow yogurt, ES ewe semi-skimmed yogurt, EW ewe whole yogurt) by Cho-index groups. **a** ICAM-1 levels, **b** P-selectin levels in Cho-I group A ($N=10$) and Cho-I group B ($N=20$), separately. Treatment effect (P_{tt}) by Friedman test for related samples. *Significant differences between treatments by Wilcoxon test, $P < 0.05$;

c MCP-1 levels in women of the Cho-I group A ($N=6$) and Cho-I group B ($N=10$). Treatment effect (P_{tt}) by linear mixed model with treatment as fixed factor, visit as random factor and age as covariable. *Significant differences between treatments by Wilcoxon test, $P < 0.05$. Circles represent atypical values and asterisks represent outliers

rectale group ($P=0.044$) and an interaction between Cho-I and treatment for *Clostridium leptum* group ($P=0.050$) (Table 4). Further analyses showed differences in women of the Cho-I group A among treatments between the change after EW yogurt and the change after ES yogurt in *Blautia coccoides*–*Eubacterium rectale* counts ($P=0.028$; Fig. 3a). The results showed a decrease during

the consumption of EW yogurt compared to ES yogurt [rates of change (medians): -0.037 and 0.000 , respectively]. In the case of *Clostridium leptum* group, differences were found in Cho-I group B subjects between the positive change during CW yogurt consumption and the negative change during ES yogurt consumption ($P=0.053$; Fig. 3b) (rates of change [medians]: 0.0152 and -0.0131 , respectively).

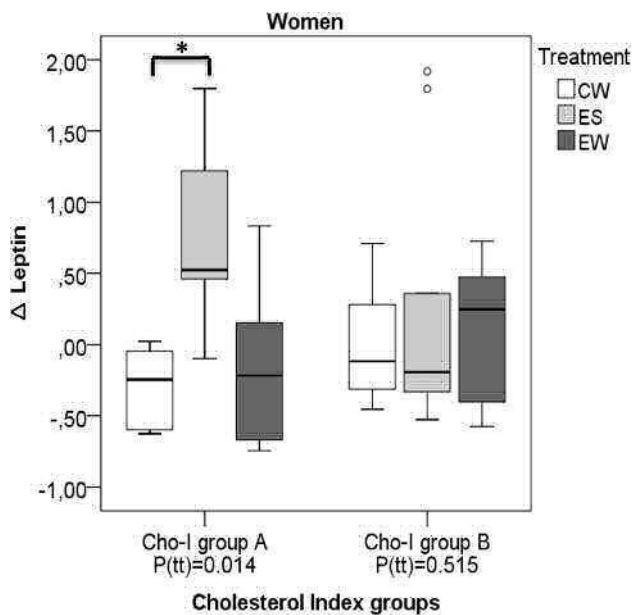


Fig. 2 Rates of change of leptin with each treatment (CW cow yogurt, ES ewe semi-skimmed yogurt, EW ewe whole yogurt) in women of the Cho-I group A ($N=6$) and Cho-I group B ($N=10$), separately. Treatment effect (P_{tt}) by linear mixed model with treatment as fixed factor, visit as random factor and age as covariable. *Significant differences between treatments by Wilcoxon test, $P < 0.05$. Circles represent atypical values

Discussion

The study results showed that the consumption of ewe's yogurt does not exert a significant effect on the inflammatory markers or the microbiota of healthy subjects compared to conventional yogurt consumption. Thus, the different fatty acid composition and nutrients amounts, such as protein and various minerals between the three types of yogurts does not seem to influence in a substantial way the metabolism of regular consumers. However, when considering the TC/HDL-c of the subjects, the consumption of the EW yogurt showed some effects on certain inflammatory markers such as adhesion molecules and MCP-1. These are to be taken as preliminary, since the number of subjects in this group was small and confirmation with a new study designed to this specific aim would be necessary. In this group with the highest TC/HDL-c levels, the reduced values observed for ICAM-1, P-selectin and MCP-1 (only in women) after the EW yogurt compared to the other yogurts could be attributable to the particular composition of the former. In this sense, EW yogurt contains higher levels of fat and, specifically, of SCFA and MCFA and lower LCFA compared to CW [26]. Saturated fatty acids effect on cholesterol metabolism and inflammation depend on their chain length [5]. Specifically, palmitic and stearic acids have been associated with increased white adipose tissue inflammation and

toll-like receptors (TLR)-mediated proinflammatory signaling pathways [33] and can induce endothelial cell growth and function (*in vitro*) [34]. In contrast, MCFA have shown no detrimental effects on the metabolic profile in humans [35, 36], and beneficial effects in mice regarding visceral fat accumulation and lipid genes expression in the liver [37]. It seems that the rapid metabolism in the liver of MCFA as compared to LCFA, which are more likely stored in the adipose tissue and liver, is the main driver of these beneficial effects [38]. However, it should be noted that no effects of the ewe's yogurts on cholesterol levels or its fractions were observed in this study both in the whole sample and in the highest TC/HDL-c group subjects [26]. On the other hand, EW contains higher calcium levels and a different composition and amount of β -casein, which is related to the bioactive peptide profile of the yogurts; both nutrients have been associated with cardio-metabolic benefits, i.e. antihypertensive activity [20, 39] and others that are so far based only on speculative mechanisms [5]. Ewe's yogurt intake did not affect the hormonal status since no relevant changes were observed in insulin and leptin levels, probably indicating that the influence of the type of yogurt on the dietary modulation of the metabolism is limited.

Similarly, no changes in the microbiota composition were observed, which suggests that ewe's yogurt is a similar option to cow's milk yogurt regarding dairy products consumption and intestinal health for the general population. However, the results also showed one specific modification on the *Blautia coccoides*–*Eubacterium rectale* group by the consumption of EW yogurt in those women with a less favourable TC/HDL-c, with EW decreasing the amount of this bacterial group compared to the consumption of ES. Several studies have revealed gut microbiota changes after yogurt interventions in healthy adults which were not associated with the yogurt bacteria content [21, 22]. In our study, EW yogurt would provide roughly double amount of all, SCFA, MCFA and LCFA compared to ES yogurt [26], and there is evidence that high intakes of LCFA have been related to detrimental changes in the host microbiota composition in animals [40–42]. The mechanism might be related to bacterial activities that allow the metabolism of primary bile acids to secondary bile acids in the distal ileum, which might affect the growth of bacteria such as the *Clostridium* and *Eubacterium* genera, primarily performing this process [43]. Also, other bacterial activities on taurine-conjugated bile acids might impact the gut microbiota as shown in an animal model fed with a milk-fat rich diet [44]. Regarding existing evidence of gut microbiota changes after SCFA or MCFA intakes, a recent study performed in mice fed with a relatively high content of medium-chain triacylglycerols compared to a high-fat diet showed a decrease in the Firmicutes-to-Bacteroidetes ratio which was dose dependent with the amount of MCFA in the fed triacylglycerols [37].

Table 4 PCR quantitation of 16S rRNA genes of the main bacterial groups in feces of study participants by experimental product treatments, expressed as logarithm of bacterial counts/g. feces, and rates of change [(Post-Tr) – (Pre-Tr)/Pre-Tr]

	Cow's whole-milk yogurt (n = 29)			Ewe's semi-skimmed-milk yogurt (n = 29)			Ewe's whole-milk yogurt (n = 29)			P#	P*
	Pre-Tr	Post-Tr	Rate of change	Pre-Tr	Post-Tr	Rate of change	Pre-Tr	Post-Tr	Rate of change		
<i>Bacteroides</i> spp.	9.58 (0.68)	9.45 (0.75)	-0.022 (0.054)	9.74 (0.60)	9.60 (0.66)	-0.017 (0.049)	9.41 (0.80)	9.62 (0.60)	0.015 (0.066)	0.198	NS
<i>Blautia</i> <i>coccoides</i> - <i>Eubacterium</i> <i>rectale</i> group	10.77 (0.51)	10.70 (0.53)	-0.005 (0.050)	10.93 (0.48)	10.80 (0.53)	-0.011 (0.034)	10.82 (0.49)	10.81 (0.55)	0.002 (0.060)	0.315	Tr*C*S 0.044
<i>Clostridium leptum</i> group	7.90 (0.55)	7.89 (0.72)	0.002 (0.100)	8.05 (0.50)	7.99 (0.54)	-0.006 (0.040)	7.88 (0.59)	7.85 (0.65)	0.004 (0.110)	0.210	Tr*C 0.050
<i>Bifidobacterium</i> spp.	7.50 (0.38)	7.49 (0.46)	0.000 (0.053)	7.59 (0.41)	7.44 (0.43)	-0.019 (0.040)	7.56 (0.38)	7.37 (0.43)	-0.021 (0.056)	0.127	NS
<i>Faecalibacterium prausnitzii</i>	8.03 (0.39)	7.93 (0.60)	-0.011 (0.081)	8.09 (0.36)	8.06 (0.38)	-0.003 (0.034)	8.10 (0.33)	7.98 (0.47)	-0.012 (0.046)	0.784	NS
<i>Lactobacillus</i> spp.	6.48 (1.40)	6.74 (1.46)	0.054 (0.191)	6.52 (1.46)	6.33 (1.18)	-0.010 (0.154)	6.63 (1.40)	6.63 (1.47)	0.043 (0.293)	0.837	NS
<i>Enterobacteriaceae</i>	4.95 (1.21)	5.22 (1.17)	0.093 (0.292)	5.13 (1.21)	4.93 (1.46)	-0.014 (0.410)	5.12 (1.25)	5.22 (1.08)	0.062 (0.261)	0.932	NS
<i>Enterococcus</i> spp.	3.88 (1.05)	3.91 (1.08)	0.048 (0.322)	3.71 (0.87)	4.00 (0.96)	0.110 (0.270)	3.75 (1.20)	4.17 (1.45)	0.099 (0.277)	0.176	NS
Total bacteria	9.40 (0.31)	9.29 (0.37)	-0.011 (0.036)	9.44 (0.23)	9.35 (0.32)	-0.009 (0.029)	9.27 (0.40)	9.29 (0.37)	0.005 (0.060)	0.988	NS

Treatment effect by linear mixed model applied to bacterial rates of change with treatment (Tr), Cho-I (C) and sex (S) as fixed factors and visit as repeated measure factor with random effect.*Significant factor interactions in the linear mixed model

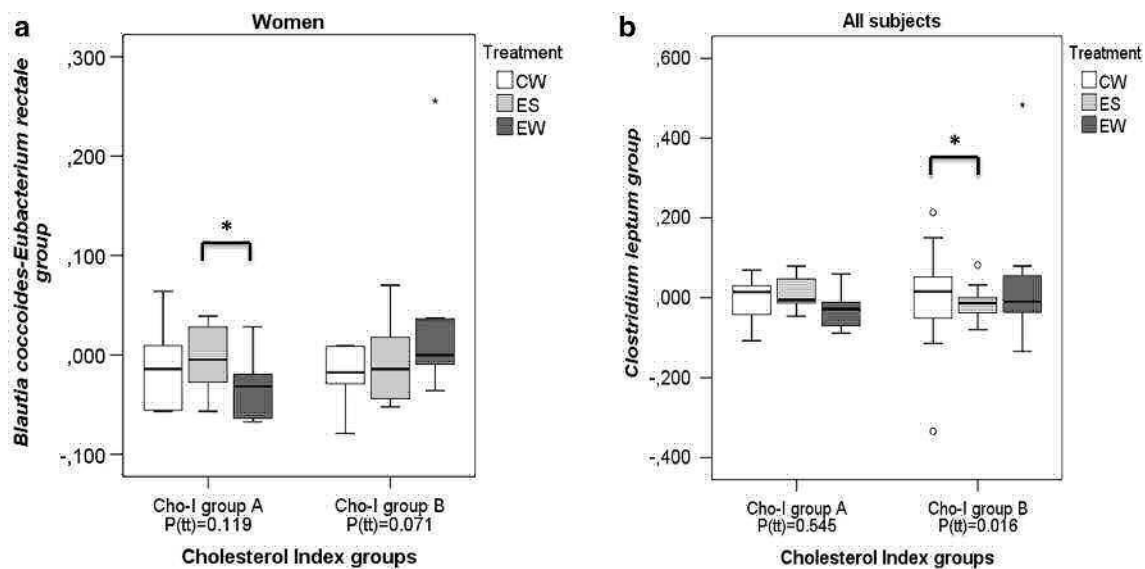


Fig. 3 Rates of change of bacteria groups with each treatment (CW cow yogurt, ES ewe semi-skimmed yogurt, EW ewe whole yogurt) by Cho-index groups. **a** *Blautia coccoides-Eubacterium rectale* group in women of the Cho-I group A ($N=6$) and Cho-index group B ($N=10$). **b** *Clostridium leptum* group in subjects from the Cho-I

group A ($N=10$) and Cho-index group B ($N=20$), separately. Treatment effect (P_{it}) by linear mixed model with treatment as fixed factor and visit as random factor. *Significant differences between treatments by Wilcoxon test, $P < 0.05$. Circles represent atypical values and asterisks represent outliers

This was attributed in part to a decrease in *Lachnospiraceae*, which is in line with our findings. Finally, the increase in *C. leptum* group counts with CW yogurt as compared to ES might be attributed to either the higher supply of MUFA and LCFA or the lower supply of SCFA and MCFA. In the context of an unhealthy diet with a high proportion of saturated fat as the one consumed by our subjects, the different proportion of saturated vs. polyunsaturated LCFA in the different yogurts could also have contributed to *Clostridium leptum* changes. Further research is necessary to ascertain the usefulness of each product for a particular population, since several studies have shown that *Blautia coccoides-Eubacterium rectale* group, together with *Clostridium leptum* group (Clostridial cluster IV), seem to be related to the inflammatory and metabolic status of the host [45–47].

Our findings suggest that the metabolic and physiological situation of the subjects is relevant. Indeed, one limitation of the study is the lack of a higher number of subjects with a high TC/HDL-c ratio, to strengthen the evidence of the possible effects of cow's and ewe's yogurt consumption on inflammation and gut microbiota. Another limitation is the difficulty to assess the relevance of the actual change in the nutrient composition of the overall diet with the different yogurt interventions. We have shown that the diet composition excluding yogurts did not change between periods and also that the yogurt compositions are different for total fat and fatty acid proportions and other nutrient contents; however, it would have been interesting to show to what extent the overall diets are different in their nutrient

content once two daily portions of a specific yogurt have been incorporated.

In conclusion, the intake of semi-skimmed and whole ewe's milk yogurts instead of cow's milk yogurt did not change the inflammatory status and the gut microbiota composition of healthy adults with borderline-high plasma cholesterol levels. However, we observed an attenuation of some markers of inflammation in subjects with the highest total-cholesterol/HDL-c ratio after the intake of ewe's whole-milk yogurt. Thus, a proof-of-concept study would need to be carried out in population at high CVR to explore the beneficial effects of ewe's milk yogurt on inflammation-related biomarkers in this population.

Acknowledgements This research was financed by MINECO Agro Technological Institute (ITACyL) and INIA (National Institute for Agricultural and Food Research and Technology) through the project RTA2012-00113-CO2-01 and co-financed through the European Regional Development Fund. It also received complementary funding from Quesos Artesanos de Letur S.A. Natalia García-González is the recipient of predoctoral contract FPI-INIA-19-2014, financed by INIA and the European Social Fund. The authors would like to thank Christian Hansen (Isabel López-Viñas) for kindly supplying the starter cultures and Irene Santiago for technical support.

Compliance with ethical standards

Ethics approval and consent to participate The current project was approved by the Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, (Madrid, Spain) (Record no 305, dated 9 December 2014) and the Bioethics Committee of the Spanish Scientific Research Council (CSIC). The study was carried out according to the Declaration of Helsinki (59^a

General Assembly, Seúl, Korea, October 2008) and the Good Clinical Practices. Signed informed consent was obtained from all volunteers.

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Dietary Guidelines Advisory Committee (2015) Scientific report of the 2015 dietary guidelines advisory committee. <http://www.health.gov/dietaryguidelines/2015-scientific-report/pdfs/scientific-report-of-the-2015-dietary-guidelines-advisory-committee.pdf>. Accessed Oct 2016
- Wang H, Livingston KA, Fox CS, Meigs JB, Jacques PF (2013) Yogurt consumption is associated with better diet quality and metabolic profile in American men and women. *Nutr Res* 33(1):18–26. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2012.11.009>
- Cormier H, Thifault E, Garneau V, Tremblay A, Drapeau V, Perusse L, Vohl MC (2016) Association between yogurt consumption, dietary patterns, and cardio-metabolic risk factors. *Eur J Nutr* 55(2):577–587. <https://doi.org/10.1007/s00394-015-0878-1>
- Adolfsson O, Meydani S, Russell R (2004) Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr* 80:245–256
- Fernandez MA, Panahi S, Daniel N, Tremblay A, Marette A (2017) Yogurt and cardiometabolic diseases: a critical review of potential mechanisms. *Adv Nutr* 8(6):812–829. <https://doi.org/10.3945/an.116.013946>
- Dumas A, Lapointe A, Dugrenier M, Provencher V, Lamarche B, Desroches S (2017) A systematic review of the effect of yogurt consumption on chronic diseases risk markers in adults. *Eur J Nutr* 56:1375–1392. <https://doi.org/10.1007/s00394-016-1341-7>
- Sadrzadeh-Yeganeh H, Elmadafi I, Djazayeri A, Jalali M, Heshmat R, Chamary M (2010) The effects of probiotic and conventional yoghurt on lipid profile in women. *Br J Nutr* 103:1778–1783
- Labonté ME, Couture P, Richard C, Desroche S, Lamarche B (2013) Impact of dairy products on biomarkers of inflammation: a systematic review of randomized controlled nutritional intervention studies in overweight and obese adults. *Am J Clin Nutr* 97:706–717
- Tamime AY, Robinson RK (1999) Background to manufacturing practice. In: Tamime AY, Robinson RK (eds) *Yoghurt science and technology*, 2nd edn. CRC Press, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, pp 32–33
- Jandal JM (1996) Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Ruminant Res* 22:177–185
- Katcher HI, Hill AM, Lanford JL, Yoo JS, Kris-Etherton PM (2009) Lifestyle approaches and dietary strategies to lower LDL-cholesterol and triglycerides and raise HDL-cholesterol. *Endocrinol Metab Clin North Am* 38(1):45–78. <https://doi.org/10.1016/j.ecl.2008.11.01>. (PubMed PMID:19217512)
- Tall AR, Yvan-Charvet L (2015) Cholesterol, inflammation and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 15(2):104–116. <https://doi.org/10.1038/nri3793>
- Hansson GK (2005) Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 352:1685–1695
- Calder PC, Ahluwalia N, Albers R, Bosco N, Bourdet-Sicard R, Haller D, Holgate ST, Jönsson LS, Latulippe ME, Marcos A et al (2013) A consideration of biomarkers to be used for evaluation of inflammation in human nutritional studies. *Br J Nutr* 109(Suppl 1):S1–S34. <https://doi.org/10.1017/S0007114512005119>
- Hogas S, Bilha SC, Branisteanu D, Hogas M, Gaipov A, Kanbay M, Covic A (2017) Potential novel biomarkers of cardiovascular dysfunction and disease: cardiotrophin-1, adipokines and galectin-3. *Arch Med Sci* 13(4):897–913. <https://doi.org/10.5114/aoms.2016.58664>
- González-Gil EM, Cadenas-Sanchez C, Santabárbara J, Bueno-Lozano G, Iglesia I, González-Gross M, Molnar D, Gottrand F, De Henauw S, Kafatos A et al; HELENA study group (2018) Inflammation in metabolically healthy and metabolically abnormal adolescents: The HELENA study. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 28(1):77–83. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2017.10.004>
- Sonnenburg J, Bäckhed F (2016) Diet–microbiota interactions as moderators of human metabolism. *Nature* 535(7610):56–64. <https://doi.org/10.1038/nature18846>
- German JB, Dillard CJ (2004) Saturated fats: what dietary intake? *Am J Clin Nutr* 80(3):550–559
- Huth P, Fulgoni V, Jandacek RJ, Jones PJ, St-Onge MP, Senanayake V (2010) Bioactivity and emerging role of short and medium chain fatty acids. *Lipid Technol* 22(12):266–269
- Azadbakht L, Mirmiran P, Esmailzadeh A, Azizi F (2005) Dairy consumption is inversely associated with the prevalence of the metabolic syndrome in Tehranian adults. *Am J Clin Nutr* 82:523–530
- Uyeno Y, Sekiguchi Y, Kamagata Y (2008) Impact of consumption of probiotic lactobacilli-containing yogurt on microbial composition in human feces. *Int J Food Microbiol* 122(1–2):16–22
- García-Albiach R, Pozuelo de Felipe M, Angulo S, Morosini MI, Bravo D, Baquero F, del Campo R (2008) Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. *Am J Clin Nutr* 87:91–96
- Lemieux I, Lamarche B, Couillard C, Pascot A, Cantin B, Bergeron J, Dagenais GR, Després JP (2001) Total cholesterol/HDL cholesterol ratio vs LDL cholesterol/HDL cholesterol ratio as indices of ischemic heart disease risk in men: the Quebec Cardiovascular Study. *Arch Intern Med* 161(22):2685–2892
- Klein A, Friedrich U, Vogelsang H, Jahreis G (2008) *Lactobacillus acidophilus* 74–2 and *Bifidobacterium animalis subsp lactis* DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. *Eur J Clin Nutr* 62(5):584–593
- Worthley DL, Le Leu RK, Whitehall VL, Conlon M, Christophersen C, Belobrajdic D, Mallitt KA, Hu Y, Irahara N, Ogino S et al (2009) A human, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of prebiotic, probiotic, and synbiotic supplementation: effects on luminal, inflammatory, epigenetic, and epithelial biomarkers of colorectal cancer. *Am J Clin Nutr* 90(3):578–586. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28106>
- Olmedilla-Alonso B, Nova E, García-González N, Martín-Diana AB, Fontecha J, Delgado D, Gredilla AE, Bueno F, Asensio-Vegas C (2017) Effect of ewe's (semi-skimmed and whole) and cow's milk-yogurt consumption on the lipid profile of control subjects. A crossover study. *Food Nutr Res* 61(1):1391669. <https://doi.org/10.1080/16546628.2017.1391669>
- Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R (2004) Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 70(12):7220–7228
- Gueimonde M, Tölkö S, Korpimäki T, Salminen S (2004) New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. *Appl Environ Microbiol* 70(7):4165–4169
- Bartosch S, Fite A, Macfarlane GT, McMurdo ME (2004) Characterization of bacterial communities in feces from healthy elderly volunteers and hospitalized elderly patients by using real-time PCR and effects of antibiotic treatment on the fecal microbiota. *Appl Environ Microbiol* 70(6):3575–3581
- Heilig HGJ., Zoetendal EG, Vaughan EE, Marteau P, Akkermans ADL, de Vos WM (2002) Molecular diversity of *Lactobacillus*

