



Potenciales beneficios de los probióticos en el tratamiento del estrés y trastornos de ansiedad y depresión: Revisión narrativa.

TRABAJO DE FIN DE GRADO

GRADO EN FARMACIA

TUTOR: ENRIQUE BARRAJÓN CATALÁN

AUTORA: MARÍA GREGORI NAVARRO

Tabla de contenido

| | |
|--|-----------|
| 1. RESUMEN | 2 |
| 2. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 2.1 <i>Microbiota intestinal</i> | 4 |
| 2.2 <i>Eje intestino-cerebro</i> | 5 |
| a) Nervio vago..... | 7 |
| b) Neurohormonas | 7 |
| c) Sistema inmune | 9 |
| d) Eje hipotálamo-pituitario-adrenal | 10 |
| e) Ácidos grasos de cadena corta | 10 |
| 3. OBJETIVOS | 10 |
| 4. MÉTODOS | 10 |
| 5. RESULTADOS: ENSAYOS CLÍNICOS | 12 |
| 5.1 <i>El probiótico Lactobacillus plantarum 299v (LP299v) disminuye la concentración de kineurina y mejora las funciones cognitivas en pacientes con depresión mayor: estudio de doble ciego, randomizado y controlado con placebo¹⁸</i> | 13 |
| 5.1.1 Introducción | 13 |
| 5.1.2 Diseño del estudio | 14 |
| 5.1.3 Resultados y análisis estadístico | 16 |
| 5.1.4 Discusión | 18 |
| 5.2 <i>Respuesta clínica y metabólica a la administración de probióticos en pacientes con trastorno depresivo mayor: ensayo de doble ciego, randomizado y controlado con placebo²⁶</i> . 19 | |
| 5.2.1 Introducción | 20 |
| 5.2.2 Diseño del estudio | 20 |
| 5.2.3 Resultados y análisis estadístico | 21 |
| 5.2.4 Discusión | 23 |
| 5.3 <i>Lactobacillus plantarum DR7 alivia el estrés y ansiedad en los adultos: ensayo de doble ciego, randomizado y controlado con placebo³³</i> | 24 |
| 5.3.1 Introducción | 24 |
| 5.3.2 Diseño del estudio | 25 |
| 5.3.3 Análisis estadístico y resultados | 26 |
| 5.3.4 Discusión | 30 |
| 6. DISCUSIÓN | 33 |
| 7. CONCLUSIONES | 37 |
| BIBLIOGRAFÍA | 38 |

1. RESUMEN

Se sabe que existe una conexión entre la microbiota intestinal y el cerebro, el llamado “eje intestino-cerebro”, un eje bidireccional que conecta los centros cognitivo y emocional del cerebro con el control periférico y funciones del intestino. Numerosos estudios han demostrado que las variaciones en la flora intestinal pueden provocar cambios en el estado de ánimo y el comportamiento, al igual que el estrés o ansiedad pueden provocar alteraciones de la flora intestinal. Además, se ha observado una clara diferencia entre la microbiota intestinal de pacientes que presentan síntomas de ansiedad y depresión y pacientes sanos. Las principales vías de comunicación que componen este eje son el sistema nervioso autónomo, sistema neuroendocrino, sistema nervioso entérico y sistema neuroinmune.

El presente trabajo recopila los ensayos clínicos llevados a cabo desde 2015 en humanos sobre la influencia de la toma de probióticos en la salud mental, en concreto sobre el estrés y los diversos tipos de depresión. Tres estudios han cumplido los criterios de inclusión marcados y en todos ellos se muestran evidencias claras del efecto beneficioso de la toma de probióticos sobre diferentes marcadores de la salud mental, tanto a nivel molecular, como bioquímico y psicológico. Algunos de estos cambios observados son la mejora de las funciones cognitivas, disminución de la concentración de kineurinas, de los niveles de cortisol, disminución de células implicadas en la inflamación o mejora del perfil lipídico.

Con los resultados obtenidos se podría plantear el futuro uso de los probióticos en el tratamiento del estrés y la ansiedad y como coadyuvante al tratamiento farmacológico de la depresión mayor.

Palabras clave: probiotics, anxiety, depressive disorder, gut-brain axis.

