

# BACTERIAS LÁCTICAS COMO TERAPIA ALTERNATIVA PARA ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES\*

Leny Judith Álvarez Araujo

## RESUMEN

Dentro de las enfermedades inflamatorias intestinales se encuentran la colitis ulcerativa y la enfermedad de Crohn, las cuales presentan una alta incidencia a nivel mundial. En la actualidad no se cuenta con tratamientos eficaces para combatirlas debido al conocimiento parcial sobre su patogénesis, por lo que muchas de las terapias ocasionan efectos secundarios más graves que la misma enfermedad. Las bacterias lácticas son clasificadas como probióticos y se han utilizado como modelos de expresión de proteínas heterólogas. *Lactococcus lactis* es una de las más estudiadas debido a su alta capacidad para secretar proteínas heterólogas al medio en modelos murinos de las patologías mencionadas. Debido a la disponibilidad de este organismo, es posible su uso en el desarrollo de terapias que coadyuven a la inmunidad preventiva de las enfermedades inflamatorias intestinales.

**PALABRAS CLAVE:** *Lactococcus lactis*, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn.

## ABSTRACT

Inside the classification of the Inflammatory bowel diseases we can find the ulcerative colitis and the Crohn's disease, both of them have a high worldwide incidence. Up today the treatments for these diseases are inefficient due to the lack of knowledge of its pathogenesis. Most of the therapies increase malaise to the patient. Lactic bacteria are classified as probiotics and they have been used as expression models for heterologous proteins. *Lactococcus lactis* is one of the most studied because of its high capacity to secrete heterologous proteins to the media; this gives it a great value to use it for developing therapeutic vaccines of easy administration.

**KEY WORDS:** *Lactococcus lactis*, ulcerative colitis, Crohn's disease.

## INTRODUCCIÓN

La inflamación intestinal es una respuesta montada por el organismo humano en contra de cualquier agente infeccioso. El tipo de respuesta inflamatoria dependerá del tipo de antígeno. Así, una respuesta aguda, la cual es inducida por una bacteria común, involucra una respuesta inmediata por células polimorfonucleares; mientras que en una inflamación crónica de origen desconocido se involucran diferentes tipos celulares que interactúan de distintas formas para mantener la inflamación (1).

## ENFERMEDADES INFLAMATORIAS INTESTINALES

Las enfermedades inflamatorias intestinales (EII) generan una respuesta crónica y se dividen en 2 enfermedades importantes: la colitis ulcerativa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). Ambas tienen una incidencia importante a nivel mundial, sólo en Estados Unidos se presentan 30,000 nuevos casos cada año y se estima que aproximadamente 1 millón de individuos presentan EII. Ambas enfermedades son diagnosticadas entre la adolescencia y cuarta década, tanto en hombres como en mujeres (2).

Aun no se sabe con certeza cuál es la patogénesis de estas enfermedades, se han realizado estudios con los cuales se llegó a la conclusión de que hay 3 factores que interactúan para desencadenar las EII. Primero, dentro de los factores ambientales se ha encontrado que el cigarro y la nicotina afectan tanto la inmunidad celular como la humoral y reducen la motilidad del colon; el uso de drogas antiinflamatorias no esteroideas puede inducir que aparezca de nuevo la enfermedad (3). Segundo, factores congénitos, pues recientemente se han descubierto mutaciones que están alta-

\*Recibido: 10 de marzo de 2009    Aceptado: 13 de octubre de 2009

Instituto de Ciencias Biomédicas, Universidad Autónoma de Ciudad Juárez. Cd. Juárez Chihuahua, México. Correo E: Judithal79@gmail.com

mente asociadas con estas enfermedades; un ejemplo claro es el gen NOD2/CARD15 (el cual se encuentra en el cromosoma 16) que produce una proteína citoplasmática en macrófagos y sirve como receptor de reconocimiento para lipopolisacáridos bacterianos (3). Tercero, desregulación inmunológica, la cual se refiere a una activación sostenida de la respuesta inmune de mucosa, provocada por bacterias comensales en el lumen o por la penetración de productos bacterianos a través de la barrera de mucosa y que interactúan directamente con células dendríticas y linfocitos (3).