- spp. and other lactic acid bacteria in the human intestine as determined by specific amplification of 16S ribosomal DNA. *Appl Environ Microbiol* 68:114e23
31. Rinttilä T, Kassinen A, Malinen E, Krogius L, Palva A (2004) Development of an extensive set of 16S rDNA-targeted primers for quantification of pathogenic and indigenous bacteria in faecal samples by real-time PCR. *J Appl Microbiol* 97(6):1166–1177
 32. Savard P, Lamarche B, Paradis ME, Thiboutot H, Laurin É, Roy D (2011) Impact of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 and, *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *Int J Food Microbiol* 149(1):50–57
 33. Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani PD, Bäckhed F (2015) Crosstalk between gut microbiota and dietary lipids aggravates WAT inflammation through TLR signaling. *Cell Metab* 22(4):658–668. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.07.026>
 34. Harvey KA, Walker CL, Pavlina TM, Xu Z, Zaloga GP, Siddiqui RA (2010) Long-chain saturated fatty acids induce pro-inflammatory responses and impact endothelial cell growth. *Clin Nutr* 29(4):492–500
 35. St-Onge MP, Bosarge A, Goree L, Darnell B (2008) Medium chain triglyceride oil consumption as part of a weight loss diet does Not Lead to an Adverse Metabolic Profile When Compared to Olive Oil. *J Am Coll Nutr* 27(5):547–552
 36. Tsuji H, Kasai M, Takeuchi H, Nakamura M, Okazaki M, Kondo K (2001) Dietary medium-chain triacylglycerols suppress accumulation of body fat in a double-blind, controlled trial in healthy men and women. *J Nutr* 131(11):2853–2859
 37. Zhou S, Wang Y, Jacoby JJ, Jiang Y, Zhang Y, Yu LL (2017) Effects of medium- and long-chain triacylglycerols on lipid metabolism and gut microbiota composition in C57BL/6J Mice. *J Agric Food Chem* 65(31):6599–6607. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01803>
 38. Aoyama T, Nosaka N, Kasai M (2007) Research on the nutritional characteristics of medium-chain fatty acids. *J Med Invest* 54(3–4):385–388
 39. Papadimitriou C, Vafopoulou-Mastrojiannaki A, Vieira Silva S, Gomes AM, Malcata FX, Alichanidis E (2007) Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chem* 105(2):647–656
 40. Shena W, Gaskinsb HR, McIntosha M (2014) Influence of dietary fat on intestinal microbes, inflammation, barrier function and metabolic outcomes. *J Nutr Biochem* 25:270–280
 41. de Wit N, Derrien M, Bosch-Vermeulen H, Oosterink E, Keshtkar S, Duval C, de Vogel-van den Bosch J, Kleerebezem M, Müller M, van der Meer R (2012) Saturated fat stimulates obesity and hepatic steatosis and affects gut microbiota composition by an enhanced overflow of dietary fat to the distal intestine. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 303(5):G589–G599. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00488.2011>
 42. Patterson E, O' Doherty RM, Murphy EF, Wall R, O' Sullivan O, Nilaweera K, Fitzgerald GF, Cotter PD, Ross RP, Stanton C (2014) Impact of dietary fatty acids on metabolic activity and host intestinal microbiota composition in C57BL/6J mice. *Brit J Nutr* 20:1–13
 43. Gérard P (2013) Metabolism of cholesterol and bile acids by the gut microbiota. *Pathogens* 3(1):14–24. <https://doi.org/10.3390/pathogens3010014>
 44. Devkota S, Wang Y, Musch MW, Leone V, Fehlner-Peach H, Nadimpalli A, Antonopoulos DA, Jabri B, Chang EB (2012) Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in Il10^{-/-} mice. *Nature* 487:104–108
 45. Forbes JD, Van Domselaar G, Bernstein CN (2016) The gut microbiota in immune-mediated inflammatory diseases. *Front Microbiol* 7:1081. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01081>
 46. Yamashiro K, Tanaka R, Urabe T, Ueno Y, Yamashiro Y, Nomoto K, Takahashi T, Tsuji H, Asahara T, Hattori N (2017) Gut dysbiosis is associated with metabolism and systemic inflammation in patients with ischemic stroke. *PLoS One* 12(2):e0171521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0171521>
 47. Fu J, Bonder MJ, Crenn MC, Tigchelaar EF, Maatman A, Dekens JA, Brandsma E, Marczyńska J, Imhann F, Weersma RK et al. (2015) The gut microbiome contributes to a substantial proportion of the variation in blood lipids. *Circ Res* 117(9):817–824. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.306807>

Supplementary material

Effects of ewe's milk yogurt (whole and semi-skimmed) and cow's milk yogurt on inflammation markers and gut microbiota of subjects with borderline cholesterol levels. A crossover study

European Journal of Nutrition

Noemí Redondo Useros¹, Natalia García-González², Ligia E. Diaz-Prieto¹, Begoña Olmedilla-Alonso¹, Ana B. Martín-Diana³, Carmen Asensio-Vegas², Esther Nova¹.

(1) Department of Metabolism and Nutrition. Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN) - CSIC. C/ Jose Antonio Novais, 10. 28040 Madrid. Spain.

(2) Agro Technological Institute, Deputy Directorate of Research and Technology. Dairy Technological Station. Avda. Viñalta s/n, 34071 Palencia, Spain.

(3) Agro Technological Institute. Deputy Directorate of Research and Technology. Area of Innovation and Process Optimisation. Ctra. de Burgos Km.119, 47071 Valladolid, Spain.

Corresponding Author: Esther Nova. Mailing address: Institute of Food Science, Technology and Nutrition (ICTAN)-CSIC. C/ Jose Antonio Novais, 10. 28040 Madrid; Spain.

Telephone number: +34 915492300 ext: 231209; email address: enova@ictan.csic.es.

Online resource 1

Fatty acids profile and bacteria content on the ewe's milk yogurts and cow's milk yogurt.

	Cow's whole-milk yogurt (n=4)		Ewe's semi-skimmed- milk yogurt (n=9)		Ewe's whole-milk yogurt (n=10)	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Fat (g/100g yogurt)	3.0 ^a	0.1	2.8 ^b	0.1	5.8 ^c	0.2
SFA (g/100g fat)	73.87 ^a	2.3	77.85 ^b	2.03	79.59 ^b	1.69
MUFA (g/100g fat)	23.35 ^a	1.75	19.38 ^b	2.08	17.96 ^b	1.72
PUFA (g/100g fat)	2.78	0.60	2.77	0.40	2.45	0.43
SCFA (g/100g fat)	11.31 ^a	1.86	20.26 ^b	2.40	21.17 ^b	1.96
MCFA (g/100g fat)	19.73 ^a	1.10	20.99 ^{ab}	1.21	21.97 ^b	1.04
LCFA (g/100g fat)	68.96 ^a	2.93	58.75 ^b	3.04	56.86 ^b	2.41
<i>Streptococcus thermophilus</i> (log ufc. g-1)	8.97 ^a	0.05	9.02 ^a	0.06	8.82 ^b	0.06
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> (log ufc. g-1)	6.90 ^a	0.50	4.96 ^b	0.08	5.12 ^b	0.11

Different superscript letters mean differences between groups (p<0.05; Man Whitney-U test).

Online resource 2 Dietary intakes (3-day dietary records)^a, BMI and blood pressure values during treatments

	Cow's whole-milk yogurt (n=30)		Ewe's semi-skimmed-milk yogurt (n=30)		Ewe's whole-milk yogurt (n=30)		P [#]
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	
Energy (Kcal)	2105	526	2049	814	2159	599	0.810
Proteins (%) [⊥]	15.59	2.52	16.14	3.67	16.23	3.79	0.235
Carbohydrates (%)	38.28	6.80	35.60	6.20	37.04	7.25	0.265
Sugars (%)	17.013	15.80	17.73	6.18	15.55	4.27	0.783
Fats (%)	40.58	7.32	42.52	7.75	42.00	8.26	0.373
SFA (%)	12.74	3.36	12.61	2.89	12.60	3.28	0.307
MUFA (%) [⊥]	18.17	4.38	19.86	5.743	19.14	5.06	0.282
PUFA (%) [⊥]	5.54	1.86	5.97	2.41	5.97	1.99	0.835
Cholesterol (mg) [⊥]	312	137	324	146	378	160	0.339
Total fibre (gr) [⊥]	19.7	8.0	19.7	10.6	19.8	7.1	0.833
BMI (Kg/m ²)	24.90	3.40	25.03	3.33	25.22	3.11	0.971
Systolic blood pressure (mmHg)	119.4	17.74	119.7	20.75	120.4	17.86	0.962
Diastolic blood pressure(mmHg)	77.26	11.15	77.33	11.52	78.07	9.15	0.970

^aDietary intakes have been calculated without yogurt's nutrient contribution.

[#]Treatment effect by lineal mixed model with treatment, sex and BMI as fixed factors and visit as random factor for dietary intakes ([⊥]Square root and [⊥]Ln transformed) and treatment, sex and Cho-I as fixed factor, visit as random factor and age as covariable factor for BMI and blood pressure post-treatment values.

4.2. DATOS INÉDITOS

4.2.1. Evaluación de la actividad inmunitaria innata tras el consumo de la cepa probiótica *Lactobacillus coryniformis* CECT5711.

Aunque el objetivo primario del estudio Pro-L-cory era evaluar la capacidad coadyuvante de la cepa probiótica mediante la producción de anticuerpos específicos, también se estudiaron parámetros de inmunidad innata como la actividad fagocítica con el objetivo de estudiar su capacidad inmunomoduladora.

Actividad Fagocítica

Tal y como se observa en la Tabla 7, se encontraron diferencias significativas entre visitas en todos los grupos, con descensos de la actividad a lo largo del estudio, lo que sugiere que se trata de un descenso ajeno al tratamiento y atribuible probablemente a la pérdida de la fluorescencia de la bacteria empleada para visualizar y cuantificar la fagocitosis.

Tabla 7. Actividad fagocítica de granulocitos y monocitos (%) al comienzo de la intervención (V1) y después de 2 semanas (V2) y 6 semanas (V3) de intervención en todos los grupos.

Media (DE)	V1	V2	V3	P*
Granulocitos (%)				
Placebo	96,01 (2,26)	95,67 (1,87)	94,70 (3,26)	0,097
Probiótico	96,13 (3,08) ^a	95,13 (3,86) ^{ab}	94,07 (4,07) ^b	0,039
Mixto	96,31 (1,94) ^a	95,13 (3,07) ^{ab}	93,12 (5,73) ^b	0,002
Monocitos (%)				
Placebo	70,25 (10,52) ^a	71,52 (10,30) ^{ab}	63,29 (12,01) ^b	0,007
Probiótico	70,05 (11,90) ^a	66,85 (10,45) ^{ab}	61,48 (12,98) ^b	0,024
Mixto	68,87 (10,61) ^{ab}	69,35 (9,26) ^a	62,88 (11,62) ^b	0,036

*Diferencias entre visitas dentro de cada grupo. ANOVA de medidas repetidas con factor fijo "visita" y factor aleatorio "sexo". $P < 0,05$. Superíndices distintos indican diferencias significativas entre visitas mediante test posthoc de Bonferroni.

4.2.2. Funcionalidad de la microbiota y su relación con el consumo de probióticos y yogures.

4.2.2.1. Relación entre el consumo de LFP, los niveles de AGCC y otros parámetros de funcionalidad intestinal.

Como se observa en la Tabla 8, los niveles de los AGCC analizados fueron similares entre consumidores y no consumidores de LFP. Se observa que el AGCC mayoritario es el ácido acético, seguido del ácido propiónico y ácido butírico.

Tabla 8. Niveles de AGCC entre grupos según consumo de LFP.

Media (DE)	No consumidores de LFP	Consumidores de LFP	P
	n = 175	n = 85	
Ácido acético ($\mu\text{M/g}$) [†]	35,15 (15,32)	34,53 (14,82)	0,692
Ácido propiónico ($\mu\text{M/g}$) [†]	11,86 (6,647)	11,91 (5,609)	0,318
Ácido butírico ($\mu\text{M/g}$) [†]	9,986 (6,612)	9,329 (5,238)	0,846
Ácido isobutírico ($\mu\text{M/g}$) [†]	1,655 (0,774)	1,713 (0,954)	0,522
Ácido valérico ($\mu\text{M/g}$) [†]	1,787 (1,257)	1,652 (0,978)	0,998
Ácido isovalérico ($\mu\text{M/g}$) [†]	2,410 (1,310)	2,552 (1,662)	0,328

Modelo general lineal, utilizando como factores fijos "Grupos de LFP", género y grupos de IMC-grasa corporal, y edad, síntomas intestinales y energía como covariables. [†]Variables transformadas logarítmicamente ($\text{Ln} + 1$).

Se estudiaron las posibles diferencias en los niveles de AGCC en función de los dos criterios utilizados para clasificar los grupos de LFP: el tipo de LFP y la cantidad de LFP consumida. Tal y como se observa en las tablas 9 y 10, ni el tipo ni la cantidad de LFP consumida se relacionaron con los niveles de los AGCC analizados.

Tabla 9. Niveles de AGCC según el tipo de LFP consumida.

Media (DE)	NC-LFP	LFP-Bif	LFP-Lb	LFP-Mixto	P
	n=175	n=33	n=14	n=38	
Ácido acético ($\mu\text{M/g}$) [†]	35,15 (15,32)	34,11 (11,20)	32,64 (17,20)	40,14 (17,04)	0,437
Ácido propiónico ($\mu\text{M/g}$) [†]	11,86 (6,648)	11,98 (4,492)	11,13 (6,536)	13,54 (6,023)	0,370
Ácido butírico ($\mu\text{M/g}$) [†]	9,986 (6,612)	9,417 (3,912)	8,222 (5,714)	11,70 (0,790)	0,270
Ácido isobutírico ($\mu\text{M/g}$) [†]	1,655 (0,774)	1,711 (0,828)	1,712 (1,158)	1,262 (6,644)	0,933
Ácido valérico ($\mu\text{M/g}$) [†]	1,787 (1,257)	1,685 (0,655)	1,550 (1,289)	1,799 (0,909)	0,450
Ácido isovalérico ($\mu\text{M/g}$) [†]	2,410 (1,310)	2,577 (1,520)	2,610 (1,934)	2,352 (1,419)	0,853

Modelo general lineal, utilizando como factores fijos "Tipos de LFP", género y grupos de IMC-grasa corporal, y edad, síntomas intestinales y energía como covariables. [†]Variables transformadas logarítmicamente ($\text{Ln} + 1$).

Tabla 10. Niveles de AGCC según cantidad de LFP consumida.

Media (DE)	Consumo bajo de LFP	Consumo medio de LFP	Consumo alto de LFP	P
	(>0 y <2 LFP/semana)	(≥ 2 -4 LFP/semana)	(≥ 5 LFP/semana)	
Ácido acético ($\mu\text{M/g}$) [†]	35,10 (15,12)	33,05 (13,61)	36,46 (17,36)	0,977
Ácido propiónico ($\mu\text{M/g}$) [†]	11,84 (6,469)	12,08 (6,141)	11,82 (5,535)	0,838
Ácido butírico ($\mu\text{M/g}$) [†]	9,83 (6,427)	9,489 (5,468)	9,747 (5,474)	0,948
Ácido isobutírico ($\mu\text{M/g}$) [†]	1,666 (0,776)	1,701 (0,782)	1,699 (1,277)	0,884
Ácido valérico ($\mu\text{M/g}$) [†]	1,781 (1,212)	1,687 (1,001)	1,526 (1,101)	0,885
Ácido isovalérico ($\mu\text{M/g}$) [†]	2,425 (1,335)	2,543 (1,307)	2,573 (2,192)	0,401

Modelo general lineal, utilizando como factores fijos "Grupos de consumo de LFP", género y grupos de IMC-grasa corporal, y edad, síntomas intestinales y energía como covariables. [†] Variables transformadas logarítmicamente ($\text{Ln} + 1$).

En cuanto a los síntomas intestinales, no se observaron diferencias en la puntuación global de síntomas ni de cada síntoma individual en hombres y mujeres de los diferentes grupos de consumo de LFP. Se observó que las mujeres presentaban puntuaciones más altas en borborismos, flatulencia e hinchazón abdominal en comparación con los hombres. El número de deposiciones al día y la consistencia de las deposiciones tampoco fueron diferentes entre grupos. El número de deposiciones al día fue de alrededor de 1 deposición/día tanto en hombres como en mujeres de los diferentes grupos, y la consistencia de las heces con valor entre 3-4, reflejando consistencia normal según la escala de Bristol (Tabla 11). Estos resultados sugieren que la población de estudio presenta una buena funcionalidad intestinal propia de adultos sanos sin alteraciones intestinales tales como estreñimiento o diarrea.

Tabla 11. Parámetros de funcionalidad intestinal en hombres y mujeres de los diferentes grupos de consumo de LFP.

Mediana (RIQ)	No consumidores de LFP	Consumidores de LFP	P
Hombre	n=101	n=33	
Síntomas intestinales (puntuación)	7,00 (4,00-11,00)	9,00 (6,00-11,00)	0,345
Nausea	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,146
Borborismos	3,00 (0,00-3,00)	3,00 (0,50-3,00)	0,216
Flatulencia	3,00 (3,00-4,00)	3,00 (2,50-4,00)	0,860
Dolor abdominal	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-1,00)	0,298
Ardores	0,00 (0,00-2,00)	0,00 (0,00-2,00)	0,292
Hinchazón	0,00 (0,00-3,00)	0,00 (0,00-1,00)	0,163
Número de deposiciones al día	1,00 (1,00-1,50)	1,00 (1,00-1,50)	0,843
Consistencia de las deposiciones	4,00 (3,00-4,00)	4,00 (3,00-4,00)	0,440
Mujer	n=74	n=52	
Síntomas intestinales (puntuación)	11,00 (7,00-15,00)	12,00 (6,00-16,00)	0,546
Nausea	0,00 (0,00-1,00)	0,00 (0,00-2,00)	0,118
Borborismos	3,00 (0,00-4,00)	3,00 (2,00-4,00)	0,744
Flatulencia	3,00 (2,00-5,00)	3,00 (2,00-4,00)	0,548
Dolor abdominal	0,00 (0,00-3,00)	0,00 (0,00-4,00)	0,385
Ardores	0,00 (0,00-3,00)	0,00 (0,00-3,00)	0,917
Hinchazón	2,50 (0,00-4,00)	3,00 (0,00-4,00)	0,334
Número de deposiciones al día	1,00 (1,00-1,50)	1,00 (1,00-2,00)	0,628
Consistencia de las deposiciones	4,00 (3,00-4,00)	3,00 (3,00-4,00)	0,258

Test de U-Mann Whitney.

4.2.2.2. Relación entre el consumo de yogures, los niveles de AGCC y otros parámetros de funcionalidad intestinal.

Como se observa en la Tabla 12, los niveles de los principales AGCC no fueron diferentes entre grupos de consumo de yogur; sólo se observa una tendencia a niveles más elevados de ácido butírico en el grupo de consumo medio de yogur en comparación con el grupo de consumo bajo ($P=0,090$). Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas en cuanto a AGCC minoritarios, tales como los ácidos isobutírico y valérico, en el grupo de consumo medio de yogur (3-4 yogures/semana). En concreto, este grupo presentó niveles más elevados de ácido

isobutírico en comparación con el grupo de bajo consumo y el de alto consumo (P=0,012 y P=0,033 respectivamente), y de ácido valérico en comparación con el grupo de alto consumo (P=0,050). De hecho, no se observa una correlación positiva entre el número de yogures consumidos y los niveles de ácido isobutírico o valérico (P=0,342 y P=0,858 respectivamente), sugiriendo la existencia de otro factor no identificado implicado en los resultados encontrados.

Tabla 12. Niveles de AGCC entre los diferentes grupos de consumo de yogur.

Media (DE)	No consumidores (0 yogures/sem) n=40	Consumo bajo (>0-2 yog/sem) n=41	Consumo medio (3-4 yog/sem) n=44	Consumo alto (≥5 yog/sem) n=50	P*
Ácido acético (μM/g) [†]	33,65 (12,23)	32,55 (10,95)	37,51 (12,99)	36,07 (11,13)	0,358
Ácido propiónico (μM/g) [†]	12,23 (6,825)	10,95 (7,697)	12,99 (5,934)	11,13 (6,220)	0,243
Ácido butírico (μM/g) [†]	9,295 (5,433)	8,433 (5,521)	12,56 (8,577)	9,445 (5,812)	0,073
Ácido isobutírico (μM/g) [†]	1,723 (0,806) ^{ab}	1,413 (0,689)^a	1,972 (0,865)^b	1,503 (0,624)^a	0,007
Ácido valérico (μM/g) [†]	1,733 (1,033) ^{ab}	1,564 (1,070) ^{ab}	2,262 (1,724)^a	1,575 (0,962)^b	0,031
Ácido isovalérico (μM/g) [†]	2,558 (1,250)	2,054 (1,235)	2,775 (1,549)	2,248 (1,098)	0,116

*Modelo general linear, utilizando como factores fijos "Grupos de consumo de yogur", género y grupos de IMC-grasa corporal, y edad, síntomas intestinales y energía como covariables. Superíndices diferentes reflejan diferencias entre grupos a un nivel de significación de P<0,05 mediante test post-hoc de Bonferroni (marcados en negrita). [†]Variables transformadas logarítmicamente (Ln + 1).

En cuanto a los síntomas intestinales, se observa en hombres una mayor puntuación global de síntomas intestinales en el grupo de no consumidores de yogur en comparación con los grupos de bajo y alto consumo de yogur (P=0,028 y P=0,003 respectivamente). En concreto, esta puntuación más alta parece deberse a la mayor puntuación observada en el síntoma de flatulencia (P=0,018 y P=0,036 respectivamente), así como una tendencia a menor frecuencia e intensidad de ardores en este grupo. En las mujeres no se observan diferencias entre grupos de consumo de yogur en la puntuación global de los síntomas intestinales, aunque cabe señalar una mayor puntuación en la mayoría de los síntomas en comparación con el hombre (Tabla 13).

