



Lista de contenidos disponible en SciVerse ScienceDirect

Toxicología Química y de Alimentos

Sitio web de la revista: www.elsevier.com/locate/foodchemtox

EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD Y TOLERANCIA DE *LACTOBACILLUS REUTERI* NCIMB 30242 MICROENCAPSULADO EN UNA FORMULACIÓN DE YOGUR: ESTUDIO CON DISTRIBUCIÓN ALEATORIA, CONTROLADO CON PLACEBO Y DOBLE CIEGO

Mitchell L. Jones^{1, 2}, Christopher J. Martoni², Sandeep Tamber², Mathieu Parent², Satya Prakash^{1, 2, *}

Laboratorio de Investigación de Tecnología Biomédica y Terapia Celular, Departamento de Ingeniería Biomédica, Centro de Investigación de Fisiología y Células y Órganos Artificiales, Facultad de Medicina, Universidad McGill, 3775 University Street, Montreal, Quebec, H3A 2B4, Canadá.

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

RESEÑA

Historia del artículo:

Recibido el 9 de enero de 2012
Aceptado el 5 de marzo de 2012
Disponible en línea el 15 de marzo de 2012

Palabras claves:

Seguridad
Lactobacillus
Probiótico
Microencapsulación
Hidrolasa de sal biliar
Eventos adversos

Los organismos probióticos han demostrado ser una opción prometedora en el tratamiento de enfermedades. Anteriormente habíamos informado sobre la eficacia del *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en una formulación de yogur en la reducción de los niveles de colesterol sérico en adultos hipercolesterolémicos, sanos en los demás aspectos. Este estudio investiga la seguridad y toxicología de la ingesta oral del *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en una formulación de yogur. Un grupo con distribución aleatoria de 120 sujetos recibió una dosis de 5×10^{10} CFU de *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en yogur ($n = 59$) o yogur con placebo ($n = 61$) dos veces al día durante 6 semanas. Se analizaron los parámetros de seguridad de la química clínica y hematológicos. Se recogieron muestras fecales en estas ocasiones para el análisis de los ácidos biliares desconjugados. Para ambos grupos se registraron tanto la frecuencia, duración e intensidad de los eventos adversos (AE, por sus siglas en inglés) como la importancia clínica de los parámetros de seguridad. En los resultados de la química clínica sanguínea o de la hematología no se detectaron diferencias clínicas significativas entre el grupo tratado con el yogur con probiótico y aquel tratado con el yogur con placebo y no hubo un incremento significativo en los ácidos biliares desconjugados ($P = 0,05$) entre el grupo tratado y el de control. La frecuencia e intensidad de los AE fue similar en los dos grupos. Estos resultados demuestran el uso seguro de esta formulación en los alimentos.

© 2012 Elsevier Ltd. Todos los derechos reservados.

Abreviaciones: AE, efectos adversos; ALT alanina transaminasa; APA, algún-polilisina-algún; AlkP, fosfatasa alcalina; AST aspartate aminotransferasa; Bpm, pulsos por minuto; BSH, hidrolasa de sal biliar; BMI, índice de masa corporal; Ca^{2+} , calcio; Cl-, cloruro; CSV, valor clínicamente importante; GGT, gamaglutamil transpeptidasa; ICH-GCP, Conferencia Internacional de Armonización - Buenas Prácticas Clínicas; LAB, bacterias de ácido láctico; N, número de sujetos; ANOVA, análisis de varianza de una vía; PRO, resultado informado por el paciente; PO_4^{3-} , fosfato; K^+ , potasio; QC, control de calidad; QPS, presunción de seguridad calificada; Na^+ , sodio; SOP procedimientos operativos estándar.

* Autor para correspondencia en: Departamento de Ingeniería Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad McGill, 3775 University Street, Montreal, Quebec, H3A2B4, Canadá.

Direcciones de correo electrónico: mitchell.jones@mcgill.ca, mitchell@micropharma.net (M.L. Jones), christopher@micropharma.net (C.J. Martoni), sandeep@micropharma.net (S. Tamber), mathieu@micropharma.net (M. Parent), satya.prakash@mcgill.ca, satya@micropharma.net (S. Prakash).

¹ Laboratorio de Investigación de Tecnología Biomédica y Terapia Celular, Departamento de Ingeniería Biomédica, Facultad de Medicina, Universidad McGill, 3775 University Street, Montreal, Quebec, H3A2B4, Canadá. Tel.: +1 514 398 3676; fax: +1 514 398 7461.

² Micropharma Limited, 141 avenue du President Kennedy, UQAM, Edificio de Ciencias Biológicas, 5° piso, Suite 5569, Montreal, Quebec, H2X3Y7, Canadá. Tel.: +1 514 987 4151; fax: +1 514 987 4616.

0278-6915/\$ - ver la explicación más abajo © 2012 Elsevier Ltd. Todos los derechos reservados.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.03.010>

1. Introducción

El uso de organismos probióticos data de hace miles de años con la utilización de los productos tradicionales de leche fermentada por parte de los pueblos indígenas. Metchnikoff fue el primero en reconocer las propiedades beneficiosas para la salud de estos productos, atribuyendo sus efectos a los microbios fermentantes que ellos contienen e introduciendo así el concepto de bacterias útiles ([Dobrogosz et al., 2010](#)). De hecho, este concepto ha sido apoyado innumerables veces en la literatura científica, lo que demuestra la eficacia de los organismos probióticos para tratar una variedad de condiciones gastrointestinales, inmunológicas y metabólicas en varios sujetos modelo, incluyendo seres humanos ([Gareau et al., 2010](#); [Narayan et al., 2010](#); [Parkes et al., 2010](#); [Sanz et al., 2010](#); [Vanderhoof y Mitmesser, 2010](#)). Estos estudios resaltan el potencial que tienen los organismos probióticos para impactar en la salud humana. Sin embargo, para sacar el máximo rendimiento de sus potenciales aplicaciones clínicas, se requiere más evidencia clínica que demuestre no solo la eficacia sino también la seguridad de estos organismos.

Los probióticos están definidos como microorganismos vivos que, cuando son ingeridos en cantidades adecuadas, se espera que confieran beneficios de salud al anfitrión ([OMS, 2001](#)). En la práctica, las especies que pertenecen al grupo de bacterias productoras de ácido láctico (LAB, por sus siglas en inglés), tales como el *Lactobacillus*, *Bifidobacterias*, *Leuconostoc* y *Pediococcus*, se utilizan más frecuentemente y tienen un largo historial de uso en alimentos fermentados, incluyendo al yogur, queso, salami y aceitunas ([Salminen y von Wright, 1993](#); [Kurmann et al., 1992](#)). Esta larga historia de uso, en combinación con su estado comensal en los seres humanos y su ubicuidad ambiental, sugiere que estas especies son seguras para el consumo humano. El *Lactobacillus reuteri* se aisló por primera vez a principios de los años 60 a partir del tracto gastrointestinal humano; desde entonces, se han aislado especies adicionales de los tractos intestinales de especies no humanas sanas así como de fuentes de alimentos tradicionales ([Lee et al., 2009](#); [Molin et al., 1992](#); [Naito et al., 1995](#); [Taranto et al., 2003](#)). Un gran número de estudios clínicos en seres humanos han demostrado que no hay efectos adversos asociados con el consumo de *L. reuteri* ([Wolf et al., 1998](#); [Oliva et al., 2011](#); [Wolf et al., 1995](#); [Weizman and Alsheikh, 2006](#); [Rosander et al., 2008](#); [Coccorullo et al., 2010](#); [Connolly et al., 2005](#)). En concordancia con lo anterior, el *L. reuteri* cuenta con una presunción calificada de seguridad (QPS, por sus siglas en inglés) de parte de la Autoridad Europea de Seguridad de los Alimentos ([Panel de la EFSA sobre Peligros Biológicos, 2009](#)).