### SÍNTOMAS

Estas enfermedades presentan síntomas clínicos similares, a pesar de que son desórdenes diferentes, algunas de estas características en común son: fiebre, vómito y diarrea. La CU se caracteriza por estar confinada al colon, presenta una inflamación superficial (mucosa) con infiltración de

linfocitos y granulocitos y pérdida de las células que forman la estructura de las vellosidades intestinales; mientras que la EC puede aparecer en cualquier parte del tracto gastrointestinal, tiene una infiltración densa de linfocitos y macrófagos afectando todas las capas de la pared intestinal (2, 4).

### TRATAMIENTOS

Debido a que aun no se conocen con certeza las causas de la EC y la CU, los tratamientos con los que se cuenta hasta el momento no son 100% efectivos, llevando a muchos pacientes, con el tiempo, a cirugías, debido a que el tratamiento médico deja de tener efecto o por complicaciones de la enfermedad. Algunos de los medicamentos usados para tratar las EII son los corticoesteroides, aminosalicilatos, agentes inmunomoduladores, antibióticos y otros agentes novedosos (Tabla 1) (5). El uso de estos tratamientos depende de varios factores, como por ejemplo: qué tan avanzada

se encuentre la enfermedad, cómo ha respondido el paciente a otros medicamentos, si hay alguna complicación y cuál sea la meta clínica que se desea obtener (mantenimiento o remisión). Como se puede observar no todas las terapias pueden ser usadas de la misma forma, además que la mayoría de ellas presentan efectos secundarios severos si son aplicadas por un periodo prolongado; esto lleva a la suspensión del tratamiento o la modificación del mismo, agravando aun más la condición del paciente (6).

Dentro de los agentes novedosos se encuentran las terapias biológicas, muchas de éstas diseñadas para bloquear la respuesta inflamatoria por medio de anticuerpos en contra de las proteínas involucradas en esta cascada: el infliximab, los anticuerpos monoclonales (mAb) contra interleucinas IL-12, IL-18; IL-10; anti-CD3, anti-CD25 y que son las que hasta la fecha se han estudiado más, mostrando resultados favorables para los pacientes. Algunas otras de estas

TABLA 1  
Tratamientos médicos actuales para la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerativa

	ENFERMEDAD DE CROHN			COLITIS ULCERAIVA		
	Leve a moderada	Severa	Terapia de control	Leve a moderada	Severa	Terapia de control
<b>5-ASA</b>						
Oral	+	-	+	+	-	+
Tópica	+	-	+	+	-	+
<b>Corticoesteroides</b>						
Oral	+	+	-	+	+	-
Tópicos	+	+	-	+	+/-	-
Intravenoso (IV)	+	+	-	+	+	-
<b>antibióticos</b>	+	+/-	+/-	-	-	+/-
<b>AZA/6-MP</b>	+	+	+	+	+	+
<b>Metotrexato</b>	+	+/-	+/-	?	?	?
<b>Ciclosporina</b>	-	+/-	-	?	+	-
<b>Infliximab</b>	+	+	+	?	?	?

5-ASA (ácido 5-aminosalicilado), AZA (azatioprina), 6-MP (6-mercaptopurina). (+) Funcionable, (-) no funcionable, (?) se desconoce su funcionalidad.

terapias que están en proceso de investigación se basan en inhibidores de los factores de transcripción, inhibidores de las señales de transducción y en usar factores de crecimiento para estimular el sistema inmune innato (7).