Tabla 13. Parámetros de funcionalidad intestinal en hombres y mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur

	No consumidores (0 yogures/sem) n=21	Consumo bajo (>0-2 yogures/sem) n=24	Consumo medio (3-4 yogures/sem) n=24	Consumo alto (≥5 yogures/sem) n=33	P*
Hombre	n=21	n=24	n=24	n=33	
Síntomas intestinales (puntuación)	11,00 (6,50-14,00)^a	7,00 (3,25-9,00)^b	7,00 (4,00-13,00) ^{ab}	6,00 (3,00-9,00)^b	0,004
Nausea	0,00 (0,00-2,50)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,497
Borborigmos	3,00 (2,00-3,00)	3,00 (0,00-3,00)	1,00 (0,00-3,00)	3,00 (0,00-3,00)	0,272
Flatulencia	4,00 (3,00-5,00)^a	3,00 (3,00-3,00)^b	4,00 (0,75-4,00) ^{ab}	3,00 (0,50-4,00)^b	0,013
Dolor abdominal	0,00 (0,00-2,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,117
Ardores	0,00 (0,00-3,00)	0,00 (0,00-2,00)	0,00 (0,00-2,00)	0,00 (0,00-1,00)	0,054
Hinchazón	2,00 (0,00-3,00)	0,00 (0,00-2,00)	0,00 (0,00-3,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,243
Número de deposiciones al día	1,00 (1,00-1,50)	1,00 (1,00-1,50)	1,00 (1,00-1,37)	1,00 (1,00-2,00)	0,798
Consistencia de las deposiciones	4,00 (3,00-4,00)	4,00 (3,00-4,00)	3,00 (3,00-4,00)	4,00 (3,00-4,00)	0,418
Mujer	n=22	n=17	n=20	n=17	
Síntomas intestinales (puntuación)	11,50 (7,75-17,00)	9,00 (6,00-17,50)	10,00 (8,00-13,50)	12,00 (6,50-15,00)	0,821
Nausea	0,00 (0,00-2,50)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,00 (0,00-0,00)	0,417
Borborigmos	3,00 (0,00-4,00)	3,00 (2,00-4,50)	3,00 (1,00-5,00)	3,00 (0,00-4,50)	0,995
Flatulencia	3,00 (2,00-5,00)	3,00 (2,00-4,00)	4,00 (1,50-5,00)	3,00 (0,00-4,50)	0,952
Dolor abdominal	3,00 (0,00-4,00)	0,00 (0,00-2,00)	0,00 (0,00-1,00)	0,00 (0,00-3,50)	0,119
Ardores	0,00 (0,00-3,00)	0,00 (0,00-2,00)	0,00 (0,00-1,00)	0,00 (0,00-3,50)	0,727
Hinchazón	3,00 (0,00-4,25)	2,00 (0,00-4,00)	2,00 (0,00-4,00)	3,00 (0,00-3,50)	0,886
Número de deposiciones al día	1,00 (1,00-1,62)	1,00 (1,00-1,27)	1,00 (0,50-1,25)	1,00 (1,00-1,25)	0,629
Consistencia de las deposiciones	4,00 (3,00-4,25)	3,00 (3,00-4,00)	4,00 (3,00-4,00)	3,00 (2,25-4,00)	0,486

*Test de Kruskal Wallis. Superíndices diferentes reflejan diferencias entre grupos a un nivel de significación P<0,05 mediante test post-hoc de Bonferroni (marcados en negrita).

Dada la relación negativa encontrada entre la puntuación global de síntomas intestinales y en concreto, flatulencia, con un consumo alto de yogur en hombres, y al hecho de que se observaron niveles más elevados de *St. thermophilus* y *Streptococaceae* en este grupo de consumo de yogur (Apartado 4.1.2), nos planteamos estudiar la posible relación entre ellos dada la evidencia existente entre la aparición de síntomas intestinales y una determinada composición de grupos bacterianos en el colon (203). Se observó una tendencia negativa entre los síntomas intestinales y *St. thermophilus*, sin llegar a ser significativa. Sin embargo, sí se correlacionó de forma negativa con la frecuencia e intensidad de ardores ($P=0,024$) (Figura 7).

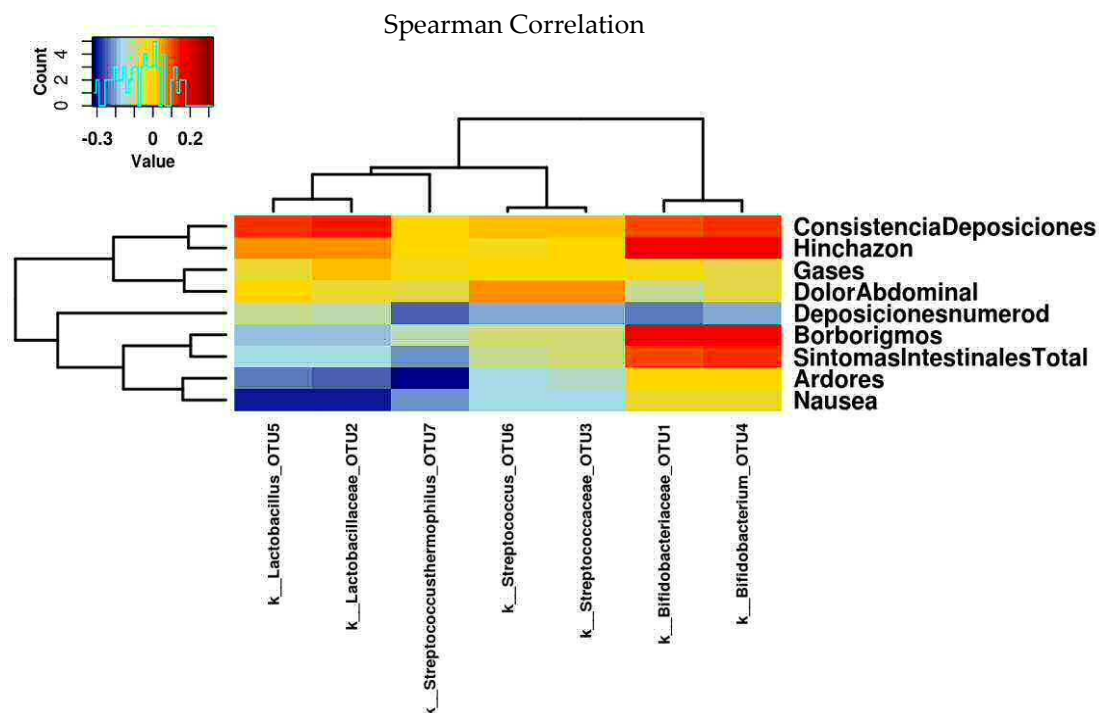


Figura 7. Mapa de correlaciones entre bacterias intestinales relacionadas con el consumo de yogur y los parámetros intestinales estudiados

4.2.3. Relación entre el consumo de yogures, el estilo de vida, la composición corporal y el patrón dietético.

4.2.3.1. Consumo de yogures, estilo de vida y composición corporal

El estudio de los factores de estilo de vida (horas de sueño y hábito de consumo de tabaco) y la composición corporal y su relación con el consumo de yogur revela que no existen diferencias entre los diferentes grupos de consumo de yogur ni en hombres ni en mujeres. A nivel socioeconómico, se observa que las mujeres que consumen entre 3-4 yogures a la semana pertenecen en una mayor proporción a un nivel socioeconómico bajo en comparación con el resto de grupos de consumo de yogur (Tabla 14).

Tabla 14. Características demográficas, antropométricas y de estilo de vida en hombres y mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur.

	No consumidores (0 yogures/sem)	Consumo bajo (>0-2 yogures/sem)	Consumo medio (3-4 yogures/sem)	Consumo alto (≥5 yogures/sem)	P*	P [†]	P [‡]
Hombre	n=21	n=24	n=24	n=33			
Edad (años)	36,78 (5,544)	38,61 (5,585)	37,48 (6,766)	36,50 (5,661)	0,592	---	---
IMC (kg/m ²)	25,22 (2,269)	26,21 (3,997)	27,03 (3,521)	25,24 (2,610)	---	0,179	---
Grasa corporal (%)	18,94 (3,705)	19,81 (6,703)	21,60 (6,032)	18,21 (5,130)	---	0,173	---
Grasa visceral (índice)	6,00 (5,00-8,00)	6,50 (3,63-10,00)	7,50 (4,63-10,75)	6,00 (3,50-8,00)	---	---	0,206
Horas de sueño	7,29 (0,864)	7,54 (0,820)	7,36 (0,995)	7,12 (0,793)	---	0,280	---
Consumo de tabaco (%)							
Fumadores habituales	38,1	23,8	19,0	19,0			
Ex-fumadores	13,3	20,0	26,7	40,0			0,388
No fumadores	15,4	24,6	24,6	35,4			
Estatus socioeconómico (%)							
Bajo (<50,000 €/año)	28,6	25,7	22,9	22,9			
Medio (50,000–200,000 €/año)	13,0	30,4	19,6	37,0			0,157
Alto (>200,000 €/año)	20,0	5,0	35,0	40,0			
Mujer	n=22	n=17	n=20	n=17			
Edad (años)	37,65 (7,543)	32,90 (6,192)	33,91 (7,136)	33,91 (7,136)	0,070		
IMC (kg/m ²)	23,061 (2,735)	22,66 (2,710)	23,95 (3,810)	23,54 (4,008)	---	0,326	---
Grasa corporal (%)	28,09 (6,050)	29,00 (6,921)	28,86 (8,301)	28,91 (8,285)	---	0,196	---
Grasa visceral (índice)	3,00 (2,00-4,13)	4,00 (2,00-4,25)	3,00 (1,25-4,00)	2,00 (1,00-4,25)	---	---	0,691
Horas de sueño	7,83 (1,135)	7,30 (0,824)	7,58 (0,660)	7,39 (0,609)	---	0,266	---
Consumo de tabaco (%)							
Fumadores habituales	25,0	25,0	20,0	30,0			
Ex-fumadores	37,5	25,0	18,8	18,8			
No fumadores	25,6	20,5	33,3	20,5			0,840
Estado socioeconómico (%)							
Bajo (<50,000 €/año)	28,0^a	18,0^a	36,0^b	18,0^a			
Medio (50,000–200,000 €/año)	33,3^a	25,0 ^{ab}	8,3^b	33,3^a			0,017
Alto (>200,000 €/año)	0,0	100,0	0,0	0,0			

*Anova de 1 factor con variable independiente "Grupos de consumo de yogur". [†]Modelo lineal general con variable independiente "Grupos de consumo de yogur" y ajustado por IMC-grasa como factor fijo y edad como covariable. Superíndices diferentes reflejan diferencias entre grupos a un nivel de significación P<0,05 mediante test post-hoc de Bonferroni (marcados en negrita). [‡]Test de Kruskal Wallis con corrección de Bonferroni para variables no paramétricas y test de Chi-cuadrado para variables categóricas. P<0,05.

4.2.3.2. Consumo de yogures y patrón dietético

- Contribución de los diferentes tipos de yogures consumidos

Respecto al número de yogures consumidos, que representa la principal variable del estudio, el grupo de consumo bajo de yogur consumía una media de 1,8 y 1,1 yogures/semana, el grupo de consumo medio una media de 3,5 y 3,6 yogures/semana y el grupo de consumo alto una media de 8,9 y 9,3 yogures/semana, respectivamente para hombre y mujer (Figura 8).

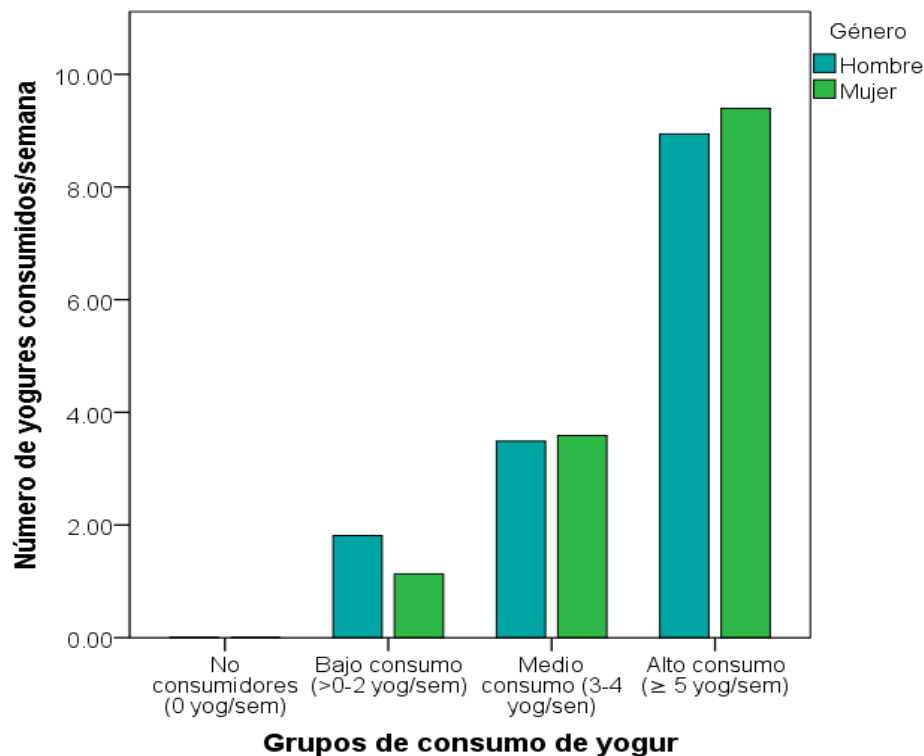


Figura 8. Número de yogures consumidos en hombres y mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur.

Tal y como se observa en las figuras 9 y 10, se encuentran diferencias en la contribución de los diferentes tipos de yogures (clasificados en función de su aporte de grasa) al total de yogures consumidos. En hombres, se observa que en el grupo de consumo bajo de yogur, el yogur entero contribuye de forma más significativa al total de yogures en comparación con el yogur griego ($P=0,042$), observándose lo mismo para el yogur desnatado en comparación con el yogur griego en el grupo de alto consumo ($P=0,003$). En mujeres, se observa tanto en el grupo de medio como de alto consumo una mayor contribución del yogur desnatado en comparación con el griego al total de yogures consumidos ($P=0,053$ y $P=0,008$ respectivamente), así como de yogur entero en comparación con el griego en el grupo de alto consumo ($P=0,049$).

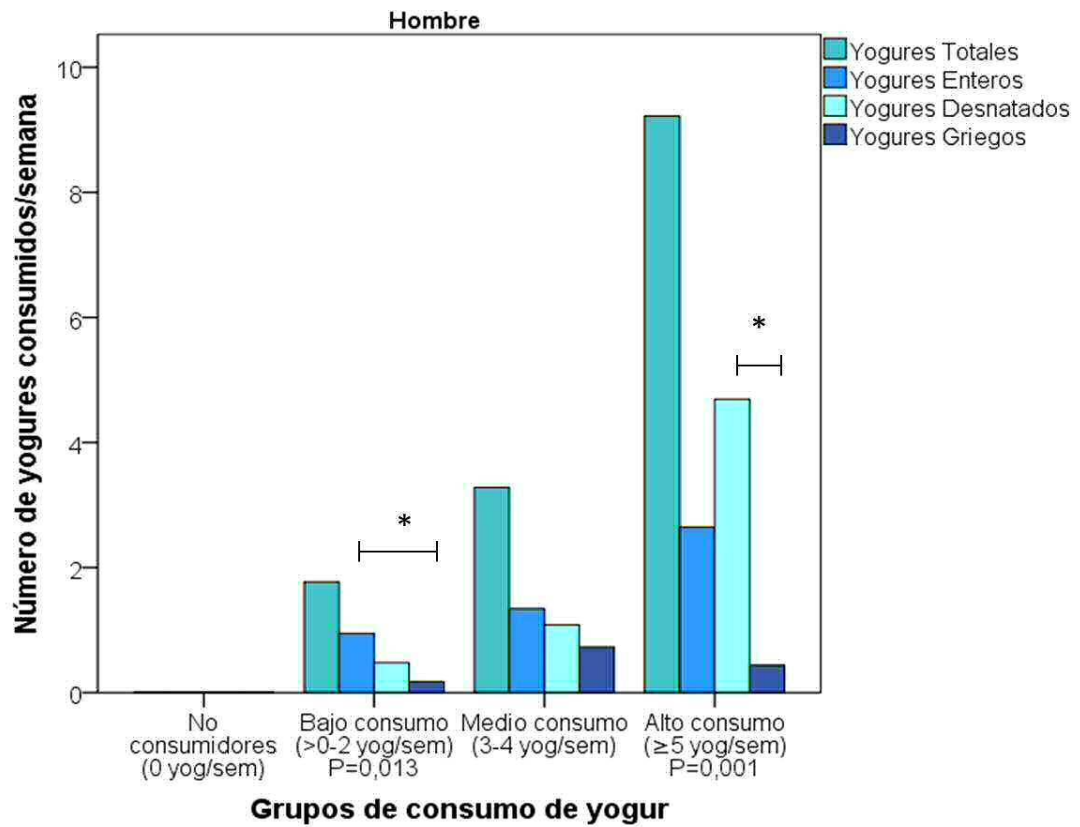


Figura 9. Contribución de los diferentes tipos de yogur al total de yogures consumidos en hombres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Test de Friedman de muestras relacionadas. *Test de Bonferroni.

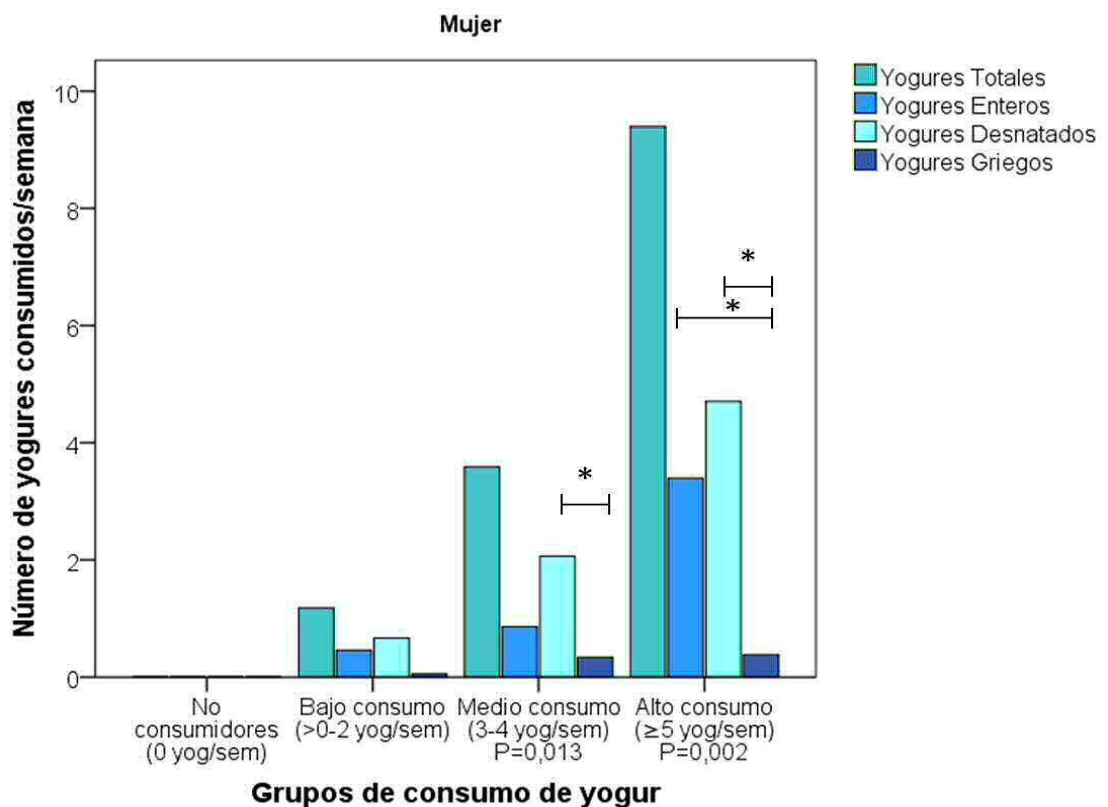


Figura 10. Contribución de los diferentes tipos de yogur al total de yogures consumidos en mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Test de Friedman de muestras relacionadas. *Test de Bonferroni.

En los 3 tipos de yogur analizados y clasificados por su contenido en grasa (entero, desnatado y griego) encontramos tanto yogures naturales, de sabores o con trozos de fruta, así como azucarados, edulcorados o sin endulzar. Nos planteamos ver en este primer análisis la relación entre las variables estudiadas (estilo de vida, composición corporal y patrón dietético) y el consumo de yogur en función de su contenido en grasa para seguir en línea con el objetivo del tercer trabajo de la presente tesis doctoral, aunque queda pendiente realizar un futuro análisis de la relación del yogur en función de su sabor/contenido en azúcar con las variables mencionadas.

- Yogures y patrón dietético

Tanto hombres como mujeres de nuestro estudio no cumplen con las recomendaciones de la OMS en cuanto a un perfil dietético saludable, el cual debe estar constituido por un 50-55% de hidratos de carbono complejos, 15-20% proteínas y 25-30% de grasas saludables (204). De hecho, consumen más energía procedente de grasa totales, y menor de hidratos de carbono, y poca cantidad de fibra dietética (<15 g/día).

En cuanto a la relación del consumo de yogur con el perfil nutricional, se observó que los hombres del grupo de alto consumo de yogur consumían más fibra dietética en comparación con los no consumidores ($P=0,032$) y menos grasa saturada en comparación con el grupo de bajo consumo ($P=0,025$). En mujeres no se observa esta relación, observándose niveles más bajos de fibra en el grupo de consumo bajo en comparación con no consumir o el grupo de consumo medio ($P=0,024$ y $P=0,050$ respectivamente). Por otro lado, las mujeres del grupo de consumo alto de yogur consumían menos grasa dietética en comparación con el grupo de bajo consumo ($P=0,012$), y en concreto, de grasa monoinsaturada ($P=0,022$) y saturada ($P=0,023$), así como de grasa poliinsaturada en comparación con el grupo de no consumidoras ($P=0,009$) (Tabla 15).

Tabla 15. Características del patrón dietético en hombres y mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur.