Hasta la fecha, el uso de muchas formulaciones de probióticos se ha enfocado en los beneficios no específicos derivados de la acción del organismo probiótico para mantener un balance favorable de la flora gastrointestinal ([Parkes et al., 2010](#); [Bosscher et al., 2009](#); [Vasile et al., 2011](#); [Rauch y Lynch, 2011](#)). Sin embargo, hay un creciente interés en desarrollar cepas de probióticos más eficaces, hechas a la medida para tratar condiciones específicas. A este respecto, hemos seleccionado al *L. reuteri* NCIMB 30242 por su capacidad de reducir el colesterol. Este organismo posee una enzima de hidrolasa de sal biliar altamente activa (BSH) que le permite desconjugar los ácidos biliares ([Jones et al., 2011](#)). Las características de seguridad del *L. reuteri* NCIMB 30242 han sido ampliamente caracterizadas a nivel molecular, metabólico y genómico ([Branton et al., 2011](#)). El genoma del *L. reuteri* NCIMB 30242 no codifica factores de virulencia que le podrían implicar en alguna infección oportunista, ni determinantes de resistencia antibiótica que se podrían transferir a otras bacterias ([Branton et al., 2011](#)). Adicionalmente, la cepa no produce derivados metabólicos potencialmente tales como aminos biogénicos y D-lactato a niveles que podrían producir efectos adversos en subgrupos de la población ([Branton et al., 2011](#)). Con base en estas

características intrínsecas del *L. reuteri* NCIMB 30242, no se espera que su consumo produzca efectos dañinos a los seres humanos.

Adicionalmente a la eficacia y seguridad, la administración de organismos probióticos es una consideración importante. La exposición a compuestos ácidos, oxígeno, enzimas digestivas y otros componentes antibacterianos puede comprometer la supervivencia de los probióticos a medida que transitan por el tracto intestinal ([Holzapfel et al., 1998](#); [Huang y Adams, 2004](#)). La encapsulación de bacterias en microcápsulas de algin-polilisina-algín (APA) proporciona una barrera física contra las inmunoglobulinas y enzimas digestivas, amortigua contra un ambiente gástrico ácido y concentra las bacterias dentro de la microcápsula, lo que resulta en la administración de altas cantidades de células metabólicamente activas al intestino delgado proximal ([Del et al., 2011](#); [Prakash et al., 2011](#)).

El objetivo del presente estudio fue evaluar la seguridad y tolerancia del *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en APA en una formulación basada en yogur, a través de un estudio con distribución aleatoria, doble ciego, controlado con placebo en sujetos humanos cercanamente monitoreados. Se incluyó la documentación secuencial de la química clínica, hematología y parámetros fecales de los sujetos tratados con el fin de determinar si los valores obtenidos se extendían más allá de los límites normales o diferían significativamente de los hallazgos en el grupo con placebo. Adicionalmente, se monitoreó cercanamente la cantidad, duración e intensidad de AE informados y se evaluó la importancia clínica de los parámetros de seguridad.

2. Materiales y métodos

2.1 Diseño del estudio

El objetivo del estudio fue evaluar la tolerancia, seguridad e impacto en los parámetros de salud de sujetos humanos moderadamente hipercolesterolémicos con respecto al *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en una formulación de yogur. El estudio doble ciego, controlado con placebo y multicéntrico incluyó a 120 sujetos masculinos y femeninos distribuidos aleatoriamente en dos grupos de tratamiento (yogur con probiótico o yogur con placebo). Se filtró a los sujetos para determinar si cumplían con los criterios de inclusión antes de un período de reposo farmacológico de 2 semanas en el cual se instruyó a los sujetos que sigan las recomendaciones nutricionales generales (Guía de Alimentos de Canadá, Salud Canadá) durante todo el estudio, un período de preinclusión de 2 semanas en el que los sujetos consumieron yogures con placebo dos veces al día con las comidas de la mañana y noche y un período de tratamiento de 6 semanas en el que los sujetos consumieron ya sea el yogur con placebo o el yogur con probióticos dos veces al día con las comidas de la mañana y noche. Se tomaron varias muestras biológicas, incluyendo sangre y heces, de los participantes en varios puntos en el tiempo para efectos de análisis. Una organización de investigación contratada para el efecto, A-Pharma s.r.o. (Praga, CZ), llevó a cabo el estudio en cumplimiento con las Buenas Prácticas Clínicas de la Conferencia Internacional de Armonización (ICH-GCP), incluyendo el mantenimiento de un archivo de documentos esenciales. El estudio se condujo de conformidad con los principios de la Declaración de Helsinki. Todos los procedimientos que involucraban a sujetos humanos fueron aprobados por el comité central de ética (comité multicéntrico de ética) y el comité local de ética en la República Checa. Se obtuvo el consentimiento escrito informado de todos los sujetos. Los monitores de A-Pharma s.r.o. realizaron visitas regulares de monitoreo a los sitios de investigación antes, durante y después de la fase de tratamiento, para asegurar que el estudio se estaba conduciendo en cumplimiento con el protocolo, los lineamientos ICH-

GCP y las regulaciones aplicables para la prueba clínica y que los derechos, seguridad y bienestar de los sujetos bajo estudio estaban protegidos en todo momento. El estudio se registró en ClinicalTrials.gov (NCT ID: NCT0118579).

2.2 *Inclusión de los sujetos*

Antes del registro, se evaluaron criterios estrictos de inclusión en el estudio. Se reclutaron hombres y mujeres adultos hipercolesterolémicos, sanos en los demás aspectos, en 5 centros en Praga, República Checa. Los criterios de inclusión para la distribución aleatoria eran hombres y mujeres sanos en los demás aspectos, en edades entre los 18 y 74 años (inclusive); niveles de Colesterol LDL >3,4 mmol/l; niveles de triglicéridos <4,0 mmol/l; índice de masa corporal (BMI) de 22-32 kg/m². Los criterios de exclusión para la distribución aleatoria fueron el uso de fármacos bajo prescripción para bajar el colesterol en los últimos 6 meses; uso de suplementos para reducir el colesterol en los últimos 3 meses; historia de uso crónico de alcohol (>2 medidas/d); uso de anticuerpos, corticosteroides, andrógenos o fenitoína sistémicos; infarto al miocardio, bypass de la arteria coronaria o procedimiento quirúrgico mayor en los últimos 6 meses; intolerancia a la lactosa o alergias a productos lácteos; historia de angina, insuficiencia cardíaca, enfermedad inflamatoria del colon, pancreatitis, diabetes, enfermedad gastrointestinal, renal, pulmonar, hepática o biliar o cáncer; (evidencia de lesiones activas, quimioterapia o cirugía en el último año); uso crónico de probióticos o laxantes de fibra (>2 dosis / semana) o laxantes estimulantes; historia de desórdenes alimenticios, ejercicios más allá de las 15 millas / semana o 4.000 kcal/ semana; embarazo, lactancia o intención de embarazo.

2.3 *Examen de la condición física y signos vitales*

Las evaluaciones a los sujetos se realizaron en 5 diferentes ocasiones: Visita V0 (semana -4), V1 (semana -2), V2 (semana 0, distribución aleatoria y línea de base del tratamiento), V3 (semana 3, punto medio del tratamiento) y V4 (semana 6, punto final del tratamiento). Las características demográficas documentadas de los participantes incluyeron historias clínicas y quirúrgicas, uso de alcohol y tabaco y métodos de anticoncepción (para mujeres en edad fértil). En las visitas V1 (semana -2) y V4 (semana 6) se realizaron exámenes físicos abreviados. Los parámetros registrados incluyeron el peso de los sujetos, su índice de masa corporal (BMI), signos vitales (ritmo cardíaco, presión sanguínea sistólica y diastólica y temperatura oral), así como cualquier anomalía detectable en la piel, ojos, oídos, nariz y garganta, corazón, pulmones, abdomen, sistema musculoesquelético, nódulos linfáticos y sistema nervioso. También se evaluaron regularmente el cumplimiento nutricional y el uso de alcohol por parte de los sujetos a lo largo del período de estudio.