2. INTRODUCCIÓN

El estudio del microbioma ha supuesto una revolución, pues años atrás no existían técnicas para estudiar aquellos organismos que no se podían cultivar, como es el caso de muchos de los que forman parte de la microbiota. Por ello, el estudio y desarrollo clínico de los probióticos y prebióticos es un campo relativamente nuevo que aún requiere de mucha investigación.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) “los **probióticos** son aquellos microorganismos vivos que, cuando son administrados en las cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del hospedador”. Se trata de suplementos dietéticos que tienen la capacidad de cambiar la composición de la microbiota del colon, mejorando el equilibrio intestinal. Por otro lado, los **prebióticos** se definen como aquellos ingredientes no digeribles que afectan al huésped de manera beneficiosa mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o actividad de determinadas especies de bacterias que residen en el colon¹.

Si bien es cierto que sí hay muchos estudios a cerca de como los probióticos pueden servir para tratar diferentes patologías relacionadas con el intestino, como por ejemplo el síndrome de colon irritable o algunas gastroenteritis, su uso en el tratamiento de enfermedades relacionadas con el sistema nervioso central es todavía muy incipiente y novedoso.

El complejo sistema de comunicación entre el intestino y el cerebro no sólo garantiza el mantenimiento y coordinación de las funciones gastrointestinales que regulan el comportamiento individual y los procesos fisiológicos, sino que también permite una retroalimentación, actuando en el estado de ánimo, el comportamiento motivado y las funciones cognitivas superiores².

Este vínculo entre las funciones intestinales y los procesos emocionales y cognitivos se debe a señales aferentes y eferentes a través de cuatro vías principales: sistema nervioso autónomo, sistema neuroendocrino, sistema nervioso entérico y sistema neuroinmune³.

La alteración de estos sistemas puede dar lugar a trastornos psiquiátricos o alteraciones de la conducta. De hecho, se ha demostrado una alta comorbilidad entre los trastornos gastrointestinales, como el síndrome de colon irritable, y los trastornos psiquiátricos relacionados con el estrés, como la ansiedad y la depresión⁴.

2.1 Microbiota intestinal

El término **microbiota o microflora** hace referencia a los microorganismos (bacterias, hongos, virus) que viven en un determinado entorno, como en el tracto gastrointestinal, el genitourinario, la cavidad oral, la nasofaringe, el tracto respiratorio y la piel. El término **microbioma**, hace referencia al conjunto de genes (genoma) de los organismos que integran la microflora o microbiota⁵.

El número de bacterias que componen la microbiota intestinal (MI) es de entre 10^{14} - 10^{15} , es decir, diez veces más la cantidad de células eucariotas que tenemos en nuestro organismo. Estas bacterias compiten con las patógenas por los nutrientes y por la unión a receptores en el epitelio intestinal, y se pueden encontrar hasta mil especies distintas^{6,7}. La mayor parte de estas especies se encuentran principalmente en el colon.

La MI va variando a lo largo de la vida del individuo. El intestino del feto es estéril y a partir del nacimiento es cuando empieza a ser colonizado por los diferentes microorganismos. Por ello el tipo de parto (vaginal o cesárea) o el tipo de lactancia (natural o artificial) va a influir mucho en el desarrollo de la MI de cada individuo. Desde los cero a los tres años la MI de cada individuo se va diversificando, y es partir de los tres años cuando ésta comienza a estabilizarse. Durante la edad adulta la MI es muy estable y es poco probable que sufra modificaciones, aunque pueden influir factores como la alimentación, la toma de antibióticos o el estilo de vida. También el factor genético juega un papel importante. En la vejez, la flora intestinal se empobrece ligeramente⁶.

En los adultos, los microorganismos que se encuentran en mayor proporción son *Bacteroidetes* y *Firmicutes*, mientras que *Actinobacterias*, *Proteobacterias* y *Verrucomicrobias* se encuentran en menor proporción⁸. Las bacterias anaerobias facultativas como enterobacterias, enterococos y

lactobacilos, son las primeras en colonizar el tracto gastrointestinal. Mientras que los organismos anaerobios estrictos como *Bifidobacterium*, *Bacteroides* y *Clostridium* se van estableciendo gradualmente, promoviendo un desplazamiento de los organismos anaerobios facultativos por anaerobios estrictos³ (Figura 1).