### Modelos experimentales en las enfermedades inflamatorias intestinales

Los modelos murinos de inflamación mucosal, debido a su amplia variedad, están dando pistas importantes para los varios mecanismos de las EII. Estos son modelos que pueden ser inducidos o que ocurren de manera espontánea, como es el caso de los ratones "knockout" en IL-10 y en IL-12 los cuales desarrollan inflamación colónica estando presentes en un ambiente normal. Los modelos inducidos se refieren a aquellos animales que han sido tratados con agentes que promueven la inflamación intestinal, como el dextrán sulfato de sodio (DSS) y el ácido trinitrobenzen-sulfónico (TNBS). Estos agentes son capaces de dañar la mucosa intestinal y producir una respuesta inflamatoria capaz de tornarse crónica, simulando, de esta manera, a las EII en humanos. La colitis se induce mediante un enema que contenga TNBS en etanol o DSS. Este último agente es el modelo más frecuentemente utilizado para estudiar los mecanismos de reparación de mucosa. Una solución al 4% de esta sustancia causa síntomas similares a la colitis ulcerativa en 4 días; se ha observado que exposiciones por tiempo más largo resultan en perforaciones del intestino y muerte. Estudios previos han demostrado que el DSS es citotóxico sólo en el epitelio colonico induciendo daño y pérdida de criptas, erosiones masivas y una baja en el número de células de goblet (8).

TABLA 2

### Crterios para la seleccin de microorganismos probi3ticos

---

Actividad no patogénica
Estables en ácidos y sales biliares
Adherencia en células intestinales humanas
Persistencia en el tracto intestinal humano
Producción de sustancias antimicrobianas
Antagonismo en contra de bacterias patógenas
Seguridad en uso clínico y alimenticio
Efectos en la salud clínicamente validados y documentados

---

### BACTERIAS LÁCTICAS

#### Papel de los probi3ticos en las enfermedades inflamatorias intestinales

En trabajos recientes se ha encontrado que las bacterias probi3ticas son efectivas en el manejo ciertas enfermedades diarreicas agudas. El término probi3tico o pro-vida se introdujo en 1965 por Lilly y Stillwell, el cual significa organismos vivos que afectan de forma benéfica al huésped al mejorar el equilibrio microbiano intestinal. Pero antes de ellos, Elie Metchnikoff ya le había atribuido propiedades benélicas para el ser humano a ciertas bacterias como *Lactobacillus* que se encuentra presente en el yogurt (9). El mantenimiento de una microflora saludable puede prevenir trastornos gastrointestinales, incluyendo infección gastrointestinal, enfermedades inflamatorias intestinales e incluso cáncer. Las bacterias probi3ticas se sabe que son de uso mundial y se encuentran presentes en productos lácteos y jugos. Las bacterias que se encuentran dentro de este grupo son las especies de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, las cuales son las de mayor uso comercial. Aunque también se incluyen algunas otras como: *Streptococcus thermophilus*, levaduras (*Saccharomyces boulardii*) y mohos (9).

Los probi3ticos son microorganismos que no poseen patogenicidad, los cuales al ser ingeridos tienen efec-

tos benélicos en la salud de la persona, así como la capacidad de prevenir ciertas condiciones patológicas (10). Para que una bacteria pueda ser catalogada como probi3tica debe cumplir con ciertos requisitos y características específicas (Tabla 2) y principalmente contar con la categoría de GRAS (generalmente reconocidas como seguras). Entre algunos de los beneficios a la salud que se han atribuido a estos probi3ticos se encuentran que son capaces de mantener la microflora intestinal normal, son inmunoestimuladores e inmunomoduladores, tienen actividad anticarcinogénica y antimutagénica y reducen el colesterol en suero (11).

Para que un probi3tico pueda beneficiar a la salud humana debe cubrir ciertos requisitos:

- tener propiedades tecnológicas para que pueda manufacturarse e incorporarse a productos alimenticios, sin perder funcionalidad.
- no debe crear texturas o colores desagradables,
- debe sobrevivir el paso a través del tracto gastrointestinal y arribar vivo al sitio de acción,
- debe funcionar en ambientes del intestino.