2.4 *Preparación del material de prueba*

El *L. reuteri* NCIMB 30242 (Cardioviva™) se propagó en un fermentador FV8 y se concentró en cumplimiento con los procedimientos operativos estándar (SOP por sus siglas en inglés) y los procedimientos de control de calidad (QC, por sus siglas en inglés) en Microbial Developments Ltd. (Malvern, RU). Los análisis microbiológicos y la pureza del cultivo bacteriano se confirmaron después de cada lote de producción. Se prepararon las microcápsulas de algín-polilisina-algín (APA) que contenían *L. reuteri* NCIMB 30242 en cumplimiento con el SOP y los procedimientos de QC en Brace GmbH (Karlstein, DE) para

una viabilidad de 5×10^9 CFU/g de microcápsula, lo cual se confirmó después de cada lote de producción. Los yogures de placebo y de tratamiento se produjeron y prepararon en Milcom (Praga, CZ). Los yogures con placebo contenían: 7,9 g de proteína; 11,5 g de carbohidratos; 1,3 g de lípidos; y $1,25 \times 10^9$ de bacterias de yogur. Los yogures con probióticos contenían 7,2 g de proteína; 10,6 g de carbohidratos; 1,2 g de lípidos; y $1,15 \times 10^9$ de bacterias de yogur; y, 10 g de *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado. Además de la carga bacteriana, las microcápsulas APA de *L. reuteri* NCIMB 30242 contenían ~0,03 g de microcápsulas de alginato de sodio / g, 0,0005 g de microcápsulas de poli-L-lisina / g, cloruro de calcio (traza) y agua. La viabilidad de *L. reuteri* NCIMB 30242 en los yogures con probióticos se determinó en la fecha de expiración del lote (después de su embarque internacional a 4°C) y fue de $\sim 1,4 \times 10^9$ CFU / yogur. Con base en los valores de viabilidad de producción y expiración y en estudios de viabilidad previos, la dosis promedio viable administrada *L. reuteri* NCIMB 30242 se estimó en $\sim 1 \times 10^{10}$ CFU / yogur. Los yogures con placebo y con probiótico se produjeron 5 veces durante el estudio, con números de lote 1 a 5. La fecha de expiración de los yogures con placebo y con probiótico se mantuvo en 3 semanas después de la producción del yogur.

2.5 Distribución aleatoria de los sujetos y dosificación

Un estadístico externo determinó la distribución aleatoria de los sujetos. Se generaron secuencias numéricas activas (yogur con probiótico) y placebo (yogur con placebo) y los sujetos que cumplían los criterios de inclusión se asignaron aleatoriamente a uno de los grupos de tratamiento. Se instruyó a los participantes en el estudio que consuman todo el contenido de los yogures de tratamiento dos veces al día con las comidas de la mañana y noche. Los sujetos registraron por sí mismos el consumo de cada dosis en un diario durante las seis semanas de la fase de tratamiento. Los investigadores de campo registraron el cumplimiento en cada visita investigativa, considerando aceptable el cumplimiento si se había tomado $\geq 80\%$ de las dosis.

2.6 Análisis de las muestras

2.6.1 Sangre

Se obtuvieron muestras de sangre en ayunas para evaluación de hematología y química sérica mediante venopunción tanto antes del período de preinclusión (V1, semana -2) y al terminar el tratamiento (V4, semana 6). Se analizó la bioquímica sérica con respecto a urea, creatinina, bilirrubina, aspartato aminotransferasa (AST), alanina transaminasa (ALT), gamma-glutamil transpeptidasa (GGT), fosfatasa alcalina (AlkP), glucosa, calcio (Ca^{2+}), fosfato (PO_4^{3-}), potasio (K^+), sodio (Na^+), cloruro (Cl^-) y lipasa. Se realizó el análisis sérico en un analizador bioquímico Dimensión RxL usando los juegos apropiados de reactivos (Dade Behring, Siemens, DE). Se analizó la sangre completa (hematología) con respecto a hemoglobina, hematocrito, glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas usando un analizador de hematología Celltac F (Nihon Kohden, Japón). Durante el estudio, se solicitó a los investigadores registrar si los valores individuales de la hematología sanguínea y de la química sanguínea se consideraron clínicamente significativos (sí, no o desconocido) indicándolo en el formulario de informe de caso.

2.6.2 Fecal

Se recogieron muestras fecales en los 3 días antes del período de preinclusión (V1, semana -2) y al terminar el tratamiento (V4, semana 6). Se evaluó la concentración fecal de ácido biliar desconjugado en 10-15 μg de muestras liofilizadas de heces mediante cromatografía líquida de gases según lo descrito ([Batta et al., 2002](#)).

2.7 Monitoreo de eventos adversos

Durante el período de estudio se anotó y documentó el uso de medicamentos concomitantes y cualquier procedimiento médico, quirúrgico y / o dental. Un AE se define como cualquier cambio adverso en la salud (ej.: signo, síntoma, enfermedad, valor anormal de laboratorio u otro evento médico) experimentado por una persona que participa en un estudio clínico, sea o no que se considere directamente relacionado con el tratamiento prescrito, y que aparezca o empeore durante el curso del estudio, o dentro de un período especificado después de la terminación del tratamiento. Durante el estudio, se solicitó a los investigadores que registren todos los AE directamente observados y espontáneamente informados. Empezando en la visita anterior al período de preinclusión (V1, semana -2), en cada visita del estudio se consultó a los sujetos acerca de la ocurrencia de AE. El investigador clasificó cada AE como grave o no grave. En caso de la ocurrencia de un AE grave, el informe siguió el procedimiento para hacerlo de forma expedita. La información que describía el AE, recogida para evaluación y documentación, incluía lo siguiente: fecha de inicio / resolución, intensidad (es decir una reducción o incremento de la intensidad), gravedad y relación causal con el tratamiento del estudio o la conducción del estudio (según lo determinado por el médico). Todos los AE documentados se monitorearon hasta su resolución o hasta que el médico los determinó clínicamente insignificantes.

2.8 Monitoreo del estudio, recolección de datos y análisis estadístico

A-Pharma s.r.o. monitoreó el estudio para asegurar el cumplimiento regulatorio, adherencia al protocolo e integridad de la recolección de datos. Los datos se recogieron en formularios de informe de caso y luego se verificaron con los documentos fuentes originales de cada clínica. Cada formulario de informe de caso se ingresó doblemente en la base de datos (MARVIN, Plataforma Eclipse, Versión 3.3.1.1) antes del cierre de la base de datos y el análisis estadístico.

El número de sujetos se calculó con base en el criterio de valoración primario del estudio, colesterol LDL, y se planificó incluir a un total de 120 sujetos para distribución aleatoria según lo antes descrito ([Jones et al., 2011](#)). Se analizaron las diferencias entre los grupos de tratamiento en cuanto a características de línea de base utilizando un análisis de varianza de una vía (ANOVA) para variables continuas o la prueba de chi cuadrado para variables categóricas. Se resumieron los AE de acuerdo a los siguientes parámetros: relación con el tratamiento (no relacionado, improbable, posible y probable), intensidad e incidencia de AE graves. Los AE también se resumieron de acuerdo a la primera ocurrencia de cada AE. Por lo tanto, cuando los sujetos informaron sobre múltiples ocurrencias del mismo evento, esas ocurrencias solo se contaron como una. Se utilizó la prueba Shapiro-Wilk para determinar si las variables continuas estaban distribuidas paramétricamente. Se analizaron los cambios con respecto a la línea de base en cuanto a peso, índice de masa corporal (BMI), signos vitales, hematología de sangre y química sanguínea mediante un ANOVA de una vía, para las variables paramétricamente distribuidas, o una prueba *U* de Mann-Whitney, para variables que no calzaban con la descripción paramétrica. Se analizaron las diferencias en los ácidos biliares fecales desconjugados totales entre y dentro de los grupos usando

ANOVA de modelo mixto. Los análisis de datos se realizaron usando el paquete de software SAS, versión 9 (SAS Institute, Cary, NC, EE.UU.) o el paquete de software SPSS, versión 17.0 (SPSS Inc.; Chicago, IL).