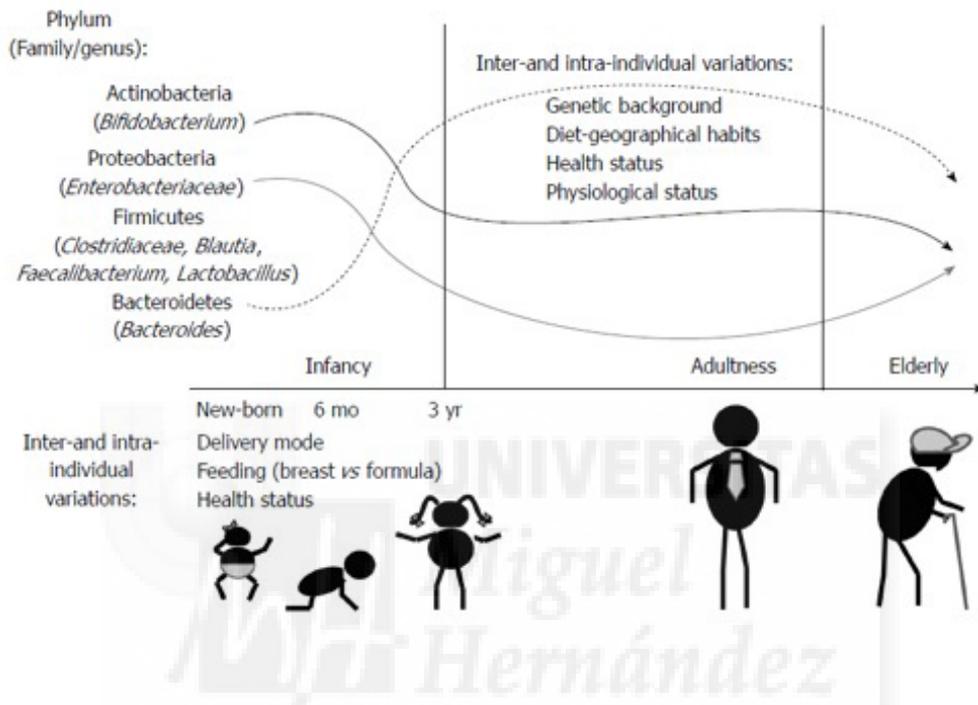


Figura 1: muestra la evolución de la microbiota intestinal a lo largo de la vida⁹.

Las alteraciones en la MI y la respuesta adversa del hospedador a estos cambios es lo que se conoce como **disbiosis**. Cuando se produce un estado de disbiosis, comienza a producirse el estrés proinflamatorio, estrés oxidativo, desequilibrio en la homeostasis energética y un incremento de la degeneración celular¹⁰.

2.2 Eje intestino-cerebro

La MI y el sistema nervioso central (SNC) se encuentran comunicados mediante diferentes vías, esto es lo que se conoce como **eje intestino-cerebro**. Se trata de un sistema de comunicación bidireccional a través de cuatro vías: sistema nervioso autónomo, sistema neuroendocrino, sistema nervioso entérico y sistema neuroinmune³. Por tanto, las señales pueden llegar al SNC a través de

la estimulación del nervio vago por el sistema nervioso entérico, a través de la producción de metabolitos como hormonas, neurotransmisores o ácidos grasos de cadena corta o, a través del sistema nervioso inmune mediante la liberación de citoquinas⁸ (**Figura 2**). En esta interacción juega también un papel muy importante la permeabilidad intestinal, la cual se puede ver alterada por ciertas infecciones o factores estresantes. Debido a esta forma de comunicación entre cerebro e intestino existe la posibilidad de actuar sobre los mecanismos de homeostasis y regulación del estrés a través de la MI mediante la administración de probióticos¹¹.

Así apareció el concepto de **psicobióticos**, definido como el conjunto de probióticos y prebióticos que, ingeridos en las cantidades adecuadas, tienen un efecto favorable en la salud mental¹¹. Este concepto no se limita únicamente a las enfermedades relacionadas con el SNC, sino que también abarca la modulación de la respuesta emocional, memoria, aprendizaje y comportamiento.