	No consumidores (0 yogures/sem)	Consumo bajo (>0-2 yogures/sem)	Consumo medio (3-4 yogures/sem)	Consumo alto (≥5 yogures/sem)	P*	P [#]	P [†]
Hombre	n=21	n=24	n=24	n=33			
Energía (kcal/día)	2141 (539,3)	2204 (630,8)	2180 (504,7)	2234 (550,7)	0,890	---	---
Carbohidratos (%)	39,65 (6,748)	39,62 (5,327)	40,28 (5,112)	41,49 (5,983)	---	0,527	---
Proteínas (%)	16,85 (2,567)	17,48 (2,596)	17,02 (2,524)	18,31 (2,953)	---	0,174	---
Grasa (%)	39,76 (6,261)	39,45 (3,819)	40,67 (4,482)	38,06 (5,285)	---	0,271	---
Monoinsaturada (%)	18,30 (3,540)	17,18 (2,200)	18,45 (3,682)	16,59 (3,054)	---	0,096	---
Poliinsaturada (%)	6,503 (1,805)	5,890 (1,235)	6,262 (1,329)	6,522 (2,080)	---	0,469	---
Saturada (%)	11,11 (2,178) ^{ab}	11,81 (2,450)^a	11,40 (1,937) ^{ab}	10,20 (2,061)^b	---	0,028	---
Fibra (g/1000 kcal) ^L	9,53 (3,727)^a	10,18 (2,981) ^{ab}	10,40 (3,846) ^{ab}	12,19 (3,634)^b	---	0,020	---
Alcohol (g/día)	8,57 (3,29-14,6)	10,17 (2,36-15,53)	3,67 (1,37-11,1)	5,08 (1,42-8,84)	---	---	0,100
Mujer	n=22	n=17	n=20	n=17			
Energía (kcal/día)	2118 (446,4)	1746(339,8)	2078 (445,9)	2009 (579,5)	0,128	---	---
Carbohidratos (%)	40,76 (7,795)	35,31 (6,007)	40,52 (7,880)	42,11 (8,259)	---	0,095	---
Proteínas (%)	16,58 (2,871)	17,33 (3,206)	16,44 (2,652)	17,99 (3,029)	---	0,353	---
Grasa (%)	40,41 (5,597) ^{ab}	44,95 (4,131)^a	41,01 (6,877) ^{ab}	37,79 (7,204)^b	---	0,019	---
Monoinsaturada (%)	18,00 (3,191) ^{ab}	20,95 (2,704)^a	19,34 (4,666) ^{ab}	16,58 (4,930)^b	---	0,020	---
Poliinsaturada (%)	6,748 (2,157)^a	6,051 (1,351) ^{ab}	5,994 (1,199) ^{ab}	4,999 (1,536)^b	---	0,017	---
Saturada (%)	10,81 (5,563)^a	13,11 (1,331)^b	10,64 (2,626)^a	11,00 (2,222)^a	---	0,002	---
Fibra (g/1000 kcal) ^L	12,43 (4,669)^a	9,30 (2,227)^b	12,31 (4,992)^a	11,21 (2,712) ^{ab}	---	0,020	---
Alcohol (g/día)	5,84 (1,03-11,5)	4,38 (1,42-9,48)	6,07 (1,54-8,73)	2,97 (2,11-11,2)	---	---	0,917

*Anova de 1 vía con variable independiente "Grupos de consumo de yogur". [#]Modelo lineal general con variable independiente "Grupos de consumo de yogur" y ajustado por IMC-grasa como factor fijo y edad como covariable. Superíndices diferentes reflejan diferencias entre grupos a un nivel de significación P<0,05 mediante test post-hoc de Bonferroni (marcados en negrita).

[†]Test de Kruskal Wallis con corrección de Bonferroni para las comparaciones por parejas. P<0,05. ^LVariables transformadas logarítmicamente (Ln + 1).

En cuanto a los grupos de alimentos consumidos, cuantificado con el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, se observó que tanto hombres como mujeres del grupo de alto consumo de yogur consumían más gramos de lácteos al día en comparación con el resto de grupos de consumo de yogur (Figuras 11 y 12). No se observaron diferencias en los gramos de leche entera, semidesnatada y desnatada, cuajadas, petit-suisse, nata y diferentes tipos de quesos entre los grupos de consumo de yogur, sugiriendo que las diferencias encontradas en los gramos de lácteos se debían a la contribución de los gramos de yogur consumido cuantificados en el CFCA, los cuales eran significativamente más altos en comparación con el resto de los grupos (Figuras 13 y 14).

Por otro lado, los hombres del grupo de alto consumo de yogur consumían más cereales integrales en comparación con el grupo de medio consumo y el grupo de no consumidores ($P=0,019$ y $P=0,024$; Figura 15). En cuanto a las mujeres, el consumo de fruta fue menor en el grupo de consumo bajo en comparación con las mujeres no consumidoras ($P=0,042$; Figura 16), diferenciándose también del grupo de alto consumo de yogur ($P=0,008$), al igual que de verdura ($P=0,039$; Figura 17). También se observó una tendencia a un mayor consumo de embutidos en las mujeres del grupo de consumo bajo de yogur en comparación con las del grupo de consumo alto ($P=0,062$; Figura 18).

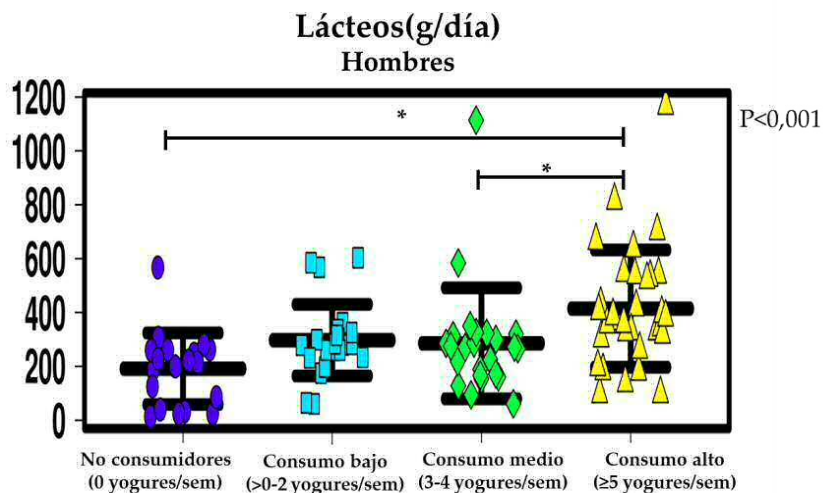


Figura 12. Consumo de lácteos (g/día) en hombres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni. P<0,05.

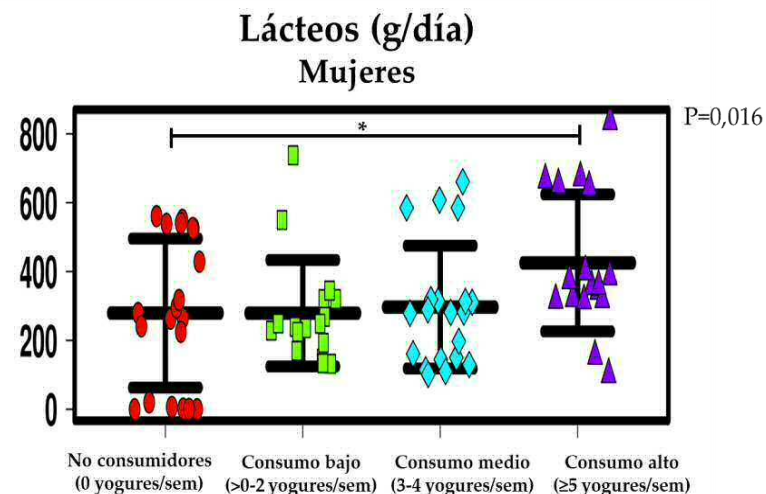


Figura 11. Consumo de lácteos (g/día) en mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni. P<0,05.

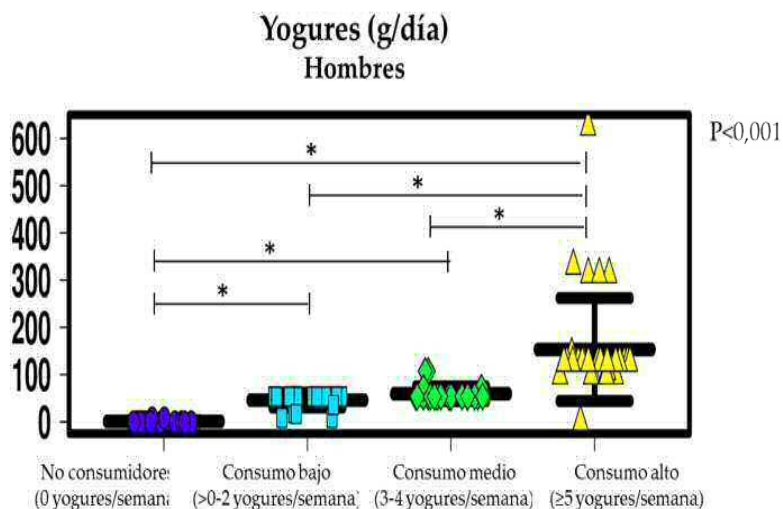


Figura 14. Consumo de yogures (g/día) en hombres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni. P<0,05.

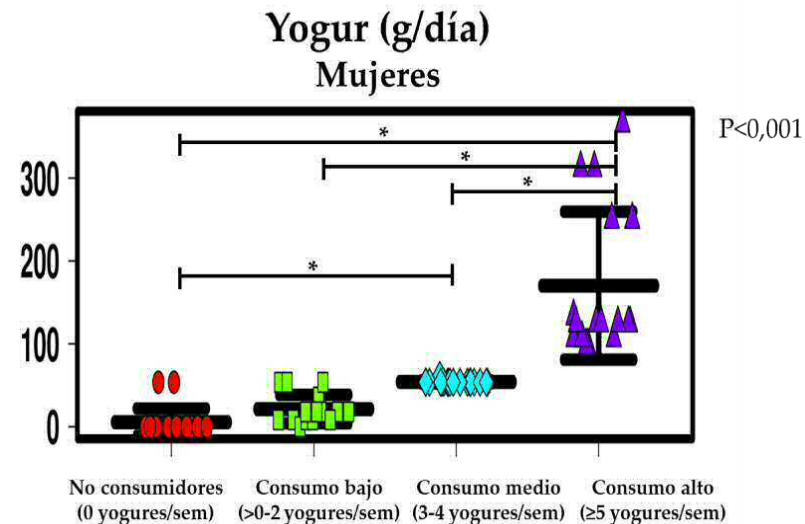


Figura 13. Consumo de yogures (g/día) en mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni. P<0,05.

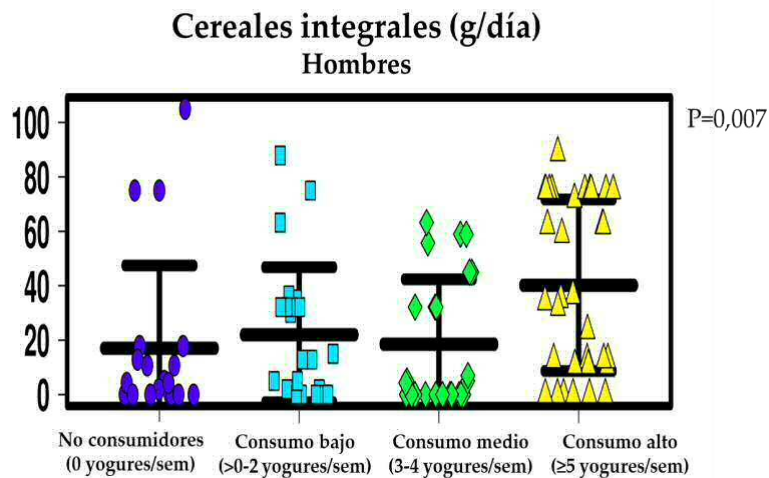


Figura 15. Consumo de cereales integrales (g/día) en hombres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni. P<0,05

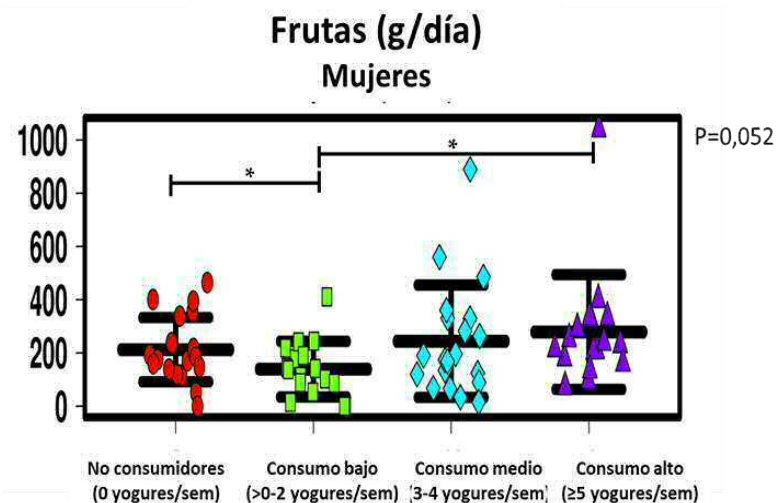


Figura 16. Consumo de frutas (g/día) en mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni. P<0,05

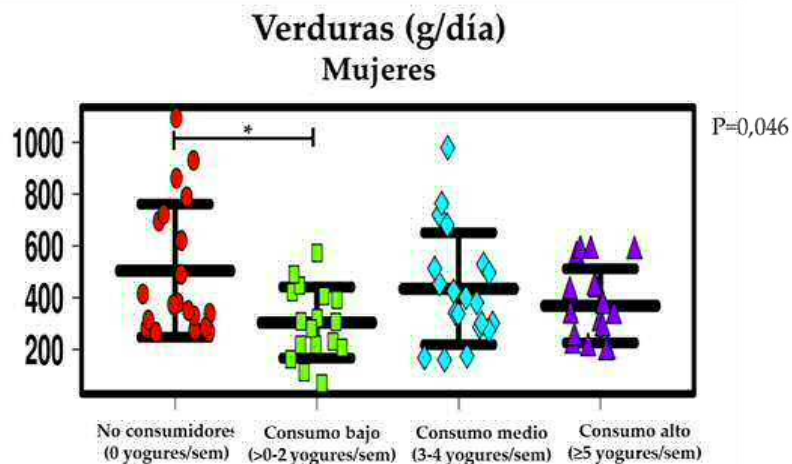


Figura 17. Consumo de verduras (g/día) en mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni. P<0,05

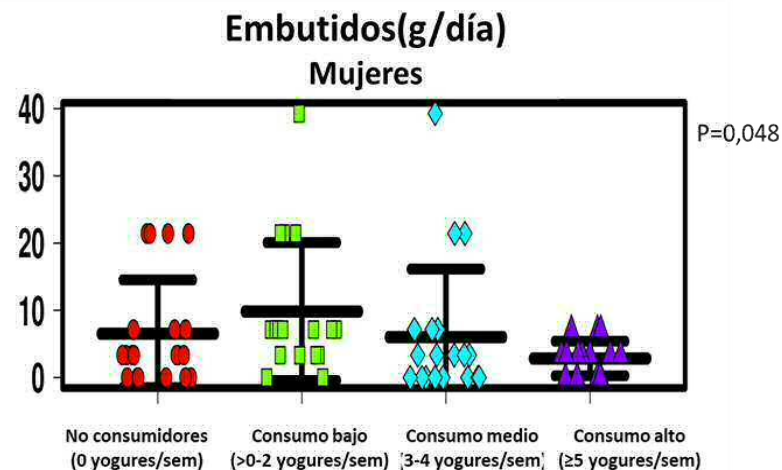


Figura 18. Consumo de embutidos (g/día) en mujeres de los diferentes grupos de consumo de yogur. Anova de 1 factor de Kruskal Wallis. *Test de Bonferroni. P<0,05

- Relación entre el consumo de yogur, parámetros de funcionalidad intestinal, la microbiota intestinal y el patrón dietético.

Dada las relaciones encontradas entre las variables de consumo de yogures, los parámetros de funcionalidad intestinal y el patrón dietético, así como la diferente contribución aportada por cada tipo de yogur al total de yogures consumidos, nos plantamos evaluar la relación entre ellas de forma separada en hombres y mujeres y estudiando a su vez su relación con los niveles bacterianos de *Lactobacillaceae*, *Lactobacillus*, *Streptococaceae*, *Streptococcus*, *Bifidobacteriaceae* y *Bifidobacterium*.

En hombres, se observaron correlaciones positivas entre el consumo de yogures totales y lácteos ($P < 0,001$), así como con *Streptococaceae* ($P = 0,039$), *Streptococcus* ($P = 0,046$) y *Lactobacillaceae* ($P = 0,038$). Sin embargo, los yogures totales correlacionaron negativamente con la ingesta de AGS ($P = 0,004$). Respecto al tipo de yogur consumido, se observó el mismo comportamiento en los yogures desnatados, observándose una correlación negativa con los AGS ($P = 0,002$) y con la energía total consumida de la dieta ($P = 0,001$), y positiva con cereales integrales ($P = 0,038$) y con el porcentaje de proteínas ($P < 0,001$). Se observó el comportamiento contrario en yogures enteros, cuyo consumo se correlacionó positivamente con la energía total consumida de la dieta (kcal/día) ($P = 0,001$), observándose una tendencia con el porcentaje de hidratos de carbono ($P = 0,066$), y de forma significativa con la fibra de la fruta ($P = 0,006$), fibra de las legumbres ($P = 0,038$) y los gramos de legumbre consumidos ($P = 0,034$), y negativamente con el porcentaje de proteínas ($P < 0,001$) (Figura 19).

En cuanto a la mujer, el consumo de yogures totales se correlacionó negativamente con las grasas totales y AGM ($P = 0,016$ y $P = 0,022$ respectivamente), y positivamente con el consumo de lácteos ($P = 0,016$) y fruta ($P = 0,032$). En cuanto al tipo de yogur consumido, el consumo de yogur desnatado se correlacionó positivamente con la fibra total ($P = 0,024$), la fibra de verduras ($P = 0,054$) y la fibra de frutas ($P = 0,037$) y negativamente con la ingesta de AGS ($P = 0,043$). No se observaron correlaciones con los niveles de *Streptococaceae*, *Streptococcus*, *Lactobacillaceae*, *Lactobacillus*, *Bifidobacteriaceae* y *Bifidobacterium* (Figura 20).

Por otro lado, el número de yogures consumidos, así como los diferentes tipos de yogur, no se correlacionaron con los niveles de AGCC, síntomas intestinales, número de deposiciones al día o consistencia de las deposiciones.

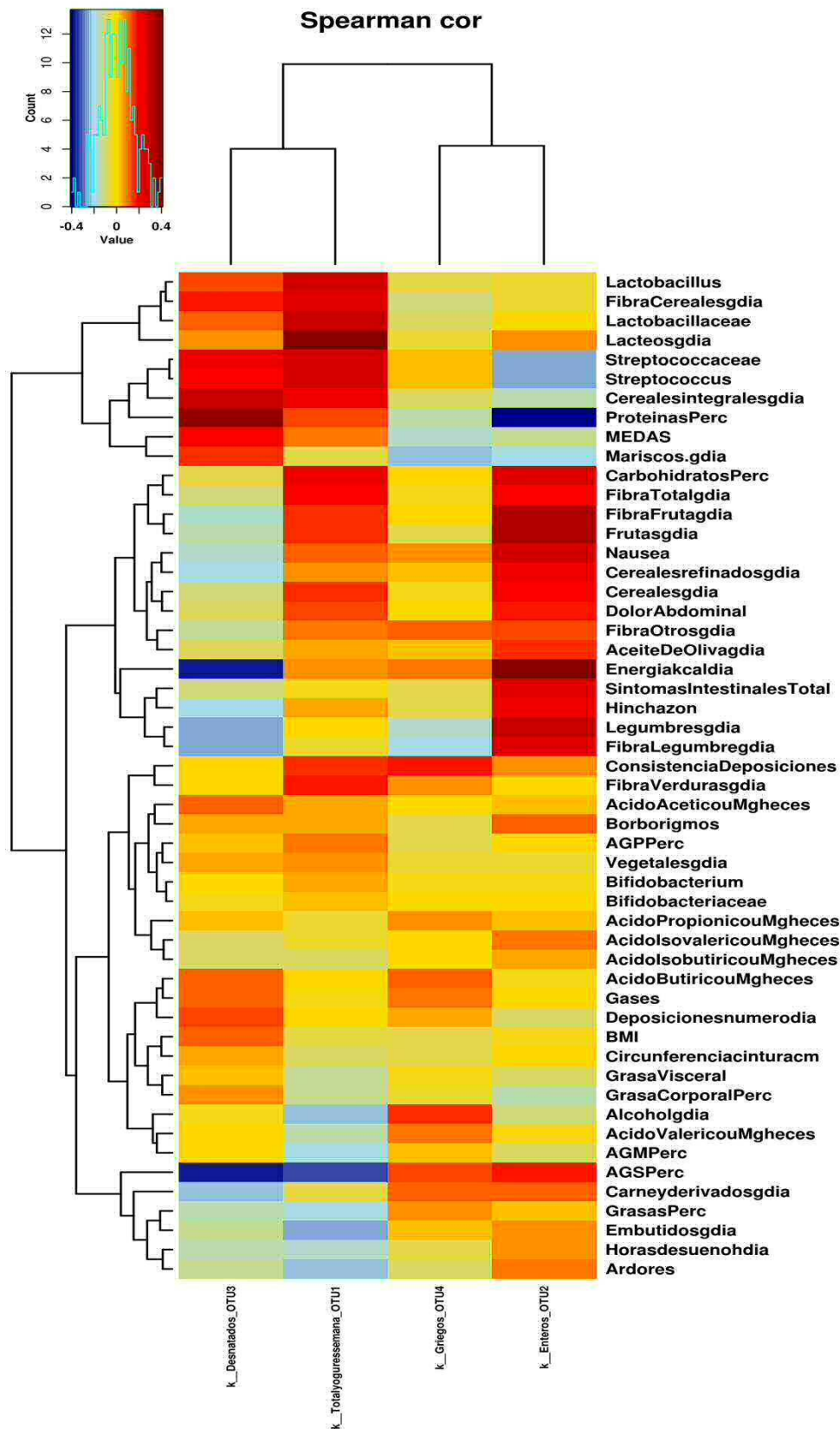


Figura 19. Mapa de correlaciones entre los diferentes tipos de yogur con parámetros dietéticos, de funcionalidad intestinal y determinados grupos de la microbiota intestinal en hombres.