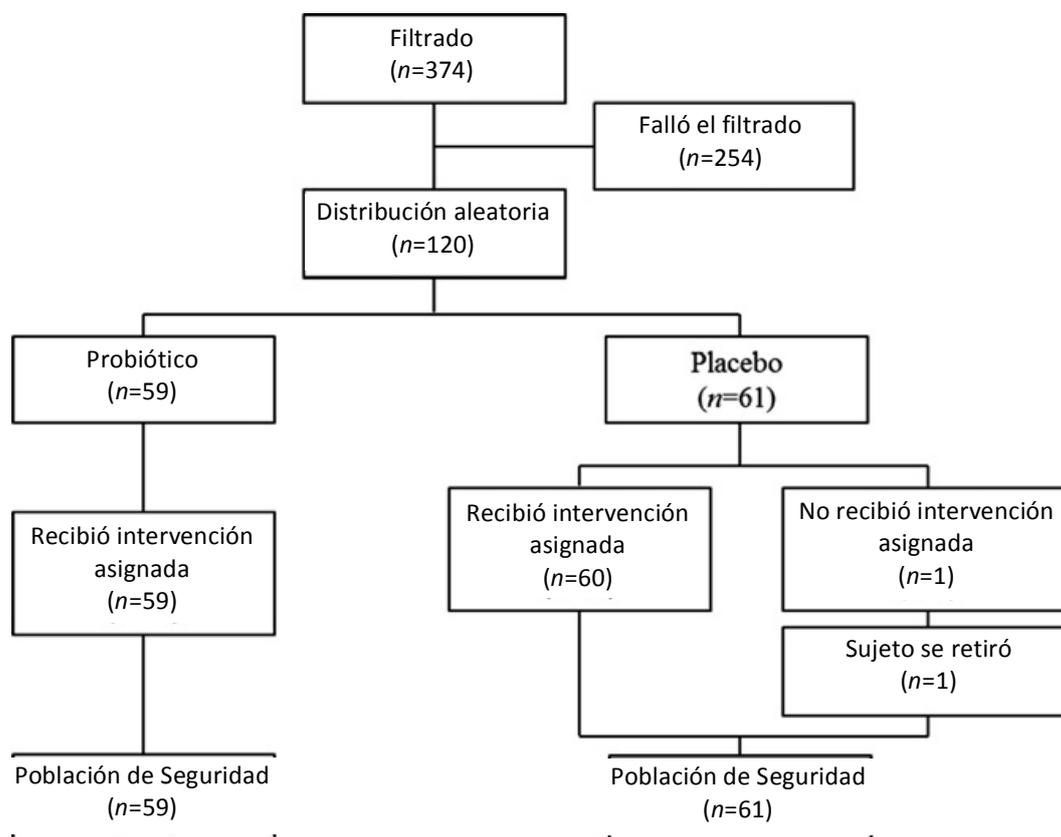


Fig. 1. Flujograma de los sujetos de estudio contabilizados a lo largo del estudio.

3. Resultados

3.1 Población del estudio

De 374 voluntarios filtrados inicialmente en cuanto a elegibilidad, 120 sujetos se registraron subsiguientemente en el estudio entre septiembre y octubre de 2008 (59 sujetos distribuidos aleatoriamente para el grupo con yogur con probiótico [22 hombres y 37 mujeres] y 61 para el grupo con yogur con placebo [21 hombres y 40 mujeres]; $P > 0,05$). Uno de los sujetos distribuidos aleatoriamente al grupo con placebo se retiró del estudio por razones personales (Fig. 1). Se monitoreó el progreso de todos los participantes a lo largo del estudio, es decir durante las fases de reposo farmacológico, preinclusión y tratamiento. Los sujetos tenían entre 20 y 74 años de edad (inclusive) con un promedio de 52,0 para el grupo con yogur con probiótico y 48,9 para el grupo con yogur con placebo ($P > 0,05$). La altura, peso, BMI y raza promedio no fueron significativamente diferentes entre los dos grupos ($P > 0,05$).

Cuadro 1

Resumen de todos los eventos adversos por intensidad

	Yogur con placebo (n = 61)			Yogur con <i>L. reuteri</i> (n = 59)		
	Leve	Mod.	Grave	Leve	Mod.	Grave
Entesopatía	1	0	0	0	0	0
Bronquitis	2	0	0	2	0	0
Infección viral	1	0	0	3	0	0
Amigdalitis	1	0	0	0	0	0
Dispepsia	1	0	0	0	0	0
Otitis media	0	0	0	1	0	0
Rinitis	0	0	0	0	1	0
Diarrea	0	0	0	1	0	0
Extirpación de neoplasma de la piel	0	0	0	1	0	0
Amigdalitis aguda	0	0	0	1	0	0
Total	6	0	0	9	1	0

n = número de sujetos

3.2 Eventos adversos

No se observaron AE graves en el grupo con yogur con probiótico ni en el grupo con yogur con placebo. Se registró al menos 1 AE que no era grave durante las fases de reposo farmacológico, preinclusión o tratamiento en 16,9% de los sujetos en el grupo con yogur con probiótico, comparado con el 10% de los sujetos en el grupo con yogur con placebo. El [Cuadro 1](#) muestra la gravedad de todos los AE por intensidad durante todo el estudio. En general, un total de 9 AE en el grupo con yogur con probiótico, comparado con 6 AE en el grupo con yogur con placebo, se clasificaron como leves en intensidad y 1 AE en el grupo con yogur con probiótico, comparado con 0 AE en el grupo con yogur con placebo se clasificó como moderado en intensidad. No se informó de AE graves en intensidad en los grupos con yogur con probiótico o placebo. El [Cuadro 2](#) muestra el resumen de todos los AE que ocurrieron durante la fase de tratamiento del estudio para ambos grupos. 16,9% de los sujetos en el grupo con yogur con probiótico, comparado con 8,3% de sujetos en el grupo con yogur con placebo, informó sobre al menos un AE no grave durante la fase de tratamiento. El [Cuadro 3](#) resume todos los AE potencialmente relacionados con el tratamiento (es decir, AE considerados improbablemente, posiblemente o probablemente relacionados con el tratamiento). En general, no hubo AE en el grupo con yogur con probiótico, comparado con 1 AE en el grupo con placebo, que se consideró potencialmente relacionado con el tratamiento. El [Cuadro 4](#) muestra la gravedad de todos los AE por intensidad durante la fase de tratamiento. Un total de 9 AE en el grupo con yogur con probiótico, comparado con 5 AE en el grupo con yogur con placebo se clasificaron como leves en intensidad y 1 AE en el grupo con yogur con probiótico, comparado con 0 AE en el grupo con placebo se clasificó como moderado en intensidad.

Cuadro 2

Resumen de eventos adversos – fase de tratamiento

	Yogur con placebo (n = 61)	Yogur con <i>L. reuteri</i> (n = 59)
Número con al menos un AE	5 (8,3%)	10 (16,9%)
Entesopatía	1 (1,7%)	0 (0%)
Bronquitis	2 (3,3%)	2 (3,4%)

Infección viral	0 (0%)	3 (5,1%)
Amigdalitis	1 (1,7%)	0 (0%)
Dispepsia	1 (1,7%)	0 (0%)
Otitis media	0 (0%)	1 (1,7%)
Rinitis	0 (0%)	1 (1,7%)
Diarrea	0 (0%)	1 (1,7%)
Extirpación de neoplasma de la piel	0 (0%)	1 (1,7%)
Amigdalitis aguda	0 (0%)	1 (1,7%)

n = número de sujetos

Cuadro 3

Resumen de todos los eventos adversos relacionados con el tratamiento^a

	Yogur con placebo (<i>n</i> = 61)	Yogur con <i>L. reuteri</i> (<i>n</i> = 59)
Número con al menos un AE	1 (1,7%)	0 (0%)
Dispepsia	1 (1,7%)	0 (0%)

n = número de sujetos

^a Eventos considerados improbablemente, posiblemente o probablemente relacionados con el tratamiento.

Cuadro 4

Resumen de todos los eventos adversos por intensidad – fase de tratamiento

	Yogur con placebo (<i>n</i> = 61)			Yogur con <i>L. reuteri</i> (<i>n</i> = 59)		
	Leve	Mod.	Grave	Leve	Mod.	Grave
Entesopatía	1	0	0	0	0	0
Bronquitis	2	0	0	2	0	0
Infección viral	0	0	0	3	0	0
Amigdalitis	1	0	0	0	0	0
Dispepsia	1	0	0	0	0	0
Otitis media	0	0	0	1	0	0
Rinitis	0	0	0	0	1	0
Diarrea	0	0	0	1	0	0
Extirpación de neoplasma de la piel	0	0	0	1	0	0
Amigdalitis aguda	0	0	0	1	0	0
Total	5	0	0	9	1	0

n = número de sujetos

3.3 Efecto en el peso, BMI y signos vitales

No hubo cambios estadísticamente significativos ($P > 0,05$) entre las mediciones de signos vitales (ritmo cardíaco, PS sistólica, PS diastólica o temperatura oral) en la línea de base y el final de tratamiento para los sujetos que recibieron ya sea los yogures con probiótico o los yogures con placebo (Cuadro 5).