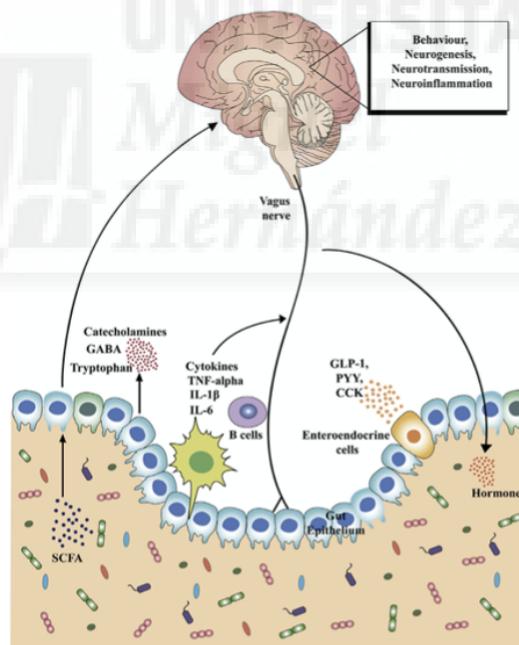


Figura 2: mecanismos de comunicación de la MI a través del eje intestino-cerebro. Entre ellos se encuentran la activación del nervio vago, la respuesta de células B ante la producción de antígenos bacterianos, producción de ácidos grasos de cadena corta (*short chain fatty acids*, SCFAs) y señalización enteroendocrina por las células del epitelio gastrointestinal (por ejemplo, células I que liberan CCK o células L que liberan GLP-1, PYY y otros péptidos). Mediante estas rutas el eje MI-intestino-SNC controla procesos tales como comportamiento, neurotransmisión, neurogénesis, neuroinflamación y señalización neuroendocrina, implicados en respuestas relacionadas con el estrés. 5-HT serotonina, CCK colecistoquinina, PYY péptido YY, TNF factor de necrosis tumoral².

Antes de profundizar en los mecanismos de comunicación entre intestino y cerebro, cabe aclarar que el **estrés** es un estado dinámico complejo en el que la homeostasis o el estado de equilibrio interno se ve alterado o amenazado. Es normal que a lo largo de la vida acontezcan muchas situaciones de estrés (psíquico, físico, inmunológico...) que, en condiciones normales, acaban en un estado de equilibrio. Exposiciones prolongadas al estrés, pueden derivar en trastornos como la ansiedad y la depresión. Por ello, la regulación de la respuesta al estrés parece ser un mecanismo clave por el que la microbiota puede influir sobre los trastornos psiquiátricos.

A continuación, se explican los mecanismos mediante los cuales la MI puede modular la respuesta al estrés, y por tanto, a la ansiedad y a la depresión.

a) Nervio vago

Parece que la principal vía de comunicación MI-SNC es a través del nervio vago. Estudios en ratones han demostrado que el tratamiento crónico con *Lactobacillus rhamnosus* puede afectar a ciertos comportamientos relacionados con la neurotransmisión del GABA, mientras que en los ratones vagotomizados este hecho no sucede⁴. Esto apunta al importante papel del nervio vago en dicha comunicación.

b) Neurohormonas

Otro modo de comunicación es a través de las neurohormonas, sustancias químicas que actúan como neurotransmisores, pero que en vez de ser liberadas a la hendidura sináptica, son liberadas a la circulación sistémica. Son producidas por las células neuroendocrinas del intestino. Las principales son las catecolaminas y la serotonina. Éstas pueden actuar directa e indirectamente en el estado de ánimo y en el comportamiento.

La **serotonina** tiene un papel clave como neurotransmisor en el SNC y en el sistema nervioso entérico (SNE). Su producción en el SNC representa el 5% de la síntesis total, mientras que el 90% es sintetizada en las células enterocromafines del epitelio gastrointestinal. La serotonina restante es sintetizada de forma local en tejidos periféricos. Esta serotonina sintetizada por las células enterocromafines actúa como hormona paracrina en el intestino y como hormona endocrina transportada a través de la sangre unida

mayoritariamente a las plaquetas. Su función como hormona es conectar ambas partes del eje intestino-cerebro y la producción de efectos sistémicos como la densidad ósea y el metabolismo. Aunque no puede atravesar la barrera hematoencefálica (BHE), existe una conexión indirecta con el SNC debida a la actuación de la MI sobre su precursor, el triptófano, y sobre el transportador de serotonina¹².

Se cree que las catecolaminas libres son producidas por la desconjugación de catecolaminas conjugadas, por tanto, es posible que la desconjugación por enzimas bacterianas pueda ser uno de los mecanismos por el cual la MI puede producir serotonina libre en el lumen del intestino.