Aun no se determina con exactitud cuáles son los mecanismos de acción con los que actúan los probi3ticos para prevenir al huésped de enfermedades intestinales. Algunas

TABLA 3  
**Proteínas heterólogas producidas en *Lactococcus lactis***

Proteína	Origen	Localización	Referencia
L7/L12	<i>Brucilla abortus</i>	Citoplasma/secretada/anclada	Ribeiro et al 2002*
CWP2	<i>Giardia lamblia</i>	Intracelular/secretada/anclada	Lee y Faubert 2006
E7	HPV tipo 16	Citoplasma/secretada/anclaje	Bermúdez-Humarán et al 2002*
NSP4	Coronavirus de bovino	Citoplasma	Enouf et al 2001*
IL-12	Ratón	Secretada	Bermúdez-Humarán et al 2003*
BLG	Bovino	Citoplasma/secretada	Nouaille et al 2005*
EDIII	Virus del Dengue, serotipo 2	Citoplasma	Alonso et al 2008
TFF	Murino	Secretada	Vandenbroucke et al 2004

\*citados en Le Loir et al 2005. Proteína de la pared del quiste (CWP); Proteína no estructural 4 (NSP4);  $\beta$ -Lactoglobulina bovina (BLG); Factor trefoil (TFF); Dominio III de la cubierta (EDIII).

propuestas que se manejan mencionan que involucran cambios en el pH, son capaces de competir por los nutrientes con bacterias patógenas; compiten por los sitios de unión a los receptores a los que se unen los patógenos; pueden regular la producción de citocinas pro y anti-inflamatorias; pueden producir sustancias, como ácidos orgánicos y bacteriocinas, que inhiben a otras bacterias y pueden estimular la secreción de IgA (10, 11).

Se ha mostrado que estos probióticos preservan la integridad del intestino y median el efecto de un número de otras enfermedades intestinales, como diarrea asociada a antibióticos; enfermedades inflamatorias intestinales; diarrea pediátrica; diarrea de viajero y colitis. Estudios han mostrado una mejoría en los síntomas de EII y CU con el consumo de ciertas cepas lácticas. Aun se están haciendo estudios para encontrar la mejor forma de aprovechar a estas bacterias para la mejoría en las enfermedades de inflamación intestinal.

### USO DE BACTERIAS LÁCTICAS COMO TERAPIA

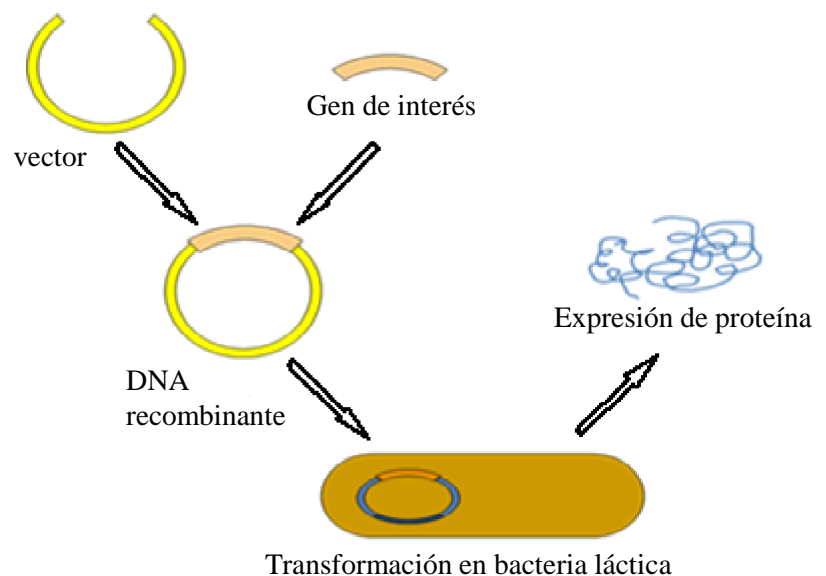
Las bacterias lácticas (BL) son bacterias gram positivas no invasivas y no patógenas clasificadas como GRAS.