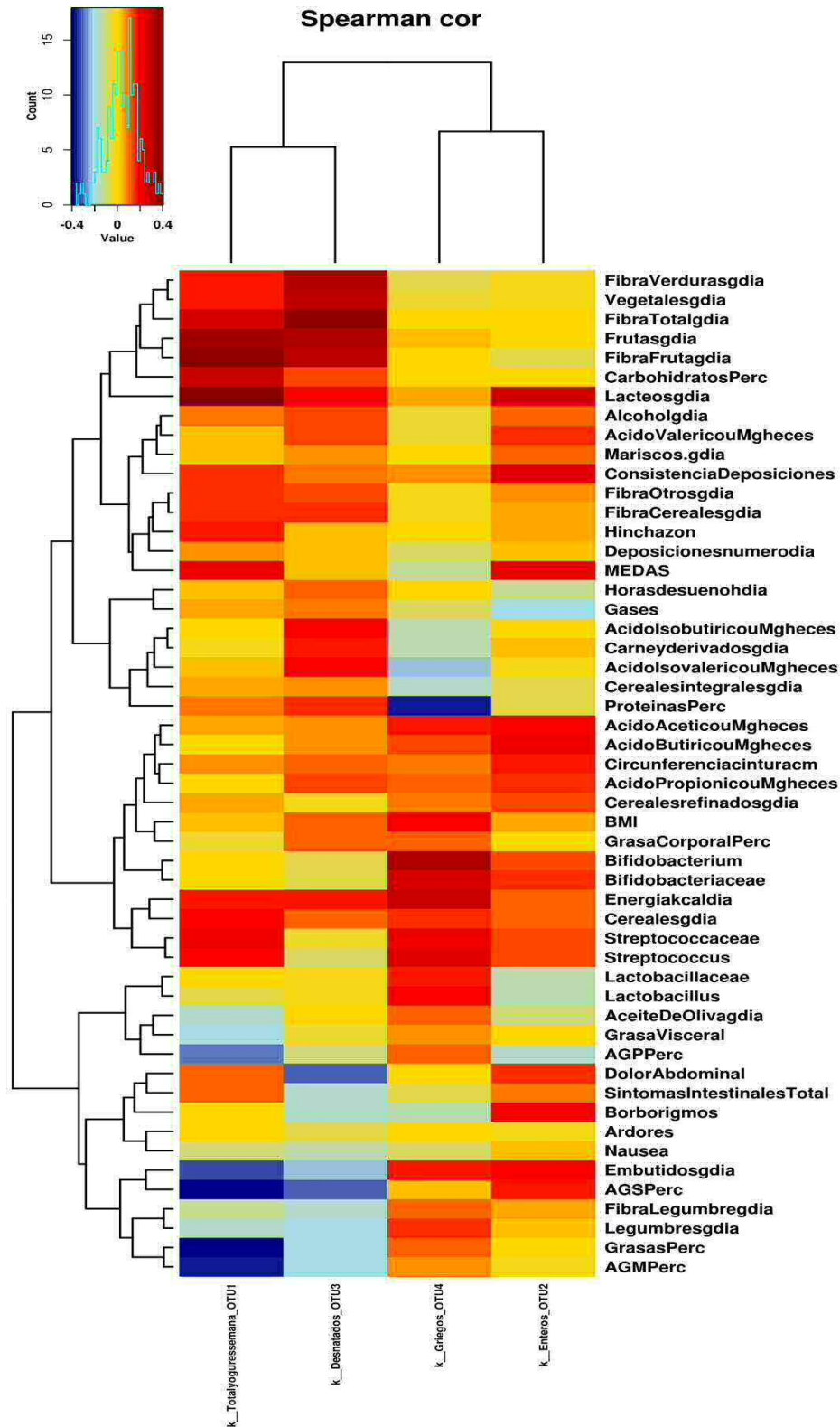


Figura 20. Mapa de correlaciones entre los diferentes tipos de yogur con parámetros dietéticos, de funcionalidad intestinal y determinados grupos de la microbiota intestinal en mujeres.

5. DISCUSIÓN INTEGRADORA

5. DISCUSIÓN INTEGRADORA

En resumen, los resultados de la presente tesis doctoral sugieren que el consumo de la cepa probiótica *L. coryniformis* CECT5711 (Lc) se relaciona con una mejora de la inmunidad específica, y que cepas probióticas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* presentes en leches fermentadas se relacionan con una modulación positiva de los niveles de Bifidobacterias en heces. Por otro lado, el consumo de yogur clásico se relacionó con efectos limitados sobre la composición de la microbiota intestinal, sin observarse diferencias entre el yogur de vaca y los yogures de oveja en cuanto a cambios en marcadores inflamatorios y en la microbiota intestinal en adultos aparentemente sanos. Sin embargo, al considerar el perfil metabólico de los sujetos de estudio, el consumo de yogur de oveja entero atenuó los niveles de ciertos marcadores inflamatorios en comparación con el yogur de vaca entero y de oveja semidesnatado en aquellos sujetos con el cociente más alto de colesterol total/HDL, sugiriendo que la situación metabólica de los sujetos es relevante en la respuesta al consumo de yogures.

5.1. Efectos del consumo de probióticos sobre el sistema inmunitario y la microbiota intestinal

El estudio del efecto de los probióticos sobre el sistema inmunitario de adultos sanos se ha evaluado de forma específica con la cepa probiótica *L. coryniformis* CECT5711 administrada en cápsulas durante 6 semanas (Estudio Pro-L-cory), mientras que su relación con cambios sobre la composición de la microbiota intestinal y parámetros de funcionalidad intestinal se ha estudiado con diferentes cepas probióticas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* presentes en leches fermentadas (Estudio Almicrobhol).

Lactobacillus es uno de los géneros bacterianos más frecuentemente utilizados como probióticos debido a su larga evidencia acerca de su papel en la prevención de infecciones GI (163), hecho que sugiere su papel esencial en la modulación del sistema inmunitario y de la microbiota intestinal (97). En este sentido, las especies probióticas más estudiadas en adultos sanos por su relación con propiedades inmunomoduladoras son *L. gasseri*, *L. salivarius*, *L. paracasei* y *L. casei* (Tablas 3 y 4). En concreto, *L. paracasei* ssp. *paracasei* (*L. casei* 431), *L. rhamnosus* GG y *L. fermentum* CECT5711 podrían actuar como coadyuvantes en un proceso de vacunación, ya que su consumo se relaciona con un aumento en la producción de anticuerpos específicos y con ello con una mejor protección frente a futuras infecciones (14,130). Sin embargo, existen pocos estudios con la cepa probiótica objeto del primer estudio de la presente tesis doctoral, *L. coryniformis* CECT5711, de largo consumo en países de Europa del Este como Bulgaria o Turquía, ya que forma parte de una bebida fermentada habitual llamada “Boza” (157). Los antecedentes que existen de la cepa han revelado sus potenciales propiedades probióticas *in vitro* (158), así como su capacidad inmunomoduladora tanto en niños, mejorando marcadores inmunitarios específicos relacionados con la alergia y modulando los niveles de *Lactobacillus* en heces (160), como en adultos sanos estimulando la actividad inmunitaria innata (158). Sin embargo, en estos estudios *L. coryniformis* CECT5711 se administró junto con la cepa probiótica *L. gasseri* CECT5714, dificultando así poder establecer una relación directa entre los resultados encontrados y el consumo aislado de *L. coryniformis*. Debido a los hallazgos que relacionan el consumo de la cepa con una posible modulación del sistema inmunitario, así como al bajo

número de estudios al respecto, se planteó su estudio bajo un modelo de vacunación con el virus de la Hepatitis A con el objetivo de poder confirmar sus propiedades coadyuvantes a través de la producción de anticuerpos específicos del virus de la vacuna en sangre.

Los resultados del primer trabajo sugieren que la cepa probiótica *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 (3×10^9 ucf/g) consumida durante dos semanas antes de administrar la vacuna de la Hepatitis A podría actuar como coadyuvante en un proceso de vacunación al aumentar de forma significativa los niveles de anticuerpos específicos de la vacuna en sangre a las 4 semanas de la vacunación en comparación con el grupo placebo. En este sentido, la producción de anticuerpos específicos es uno de los biomarcadores más empleados como indicador de la mejora de la respuesta a una infección, y que de acuerdo a lo que establece la EFSA, podría emplearse para sustentar una declaración de salud referente al papel de los probióticos sobre la defensa frente a patógenos (16). Los resultados derivados de este estudio también sugieren que el momento de administración de la cepa es relevante, ya que se observaron resultados diferentes en la producción de anticuerpos específicos en función de si el consumo se realiza dos semanas antes de la vacunación o bien si continúa durante 4 semanas posteriores a la misma. En este sentido, el consumo previo a la vacunación y no tras la misma (grupo mixto) podría preparar de una forma más eficiente al sistema inmunitario. Sin embargo, el hecho de que el consumo continuado de la cepa durante 4 semanas posteriores a la vacunación produjera valores de anticuerpos más bajos que el consumo previo sin diferenciarse significativamente del grupo placebo es difícil de explicar. Por un lado, el consumo continuado de la cepa después de la vacunación podría haber atenuado la respuesta inmunitaria específica por mecanismos no estudiados en el presente estudio, como la modulación de las respuestas T reguladoras, responsables de mecanismos de regulación y control de respuestas inmunitarias tipo T y B (205), pudiendo así haber influido en la producción de anticuerpos específicos del virus. Por otro lado, la incorporación de medidas adicionales a las 2 o 3 semanas de la vacunación podría haber aportado más claridad en torno a los mecanismos subyacentes a través de los cuales la cepa probiótica es capaz de modular la respuesta inmunitaria cuando es consumida 4 semanas después de la vacuna. Sin embargo, dado que el objetivo primario del estudio era evaluar la capacidad de producción de anticuerpos específicos, los cuales parecen presentar un pico de producción a las 4 semanas de administrar la vacuna (18), se eligió este punto temporal para todos los parámetros inmunológicos. De hecho, no se observaron cambios en otros parámetros relacionados con la respuesta inmunitaria a una vacuna, como la actividad fagocítica, así como en los niveles celulares de los linfocitos T CD8+ citotóxicos o células NK, ni en la producción de algunas citoquinas involucradas, como IFN- γ (13). En este sentido, tras una vacunación, la respuesta inmunitaria típica comprende durante los primeros días una estimulación de la respuesta inmune innata con aumento de los niveles de citoquinas, de la actividad NK y fagocitosis, seguido gradualmente de respuestas T específicas (13). El tipo y modo de administración de la vacuna también pudo haber contribuido al tipo de respuesta inmunitaria observada. En este sentido, la vacuna de la Hepatitis A contiene el antígeno proteico del virus inactivado y está formulada con sales de aluminio como coadyuvante. Este tipo de vacunas proteicas parecen ejercer un mayor efecto a nivel de producción de linfocitos B y anticuerpos específicos en los centros germinales en comparación con los antígenos de polisacáridos (18). Los estudios que existen acerca del efecto sobre el sistema inmunitario de la vacuna de la Hepatitis A revelan una gran eficacia en la producción de anticuerpos (206), pero existen pocos

datos acerca de su efecto en otros parámetros inmunitarios. La vacuna de la Hepatitis A es poco utilizada en estudios con probióticos, ya que no es una enfermedad endémica en sociedades desarrolladas y en España se suelen emplear otro tipo de vacunas, como la vacuna de la gripe, con el objetivo de estudiar de forma paralela el papel de las cepas probióticas en la prevención de infecciones comunes de la población (14). Sin embargo, uno de los motivos que condujeron al uso de esta vacuna fue el hecho de poder encontrar el mayor número de sujetos sin anticuerpos específicos basales del virus en sangre, ya que la probabilidad de haber pasado la infección en España es más baja que otras vacunas más frecuentemente utilizadas como puede ser la gripe. La importancia radica en que el hecho de tener unos niveles basales de anticuerpos específicos del virus podría enmascarar la respuesta posterior de producción de anticuerpos a la vacuna, y con ello, influir en los posibles efectos atribuidos al consumo de probióticos. En nuestro estudio, 7 sujetos fueron positivos a anticuerpos del virus de la Hepatitis A antes de la vacunación y por tanto se excluyeron del análisis.

Por otro lado, se observó una modulación de la memoria inmunológica tras el consumo de Lc durante 6 semanas, al aumentar de forma significativa los niveles de linfocitos T CD4+ de memoria en comparación con los niveles basales. Sin embargo, sería necesario medir los niveles de linfocitos T CD4+ de memoria específicos del virus de la Hepatitis A para confirmar su papel en la mejora de la protección frente a una segunda infección. El consumo de la cepa probiótica no modificó los valores de citoquinas plasmáticas, a diferencia del grupo placebo, en el que se observaron niveles más elevados de la citoquina pro-inflamatoria TNF- α , así como de la citoquina anti-inflamatoria IL-10 a las 6 semanas de intervención en comparación con los niveles basales, sugiriendo una posible reacción inmunitaria frente a la vacuna. El hecho de que no se observen diferencias en los grupos que consumieron la cepa probiótica sugiere que el consumo de Lc podría haber atenuado la respuesta inflamatoria que se desencadena tras una vacunación, relacionándose así con una mejor recuperación de la homeostasis inmunológica.

Una de las limitaciones del estudio fue no incluir el análisis de cuantificación de la cepa probiótica en heces, así como la evaluación de sus efectos sobre la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal. En concreto, la evidencia previa del estudio de Olivares y col. 2006 reveló niveles elevados de AGCC y de *Lactobacillus* en las heces de voluntarios sanos tras el consumo de *L. coryniformis* CECT5711 y *L. gasseri* CECT5714 durante 4 semanas (135). Con estos análisis se hubiera confirmado su paso activo a través del tracto GI y con ello la posibilidad de interacción con las bacterias comensales, uno de los mecanismos a través de los cuales la cepa probiótica podría haber modulado la respuesta inmunitaria observada (109). Además, dicha interacción podría modular la producción de metabolitos por parte de las bacterias comensales, como los AGCC, los cuales pueden influir en la actividad de las células inmunitarias y con ello contribuir a la producción de anticuerpos específicos (58). Por ello, nos planteamos estudiar en un segundo trabajo (Estudio Almicrobhol) si el consumo de probióticos presentes en leches fermentadas se relacionaba con una modulación de las bacterias comensales presentes en la microbiota intestinal y en concreto, con aquellas relacionadas con las cepas probióticas ingeridas, así como con la producción de AGCC y otros parámetros de funcionalidad intestinal. Los resultados del segundo trabajo sugieren que el consumo de leches fermentadas con probióticos (LFP) de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* se relaciona con niveles más elevados de Bifidobacterias comparado con población no consumidora, observándose relación

en todos los grupos taxonómicos de Bifidobacterias, desde filo a especies concretas de *Bifidobacterium*. Se observó que dicha relación era dependiente del tipo de probiótico presente en las LFP, así como de la dosis de LFP consumida en el caso de algunas especies de *Bifidobacterium*.

En este sentido, el consumo de LFP con *Lactobacillus*, en concreto cepas de *L. casei*, se relacionó con niveles más elevados de los grandes grupos taxonómicos, como el filo Actinobacteria, la familia *Bifidobacteriaceae* y el género *Bifidobacterium*, así como de dos de las especies más abundantes de la microbiota intestinal de adultos sanos, *B. longum* y *B. kashiwanohense*. Por otro lado, el consumo de LFP con *Bifidobacterium*, en concreto, cepas de *B. animalis*, se relacionó con niveles más elevados de esta especie, así como de otras especies minoritarias filogenéticamente relacionadas, como *B. thermophilum*, *B. pseudolongum*, *B. merycicum* y *B. magnum*. Estos resultados sugieren que el consumo de cepas probióticas de *L. casei* junto con las bacterias acidolácticas presentes en el yogur, *L. bulgaricus* y *St. thermophilus*, podría modular de forma positiva los niveles de especies de Bifidobacterias consideradas autóctonas, promoviendo así un mayor beneficio para el ecosistema intestinal al tratarse de bacterias comensales en contacto directo con la mucosa intestinal y el sistema inmunitario asociado a mucosas (207). De hecho, el consumo de *B. longum* se ha relacionado con efectos probióticos sobre la modulación de la microbiota intestinal de adultos sanos (208). Estos resultados podrían a priori resultar contradictorios, al no observarse modulación de los mismos grupos bacterianos que las bacterias probióticas ingeridas, en este caso *Lactobacillus*. Sin embargo, está documentado en la bibliografía que diversas cepas de *Lactobacillus* son capaces de modular los niveles de Bifidobacterias (136,137), tal y como sugieren nuestros resultados. Los posibles mecanismos involucrados podrían estar relacionados con procesos de cross-feeding entre bacterias, ya que algunas cepas de *Lactobacillus* parecen participar en la hidrólisis de hidratos de carbono complejos como la fibra, así como en la síntesis y degradación de polisacáridos de mucina, proporcionando sustratos de fermentación a cepas de Bifidobacterias y por tanto promoviendo una modulación de las mismas (140). Sin embargo, el bajo tamaño muestral de consumidores de LFP con *Lactobacillus* no permite hacer conclusiones definitivas y se necesitan más estudios al respecto. Por otro lado, los valores más elevados de *B. animalis* tras el consumo de LFP con *Bifidobacterium* sugieren un relación positiva para la salud derivada de su consumo, ya que *B. animalis* se asocia con efectos beneficiosos sobre el sistema inmunitario y la microbiota intestinal de adultos sanos (123,209), aunque se considera una especie transitoria que no coloniza de forma permanente el tracto gastrointestinal (141). La falta de evidencia acerca de la abundancia y funciones en adultos sanos de las especies *B. thermophilum*, *B. pseudolongum*, *B. merycicum* y *B. magnum* (210), junto con la posibilidad de errores en los procesos de alineación y asignación de secuencias por el método propio de la plataforma Illumina MiSeq dada la elevada relación filogenética entre ambas (211), no nos permite realizar conclusiones claras acerca de los resultados observados. Es importante recalcar dos aspectos relevantes que deben ser considerados a la hora de interpretar los resultados encontrados en los niveles de Bifidobacterias. Por un lado, los niveles más elevados encontrados en consumidores de LFP podrían ser transitorios si su consumo es interrumpido (212), o bien si no es lo suficientemente alto, como se observa en nuestros resultados para algunas especies de Bifidobacterias, como *B. animalis*, *B. thermophilum* o *B. pseudolongum*, las cuales presentan niveles más altos en el grupo que consume 5 o más LFP a la semana en comparación con el grupo de bajo consumo de yogur

(>0 y hasta 2), en los cuales apenas se encuentran valores detectables de las mismas. Por otro lado, no se observó una relación entre el consumo de LFP y los niveles de *Lactobacillus* en heces. Existe controversia en este sentido en la literatura, ya que mientras unos estudios muestran modulación de los niveles de *Lactobacillus* tras la ingesta de probióticos (138,190), otros no revelan una asociación positiva entre ambos (213). *Lactobacillus* es un género predominante en el intestino delgado con menor abundancia en el colon (48). De hecho, nuestros resultados revelan niveles del género *Lactobacillus* por debajo de <0,1% de abundancia relativa, y muchas de las especies, como *L. paracasei*, *L. rhamnosus* o *L. salivarius*, cuando están presentes, muestran una abundancia relativa extremadamente baja (Anexo I), pudiendo este aspecto influir en la ausencia de resultados relacionados con el consumo de LFP con *Lactobacillus*. A su vez, el hecho de que no se observe una relación entre el consumo de LFP con otros grupos bacterianos de la microbiota intestinal podría reflejar que el consumo de las cepas probióticas a la dosis que se administran no es suficiente para inducir una modulación en grupos mayoritarios ni en la composición global de la microbiota intestinal, formada por un estable conjunto de 10^{11} - 10^{12} bacterias por gramo de contenido colónico (97). Sin embargo, sí se observaron niveles más bajos de algunos grupos bacterianos minoritarios como el filo Tenericutes y el género *Butyricimonas* en los consumidores de LFP comparado con los no consumidores, resultados que podrían ser positivos dada la relación de estos géneros con ciertas patologías, tales como efectos pro-atérogénicos asociados a algunos géneros de Tenericutes (214) o alcoholismo (215), respectivamente. Sin embargo, la evidencia en adultos sanos es escasa y se necesitan más estudios que demuestren dicha relación.

En cuanto a su relación con parámetros de funcionalidad intestinal, el consumo de LFP no se relacionó con los niveles de AGCC en heces, ni con la frecuencia e intensidad de síntomas intestinales, número o consistencia de las deposiciones, sugiriendo una relación neutra entre consumo de LFP y funcionalidad intestinal. Existe evidencia de la relación entre el consumo de probióticos con una mejor función intestinal en adultos sanos (135), aunque en muchos estudios la población estudiada a pesar de ser considerada sana presenta trastornos intestinales tales como estreñimiento o elevada frecuencia de síntomas intestinales (216). La importancia de encontrar una mejora en la función intestinal tras una intervención con probióticos radica en el hecho de que cada vez se observa más un aumento progresivo en la aparición de alteraciones intestinales en población adulta sana, tales como estreñimiento, diarrea o síntomas intestinales, como consecuencia de una disbiosis intestinal derivada de la práctica de un estilo de vida no saludable como el estrés crónico o una alimentación desequilibrada (8), conduciendo todo ello a una disminución en la calidad de vida de la población adulta sana (203). La posible relación positiva observada entre Bifidobacterias y el consumo de LFP, tal y como se ha explicado previamente, podría asociarse con niveles más elevados de metabolitos microbianos como los AGCC, en concreto el ácido acético, principal metabolito de fermentación de las Bifidobacterias (65). El hecho de que en nuestros resultados no se observe una relación entre el consumo de LFP con una mejor funcionalidad GI puede ser debido al carácter observacional del estudio, que no permite hacer un seguimiento en el tiempo de dichos parámetros de una forma más controlada, o bien a la existencia de factores de confusión no controlados, como puede ser la ingesta de fibra, principal sustrato de fermentación de las bacterias comensales (65), o la composición basal de grupos bacterianos, ya que existe evidencia de que valores disminuidos o aumentados de ciertos grupos bacterianos podrían influir en la respuesta al consumo de probióticos (190).

5.2. Efectos del consumo de yogures sobre la microbiota intestinal y el sistema inmunitario

El estudio de los efectos del yogur sobre la microbiota intestinal se ha evaluado, por un lado, en el segundo trabajo de la presente tesis doctoral, estudiando la posible relación entre el consumo de yogur y la microbiota intestinal (Estudio Almicrobhol), así como con parámetros de funcionalidad intestinal. Por otro lado, en el tercer trabajo (Estudio O-yogur) se evaluaron los efectos de diferentes tipos de yogur, en concreto yogur de oveja semidesnatado y entero y yogur de vaca entero sobre determinados grupos bacterianos de la microbiota intestinal. El análisis de los efectos del yogur sobre el sistema inmunitario sólo se ha estudiado en este tercer trabajo a través de la medición de ciertos parámetros inflamatorios, dado el perfil metabólico de los participantes, que presentaban unos niveles ligeramente altos de colesterol plasmático y en los cuales puede ser más probable encontrar algún cambio en la respuesta inflamatoria que en adultos sanos sin alteraciones metabólicas, como es el caso de la población del estudio Almicrobhol.

Según el Códex Alimentarius, el yogur es el producto obtenido tras la fermentación de la leche por *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus* y *St. thermophilus*, resultando en un producto de alta palatabilidad con un contenido en bacterias acidolácticas viables que debe estar en torno a 10^7 ufc/g en el momento de consumo (Códex). El yogur contiene además proteínas de alta calidad, ácidos grasos esenciales, vitaminas del grupo B, calcio, fósforo y potasio, entre otros, resultando así en un producto de un gran valor nutritivo (217). En este sentido, el consumo de yogur se ha relacionado en varios estudios con una mejor calidad de la dieta (218). Nuestros resultados revelan una asociación positiva entre el consumo de yogur y un mejor perfil nutricional, al relacionarse con una mayor ingesta de fibra y menor de grasa dietética, en concreto saturada, tanto en hombres como en mujeres. En concreto, un consumo bajo de yogur (>0-2 yogures/semana) en mujeres se relacionó con una menor ingesta de fruta y verdura, y mayor cantidad de embutidos. El yogur más consumido en los grupos de alto consumo fue el yogur desnatado para ambos sexos, aunque en hombres el yogur entero fue el mayoritario en el grupo de consumo medio. En este sentido, se observó un diferente comportamiento en hombres y mujeres en cuanto a la relación entre el tipo de yogur consumido y el patrón dietético. En hombres, el consumo de yogur entero se relacionó con una mayor ingesta de fibra, en concreto de fruta y legumbre, y una menor ingesta de calorías, mientras que en mujeres fue el yogur desnatado el que se relacionó con un mejor perfil dietético al relacionarse positivamente con la fibra total, fibra de verduras y de fruta, y negativamente con la ingesta de AGS. Estos hallazgos sugieren la necesidad de investigar de forma separada en hombres y mujeres la relación entre el tipo de yogur consumido y el perfil nutricional de la dieta, como se ha revelado en otros estudios (219). Los beneficios del yogur sobre una mejora en la calidad de la dieta podrían tener un impacto beneficioso en la salud de la población y por ello, su estudio en el marco de la salud humana relativo a sus efectos sobre el sistema inmunitario y la salud GI ha aumentado en los últimos años. Sin embargo, es importante discernir qué componente es el responsable de los beneficios asociados a su consumo.