Cuadro 5

Peso, BMI y signos vitales en la línea de base y sus cambios

	Yogur con placebo (n = 61)	Yogur con <i>L. reuteri</i> (n = 59)
Peso (kg)		
Línea de Base \pm de	75,85 \pm 11,67	75,72 \pm 10,99
Cambio medio al final del tratamiento	0,56 \pm 2,64	-0,05 \pm 2,44
Valor <i>P</i>	0,207 ^b	
BMI (kg/m²)		
Línea de Base \pm de	26,08 \pm 2,62	26,11 \pm 2,80
Cambio medio al final del tratamiento	0,19 \pm 0,89	-0,04 \pm 0,87
Valor <i>P</i>	0,185 ^b	
Ritmo cardíaco (bpm)		
Línea de Base \pm de	75,41 \pm 6,16	75,93 \pm 4,77
Cambio medio al final del tratamiento	0,33 \pm 7,54	-1,42 \pm 6,63
Valor <i>P</i>	0,071 ^b	
PS sistólica (mm Hg)		
Línea de Base \pm de	134,57 \pm 10,12	134,32 \pm 9,67
Cambio medio al final del tratamiento	-3,07 \pm 12,39	-1,19 \pm 11,58
Valor <i>P</i>	0,452 ^b	
PS diastólica (mm Hg)		
Línea de Base \pm de	78,82 \pm 5,78	78,88 \pm 6,50
Cambio medio al final del tratamiento	-1,18 \pm 7,51	-0,98 \pm 7,06
Valor <i>P</i>	0,593 ^b	
Temp. oral (°C)		
Línea de Base \pm de	36,39 \pm 0,29	36,39 \pm 0,28
Cambio medio al final del tratamiento	0,03 \pm 0,29	0,02 \pm 0,23
Valor <i>P</i>	0,841 ^a	
Total línea de base (CSV)	0	0
Total punto final (CSV)	0	0

n = número de sujetos; CSV = valor clínicamente significativo; BMI = índice de masa corporal; bpm = pulsos por minuto.

^a Análisis de varianza de una vía (ANOVA)

^b Prueba *U* no paramétrica de Mann-Whitney

3.4 Efecto en la hematología clínica y en la química

La comparación de los resultados de la hematología al final del tratamiento con los valores de la línea de base en los dos grupos de sujetos mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) para WBC, RBC, hemoglobina, hematocrito y plaquetas ([Cuadro 6](#)).

Cuadro 6

Datos de hematología en la línea de base y sus cambios

	Yogur con placebo (n = 61)	Yogur con <i>L. reuteri</i> (n = 59)
Glóbulos blancos ($\times 10^9/l$)		
Línea de Base \pm de	6,69 \pm 1,71	7,08 \pm 1,66
Cambio medio al final del tratamiento	0,18 \pm 1,68	-0,13 \pm 1,80

Valor <i>P</i>	0,864 ^b	
Glóbulos rojos (x 10 ¹² /l)		
Línea de Base ± de	4,73 ± 0,44	4,75 ± 0,37
Cambio medio al final del tratamiento	-0,01 ± 0,31	0,01 ± 0,23
Valor <i>P</i>	0,487 ^b	
Plaquetas (x 10 ⁹ /l)		
Línea de Base ± de	263,10 ± 44,62	266,74 ± 53,76
Cambio medio al final del tratamiento	1,68 ± 50,55	-1,79 ± 61,65
Valor <i>P</i>	0,742 ^b	
Hematocritos		
Línea de Base ± de	0,42 ± 0,04	0,41 ± 0,03
Cambio medio al final del tratamiento	0,00 ± 0,02	0,01 ± 0,02
Valor <i>P</i>	0,258 ^a	
Hemoglobina (g/l)		
Línea de Base ± de	143,27 ± 12,61	142,18 ± 9,72
Cambio medio al final del tratamiento	-0,88 ± 8,16	0,93 ± 8,52
Valor <i>P</i>	0,245 ^a	
Total línea de base (CSV)	0	0
Total punto final (CSV)	0	0

n = número de sujetos; CSV = valor clínicamente significativo.

^a Análisis de varianza de una vía (ANOVA)

^b Prueba *U* no paramétrica de Mann-Whitney

Cuando se compararon los resultados de la química al final del tratamiento de los dos grupos con los valores de la línea de base, tampoco hubo diferencias estadísticamente significativas ($P > 0,05$) para urea, ALT, AST, GGT, fosfatasa alcalina, bilirrubina, lipasa, glucosa, calcio, potasio, sodio y cloruro. Las creatinina y el fosfato mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) entre los grupos con yogur con placebo y con probióticos cuando se comparó la línea de base con el final. De estos dos parámetros, un valor individual de creatinina en el grupo con yogur con placebo se encontró clínicamente significativo, según lo registrado por los investigadores en el formulario de informe de caso, tanto en la línea de base como en el punto final. No se observaron valores de creatinina clínicamente significativos en el grupo con yogur con probiótico ya sea en la línea de base o en el punto final. No se observaron valores de fosfato clínicamente significativos en los grupos con yogur con probiótico o yogur con placebo en la línea de base o en el punto final. En el [Cuadro 7](#) se presentan las comparaciones.

Cuadro 7

Datos de química en la línea de base y sus cambios

	Yogur con placebo (n = 61)	Yogur con <i>L. reuteri</i> (n = 59)
Urea (mmol/l)		
Línea de Base ± de	5,24 ± 1,82	5,31 ± 1,85
Cambio medio al final del tratamiento	-0,07 ± 1,23	-0,55 ± 1,49
Valor <i>P</i>	0,098 ^b	
Creatinina (μmol/l)		
Línea de Base ± de	81,78 ± 27,90	76,16 ± 18,18
Cambio medio al final del tratamiento	3,05 ± 15,68	6,69 ± 13,32
Valor <i>P</i>	0,031 ^b	
Bilirrubina (μmol/l)		
Línea de Base ± de	9,21 ± 4,16	8,79 ± 4,15
Cambio medio al final del tratamiento	0,32 ± 3,58	0,19 ± 4,81

Valor <i>P</i>	0,802 ^b	
ALT (μkat/l)		
Línea de Base ± de	0,72 ± 0,19	0,72 ± 0,24
Cambio medio al final del tratamiento	0,02 ± 0,13	0,03 ± 0,18
Valor <i>P</i>	0,804 ^b	
AST (μkat/l)		
Línea de Base ± de	0,39 ± 0,12	0,40 ± 0,15
Cambio medio al final del tratamiento	0,01 ± 0,12	0,01 ± 0,16
Valor <i>P</i>	0,827 ^b	
GGT (μkat/l)		
Línea de Base ± de	0,73 ± 0,67	0,58 ± 0,32
Cambio medio al final del tratamiento	-0,07 ± 0,59	0,18 ± 0,55
Valor <i>P</i>	0,051 ^b	
ALP (μkat/l)		
Línea de Base ± de	1,16 ± 0,46	1,25 ± 0,46
Cambio medio al final del tratamiento	0,29 ± 0,32	0,13 ± 0,45
Valor <i>P</i>	0,200 ^b	
Glucosa (mmol/l)		
Línea de Base ± de	5,08 ± 0,71	5,18 ± 0,91
Cambio medio al final del tratamiento	0,11 ± 0,81	-0,06 ± 0,96
Valor <i>P</i>	0,363 ^b	
Calcio (mmol/l)		
Línea de Base ± de	2,18 ± 0,11	2,20 ± 0,10
Cambio medio al final del tratamiento	0,02 ± 0,12	-0,02 ± 0,11
Valor <i>P</i>	0,085 ^a	
Fosfato (mmol/l)		
Línea de Base ± de	1,06 ± 0,17	1,10 ± 0,14
Cambio medio al final del tratamiento	0,12 ± 0,20	0,00 ± 0,21
Valor <i>P</i>	0,004 ^a	
Sodio (mmol/l)		
Línea de Base ± de	138,52 ± 2,90	138,66 ± 2,27
Cambio medio al final del tratamiento	-1,50 ± 3,21	-0,86 ± 2,54
Valor <i>P</i>	0,234 ^a	
Potasio (mmol/l)		
Línea de Base ± de	4,30 ± 0,49	4,31 ± 0,43
Cambio medio al final del tratamiento	0,09 ± 0,38	0,07 ± 0,39
Valor <i>P</i>	0,854 ^a	
Cloruro (mmol/l)		
Línea de Base ± de	100,10 ± 2,47	100,24 ± 2,23
Cambio medio al final del tratamiento	-0,87 ± 2,45	-0,39 ± 2,40
Valor <i>P</i>	0,054 ^b	
Lipasa (μkat/l)		
Línea de Base ± de	3,54 ± 0,97	3,44 ± 0,73
Cambio medio al final del tratamiento	0,69 ± 0,99	0,59 ± 0,83
Valor <i>P</i>	0,503 ^b	
Total línea de base (CSV)	2	1
Total punto final (CSV)	6	1

n = número de sujetos; CSV = valor clínicamente significativo.