Estas son ampliamente utilizadas en la industria alimenticia así como en el consumo diario por los humanos. Debido a sus características son excelentes candidatas como vectores para la producción de proteínas en alimentos o en el tracto digestivo de humanos y animales. Las bacterias que más se emplean como vehículos son *Lactobacillus sp.* y *Lactococcus sp.* Esto a diferencia de los actuales vectores como lo son la *Salmonella*, *Myco-*

*bacterium* y *E. coli*, que no pueden ser clasificados como seguros a pesar de que han sido altamente modificados para disminuir su patogenicidad (12).

### LACTOCOCCUS LACTIS COMO VEHÍCULO DE EXPRESIÓN

*L. lactis* es una bacteria gram positiva que mide entre 0.5 - 1.5  $\mu$ m de diámetro, es uno de los microorganismos más usados en la industria alimenticia debido a su capacidad de producir



**Figura 1.** Proceso para producir una proteína heteróloga en bacterias lácticas.

ácido láctico. Hasta la fecha esta BL ha sido la más estudiada, por lo cual se han diseñado varias herramientas moleculares para expresar una amplia variedad de antígenos y moléculas terapéuticas (Tabla 3) de forma intra o extra celular, las cuales pueden ser presentadas al sistema inmunológico (12, 13). Esto se hace introduciendo dentro de la bacteria un plásmido modificado genéticamente para que contenga el gen de interés, lo reproduzca y exprese de manera correcta y funcional (Fig. 1).

Algunos grupos de investigadores se han enfocado en estudiar el uso de esta bacteria como vector de expresión de proteínas que puedan ayudar en la prevención de la colitis. En 2004, Vandembroucke y colaboradores, construyeron una cepa de *L. lactis* capaz de producir un TFF (Trefoil Factor) biológicamente activo, que es un factor con un rol importante en la reparación y protección del epitelio gastrointestinal. La cepa fue administrada de forma oral diariamente en ratones que presentaban colitis inducida por DSS, dando como resultado una protección contra la colitis inducida y un descenso en la mortalidad y en la pérdida de peso (citado por 14). Otra ventaja que presenta *L. lactis* para la producción de vacunas es que su pared de peptidoglicanos es un adyuvante natural, lo cual puede aumentar la respuesta inmunológica (14). El grupo de Peppelenbosch y co-

laboradores hicieron en 2006 la primera prueba en pacientes con la enfermedad de Crohn, a quienes se les administró vía oral *L. lactis* recombinante secretora de IL-10 durante una semana. Los resultados que obtuvieron no mostraron una gran diferencia en la mejoría de esta enfermedad, pero observaron que la administración de este tipo de bacterias es segura y puede contenerse biológicamente. Esto llevó a la conclusión de que el método puede llegar a tener aplicaciones clínicas favorables para el tratamiento de las EII (reseñado en 14).

### CONCLUSIONES

El hecho de que aun no se caracterice completamente cuáles son las causas que generan las EII hace más difícil el poder encontrar un medicamento que pueda prevenirlas o curarlas. Como se mencionó, los tratamientos actuales no son efectivos y generan mayor incomodidad para los pacientes, así como un mayor gasto económico. La necesidad de encontrar una terapia más eficaz, menos costosa y menos dañina para pacientes con EII, además de que se ha incrementado la aparición de estas enfermedades en países desarrollados, ha propiciado que cada vez se unan mas grupos de investigadores a buscar mejores alternativas. La mas estudiada hasta la fecha han sido las bacterias lácticas, que por sus características particulares son buenos candidatos para utilizarse

como vehículos de expresión de proteínas recombinantes con beneficio terapéutico, pudiendo ser una mejor alternativa de vacunación, con mayor beneficio para el ser humano y de un menor costo.