Respecto a su contenido en microorganismos, las bacterias del yogur son consideradas probióticas ya que promueven una mejora en la intolerancia a la lactosa (100). Sin embargo, existe controversia acerca de su supervivencia a las condiciones del tracto GI y con ello de su posible interacción con las bacterias comensales, hecho que podría modular de forma positiva

tanto su composición como su actividad y confirmar así su posible papel probiótico en este sentido. Es por ello que nos planteamos estudiar si el consumo de yogures en población adulta sana se relacionaba con niveles más elevados de las bacterias ingeridas, así como en otros grupos bacterianos de la microbiota intestinal. En este sentido, observamos que el consumo de yogur se relacionaba con niveles más elevados de *St. thermophilus* en el grupo de alto consumo de yogur (≥ 5 unidades/semana) en comparación con los no consumidores y el grupo de bajo consumo ($>0-2$ unidades/semana), observándose lo mismo para la familia *Streptococaceae*. En concreto, *St. thermophilus* forma parte de la microbiota autóctona de la leche humana y de productos lácteos (220), mientras que en humanos su presencia en heces se considera transitoria y por tanto su presencia podría relacionarse con el consumo de productos lácteos. En concreto, aunque existe controversia en este sentido, algunas cepas de *St. thermophilus* han demostrado sus propiedades probióticas *in vitro*, como su capacidad de adhesión a células de la mucosa intestinal, así como de producción de folato y su actividad anti-cancerígena (221), sugiriendo un posible papel beneficioso sobre el sistema inmunitario del huésped. Por otro lado, el consumo de yogur no se relacionó con niveles más elevados de la otra bacteria presente en el yogur, *L. delbrueckii*, ni con los grupos taxonómicos de *Lactobacillus*, pudiendo estar este resultado influenciado por los valores tan bajos detectados en heces, como se ha comentado anteriormente. Tampoco se observó relación entre el consumo de yogur y el resto de grupos bacterianos diferentes a las bacterias ingeridas, sugiriendo así que el yogur se asocia con un efecto limitado sobre la composición global de la microbiota. Existen pocos estudios realizados en adultos sanos con el objetivo de evaluar el papel del consumo de yogur sobre la microbiota intestinal. En no de ellos sí se ha observado niveles más altos de *Lactobacillus* tras el consumo de yogur durante 4 semanas (190), mientras que en otros no se han encontrado efectos en los niveles de *Lactobacillus* aunque sí en otros grupos bacterianos, como *C. coccoides* y *Bacteroides*. Sin embargo, en este estudio se observaron resultados parecidos tras el consumo de yogur pasteurizado, sugiriendo que otros componentes del yogur podrían estar ejerciendo un papel en este sentido (152). En cuanto a su relación con parámetros intestinales, observamos que el consumo de yogur no se relaciona con los niveles de los AGCC mayoritarios, de acuerdo a un estudio reciente (219). Sin embargo, el consumo de entre 3-4 yogures/día se relacionó con niveles más elevados de ácido isobutírico y valérico en comparación con el grupo de bajo consumo y consumo alto de yogur. En este sentido, los AGCC son el principal producto de fermentación de polisacáridos, oligosacáridos, proteínas y glicoproteínas, como las presentes en la mucina de la mucosa intestinal. El ácido valérico es producido en menores cantidades que el ácido acético, propiónico y butírico, y el ácido isobutírico es un ácido graso de cadena ramificada derivado del catabolismo intestinal de aminoácidos ramificados, tales como valina, leucina e isoleucina (222). Del mismo modo, el contenido en BAL del yogur podría contribuir a la producción de los AGCC. Mientras que sí se observaron diferencias en el consumo de fibra dietética entre grupos de consumo de yogur, el consumo de proteínas no fue diferente, ambos considerados como se ha mencionado anteriormente principales sustratos de fermentación de la microbiota intestinal. Al no observarse una correlación positiva entre los niveles de AGCC y el número total de yogures consumidos, estos resultados sugieren la existencia de otros factores que podría estar influyendo en los hallazgos encontrados, como se ha mencionado anteriormente. Por otro lado, un consumo alto de yogur (≥ 5 yogures/semana) se relacionó con una menor puntuación de síntomas intestinales en hombres, en concreto de flatulencia y ardores. En este sentido, la aparición de síntomas intestinales podría estar ocasionado por un

ambiente intestinal caracterizado por una actividad bacteriana alterada o la presencia de disbiosis, debido a una alteración en el eje intestino-cerebro, entre otros (223). En concreto, niveles aumentados o disminuidos de determinados grupos bacterianos se han asociado a la aparición de síntomas intestinales, como es el caso de niveles bajos de *Bifidobacterium* relacionados con una mayor hinchazón abdominal. En este sentido, sí se observó una correlación negativa entre *St. thermophilus* y la frecuencia e intensidad de ardores, sugiriendo una posible relación en este sentido.

Como se ha mencionado previamente, existen otros componentes del yogur que podrían influir en la respuesta de la microbiota intestinal y el sistema inmunitario al consumo de yogur. El efecto de la grasa dietética sobre la respuesta inmunitaria y la composición de la microbiota intestinal es bien conocido (224), destacando los diferentes efectos encontrados en función del tipo de AG presente en la dieta (78). Por este motivo, la realización del tercer trabajo de la presente tesis doctoral mediante una intervención con diseño cruzado tuvo como objetivo evaluar si el consumo de yogures con diferente composición nutricional influía de forma distinta sobre la microbiota intestinal y la situación inflamatoria de adultos aparentemente sanos con valores al límite o ligeramente altos de colesterol plasmático. Nuestros resultados sugieren que los efectos derivados del consumo de yogur de oveja entero y semidesnatado así como de vaca entero sobre la composición de la microbiota intestinal y los niveles de marcadores de inflamación no son diferentes en el grupo global de sujetos estudiados. Sin embargo, teniendo en cuenta el perfil metabólico de los participantes, el yogur de oveja entero atenuó los niveles de ciertos parámetros inflamatorios en un subgrupo de sujetos que presentaban el cociente colesterol total/HDL más elevado. En concreto, se observaron niveles más bajos de ICAM-1 y P-selectina en comparación con el yogur de vaca y oveja semidesnatado, respectivamente, así como de MCP-1 en comparación con el yogur de oveja semidesnatado y de vaca solo en mujeres de este grupo. Las diferencias encontradas entre los tres tipos de yogur podrían ser debidas al diferente perfil de AGS, ya que el yogur de oveja entero presenta mayor cantidad de AGCC y AGCM y menor de AGCL comparado con el yogur de vaca (Material suplementario artículo 3). En este sentido, los AGCM se han relacionado con efectos positivos sobre el metabolismo (225), al contrario de lo que sucede con los AGCL (226). Esto puede ser debido a su diferente metabolización en el organismo, ya que no se utilizan como fuente principal de energía para el colonocito y pasan de forma directa al hígado donde sufren β -oxidación y se acumulan en pequeña cantidad, mientras que los AGCL necesitan ser incorporados a quilomicrones y se transportan vía linfática al hígado, donde son más fácilmente acumulados en hígado y tejido adiposo (227). El yogur de oveja entero contiene a su vez mayor cantidad de calcio y péptidos bioactivos, como la β -caseína, nutrientes que se han relacionado con beneficios a nivel cardiovascular (228,229), por lo que también podrían influir en los efectos encontrados sobre los marcadores de inflamación. En cuanto a sus efectos sobre la microbiota intestinal, el consumo de yogur de oveja indujo niveles más bajos del grupo bacteriano *Blautia coccoides-Eubacterium rectale* en comparación con el yogur de oveja semidesnatado en mujeres del grupo de alto cociente colesterol total/HDL, pudiendo en este caso ser debido a la diferente cantidad de AG entre ambos. Por otro lado, también se observaron niveles más elevados de *Clostridium leptum* tras el consumo de yogur de vaca en comparación con el yogur de oveja semidesnatado en el grupo de sujetos con valores medios del cociente colesterol total/HDL. La relación entre la calidad de la grasa de la dieta y la modulación de la microbiota intestinal está

bien documentada, aunque el número de estudios realizados con el objetivo de evaluar el efecto de los AGCC y AGCM de forma aislada sobre la microbiota intestinal es escaso. Entre ellos, un estudio realizado en ratones que recibieron un tratamiento con triacilglicéridos de cadena media reveló resultados similares a los nuestros, observándose un menor cociente Firmicutes/Bacteroidetes debido a una disminución en la familia *Lachnospiraceae*, de la cual *Blautia coccooides* forma parte, así como una modulación de la expresión de genes lipídicos en el hígado y reducción de la grasa visceral (230). Los mecanismos a través de los cuales la grasa ejerce efectos sobre la composición de los grupos bacterianos no son muy conocidos. Inicialmente se pensaba que la grasa dietética se digería completamente en el intestino delgado, pero en la actualidad hay evidencia de que un 7% llega al colon en forma de AG libres (69), los cuales pueden ejercer actividad bactericida sobre la pared celular de determinados grupos bacterianos (71), inhibiendo unos grupos y favoreciendo el crecimiento de otros. Como se ha mencionado anteriormente, el exceso de grasa saturada en la alimentación puede conllevar un aumento de LPS de bacterias Gram- en plasma al transportarse de manera conjunta a través de quilomicrones (77). Otro mecanismo involucrado podría estar relacionado con procesos de desconjugación de sales biliares primarias a sales biliares secundarias que llevan a cabo algunos grupos bacterianos como *Clostridium* o *Eubacterium* (72). Un aspecto importante a tener en cuenta es que las dietas consumidas por los participantes eran altas en grasa (>35% del total de kilocalorías), por lo que el aporte de los diferentes AG a través de la ingesta de los tres tipos de yogur podría contribuir a los efectos de la grasa total sobre los grupos de *Clostridium*, los cuales se han relacionado en diferentes estudios con efectos sobre el metabolismo y la inflamación (231,232). El hecho de que la ingesta dietética de los sujetos de estudio no cambiara a lo largo de las intervenciones, sin incluir el aporte de los yogures, y dada la importancia que tiene la dieta como uno de los principales factores moduladores de la microbiota intestinal (12), sugiere que los efectos encontrados sobre los grupos de *Clostridium* podrían ser atribuidos a la diferente composición nutricional entre los tres tipos de yogur.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

6.1. Conclusiones específicas

1. El consumo de la cepa probiótica *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 (Lc) dos semanas anteriores a la vacunación aumenta de forma significativa los niveles de anticuerpos específicos del virus de la Hepatitis A en sangre en comparación con el grupo placebo, sin observarse este efecto cuando el consumo se prolonga hasta 4 semanas después de la vacunación. Estos resultados sugieren que la capacidad coadyuvante de la cepa probiótica Lc parece ser dependiente del momento de administración. La incorporación de medidas adicionales de parámetros de inmunidad innata o reguladora a las 2 o 3 semanas de la vacunación podría aportar más claridad en torno a los mecanismos subyacentes a través de los cuales la cepa modula la respuesta inmunitaria específica.
2. El consumo de la cepa probiótica Lc durante 6 semanas produce un aumento en los niveles de linfocitos T CD4+de memoria en comparación con los niveles basales, sugiriendo su posible papel en la mejora de la memoria inmunológica. Sin embargo, sería necesario medir la memoria específica frente al virus de la Hepatitis A con el objetivo de confirmar su papel en la protección frente a una futura infección.
3. El consumo de cepas probióticas de los géneros *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* presentes en leches fermentadas no se relaciona con cambios a nivel global de la microbiota intestinal, pero sí se asocia con niveles más elevados de las bacterias ingeridas en heces, en concreto de Bifidobacterias, en comparación con el grupo de no consumidores.
4. Los niveles más elevados de Bifidobacterias observados tras el consumo de leches fermentadas con probióticos (LFP) parece ser dependiente del tipo de cepa probiótica presente en el producto. En este sentido, el consumo de LFP con *Lactobacillus* se relaciona con niveles más elevados de Bifidobacterias a nivel de filo, familia y género, y de dos de las especies autóctonas más abundantes en adultos sanos, *B. longum* y *B. kashiwanohense*, sugiriendo así un posible beneficio en el ecosistema intestinal para los consumidores de este tipo específico de LFP. Por otro lado, el consumo de LFP con *Bifidobacterium* se relaciona con niveles más elevados de especies minoritarias de *Bifidobacterium* y en concreto de *B. animalis*, que se explicaría por la ingesta de LFP que la contienen.
5. El consumo de yogur no se relaciona con la composición de la microbiota intestinal de adultos sanos. En concreto, sólo se observó una relación entre el consumo alto de yogur (≥ 5 unidades/semana) y niveles más altos de *St. thermophilus* y de la familia *Streptococaceae* en comparación con un consumo bajo ($>0-2$ unidades/semana) o el grupo de no consumidores.
6. El consumo de yogures de oveja semidesnatado y entero no produce efectos diferentes al yogur de vaca entero sobre la composición de la microbiota intestinal y los niveles de marcadores inflamatorios en adultos aparentemente sanos con valores al límite o ligeramente altos de colesterol plasmático.
7. Al considerar el perfil metabólico de los sujetos de estudio, el consumo de yogur de oveja entero atenuó los valores de algunos parámetros inflamatorios, como ICAM-1 y P-selectina, en comparación con el yogur de vaca y oveja semidesnatado respectivamente, en los 10 sujetos con

los valores más altos del cociente colesterol total/HDL dentro del grupo estudiado, así como de MCP-1 y bacterias del grupo *Eubacterium rectale-Blautia coccoides* solo en mujeres de este grupo. Estos resultados sugieren que tanto la calidad como la cantidad de determinados componentes del yogur, como los AG saturados de cadena corta y media, calcio y péptidos bioactivos podrían estar involucrados en tales hallazgos. Dada la evidencia existente acerca del posible papel de especies como *C. coccoides* sobre el metabolismo y la respuesta inflamatoria del huésped, sería interesante realizar un futuro estudio para poder confirmar la idoneidad de cada tipo de yogur dependiendo de la situación metabólica de los sujetos de estudio.

8. El consumo de yogur se relaciona con un mejor perfil nutricional tanto en hombres como en mujeres; en concreto, con una mayor ingesta de fibra y menor de grasa saturada, observándose diferentes asociaciones en función del tipo de yogur consumido (entero/desnatado) y del género de los participantes. Estos hallazgos sugieren la necesidad de un futuro estudio de intervención realizado de forma separada en hombres y mujeres con diferentes tipos de yogures con el objetivo de evaluar los posibles beneficios asociados a su consumo sobre la salud metabólica, el sistema inmunitario e intestinal del huésped.

6.2. Conclusión global

Como era de esperar partiendo de lo reflejado en la literatura concerniente a adultos sanos, el consumo de probióticos y yogures en este tipo de población no se asocia con grandes cambios en la microbiota intestinal ni en parámetros inmuno-inflamatorios. Sin embargo, en situaciones concretas, tales como la provocación de respuestas específicas como el modelo de vacunación utilizado en la presente tesis doctoral, o el estudio en población sana con un determinado perfil metabólico de riesgo, es posible observar una modulación en ciertos parámetros como el aumento de anticuerpos específicos tras el consumo diario durante 2 semanas de la cepa probiótica *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 (3×10^9 ufc/día) o la atenuación en marcadores de inflamación observada tras el consumo de 2 yogures de leche de oveja entera al día. Los resultados del estudio observacional sugieren que el consumo de leches fermentadas con probióticos, en concreto, de la especie *Lactobacillus*, podría ser beneficioso para la salud inmunitaria e intestinal del huésped al relacionarse con niveles más elevados de Bifidobacterias. En este sentido, se proponen dos futuros enfoques: por un lado, confirmar los efectos beneficiosos de los nutrientes del yogur entero de oveja sobre la salud metabólica, inmunológica e intestinal en un estudio con un mayor tamaño muestral de adultos aparentemente sanos con un perfil metabólico de riesgo. Por otro, el análisis de los efectos de LFP con *Lactobacillus* sobre especies concretas de Bifidobacterias en un estudio de intervención, junto con el análisis de parámetros de genómica funcional y metabolitos microbianos, podría aportar más claridad en torno a sus posibles mecanismos de acción y los beneficios asociados a su consumo en adultos sanos, que representan una población susceptible de sufrir alteraciones intestinales e inmunitarias dado el estilo de vida imperante en la sociedad actual de países en avanzado desarrollo.

7. REFERENCIAS

7. REFERENCIAS

1. World Health Organization. Definition of Health. Preamble to the Constitution of the World Health Organization as Adopted by the International Health Conference. 1948.
2. van Ommen B, Keijer J, Heil SG, Kaput J. Challenging homeostasis to define biomarkers for nutrition related health. *Mol Nutr Food Res*. 2009 Jul;53(7):795–804.
3. Arnold CN, Goel A, Blum HE, Boland CR. Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer*. 2005 Nov 15;104(10):2035–47.
4. Philpott M, Ferguson LR. Immunonutrition and cancer. *Mutat Res*. 2004 Jul 13;551(1–2):29–42.
5. Bo S, Ciccone G, Pearce N, Merletti F, Gentile L, Cassader M, et al. Prevalence of undiagnosed metabolic syndrome in a population of adult asymptomatic subjects. *Diabetes Res Clin Pract*. 2007 Mar;75(3):362–5.
6. WHA57.17 Global strategy on diet, physical activity and health.
7. Almeida DL, Pavanello A, Saavedra LP, Pereira TS, de Castro-Prado MAA, de Freitas Mathias PC. Environmental monitoring and the developmental origins of health and disease. *J Dev Orig Health Dis*. 2019 May 27;1–8.
8. Rinninella E, Raoul P, Cintoni M, Franceschi F, Miggiano G, Gasbarrini A, et al. What is the Healthy Gut Microbiota Composition? A Changing Ecosystem across Age, Environment, Diet, and Diseases. *Microorganisms*. 2019 Jan 10;7(1):14.
9. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv Nutr*. 2019 Jan 1;10(suppl_1):S49–66.
10. Mónica de la Fuente. Funcionamiento del sistema inmunitario. In: Marcos A, editor. *Inmunonutrición en la salud y en la enfermedad*. 1st ed. Madrid: Panamericana; 2011. p. 2–25.
11. Zhang J-M, An J. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*. 2007;45(2):27–37.
12. Bäckhed F, Fraser CM, Ringel Y, Sanders ME, Sartor RB, Sherman PM, et al. Defining a healthy human gut microbiome: current concepts, future directions, and clinical applications. *Cell Host Microbe*. 2012 Nov 15;12(5):611–22.
13. Calder PC. Immunological parameters: what do they mean? *J Nutr*. 2007 Mar 1;137(3 Suppl 2):773S–80S.
14. Rizzardini G, Eskesen D, Calder PC, Capetti A, Jespersen L, Clerici M. Evaluation of the immune benefits of two probiotic strains *Bifidobacterium animalis ssp. lactis*, BB-12® and *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*, L. casei 431® in an influenza vaccination model: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Br J Nutr*. 2012 Mar 28;107(6):876–84.

15. Brodin P, Jojic V, Gao T, Bhattacharya S, Angel CJL, Furman D, et al. Variation in the human immune system is largely driven by non-heritable influences. *Cell*. 2015 Jan 15;160(1-2):37-47.
16. Guidance on the scientific requirements for health claims related to gut and immune function. *EFSA J*. 2011 Apr;9(4):1984.
17. Castro-Piñero J, Perez-Bey A, Cuenca-Garcia M, Cabanas-Sanchez V, Gómez-Martínez S, Veiga OL, et al. Muscle Fitness Cut Points for Early Assessment of Cardiovascular Risk in Children and Adolescents. *J Pediatr*. 2019 Mar;206:134-141.e3.
18. C. S. WHO | Vaccine immunology (general aspects of vaccination). WHO. 2013;
19. Crotty S. A brief history of T cell help to B cells. *Nat Rev Immunol*. 2015 Mar 13;15(3):185-9.
20. Geginat J, Paroni M, Maglie S, Alfen JS, Kastirr I, Gruarin P, et al. Plasticity of Human CD4 T Cell Subsets. *Front Immunol*. 2014 Dec 16;5:630.
21. Bentebibel S-E, Lopez S, Obermoser G, Schmitt N, Mueller C, Harrod C, et al. Induction of ICOS+CXCR3+CXCR5+ TH cells correlates with antibody responses to influenza vaccination. *Sci Transl Med*. 2013 Mar 13;5(176):176ra32.
22. Plotkin SA. Complex correlates of protection after vaccination. *Clin Infect Dis*. 2013 May 15;56(10):1458-65.
23. Goodnow CC, Vinuesa CG, Randall KL, Mackay F, Brink R. Control systems and decision making for antibody production. *Nat Immunol*. 2010 Aug 20;11(8):681-8.
24. Flehmig B1, Staedele H, Xueref C, Vidor E, Zuckerman J ZA. Early appearance of neutralizing antibodies after vaccination with an inactivated hepatitis A vaccine. - PubMed - NCBI.
25. Kalia V, Sarkar S, Gourley TS, Rouse BT, Ahmed R. Differentiation of memory B and T cells. *Curr Opin Immunol*. 2006 Jun;18(3):255-64.
26. Good-Jacobson KL, Shlomchik MJ. Plasticity and heterogeneity in the generation of memory B cells and long-lived plasma cells: the influence of germinal center interactions and dynamics. *J Immunol*. 2010 Sep 15;185(6):3117-25.
27. Lee S, Nguyen MT. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Netw*. 2015 Apr;15(2):51-7.
28. Brodin P, Davis MM. Human immune system variation. *Nat Rev Immunol*. 2017 Jan 5;17(1):21-9.
29. Dopico XC, Evangelou M, Ferreira RC, Guo H, Pekalski ML, Smyth DJ, et al. Widespread seasonal gene expression reveals annual differences in human immunity and physiology. *Nat Commun*. 2015 Nov 12;6(1):7000.
30. Cutolo M, Straub RH. Circadian rhythms in arthritis: Hormonal effects on the immune/inflammatory reaction. *Autoimmun Rev*. 2008 Jan;7(3):223-8.
31. vom Steeg LG, Klein SL. Sex Matters in Infectious Disease Pathogenesis. Heitman J, editor. *PLoS Pathog*. 2016 Feb 18;12(2):e1005374.