^a Análisis de varianza de una vía (ANOVA)

^b Prueba *U* no paramétrica de Mann-Whitney

3.5 Efecto en los ácidos biliares fecales desconjugados

Se analizaron las muestras fecales recogidas antes del tratamiento (semana -2) y en el punto final (semana 6) en cuanto a concentración de ácido biliar fecal desconjugado. Se consideró adecuado analizar cuarenta muestras, veintiún en el grupo de tratamiento y diecinueve en el grupo con placebo. Se encontró que la concentración media de ácido biliar fecal desconjugado no era significativamente diferente entre los grupos, antes del tratamiento y en el punto final, o dentro de los grupos durante la fase de tratamiento ($P = 0,94$; ANOVA de modelo mixto) según lo informado previamente (Jones et al., 2011).

4. Discusión

L. reuteri es un organismo probiótico predominante derivado de comensales que reside en el tracto gastrointestinal humano y es la especie de *Lactobacillus* más ampliamente distribuida entre los animales ([Casas y Dobrogosz, 2000](#)). Un gran número de estudios clínicos realizados en seres humanos han demostrado que no hay efectos adversos asociados con el consumo de *L. reuteri* ([Wolf et al., 1998](#); [Oliva et al., 2011](#); [Wolf et al., 1995](#); [Weizman y Alsheikh, 2006](#); [Rosander et al., 2008](#); [Coccorullo et al., 2010](#); [Connolly et al., 2005](#)). En el presente estudio se investigó la seguridad y tolerancia clínica del *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en una formulación de yogur en sujetos hipercolesterolémicos, por lo demás sanos. Se encontró que la administración de una dosis de 5×10^{10} CFU dos veces al día de *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado fue segura y bien tolerada en la población evaluada. Anteriormente se demostró que el *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en una formulación de yogur logró una reducción significativa en Colesterol LDL de 8,92% en un estudio doble ciego, con distribución aleatoria, controlado con placebo, de brazo paralelo y multicéntrico ([Jones et al., 2011](#)). Es más, las características de seguridad de *L. reuteri* NCIMB 30242 han sido ampliamente caracterizadas a nivel molecular, metabólico y genómico ([Branton et al., 2011](#)). Este estudio apoya la visión de que el *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en una formulación de yogur no es patogénico o toxicológicamente activo cuando se ingiere dos veces al día durante un período de 6 semanas.

Aun cuando la población objetivo se seleccionó para evaluar los efectos del *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en el metabolismo del colesterol, ella es representativa de una gran población adulta con hipercolesterolemia en crecimiento alrededor del mundo. De hecho, los datos examinados de 18.053 adultos participantes en las Encuestas Nacionales de Exámenes de Salud y Nutrición desde 1999 hasta 2006 mostraron que la prevalencia no ajustada de hipercolesterolemia en los EE.UU. iba desde el 53,2% al 56,1% y cambió poco durante el período de estudio ([Ford et al., 2010](#)). Así, la población del estudio representa a una gran proporción de la población general adulta de los EE.UU.

Las pruebas clínicas en seres humanos, que evalúan la eficacia o la seguridad de los probióticos, deberían tener un tamaño de muestra suficiente como para que su poder estadístico sea el adecuado para llegar a conclusiones estadísticamente significativas que ya sea apoyen o rechacen la hipótesis a priori ([Gibson et al., 2011](#)). El presente estudio tuvo el poder estadístico requerido para evaluar adecuadamente un cambio deseado en el criterio de valoración primario, Colesterol LDL. Adicionalmente, el estudio tuvo el suficiente poder estadístico como para detectar criterios de valoración de seguridad secundarios clínicamente importantes, medidos antes y al final de la fase de tratamiento. De hecho, el tamaño de la muestra de 120 era 2-4 veces más grande que otros estudios comparables que detallan la seguridad y tolerancia de los probióticos en voluntarios saludables ([Burton et al., 2011](#); [Wolf et al., 1995](#); [Wind et al., 2010](#)) y en sujetos humanos infectados con VIH ([Wolf et al., 1998](#)). Esto es de potencial importancia en ausencia de informes conocidos y validados que documenten los números mínimos de sujetos necesarios para medir, de forma precisa, parámetros de seguridad estadísticamente significativos y la alta variabilidad en los criterios de valoración de seguridad en la población bajo estudio ([Burton et al., 2011](#)). Estudios anteriormente presentados sobre la seguridad y tolerancia de los probióticos han tenido fases de tratamiento con una duración aproximada de 3-4 semanas ([Burton et al., 2011](#); [Wind et al., 2010](#); [Wolf et al., 1998](#); [Wolf et al., 1995](#)) y en algunos casos han hecho uso de períodos de reposo farmacológico y seguimiento de eventos adversos postratamiento. La duración de la fase de tratamiento para estudios sobre seguridad y tolerancia está justificadamente ligada a la duración esperada del tratamiento, la cual podría variar considerablemente dependiendo de la condición que será tratada, el probiótico utilizado y la población involucrada. El presente estudio empleó una fase de intervención de 6 semanas, que es

comúnmente usada para estudios distribuidos aleatoriamente controlados, que examinan la eficacia, seguridad y tolerancia clínica de fármacos que reducen el colesterol, incluyendo las estatinas ([Nawrocki et al., 1995](#)) y la ezetimiba ([Bays et al., 2011](#)), así como intervenciones nutricionales ([Hansel et al., 2007](#); [Plana et al., 2008](#)).

Se encontró que el *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en una formulación de yogur es bien tolerado; en el grupo no hubo sujetos que se retiraron del estudio y se encontró que todos los sujetos cumplieron con su parte pues, según la evaluación de los médicos investigadores, consumieron al menos 80% del tratamiento asignado a ellos. Se ha informado que hay participantes en estudios clínicos en los que se administró yogur u otros productos lácteos que fueron más propensos a experimentar eventos adversos en comparación con los sujetos del grupo de control ([Agencia para la Investigación y Calidad del Cuidado de la Salud, 2011](#)). En el presente estudio no se observaron eventos adversos graves a lo largo del estudio. Es más, no se observaron eventos adversos potencialmente relacionados con el tratamiento en los sujetos que recibieron yogures con probióticos en comparación con un evento adverso potencialmente relacionado con el tratamiento en sujetos que recibieron yogures con placebo. Una revisión de 622 estudios sobre probióticos realizada por la Agencia para la Investigación y Calidad del Cuidado de la Salud concluyó que la evaluación e información sistemática sobre eventos adversos en estudios de intervención sobre probióticos es generalmente insuficiente ([Agencia para la Investigación y Calidad del Cuidado de la Salud, 2011](#)). En el presente estudio la evaluación sistemática de eventos adversos y la valoración de la fortaleza de la asociación entre evento adverso e intervención se realizó mediante reuniones cara a cara entre el sujeto y el médico calificado en el sitio de la investigación. Se ha informado que el diagnóstico del médico en el sitio de investigación es superior en cuanto a precisión e impacto que los cuestionarios de resultados informados por el paciente (PRO, por sus siglas en inglés) ([Valderas et al., 2008](#)).

El *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en una formulación de yogur no afectó significativamente al peso, BMI, signos vitales o marcadores de seguridad hematológicos de la sangre. La comparación entre los grupos con yogur con probiótico y con placebo demostró diferencias estadísticamente significativas en la creatinina y el fosfato; sin embargo, ninguno de los valores se consideró clínicamente significativo, según lo evaluado por el médico calificado en cada sitio de investigación durante cada visita de los sujetos. De hecho, un solo sujeto en el grupo con yogur con placebo tuvo un valor de creatinina clínicamente significativo, el mismo que no cambió desde la línea de base hasta el final del estudio, y ningún sujeto tuvo valores clínicamente significativos de fosfato en ninguno de los grupos de tratamiento. En total, en el grupo con yogur con placebo hubo un número mucho mayor de marcadores de seguridad bioquímicos individuales clínicamente significativos, en comparación con el grupo con yogur con probiótico.