Los trabajos realizados hasta la fecha, que involucran el uso de bacterias lácticas como posible terapia para estas enfermedades, han mostrado resultados favorables en modelos murinos; esto da un inicio para seguir investigando acerca de los potenciales clínicos que tienen estas bacterias manipuladas genéticamente para el tratamiento de las EII. El método puede ser usado para otras proteínas terapéuticas que sean difíciles de producir en las cantidades requeridas. Algunos propuestas que ya se están estudiando incluyen vacunas para generar una respuesta inmunológica contra el HPV, contra rotavirus, *Giardia lamblia* (15), el virus del dengue (16), producción de IFN- $\gamma$  biológicamente activa, entre muchas otras. La utilidad de estas bacterias es innumerable, se ha visto que la mayoría de las proteínas heterólogas que se han logrado expresar funcionan de manera correcta, lo que da paso a que esta propuesta de terapia se tome en serio y se haga más investigación al respecto, tal vez en algún futuro podamos tener una vacuna funcional contra HIV o generar una mejor alternativa terapéutica para personas dependientes de insulina.

### REFERENCIAS

1. Dignass AU, Baumgart DC, Sturm A (2004) Review article: the aetiopathogenesis of inflammatory bowel disease-immunology and repair mechanisms. *Aliment Pharmacol Ther* 20:9-17.
2. Hanauer SB (2006) Inflammatory bowel disease: Epidemiology, pathogenesis and therapeutic opportunities. *Inflamm Bowel Dis* 12(1):S3- S9.
3. Shanahan F (2004) Probiotics in inflammatory bowel disease- therapeutic rationale and role. *Adv Drug Deliv Rev* 56:809-818.
4. Steidler L (2001) Microbiological and immunological strategies for treatment of inflammatory bowel disease. *Microbes Infect* 3:1157-1166.

5. Caprilli R, Viscido A, Guagnozzi D (2002) Review article: biological agents in the treatment of Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther* 16:1579-1590.
6. Lim WC, Hanauer SB (2004) Emerging biologic therapies in inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord* 4(2):66-85.
7. Papachristou GI, Plevy S (2004) Novel biologics in inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Clin N Am* 33:251-269.
8. Strober W, Fuss JM, Blumberg RS (2002) The immunology of mucosal models of inflammation. *Annu Rev Immunol* 20:495-549.
9. Kopp-Hoolihan L (2001) Prophylactic and therapeutic uses of probiotics: a review. *J Am Diet Assoc* 101:229-241.
10. Rolfe RD (2000) The role of probiotic cultures in the control of gastrointestinal health. *J Nutr* 130:396S-402S.
11. O'Mahony L, Sheil B, Shanahan F (2007) Probiotic effects on inflammatory bowel disease. *J Nutr* 137:819S- 824S.
12. Langella P, Cortes-Perez NG, Lefevre F, Corthier G, Adel-Patient K, Bermudez-Humarán LG (2007) Influence of the route of immunization and the nature of the bacterial vector on immunogenicity of mucosal vaccines based on lactic acid bacteria. *Vaccine* 25:6581-6588.
13. Le Loir Y, Azevedo V, Oliveira SC, Freitas DA, Miyoshi A, Bermúdez-Humarán LG, Nouaille S, Ribeiro LA, Leclercq S, Gabriel JE, Guimaraes VD, Oliveira MN, Charlier C, Gautier M, Langella P (2005) Protein secretion in *Lactococcus lactis*: an efficient way to increase the overall heterologous protein production. *Microbial cell factories*. <http://www.microbialcellfactories.com/content/4/1/2> [revisado el 17 de febrero de 2007].
14. Wells JM, Mercenier A (2008) Mucosal delivery of therapeutic and prophylactic molecules using lactic acid bacteria. *Nat Rev Microbiol* 6:349-362.
15. Lee P, Faubert GM (2006) Expression of the *Giardia lamblia* cyst wall protein 2 in *Lactococcus lactis*. *Microbiol* 152:1981-1990.
16. Alonso S, Sim ACN, Lin W, Tan GKX, Sim MST, Chow VTK (2008) Induction of neutralizing antibodies against dengue virus type 2 upon mucosal administration of a recombinant *Lactococcus lactis* strain expressing envelope domain III antigen. *Vaccine* 26:1145- 1154.