32. Fish EN. The X-files in immunity: sex-based differences predispose immune responses. *Nat Rev Immunol.* 2008 Sep;8(9):737–44.
33. Yurkovetskiy L, Burrows M, Khan AA, Graham L, Volchkov P, Becker L, et al. Gender bias in autoimmunity is influenced by microbiota. *Immunity.* 2013 Aug 22;39(2):400–12.
34. Bianchi I, Lleo A, Gershwin ME, Invernizzi P. The X chromosome and immune associated genes. *J Autoimmun.* 2012 May;38(2–3):J187–92.
35. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiota shapes intestinal immune responses during health and disease. *Nat Rev Immunol.* 2009 May;9(5):313–23.
36. Misch EA, Hawn TR. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to human disease. *Clin Sci.* 2008 Mar 1;114(5):347–60.
37. Qiu F, Liang C-L, Liu H, Zeng Y-Q, Hou S, Huang S, et al. Impacts of cigarette smoking on immune responsiveness: Up and down or upside down? *Oncotarget.* 2017 Jan 3;8(1).
38. Díaz L, Montero A, González-Gross M, Vallejo A, Romeo J, Marcos A. Influence of alcohol consumption on immunological status: a review. *Eur J Clin Nutr.* 2002 Aug 30;56(S3):S50–3.
39. Shroff KE, Cebra JJ. Development of mucosal humoral immune responses in germ-free (GF) mice. *Adv Exp Med Biol.* 1995;371A:441–6.
40. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med.* 2016 Dec 27;8(1):51.
41. Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science.* 2010 Dec 24;330(6012):1768–73.
42. Neish AS. Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology.* 2009 Jan;136(1):65–80.
43. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature.* 2010 Mar 4;464(7285):59–65.
44. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature.* 2007 Oct 18;449(7164):804–10.
45. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature.* 2012 Oct 4;490(7418):55–60.
46. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature.* 2012 Jun 13;486(7402):207–14.
47. Tap J, Mondot S, Levenez F, Pelletier E, Caron C, Furet J-P, et al. Towards the human intestinal microbiota phylogenetic core. *Environ Microbiol.* 2009 Oct;11(10):2574–84.
48. Reuter G. The Lactobacillus and Bifidobacterium microflora of the human intestine: composition and succession. *Curr Issues Intest Microbiol.* 2001 Sep;2(2):43–53.
49. Derrien M, van Hylckama Vlieg JET. Fate, activity, and impact of ingested bacteria within the human gut microbiota. *Trends Microbiol.* 2015 Jun;23(6):354–66.

50. McNulty NP, Yatsunenkov T, Hsiao A, Faith JJ, Muegge BD, Goodman AL, et al. The impact of a consortium of fermented milk strains on the gut microbiome of gnotobiotic mice and monozygotic twins. *Sci Transl Med*. 2011 Oct 26;3(106):106ra106.
51. Shafquat A, Joice R, Simmons SL, Huttenhower C. Functional and phylogenetic assembly of microbial communities in the human microbiome. *Trends Microbiol*. 2014 May;22(5):261–6.
52. Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramatsu T, Ichimura A, Kimura I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients*. 2015 Apr 14;7(4):2839–49.
53. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108 Suppl(Supplement_1):4578–85.
54. Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The Impact of the Gut Microbiota on Human Health: An Integrative View. *Cell*. 2012 Mar;148(6):1258–70.
55. Biagi E, Rampelli S, Turroni S, Quercia S, Candela M, Brigidi P. The gut microbiota of centenarians: Signatures of longevity in the gut microbiota profile. *Mech Ageing Dev*. 2017 Jul;165(Pt B):180–4.
56. Candela M, Biagi E, Maccaferri S, Turroni S, Brigidi P. Intestinal microbiota is a plastic factor responding to environmental changes. *Trends Microbiol*. 2012 Aug;20(8):385–91.
57. Tanaka M, Nakayama J. Development of the gut microbiota in infancy and its impact on health in later life. *Allergol Int*. 2017 Oct;66(4):515–22.
58. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016 Jun 27;16(6):341–52.
59. Belkaid Y, Harrison OJ. Homeostatic Immunity and the Microbiota. *Immunity*. 2017 Apr 18;46(4):562–76.
60. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol*. 2010 Mar;10(3):159–69.
61. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*. 2012 Sep 13;489(7415):231–41.
62. Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S. Probiotics: effects on immunity. *Am J Clin Nutr*. 2001 Feb 1;73(2):444s–450s.
63. Quiding-Järbrink M, Lakew M, Nordström I, Banchereau J, Butcher E, Holmgren J, et al. Human circulating specific antibody-forming cells after systemic and mucosal immunizations: differential homing commitments and cell surface differentiation markers. *Eur J Immunol*. 1995 Feb;25(2):322–7.
64. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The Effect of Diet on the Human Gut Microbiome: A Metagenomic Analysis in Humanized Gnotobiotic Mice. *Sci Transl Med*. 2009 Nov 11;1(6):6ra14–6ra14.
65. Pokusaeva K, Fitzgerald GF, van Sinderen D. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacteria*. *Genes Nutr*. 2011 Aug 16;6(3):285–306.

66. Marín L, Miguélez EM, Villar CJ, Lombó F. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism: antimicrobial properties. *Biomed Res Int*. 2015;2015:905215.
67. Liu H, Wang J, He T, Becker S, Zhang G, Li D, et al. Butyrate: A Double-Edged Sword for Health? *Adv Nutr*. 2018 Jan 1;9(1):21–9.
68. Salonen A, de Vos WM. Impact of diet on human intestinal microbiota and health. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2014 Feb 28;5(1):239–62.
69. Cândido FG, Valente FX, Grześkowiak LM, Moreira APB, Rocha DMUP, Alfenas R de CG. Impact of dietary fat on gut microbiota and low-grade systemic inflammation: mechanisms and clinical implications on obesity. *Int J Food Sci Nutr*. 2018 Mar 17;69(2):125–43.
70. Gabert L, Vors C, Louche-Pélissier C, Sauvinet V, Lambert-Porcheron S, Draï J, et al. ¹³C tracer recovery in human stools after digestion of a fat-rich meal labelled with [1,1,1-¹³C₃]tripalmitin and [1,1,1-¹³C₃]triolein. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2011 Oct 15;25(19):2697–703.
71. Yoon B, Jackman J, Valle-González E, Cho N-J, Yoon BK, Jackman JA, et al. Antibacterial Free Fatty Acids and Monoglycerides: Biological Activities, Experimental Testing, and Therapeutic Applications. *Int J Mol Sci*. 2018 Apr 8;19(4):1114.
72. Ridlon JM, Kang D-J, Hylemon PB. Bile salt biotransformations by human intestinal bacteria. *J Lipid Res*. 2006 Feb;47(2):241–59.
73. Chávez-Talavera O, Tailleux A, Lefebvre P, Staels B. Bile Acid Control of Metabolism and Inflammation in Obesity, Type 2 Diabetes, Dyslipidemia, and Nonalcoholic Fatty Liver Disease. *Gastroenterology*. 2017 May;152(7):1679-1694.e3.
74. Araújo JR, Tomas J, Brenner C, Sansonetti PJ. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie*. 2017 Oct;141:97–106.
75. Jin J, Zhang X, Lu Z, Perry DM, Li Y, Russo SB, et al. Acid sphingomyelinase plays a key role in palmitic acid-amplified inflammatory signaling triggered by lipopolysaccharide at low concentrations in macrophages. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013 Oct 1;305(7):E853-67.
76. Innes JK, Calder PC. Omega-6 fatty acids and inflammation. *Prostaglandins, Leukot Essent Fat Acids*. 2018 May;132:41–8.
77. Cani PD, Amar J, Iglesias MA, Poggi M, Knauf C, Bastelica D, et al. Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes*. 2007 Jul 1;56(7):1761–72.
78. Patterson E, O' Doherty RM, Murphy EF, Wall R, O' Sullivan O, Nilaweera K, et al. Impact of dietary fatty acids on metabolic activity and host intestinal microbiota composition in C57BL/6J mice. *Br J Nutr*. 2014 Jun 14;111(11):1905–17.
79. Zhou S, Wang Y, Jacoby JJ, Jiang Y, Zhang Y, Yu LL. Effects of Medium- and Long-Chain Triacylglycerols on Lipid Metabolism and Gut Microbiota Composition in C57BL/6J Mice. *J Agric Food Chem*. 2017 Aug 9;65(31):6599–607.
80. Aoyama T, Nosaka N, Kasai M. Research on the nutritional characteristics of medium-chain fatty acids. *J Med Invest*. 2007 Aug;54(3–4):385–8.

81. Poglio S, De Toni-Costes F, Arnaud E, Laharrague P, Espinosa E, Casteilla L, et al. Adipose Tissue as a Dedicated Reservoir of Functional Mast Cell Progenitors. *Stem Cells*. 2010 Nov;28(11):2065–72.
82. Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct 22;6(10):772–83.
83. Mujico JR, Baccan GC, Gheorghe A, Díaz LE, Marcos A. Changes in gut microbiota due to supplemented fatty acids in diet-induced obese mice. *Br J Nutr*. 2013 Aug 28;110(4):711–20.
84. Lilly DM, Stillwell RH. Probiotics: Growth-promoting factors produced by microorganisms. *Science*. 1965 Feb 12;147(3659):747–8.
85. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug 10;11(8):506–14.
86. Metchnikoff E. The prolongation of life. Optimistic studies. In 1908.
87. F T. Treatment of intestinal infections using bacterial flora of the intestine. *Crit Rev Soc Biol*. 1906;60:359–61.
88. Rettger LF CH. *Bacillus acidophilus* and its therapeutic application. *Arch Intern Med*. 1922;29:357–67.
89. Kopeloff N, Blackman N MB. The incidence of *Lactobacillus acidophilus* in adults. *Infect Dis*. 1932;50(426–429).
90. FERRER FP, BOYD LJ. Effect of yogurt with prune whip on constipation. *Am J Dig Dis*. 1955 Sep;22(9):272–3.
91. Guarner F, Khan AG, Garisch J, Eliakim R, Gangl A, Thomson A, et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics October 2011. *J Clin Gastroenterol*. 2012 Jul;46(6):468–81.
92. Sanders ME. How do we know when something called “probiotic” is really a probiotic? A guideline for consumers and health care professionals. *Funct Food Rev*. 2009;1:3–12.
93. Nations F and AO of the U, Organization WH. Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Joint FAO/WHO working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Food and Agricultural Organization of the United Nations. 2002.
94. Everard A, Belzer C, Geurts L, Ouwerkerk JP, Druart C, Bindels LB, et al. Cross-talk between *Akkermansia muciniphila* and intestinal epithelium controls diet-induced obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 May 28;110(22):9066–71.
95. Sokol H, Pigneur B, Watterlot L, Lakhdari O, Bermudez-Humaran LG, Gratadoux J-J, et al. *Faecalibacterium prausnitzii* is an anti-inflammatory commensal bacterium identified by gut microbiota analysis of Crohn disease patients. *Proc Natl Acad Sci*. 2008 Oct 28;105(43):16731–6.
96. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, et al. Treg induction

- by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature*. 2013 Aug 8;500(7461):232–6.
97. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014 Aug 10;11(8):506–14.
 98. Mercasa. Tendencias en los mercados mundiales de leche y productos lácteos. *Distribución y Consumo*. 2015.
 99. Yaqoob P. Ageing, immunity and influenza: a role for probiotics? *Proc Nutr Soc*. 2014 May 3;73(2):309–17.
 100. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA J*. 2010 Oct 1;8(10).
 101. Lomax AR, Calder PC. Probiotics, immune function, infection and inflammation: a review of the evidence from studies conducted in humans. *Curr Pharm Des*. 2009;15(13):1428–518.
 102. Maidens C, Childs C, Przemska A, Dayel I Bin, Yaqoob P. Modulation of vaccine response by concomitant probiotic administration. *Br J Clin Pharmacol*. 2013 Mar;75(3):663–70.
 103. Muñoz-Quezada S, Bermudez-Brito M, Chenoll E, Genovés S, Gomez-Llorente C, Plaza-Díaz J, et al. Competitive inhibition of three novel bacteria isolated from faeces of breast milk-fed infants against selected enteropathogens. *Br J Nutr*. 2013 Jan 29;109 Suppl 2(S2):S63-9.
 104. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic Mechanisms of Action. *Ann Nutr Metab*. 2012;61(2):160–74.
 105. Mantis NJ, Rol N, Corthésy B. Secretory IgA's complex roles in immunity and mucosal homeostasis in the gut. *Mucosal Immunol*. 2011 Nov 5;4(6):603–11.
 106. Maldonado Galdeano C, Cazorla SI, Lemme Dumit JM, Vélez E, Perdigon G. Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System. *Ann Nutr Metab*. 2019;74(2):115–24.
 107. Yamasaki-Yashiki S, Miyoshi Y, Nakayama T, Kunisawa J, Katakura Y. IgA-enhancing effects of membrane vesicles derived from *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* NBRC15893. *Biosci microbiota, food Heal*. 2019;38(1):23–9.
 108. Maldonado Galdeano C, Cazorla SI, Lemme Dumit JM, Vélez E, Perdigon G. Beneficial Effects of Probiotic Consumption on the Immune System. *Ann Nutr Metab*. 2019;74(2):115–24.
 109. Vitetta L, Saltzman E, Thomsen M, Nikov T, Hall S. Adjuvant Probiotics and the Intestinal Microbiome: Enhancing Vaccines and Immunotherapy Outcomes. *Vaccines*. 2017 Dec 11;5(4):50.
 110. Galdeano CM, Perdigon G. Role of viability of probiotic strains in their persistence in the gut and in mucosal immune stimulation. *J Appl Microbiol*. 2004 Oct;97(4):673–81.

111. Hoarau C, Martin L, Faugaret D, Baron C, Dauba A, Aubert-Jacquin C, et al. Supernatant from bifidobacterium differentially modulates transduction signaling pathways for biological functions of human dendritic cells. Pockley G, editor. PLoS One. 2008 Jul 23;3(7):e2753.
112. Matsuguchi T, Takagi A, Matsuzaki T, Nagaoka M, Ishikawa K, Yokokura T, et al. Lipoteichoic Acids from Lactobacillus Strains Elicit Strong Tumor Necrosis Factor Alpha-Inducing Activities in Macrophages through Toll-Like Receptor 2. Clin Vaccine Immunol. 2003 Mar 1;10(2):259–66.
113. MacDonald TT, Bell I. Probiotics and the immune response to vaccines. Proc Nutr Soc. 2010 Aug 14;69(3):442–6.
114. Pot B, Foligné B, Daniel C, Grangette C. Understanding immunomodulatory effects of probiotics. Nestle Nutr Inst Workshop Ser. 2013;77:75–90.
115. Castillo NA, de Moreno de LeBlanc A, M Galdeano C, Perdigon G. Comparative study of the protective capacity against Salmonella infection between probiotic and nonprobiotic Lactobacilli. J Appl Microbiol. 2013 Mar;114(3):861–76.
116. Kwon H-K, Lee C-G, So J-S, Chae C-S, Hwang J-S, Sahoo A, et al. Generation of regulatory dendritic cells and CD4+Foxp3+ T cells by probiotics administration suppresses immune disorders. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Feb 2;107(5):2159–64.
117. Belenguer A, Duncan SH, Calder AG, Holtrop G, Louis P, Lobley GE, et al. Two Routes of Metabolic Cross-Feeding between Bifidobacterium adolescentis and Butyrate-Producing Anaerobes from the Human Gut. Appl Environ Microbiol. 2006 May 1;72(5):3593–9.
118. Christensen HR, Larsen CN, Kaestel P, Rosholm LB, Sternberg C, Michaelsen KF, et al. Immunomodulating potential of supplementation with probiotics: a dose-response study in healthy young adults. FEMS Immunol Med Microbiol. 2006 Aug;47(3):380–90.
119. Shida K, Sato T, Iizuka R, Hoshi R, Watanabe O, Igarashi T, et al. Daily intake of fermented milk with Lactobacillus casei strain Shirota reduces the incidence and duration of upper respiratory tract infections in healthy middle-aged office workers. Eur J Nutr. 2017 Feb;56(1):45–53.
120. Olivares M, Paz Díaz-Ropero M, Gómez N, Sierra S, Lara-Villoslada F, Martín R, et al. Dietary deprivation of fermented foods causes a fall in innate immune response. Lactic acid bacteria can counteract the immunological effect of this deprivation. J Dairy Res. 2006 Nov 21;73(4):492–8.
121. Klein A, Friedrich U, Vogelsang H, Jahreis G. Lactobacillus acidophilus 74-2 and Bifidobacterium animalis subsp lactis DGCC 420 modulate unspecific cellular immune response in healthy adults. Eur J Clin Nutr. 2008 May 18;62(5):584–93.
122. Sierra S, Lara-Villoslada F, Sempere L, Olivares M, Boza J, Xaus J. Intestinal and immunological effects of daily oral administration of Lactobacillus salivarius CECT5713 to healthy adults. Anaerobe. 2010 Jun;16(3):195–200.
123. Meng H, Lee Y, Ba Z, Peng J, Lin J, Boyer AS, et al. Consumption of Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 impacts upper respiratory tract infection and the function of NK and T cells in healthy adults. Mol Nutr Food Res. 2016 May;60(5):1161–71.

124. King S, Glanville J, Sanders ME, Fitzgerald A, Varley D. Effectiveness of probiotics on the duration of illness in healthy children and adults who develop common acute respiratory infectious conditions: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr.* 2014 Jul 14;112(1):41–54.
125. Hao Q, Dong BR, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev.* 2015 Feb 3;(2):CD006895.
126. Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda F, Gil-Campos M, Gil A. Immune-Mediated Mechanisms of Action of Probiotics and Synbiotics in Treating Pediatric Intestinal Diseases. *Nutrients.* 2018 Jan 5;10(1):42.
127. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S, Lara-Villoslada F, Fonollá J, Navas M, et al. Oral intake of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition.* 2007 Mar;23(3):254–60.
128. Jespersen L, Tarnow I, Eskesen D, Morberg CM, Michelsen B, Bügel S, et al. Effect of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, L. casei 431 on immune response to influenza vaccination and upper respiratory tract infections in healthy adult volunteers: a randomized, double-blind, placebo-controlled, parallel-group study. *Am J Clin Nutr.* 2015 Jun 1;101(6):1188–96.
129. Davidson LE, Fiorino A-M, Snyderman DR, Hibberd PL. *Lactobacillus GG* as an immune adjuvant for live-attenuated influenza vaccine in healthy adults: a randomized double-blind placebo-controlled trial. *Eur J Clin Nutr.* 2011 Apr 2;65(4):501–7.
130. de Vrese M, Winkler P, Rautenberg P, Harder T, Noah C, Laue C, et al. Probiotic bacteria reduced duration and severity but not the incidence of common cold episodes in a double blind, randomized, controlled trial. *Vaccine.* 2006 Nov 10;24(44–46):6670–4.
131. Paineau D, Carcano D, Leyer G, Darquy S, Alyanakian M-A, Simoneau G, et al. Effects of seven potential probiotic strains on specific immune responses in healthy adults: a double-blind, randomized, controlled trial. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2008 Jun;53(1):107–13.
132. Boge T, Rémy M, Vaudaine S, Tanguy J, Bourdet-Sicard R, van der Werf S. A probiotic fermented dairy drink improves antibody response to influenza vaccination in the elderly in two randomised controlled trials. *Vaccine.* 2009 Sep;27(41):5677–84.
133. Tannock GW, Munro K, Harmsen HJM, Welling GW, Smart J, Gopal PK. Analysis of the Fecal Microflora of Human Subjects Consuming a Probiotic Product Containing *Lactobacillus rhamnosus* DR20. *Appl Environ Microbiol.* 2000 Jun 1;66(6):2578–88.
134. Kim B-R, Shin J, Guevarra RB, Lee JH, Kim DW, Seol K-H, et al. Deciphering Diversity Indices for a Better Understanding of Microbial Communities. *J Microbiol Biotechnol.* 2017 Dec 28;27(12):2089–93.
135. Olivares M, Díaz-Ropero MAP, Gómez N, Lara-Villoslada F, Sierra S, Maldonado JA, et al. Oral administration of two probiotic strains, *Lactobacillus gasseri* CECT5714 and *Lactobacillus coryniformis* CECT5711, enhances the intestinal function of healthy adults. *Int J Food Microbiol.* 2006 Mar 15;107(2):104–11.
136. Zhang H, Sun J, Liu X, Hong C, Zhu Y, Liu A, et al. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* LC01 positively modulates intestinal microflora in healthy young adults. *J*

137. Savard P, Lamarche B, Paradis M-E, Thiboutot H, Laurin É, Roy D. Impact of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5-containing yoghurt, on fecal bacterial counts of healthy adults. *Int J Food Microbiol.* 2011 Sep;149(1):50–7.
138. Zhang J, Wang L, Guo Z, Sun Z, Gesudu Q, Kwok L, et al. 454 pyrosequencing reveals changes in the faecal microbiota of adults consuming *Lactobacillus casei* Zhang. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014 Jun;88(3):612–22.
139. Volokh O, Klimenko N, Berezhnaya Y, Tyakht A, Nesterova P, Popenko A, et al. Human Gut Microbiome Response Induced by Fermented Dairy Product Intake in Healthy Volunteers. *Nutrients.* 2019 Mar 4;11(3):547.
140. Moens F, Verce M, De Vuyst L. Lactate- and acetate-based cross-feeding interactions between selected strains of lactobacilli, bifidobacteria and colon bacteria in the presence of inulin-type fructans. *Int J Food Microbiol.* 2017 Jan 16;241:225–36.
141. Turrone F, Bottacini F, Foroni E, Mulder I, Kim J-H, Zomer A, et al. Genome analysis of *Bifidobacterium bifidum* PRL2010 reveals metabolic pathways for host-derived glycan foraging. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 Nov 9;107(45):19514–9.
142. Larsen CN, Nielsen S, Kaestel P, Brockmann E, Bennedsen M, Christensen HR, et al. Dose-response study of probiotic bacteria *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* BB-12 and *Lactobacillus paracasei* subsp *paracasei* CRL-341 in healthy young adults. *Eur J Clin Nutr.* 2006 Nov 24;60(11):1284–93.
143. Burton KJ, Rosikiewicz M, Pimentel G, Bütikofer U, von Ah U, Voirol M-J, et al. Probiotic yogurt and acidified milk similarly reduce postprandial inflammation and both alter the gut microbiota of healthy, young men. *Br J Nutr.* 2017 May 14;117(9):1312–22.
144. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature.* 2013 Aug 29;500(7464):541–6.
145. Kristensen NB, Bryrup T, Allin KH, Nielsen T, Hansen TH, Pedersen O. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome Med.* 2016 Dec 10;8(1):52.
146. Kim S-W, Suda W, Kim S, Oshima K, Fukuda S, Ohno H, et al. Robustness of gut microbiota of healthy adults in response to probiotic intervention revealed by high-throughput pyrosequencing. *DNA Res.* 2013 Jun 1;20(3):241–53.
147. Ferrario C, Taverniti V, Milani C, Fiore W, Laureati M, De Noni I, et al. Modulation of fecal Clostridiales bacteria and butyrate by probiotic intervention with *Lactobacillus paracasei* DG varies among healthy adults. *J Nutr.* 2014 Nov 1;144(11):1787–96.
148. Thorning TK, Bertram HC, Bonjour J-P, de Groot L, Dupont D, Feeney E, et al. Whole dairy matrix or single nutrients in assessment of health effects: current evidence and knowledge gaps. *Am J Clin Nutr.* 2017 May;105(5):1033–45.
149. Claesson MJ, O’Sullivan O, Wang Q, Nikkilä J, Marchesi JR, Smidt H, et al. Comparative Analysis of Pyrosequencing and a Phylogenetic Microarray for Exploring Microbial