Muchas bacterias probióticas, incluyendo los *Lactobacillus* y las *Bifidobacterias* pueden desconjugar activamente los ácidos biliares a través de la acción de la hidrolasa de sal biliar. El *L. reuteri* NCIMB 30242 se seleccionó específicamente por su alto nivel de actividad BSH y correspondiente capacidad de reducir el colesterol en los seres humanos cuando se consume de forma repetida ([Branton et al., 2011](#); [Jones et al., 2011](#)). Se cree que este fenotipo mejora la supervivencia del organismo en el tracto intestinal y es, por lo tanto, una característica común entre las bacterias probióticas; además, es particularmente prevalente entre las bacterias que son comensales naturales de los intestinos. Anteriormente hemos demostrado que las cepas de *L. plantarum* y *L. reuteri* microencapsuladas en APA, que exhiben actividad BSH, mantienen la viabilidad celular y la capacidad de desconjugación del ácido biliar en un modelo de simulación del tracto superior GI ([Martoni et al., 2007](#); [Martoni et al., 2008](#)). Mientras que las opiniones varían, una de las hipótesis dice que la desconjugación del ácido

biliar proximal al íleo terminal de hecho no altera la circulación enterohepática de los ácidos biliares sino que, en su lugar, altera el acervo de ácido biliar circulante (Schiff et al., 1972). Para apoyar esta hipótesis, se ha demostrado que la cepa *B. animalis* DN-173010, escogida en un proceso de filtración por su capacidad de desconjugación de ácido biliar, no resultó en un incremento en la formación de ácidos biliares secundarios en las heces de sujetos humanos saludables (Marteau et al., 2002) o en la vena porta de cerdos (Lepercq et al., 2004). En el presente estudio, cuando se comparan los grupos con yogur con placebo y con probiótico durante la fase de tratamiento, no se observó cambio significativo en la excreción fecal de ácido biliar desconjugado en las muestras recogidas.

5. Conclusiones

Se utilizó una dosis de *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en una formulación de yogur tomada dos veces al día, durante 42 días para demostrar su seguridad y tolerancia en adultos hipercolesterolémicos, sanos en los demás aspectos. La fase de tratamiento fue significativamente más larga e incluyó a un número superior de sujetos que otros estudios comparables sobre seguridad y tolerancia de probióticos. La ocurrencia de AE, evaluada por el clínico e informada por el sujeto, combinada con los resultados de la química sanguínea, hematología y evaluaciones fecales, claramente mostró que *L. reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado en una formulación de yogur es bien tolerado por los seres humanos. Se deberán diseñar estudios futuros para sustanciar este resultado durante períodos de tratamiento más largos, los cuales deberán evaluar criterios de valoración adicionales y cambios a la salud gastrointestinal mediante el cuestionario gastrointestinal.

Conflicto de intereses

M.L.J., C.J.M., S.T., M.P. y S.P. están con Micropharma Limited e informan sobre un conflicto de intereses.

Reconocimientos

Gentilmente agradecemos a J. Lahovský, A. Vajikova, N. Barannikova y K. Beber por su contribución al estudio. También agradecemos a todos los voluntarios que participaron en el estudio. M. Jones, S. Prakash, S. Tamber y C. Martoni diseñaron el estudio y prepararon el manuscrito; J.L., A.V. y N.B. condujeron la investigación; M.P., C.J.M. y K.B. realizaron el análisis estadístico. Todos los autores leyeron y aprobaron el manuscrito final. Este trabajo tuvo el apoyo de Micropharma Limited. Todos los otros contribuyentes no tienen conflicto de intereses que informar.

Referencias

- Agencia para la Investigación y Calidad del Cuidado de la Salud, 2011 Seguridad de los Probióticos para Reducir Riesgos y Prevenir o Tratar Enfermedades. 11-E007 ed., pp. 1-645.
- Batta, A.K., Salen, G., Batta, P., Tint, G.S., Alberts, D.S., Earnest, D.L., 2002. Cuantificación simultánea de ácidos grasos, esteroides y ácidos biliares en las heces humanas mediante cromatografía capilar de gases - líquidos. R. Cromatogr. B Analit. Tecnol. Biomed. Cie Vida. 775, 153-161.
- Bays, H.E., Davidson, M.H., Massaad, R., Flaim, D., Lowe, R.S., Tershakovec, A.M., Jones-Burton, C., 2011. Seguridad y eficacia de la ezetimiba añadida al rosuvastatin 5 o 10 mg versus el ajuste

- ascendente de la dosis de rosuvastatin en pacientes con hipercolesterolemia (Estudio ACTE). R. Am. Cardiol. 108, 523-530.
- Bosscher, D., Breynaert, A., Pieters, L., Hermans, N., 2009. Estrategias basadas en alimentos para modular la composición de la microbiota intestinal y sus efectos asociados a la salud. R. Farmacol. Fisiol. 60 (Supl 6), 5-11.
- Branton, W.B., Jones, M.L., Tomaro-Duchesneau, C., Martoni, C.J., Prakash, S., 2011. Caracterización *in vitro* y seguridad de la cepa de probiótico *Lactobacillus reuteri* *cardioviva* NCIMB 30242. R. Int. Probióticos Prebióticos 6, 1-12.
- Burton, J.P., Cowley, S., Simon, R.R., McKinney, J., Wescombe, P.A., Tagg, J.R., 2011. Evaluación de seguridad y tolerancia humana del probiótico oral *Streptococcus salivarius* K12: estudio con distribución aleatoria, controlado con placebo y doble ciego. Toxicol. Quím. Alimentos. 49, 2356-2364.
- Casas, I.A., Dobrogosz, W.J., 2000. Validación del concepto de probiótico: El *lactobacillus reuteri* confiere protección de amplio espectro contra la enfermedad en seres humanos y animales. Ecol. Microb. Salud Enf.. 12, 247-285.
- Coccorullo, P., Strisciuglio, C., Martinelli, M., Miele, E., Greco, L., Staiano, A., 2010. *Lactobacillus reuteri* (DSM 17938) en infantes con estreñimiento funcional crónico: estudio doble ciego, con distribución aleatoria, controlado con placebo. R. Pediatr. 157, 598-602.
- Connolly, E., Abrahamsson, T., Bjorksten, B., 2005. Seguridad de las bacterias D(-)-productoras de ácido láctico en el infante humano. R. Pediatr. Gastroenterol. Nutr. 41, 489-492.
- Del, P.M., Carmagnola, S., Ballare, M., Sartori, M., Orsello, M., Balzarini, M., Pagliarulo, M., Tari, R., Anderloni, A., Strozzi, G.P., Mogna, L., Sforza, F., Capurso, L., 2011. ¿Es la microencapsulación el futuro de las preparaciones con probióticos? La eficacia creciente de los probióticos gastroprotegidos. Microbios Intestinales. 2, 120-123.
- Dobrogosz, W.J., Peacock, T.J., Hassan, H.M., 2010. Evolución del concepto de probiótico desde la concepción hasta la validación y aceptación en la ciencia médica. Microbiol. Ava. Apli. 72, 1-41.
- Panel sobre Riesgos Biológicos EFSA 2009. Opinión científica sobre el mantenimiento de la lista de microorganismos QPS añadida intencionalmente a la alimentación o a los alimentos (actualización 2009). EFSA J. 7, 1431.
- Ford, E.S., Li, C., Pearson, W.S., Zhao, G., Mokdad, A.H., 2010. Tendencias en hipercolesterolemia, tratamiento y control entre adultos en los Estados Unidos. R. Int. Cardiol. 140, 226-235.
- Gareau, M.G., Sherman, P.M., Walker, W.A., 2010. Los probióticos y la microbiota intestinal en la salud y enfermedad intestinal. Rev. Nac. Gastroenterol. Hepatol. 7, 503-514.
- Gibson, G.R., Brummer, R.J., Isolauri, E., Lochs, H., Morelli, L., Ockhuizen, T., Rowland, I.R., Schrezenmeir, J., Stanton, C., Verbeke, K., 2011. Diseño de estudios sobre probióticos para sustanciar las afirmaciones de salud. Microbios Intestinales. 2.
- Hansel, B., Nicolle, C., Lalanne, F., Tondou, F., Lassel, T., Donazzolo, Y., Ferrieres, J., Krempf, M., Schlienger, J.L., Verges, B., Chapman, M.J., Bruckert, E., 2007. Efectos de la leche baja en grasas, fermentada, enriquecida con fitosteroles de plantas en el perfil sérico de lípidos y el estrés oxidativo en hipercolesterolemia moderada. R. Am. Nutr. Clín. 86, 790-796.
- Holzappel, W.H., Haberer, P., Snel, J., Schillinger, U., Huis in't Veld, J.H.J., 1998. Visión general de la flora intestinal y los probióticos. R. Int. Microbiol. Alim. 41, 85-101.
- Huang, Y., Adams, M.C., 2004. Evaluación *in vitro* de la tolerancia gastrointestinal superior de la propionibacteria probiótica láctea potencial. R. Int. Microbiol. Alim. 91, 253-260.
- Jones, M.L., Martoni, C.J., Parent, M., Prakash, S., 2011. Eficacia en la reducción del colesterol del *Lactobacillus reuteri* NCIMB 30242 microencapsulado, activado por hidrolasa de sal biliar, en formulación de yogur en adultos hipercolesterolémicos. R. Br. Nutr. 1-9.
- Kurmann, J.A., Rasic, J.L., Kroger, M., 1992. Enciclopedia de Productos de Leche Fresca Fermentada Van Nostrand Reinhold. Nueva York.
- Lee, D.Y., Seo, Y.S., Rayamajhi, N., Kang, M.L., Lee, S.I., Yoo, H.S., 2009. Aislamiento, caracterización y evaluación de cepas silvestres de *Lactobacillus reuteri* de heces de cerdo. R. Microbiol. 47, 663-672.
- Lepercq, P., Relano, P., Cayuela, C., Juste, C., 2004. La cepa DN-173 010 de *Bifidobacterium animalis* hidroliza las sales biliares en el tracto gastrointestinal de cerdos. R. Escand. Gastroenterol. 39, 1266-1271.
- Marteau, P., Cuillierier, E., Meance, S., Gerhardt, M.F., Myara, A., Bouvier, M., Bouley, C., Tondou, F., Bommelaer, G., Grimaud, J.C., 2002. La cepa DN-173 010 de *Bifidobacterium animalis* acorta el