- Community Structures in the Human Distal Intestine. Ahmed N, editor. PLoS One. 2009 Aug 20;4(8):e6669.
150. Haro C, Rangel-Zúñiga OA, Alcalá-Díaz JF, Gómez-Delgado F, Pérez-Martínez P, Delgado-Lista J, et al. Intestinal Microbiota Is Influenced by Gender and Body Mass Index. Sanz Y, editor. PLoS One. 2016 May 26;11(5):e0154090.
 151. Fransen F, van Beek AA, Borghuis T, Meijer B, Hugenholtz F, van der Gaast-de Jongh C, et al. The Impact of Gut Microbiota on Gender-Specific Differences in Immunity. *Front Immunol*. 2017 Jun 30;8:754.
 152. UYENO Y, Sekiguchi Y, Kamagata Y. Impact of consumption of probiotic lactobacilli-containing yogurt on microbial composition in human feces. *Int J Food Microbiol*. 2008 Feb 29;122(1-2):16-22.
 153. Wahlström A, Sayin SI, Marschall H-U, Bäckhed F. Intestinal Crosstalk between Bile Acids and Microbiota and Its Impact on Host Metabolism. *Cell Metab*. 2016 Jul 12;24(1):41-50.
 154. Hyland NP, Cryan JF. Microbe-host interactions: Influence of the gut microbiota on the enteric nervous system. *Dev Biol*. 2016 Sep 15;417(2):182-7.
 155. Filteau M, Matamoros S, Savard P, Roy D. Molecular monitoring of fecal microbiota in healthy adults following probiotic yogurt intake. *PharmaNutrition*. 2013 Oct 1;1(4):123-9.
 156. Martín R, Olivares M, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. Characterization of a reuterin-producing *Lactobacillus coryniformis* strain isolated from a goat's milk cheese. *Int J Food Microbiol*. 2005 Oct 25;104(3):267-77.
 157. Hancioğlu O, Karapinar M. Microflora of Boza, a traditional fermented Turkish beverage. *Int J Food Microbiol*. 1997 Apr 15;35(3):271-4.
 158. Lara-Villoslada F, Sierra S, Martín R, Delgado S, Rodríguez JM, Olivares M, et al. Safety assessment of two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714. *J Appl Microbiol*. 2007 Jul;103(1):175-84.
 159. Toral M, Gómez-Guzmán M, Jiménez R, Romero M, Sánchez M, Utrilla MP, et al. The probiotic *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 reduces the vascular pro-oxidant and pro-inflammatory status in obese mice. *Clin Sci (Lond)*. 2014 Jul 1;127(1):33-45.
 160. Martínez-Cañavate A, Sierra S, Lara-Villoslada F, Romero J, Maldonado J, Boza J, et al. A probiotic dairy product containing *L. gasseri* CECT5714 and *L. coryniformis* CECT5711 induces immunological changes in children suffering from allergy. *Pediatr Allergy Immunol*. 2009 Sep;20(6):592-600.
 161. Lara-Villoslada F, Sierra S, Boza J, Xaus J, Olivares M. [Beneficial effects of consumption of a dairy product containing two probiotic strains, *Lactobacillus coryniformis* CECT5711 and *Lactobacillus gasseri* CECT5714 in healthy children]. *Nutr Hosp*. 22(4):496-502.
 162. Fisberg M, Machado R. History of yogurt and current patterns of consumption. *Nutr Rev*. 2015 Aug 14;73(suppl 1):4-7.
 163. McFarland L V. From yaks to yogurt: the history, development, and current use of

- probiotics. *Clin Infect Dis*. 2015 May 15;60 Suppl 2(suppl 2):S85-90.
164. Wang H, Livingston KA, Fox CS, Meigs JB, Jacques PF. Yogurt consumption is associated with better diet quality and metabolic profile in American men and women. *Nutr Res*. 2013 Jan;33(1):18–26.
 165. Vegarud GE, Langsrud T, Svenning C. Mineral-binding milk proteins and peptides; occurrence, biochemical and technological characteristics. *Br J Nutr*. 2000 Nov;84 Suppl 1:S91-8.
 166. Boudraa G, Benbouabdellah M, Hachelaf W, Boisset M, Desjeux JF, Touhami M. Effect of feeding yogurt versus milk in children with acute diarrhea and carbohydrate malabsorption. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2001 Sep;33(3):307–13.
 167. Guarner F, Perdigon G, Corthier G, Salminen S, Koletzko B, Morelli L. Should yoghurt cultures be considered probiotic? *Br J Nutr*. 2005 Jun;93(6):783–6.
 168. Adolfsson O, Meydani SN, Russell RM. Yogurt and gut function. *Am J Clin Nutr*. 2004 Aug 1;80(2):245–56.
 169. Gijsbers L, Ding EL, Malik VS, de Goede J, Geleijnse JM, Soedamah-Muthu SS. Consumption of dairy foods and diabetes incidence: a dose-response meta-analysis of observational studies. *Am J Clin Nutr*. 2016 Apr 1;103(4):1111–24.
 170. Sayón-Orea C, Bes-Rastrollo M, Martí A, Pimenta AM, Martín-Calvo N, Martínez-González MA. Association between yogurt consumption and the risk of Metabolic Syndrome over 6 years in the SUN study. *BMC Public Health*. 2015 Dec 21;15(1):170.
 171. Dumas A-A, Lapointe A, Dugrenier M, Provencher V, Lamarche B, Desroches S. A systematic review of the effect of yogurt consumption on chronic diseases risk markers in adults. *Eur J Nutr*. 2017 Jun 2;56(4):1375–92.
 172. Fernandez MA, Panahi S, Daniel N, Tremblay A, Marette A. Yogurt and Cardiometabolic Diseases: A Critical Review of Potential Mechanisms. *Adv Nutr*. 2017 Nov 15;8(6):812–29.
 173. Pimentel G, Burton KJ, von Ah U, Bütikofer U, Pralong FP, Vionnet N, et al. Metabolic Footprinting of Fermented Milk Consumption in Serum of Healthy Men. *J Nutr*. 2018 Jun 1;148(6):851–60.
 174. Mozaffarian D, Hao T, Rimm EB, Willett WC, Hu FB. Changes in diet and lifestyle and long-term weight gain in women and men. *N Engl J Med*. 2011 Jun 23;364(25):2392–404.
 175. Zemel MB. Regulation of adiposity and obesity risk by dietary calcium: mechanisms and implications. *J Am Coll Nutr*. 2002 Apr;21(2):146S-151S.
 176. Zemel MB. Calcium modulation of hypertension and obesity: mechanisms and implications. *J Am Coll Nutr*. 2001 Oct;20(5 Suppl):428S-435S; discussion 440S-442S.
 177. Akhavan T, Luhovyy BL, Panahi S, Kubant R, Brown PH, Anderson GH. Mechanism of action of pre-meal consumption of whey protein on glycemic control in young adults. *J Nutr Biochem*. 2014 Jan;25(1):36–43.
 178. Nagpal R, Behare P, Rana R, Kumar A, Kumar M, Arora S, et al. Bioactive peptides derived from milk proteins and their health beneficial potentials: an update. *Food Funct*.

179. van Meijl LEC, Vrolix R, Mensink RP. Dairy product consumption and the metabolic syndrome. *Nutr Res Rev.* 2008 Dec 1;21(2):148–57.
180. Tamime ARR. Background to manufacturing practice. In: Tamime AY RoR, editor. *Yoghurt science and technology*. 2nd ed. Cambridge: CRC Press, Woodhead Publishing Limited; 1999. p. 32–3.
181. Bordoni A, Danesi F, Dardevet D, Dupont D, Fernandez AS, Gille D, et al. Dairy products and inflammation: A review of the clinical evidence. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2017 Aug 13;57(12):2497–525.
182. JM J. Comparative aspects of goat and sheep milk. *Small Rumin Res.* 1996;22:177–85.
183. Devkota S, Wang Y, Musch MW, Leone V, Fehlner-Peach H, Nadimpalli A, et al. Dietary-fat-induced taurocholic acid promotes pathobiont expansion and colitis in IL10^{-/-} mice. *Nature.* 2012 Jul 5;487(7405):104–8.
184. Chaplin A, Parra P, Serra F, Palou A. Conjugated Linoleic Acid Supplementation under a High-Fat Diet Modulates Stomach Protein Expression and Intestinal Microbiota in Adult Mice. Alemany M, editor. *PLoS One.* 2015 Apr 27;10(4):e0125091.
185. Martínez-Augustin O, Rivero-Gutiérrez B, Mascaraque C, Sánchez de Medina F. Food Derived Bioactive Peptides and Intestinal Barrier Function. *Int J Mol Sci.* 2014 Dec 9;15(12):22857–73.
186. Elli M, Callegari ML, Ferrari S, Bessi E, Cattivelli D, Soldi S, et al. Survival of yogurt bacteria in the human gut. *Appl Environ Microbiol.* 2006 Jul 1;72(7):5113–7.
187. Mater DDG, Bretigny L, Firmesse O, Flores M-J, Mogenet A, Bresson J-L, et al. *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* survive gastrointestinal transit of healthy volunteers consuming yogurt. *FEMS Microbiol Lett.* 2005 Sep 15;250(2):185–7.
188. del Campo R, Bravo D, Cantón R, Ruiz-Garbajosa P, García-Albiach R, Montesi-Libois A, et al. Scarce evidence of yogurt lactic acid bacteria in human feces after daily yogurt consumption by healthy volunteers. *Appl Environ Microbiol.* 2005 Jan 1;71(1):547–9.
189. Morelli L. Yogurt, living cultures, and gut health. *Am J Clin Nutr.* 2014 May 1;99(5 Suppl):1248S–50S.
190. García-Albiach R, Pozuelo de Felipe MJ, José M, de Felipe P, Angulo S, Morosini M-I, et al. Molecular analysis of yogurt containing *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in human intestinal microbiota. *Am J Clin Nutr.* 2008 Jan 1;87(1):91–6.
191. Rastall RA. Bacteria in the gut: friends and foes and how to alter the balance. *J Nutr.* 2004 Aug 1;134(8 Suppl):2022S–2026S.
192. Sun L, Yu Z, Ye X, Zou S, Li H, Yu D, et al. A Marker of Endotoxemia Is Associated With Obesity and Related Metabolic Disorders in Apparently Healthy Chinese. *Diabetes Care.* 2010 Sep 1;33(9):1925–32.
193. Labonté M-È, Couture P, Richard C, Desroches S, Lamarche B. Impact of dairy products

- on biomarkers of inflammation: a systematic review of randomized controlled nutritional intervention studies in overweight and obese adults. *Am J Clin Nutr.* 2013 Apr 1;97(4):706–17.
194. Meyer AL, Elmadfa I, Herbacek I, Micksche M. Probiotic, as well as conventional yogurt, can enhance the stimulated production of proinflammatory cytokines. *J Hum Nutr Diet.* 2007 Dec;20(6):590–8.
 195. Pei R, DiMarco DM, Putt KK, Martin DA, Gu Q, Chitchumroonchokchai C, et al. Low-fat yogurt consumption reduces biomarkers of chronic inflammation and inhibits markers of endotoxin exposure in healthy premenopausal women: a randomised controlled trial. *Br J Nutr.* 2017 Dec 28;118(12):1043–51.
 196. Joines RW, Blatter M, Abraham B, Xie F, De Clercq N, Baine Y, et al. A prospective, randomized, comparative US trial of a combination hepatitis A and B vaccine (Twinrix) with corresponding monovalent vaccines (Havrix and Engerix-B) in adults. *Vaccine.* 2001 Sep 14;19(32):4710–9.
 197. Martin-Moreno JM, Boyle P, Gorgojo L, Maisonneuve P, Fernandez-Rodriguez JC, Salvini S, et al. Development and validation of a food frequency questionnaire in Spain. *Int J Epidemiol.* 1993 Jun;22(3):512–9.
 198. Vulevic J, Juric A, Tzortzis G, Gibson GR. A Mixture of trans-Galactooligosaccharides Reduces Markers of Metabolic Syndrome and Modulates the Fecal Microbiota and Immune Function of Overweight Adults. *J Nutr.* 2013 Mar 1;143(3):324–31.
 199. Dore, J.; Ehrlich, S.D.; Levenez, F.; Pelletier, E.; Alberti, A.; Bertrand, L.; Bork, P.; Costea, P.I.; Sunagawa S., Guarner F. IHMS_SOP 06 V1: Standard operating procedure for faecal samples DNA extraction, Protocol, Q. International Human Microbiome Standards. 2015.
 200. 16S Metagenomics App. Illumina [Internet]. [cited 2019 May 27]. Available from: https://support.illumina.com/help/BaseSpace_App_16S_Metagenomics_help/16S_Metagenomics_App_Help.htm
 201. Revicki DA, Wood M, Wiklund I, Crawley J. Reliability and validity of the gastrointestinal symptom rating scale in patients with gastroesophageal reflux disease. *Qual Life Res.* 1997;7(1):75–83.
 202. Olmedilla-Alonso B, Nova-Rebato E, García-González N, Martín-Diana A-B, Fontecha J, Delgado D, et al. Effect of ewe's (semi-skimmed and whole) and cow's milk yogurt consumption on the lipid profile of control subjects: a crossover study. *Food Nutr Res.* 2017 Jan 26;61(1):1391669.
 203. Jalanka-Tuovinen J, Salonen A, Nikkilä J, Immonen O, Kekkonen R, Lahti L, et al. Intestinal Microbiota in Healthy Adults: Temporal Analysis Reveals Individual and Common Core and Relation to Intestinal Symptoms. Bereswill S, editor. *PLoS One.* 2011 Jul 28;6(7):e23035.
 204. (WHO) TWHO. Global strategy on diet, physical activity and health. 2004.
 205. Dannull J, Su Z, Rizzieri D, Yang BK, Coleman D, Yancey D, et al. Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. *J Clin Invest.* 2005 Dec 1;115(12):3623–33.

206. Bakker M, Bunge EM, Marano C, de Ridder M, De Moerlooze L. Immunogenicity, effectiveness and safety of combined hepatitis A and B vaccine: a systematic literature review. *Expert Rev Vaccines*. 2016 Jul 2;15(7):829–51.
207. Ventura M. Bifidobacteria: general overview on ecology, taxonomy, and genomics. In: Turrone F, van Sinderen D, editors. *Lactic Acid Bacteria Microbiological and functional aspects*. 4th ed. New York; 2012. p. 149.
208. Toscano M, De Grandi R, Stronati L, De Vecchi E, Drago L. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Bifidobacterium longum* BB536 on the healthy gut microbiota composition at phyla and species level: A preliminary study. *World J Gastroenterol*. 2017 Apr 21;23(15):2696–704.
209. Marteau P, Cuillerier E, Meance S, Gerhardt MF, Myara A, Bouvier M, et al. *Bifidobacterium animalis* strain DN-173 010 shortens the colonic transit time in healthy women: a double-blind, randomized, controlled study. *Aliment Pharmacol Ther*. 2002 Mar;16(3):587–93.
210. Lugli GA, Milani C, Turrone F, Duranti S, Ferrario C, Viappiani A, et al. Investigation of the evolutionary development of the genus *Bifidobacterium* by comparative genomics. Griffiths MW, editor. *Appl Environ Microbiol*. 2014 Oct 15;80(20):6383–94.
211. Schirmer M, Ijaz UZ, D'Amore R, Hall N, Sloan WT, Quince C. Insight into biases and sequencing errors for amplicon sequencing with the Illumina MiSeq platform. *Nucleic Acids Res*. 2015 Mar 31;43(6):e37.
212. Khalesi S, Bellissimo N, Vandelanotte C, Williams S, Stanley D, Irwin C. A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype? *Eur J Clin Nutr*. 2019 Jan 26;73(1):24–37.
213. Lisko DJ, Johnston GP, Johnston CG. Effects of Dietary Yogurt on the Healthy Human Gastrointestinal (GI) Microbiome. *Microorganisms*. 2017 Feb 15;5(1):6.
214. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med*. 2013 May 7;19(5):576–85.
215. Fan Y, Ya-E Z, Ji-Dong W, Yu-Fan L, Ying Z, Ya-Lun S, et al. Comparison of Microbial Diversity and Composition in Jejunum and Colon of the Alcohol-dependent Rats. *J Microbiol Biotechnol*. 2018 Nov 28;28(11):1883–95.
216. Miller LE, Ouwehand AC. Probiotic supplementation decreases intestinal transit time: meta-analysis of randomized controlled trials. *World J Gastroenterol*. 2013 Aug 7;19(29):4718–25.
217. Aryana KJ, Olson DW. A 100-Year Review: Yogurt and other cultured dairy products. *J Dairy Sci*. 2017 Dec;100(12):9987–10013.
218. Gómez-Gallego C, Gueimonde M, Salminen S. The role of yogurt in food-based dietary guidelines. *Nutr Rev*. 2018 Dec 1;76(Supplement_1):29–39.
219. González S, Fernández-Navarro T, Arboleya S, de Los Reyes-Gavilán CG, Salazar N, Gueimonde M. Fermented Dairy Foods: Impact on Intestinal Microbiota and Health-Linked Biomarkers. *Front Microbiol*. 2019 May 24;10:1046.

220. Vendramin V, Treu L, Campanaro S, Lombardi A, Corich V, Giacomini A. Genome comparison and physiological characterization of eight *Streptococcus thermophilus* strains isolated from Italian dairy products. *Food Microbiol.* 2017 May;63:47–57.
221. Tarrah A, de Castilhos J, Rossi RC, Duarte V da S, Ziegler DR, Corich V, et al. In vitro Probiotic Potential and Anti-cancer Activity of Newly Isolated Folate-Producing *Streptococcus thermophilus* Strains. *Front Microbiol.* 2018 Sep 19;9:2214.
222. Macfarlane S, Macfarlane GT. Regulation of short-chain fatty acid production. *Proc Nutr Soc.* 2003 Feb 5;62(1):67–72.
223. De Palma G, Collins SM, Bercik P. The microbiota-gut-brain axis in functional gastrointestinal disorders. *Gut Microbes.* 2014;5(3):419–29.
224. Araújo JR, Tomas J, Brenner C, Sansonetti PJ. Impact of high-fat diet on the intestinal microbiota and small intestinal physiology before and after the onset of obesity. *Biochimie.* 2017 Oct;141:97–106.
225. St-Onge M-P, Bosarge A, Goree LLT, Darnell B. Medium chain triglyceride oil consumption as part of a weight loss diet does not lead to an adverse metabolic profile when compared to olive oil. *J Am Coll Nutr.* 2008 Oct;27(5):547–52.
226. Caesar R, Tremaroli V, Kovatcheva-Datchary P, Cani PD, Bäckhed F. Crosstalk between Gut Microbiota and Dietary Lipids Aggravates WAT Inflammation through TLR Signaling. *Cell Metab.* 2015 Oct 6;22(4):658–68.
227. Sáyago-Ayerdi SG, Vaquero MP, Schultz-Moreira A, Bastida S, Sánchez-Muniz FJ. [Usefulness and controversial issues of middle-chain fatty acids consumption on lipid-protein metabolism and obesity]. *Nutr Hosp.* 23(3):191–202.
228. Papadimitriou C.G.; Vafopouloi-Mastrojiannaki A.; Vieira Silva S GAM. MFX. AE. Identification of peptides in traditional and probiotic sheep milk yoghurt with angiotensin I-converting enzyme (ACE)-inhibitory activity. *Food Chem.* 2007;105(2):647–56.
229. Azadbakht L, Mirmiran P, Esmailzadeh A, Azizi F. Dairy consumption is inversely associated with the prevalence of the metabolic syndrome in Tehranian adults. *Am J Clin Nutr.* 2005 Sep 1;82(3):523–30.
230. Zhou J-Y, Shi R, Yu H-L, Zeng Y, Zheng W-L, Ma W-L. The association between two polymorphisms in the TS gene and risk of cancer: A systematic review and pooled analysis. *Int J Cancer.* 2012 Nov 1;131(9):2103–16.
231. Yamashiro K, Tanaka R, Urabe T, Ueno Y, Yamashiro Y, Nomoto K, et al. Gut dysbiosis is associated with metabolism and systemic inflammation in patients with ischemic stroke. Smidt H, editor. *PLoS One.* 2017 Feb 6;12(2):e0171521.
232. Fu J, Bonder MJ, Cenit MC, Tigchelaar EF, Maatman A, Dekens JAM, et al. The Gut Microbiome Contributes to a Substantial Proportion of the Variation in Blood Lipids. *Circ Res.* 2015 Oct 9;117(9):817–24.

ANEXO I.

Tabla 16. Niveles de especies de *Lactobacillus* en heces de voluntarios del estudio Almicrobhol

Abundancia relativa (%)	Percentil 25	Mediana	Percentil 75
<i>Lactobacillus</i>	0,0581	0,0940	0,1759
<i>Lactobacillus japonicus</i>	0,0000	0,0010	0,0024
<i>Lactobacillus manihotivorans</i>	0,0000	0,0000	0,0020
<i>Lactobacillus equi</i>	0,0000	0,0000	0,0009
<i>Lactobacillus camelliae</i>	0,0000	0,0000	0,0006
<i>Lactobacillus antri</i>	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Lactobacillus mucosae</i>	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Lactobacillus paracasei</i>	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Lactobacillus pentosus</i>	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0,0000	0,0000	0,0000
<i>Lactobacillus ruminis</i>	0,0000	0,0000	0,0007
<i>Lactobacillus salivarius</i>	0,0000	0,0000	0,0000