- tiempo de tránsito colónico en mujeres sanas: estudio doble ciego, con distribución aleatoria, controlado. *Ter. Farmacol. Aliment.* 16, 587-593.
- Martoni, C., Bhathena, J., Jones, M.L., Urbanska, A.M., Chen, H., Prakash, S., 2007. Investigación de *Lactobacillus* microencapsulados activados por BSH en el tracto GI humano simulado. *R. Biotecnol. Biomed.* <http://dx.doi.org/10.1155/2007/13684>.
- Martoni, C., Bhathena, J., Urbanska, A.M., Prakash, S., 2008. El *Lactobacillus reuteri* microencapsulado produce hidrolasa de sal biliar para la administración oral dirigida en el tracto gastrointestinal. *Microbiol. Biotecnol. Apli.* 81, 225-233.
- Molin, G., Andersson, R., Ahrne, S., Lonner, C., Marklinder, I., Johansson, M.L., Jeppsson, B., Bengmark, S., 1992. Efecto de la sopa de avena fermentada sobre el nivel de colesterol y la colonización de *Lactobacillus* en la mucosa intestinal de la rata. *Antonie Van Leeuwenhoek* 61, 167-173.
- Naito, S., Hayashidani, H., Kaneko, K., Ogawa, M., Benno, Y., 1995. Desarrollo de lactobacilos intestinales en lechones normales. *R. Bacteriol. Apli.* 79, 230-236.
- Narayan, S.S., Jalgaonkar, S., Shahani, S., Kulkarni, V.N., 2010. Probióticos: tendencias actuales en el tratamiento de la diarrea. *R. Med. Hong Kong.* 16, 213-218.
- Nawrocki, J.W., Weiss, S.R., Davidson, M.H., Sprecher, D.L., Schwartz, S.L., Lupien, P.J., Jones, P.H., Haber, H.E., Black, D.M., 1995. Reducción de colesterol LDL en 25-60% en pacientes con hipercolesterolemia primaria por parte de atorvastatin, un nuevo inhibidor de HMG-CoA reductasa. *Arterioscler. Tromb. Vasc. Biol.* 15, 678-682.
- Oliva, S., Di, N.G., Ferrari, F., Mallardo, S., Rossi, P., Patrizi, G., Cucchiara, S., Stronati, L., 2011. Prueba clínica de distribución aleatoria: la efectividad del enema rectal de *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 en niños con colitis ulcerativa distal activa. *Ter. Farmacol. Aliment.*
- Parkes, G.C., Sanderson, J.D., Whelan, K., 2010. Tratamiento del síndrome de colon irritable con probióticos: la evidencia. *Soc. Proc. Nutr.* 69, 187-194.
- Plana, N., Nicolle, C., Ferre, R., Camps, J., Cos, R., Villoria, J., Masana, L., 2008. La leche fermentada enriquecida con fitosterol coadyuva al logro de la meta de colesterol LDL en sujetos hipercolesterolémicos. *R. Eur. Nutr.* 47, 32-39.
- Prakash, S., Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Cantor, A., 2011. La microbiota intestinal y la salud humana con énfasis en el uso de células bacterianas microencapsuladas. *R. Biotecnol. Biomed.* 2011, 981214.
- Rauch, M., Lynch, S., 2011. El potencial de manipulación probiótica de la microbioma gastrointestinal. *Opin. Actu. Biotecnol.*
- Rosander, A., Connolly, E., Roos, S., 2008. Retiro de plasmidas portadoras de genes de resistencia a los antibióticos por parte del *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 y caracterización de la cepa descendiente resultante, *L. reuteri* DSM 17938. *Microbiol. Ambien. Apli.* 74, 6032-6040.
- Salminen, S., von Wright, A., 1993. *Bacterias de Ácido Láctico* 1 ed. Marcel Dekker Ltd., Nueva York.
- Sanz, Y., Santacruz, A., Gauffin, P., 2010. Microbiota intestinal en desórdenes de obesidad y metabólicos. *Soc. Proc. Nutr.* 69, 434-441.
- Schiff, E.R., Small, N.C., Dietschy, J.M., 1972. Caracterización de la cinética de los mecanismos de transporte pasivo y activo para la absorción de ácido biliar en el intestino delgado y el colon de la rata. *R. Invest. Clín* 51, 1351-1362.
- Taranto, M.P., Vera, J.L., Hugenholtz, J., de Valdez, G.F., Sesma, F., 2003. El *lactobacillus reuteri* CRL1098 produce cobalamina. *R. Bacteriol.* 185, 5643-5647.
- Valderas, J.M., Kotzeva, A., Espallargues, M., Guyatt, G., Ferrans, C.E., Halyard, M.Y., Revicki, D.A., Symonds, T., Parada, A., Alonso, J., 2008. Impacto de la medición de resultados informados por los pacientes en una práctica clínica. *Análisis sistemático de la literatura. Inv. Cali. Vida.* 17, 179-193.
- Vanderhoof, J.A., Mitmesser, S.H., 2010. Probióticos en el manejo de niños con alergia y otros desórdenes de inflamación intestinal. *Microbios Benef.* 1, 351-356.
- Vasile, N., Ghindea, R., Vassu, T., 2011. Probióticos -tratamiento alternativo para varias enfermedades. *Arch. Rum. Microbiol. Inmunol.* 70, 54-59.
- Weizman, Z., Alsheikh, A., 2006. Seguridad y tolerancia de una fórmula de probiótico en la primera infancia, comparando dos agentes probióticos: estudio piloto. *R. Am. Coll. Nutr.* 25, 415-419.
- OMS, 2001 *Evaluación de las Propiedades para la Salud y Nutrición de los Probióticos en los Alimentos, incluyendo Leche en Polvo con Bacterias Vivas de Ácido Láctico.* 85 ed., pp. 1-50.

- Wind, R.D., Tolboom, H., Klare, I., Huys, G., Knol, J., 2010. Tolerancia y seguridad de la cepa potencialmente probiótica *Lactobacillus rhamnosus* PRSF-L477: prueba con distribución aleatoria, doble ciega, controlada con placebo en voluntarios sanos. R. Br. Nutr. 104, 1806-1816.
- Wolf, B.W., Garleb, K.A., Ataya, D.G., Casas, I.A., 1995. Seguridad y tolerancia del *Lactobacillus reuteri* en Hombres Adultos Sanos. Ecol. Microb. Salud Enf. 8, 41-50.
- Wolf, B.W., Wheeler, K.B., Ataya, D.G., Garleb, K.A., 1998. Seguridad y tolerancia de la suplementación con *Lactobacillus reuteri* a una población infectada con el virus de inmunodeficiencia humana. Toxicol. Quím. Alimentos. 36, 1085-1094.