Aunque la relación de la serotonina liberada por las células enterocromafines del intestino con el SNC pueda parecer improbable, ya que la serotonina no atraviesa la BHE, esta hipótesis se probó en ratones GF (*germ-free*, libres de microorganismos vivos) y en ratones gnotobióticos (ratones con una microbiota conocida, que se han obtenido a partir de ratones libres de microorganismos) recolonizados con flora fecal SPF (*specific pathogen-free*, libre de patógenos específicos). Se observó que los niveles de serotonina en los ratones GF eran significativamente menores que en el otro grupo de ratones. Estos niveles incrementaron rápidamente en tres días, cuando se expuso al grupo de ratones GF a microbiota SPF. También se observó que el 50% de la serotonina presente en los ratones GF se encontraba en la forma conjugada, mientras que la mayor parte de la serotonina del otro grupo de ratones se encontraba en la forma desconjugada, es decir, en la forma libre¹³.

El principal precursor de la serotonina es el aminoácido **triptófano**, el cual es usado en su mayor parte en la ruta de la kineurina y menor parte para la producción de serotonina en las células enterocromafines y el SNC, ya que puede atravesar la BHE, aunque de manera muy ineficiente en comparación con otros aminoácidos¹⁴. Curiosamente, la ausencia de microbiota a temprana edad en ratones GF conduce a un aumento de las concentraciones de triptófano en plasma y a un aumento de los niveles de serotonina en el hipocampo en la edad adulta. Esto apunta a que la MI puede tener un papel crucial en la disponibilidad y metabolismo del triptófano que afecta a la concentración central de serotonina².

Es decir, la colonización del intestino, así como los cambios en la microbiota, pueden afectar al metabolismo de triptófano y consecuentemente, al sistema serotoninérgico. Por ello, es necesario un equilibrio entre el triptófano utilizado por parte de las bacterias y el usado para la síntesis de serotonina en el SNC y en el SNE¹⁵.

Lo mismo ocurre con el neurotransmisor **GABA**. También se cree que la microbiota influye en su liberación debido a la acción enzimática de algunas bacterias. Éstas contienen la enzima glutamato descarboxilasa que degrada el glutamato presente en algunos nutrientes, provocando que se transforme en GABA. Al igual que la serotonina, el GABA sintetizado no atraviesa la BHE, por lo que su acción también es indirecta⁸.

c) Sistema inmune

El intestino es un importante órgano inmunológico que conforma una barrera de defensa entre los patógenos externos y el entorno interno. Estudios realizados con modelos animales han demostrado que los microorganismos patógenos afectan a la activación de las vías de señalización inmunológica.

La administración periférica de citoquinas proinflamatorias en roedores provoca comportamientos depresivos tales como alteraciones del sueño, disminución del apetito y supresión del comportamiento exploratorio (estos son los denominados “comportamientos de la enfermedad”)¹⁶.

Se cree que los patrones moleculares asociados a los microorganismos que activan esta vía inmunológica pueden ser los lipopolisacáridos (LPS) o lipoproteínas bacterianas (BLP), entre otros. Estos pueden activar células del sistema inmune innato como macrófagos, neutrófilos y células dendríticas. Una vez activadas, estas células producen numerosas citoquinas proinflamatorias como IL-6, IL-1 o TNF, que atraviesan la BHE, actuando sobre los receptores neuronales¹⁷. En personas sanas, el desafío LPS (en inmunología, exposición de un sujeto a un LPS que puede servir como una toxina) demostró tener un impacto negativo dosis dependiente en las funciones cognitivas¹⁸.

Los efectos inmunoregulatorios de los probióticos parecen ser la generación de células T regulatorias y la síntesis y secreción de citoquinas antiinflamatorias como la IL-10¹⁹. En apoyo a esta teoría, en un estudio realizado

a humanos, la administración oral de *Bifidobacterium infantis* 35624 se asoció con un aumento de la expresión de IL-10 en sangre periférica¹⁶.

d) Eje hipotálamo-pituitario-adrenal

El eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA) es el que regula la liberación de cortisol por la corteza suprarrenal. Ante una situación de estrés los niveles de cortisol en sangre aumentan. En un estudio realizado en ratones GF y ratones SPF sometidos a estresores, se observó un mayor incremento de corticotropina (ACTH) y corticosterona en el grupo de ratones GF que en el grupo SPF, indicando la participación de la MI en la modulación de la actividad del eje HPA. Además, este estudio demostró que la respuesta del eje HPA se normalizó después de colonizar a los ratones GF, en edad temprana, con bacterias del grupo de ratones SPF. Sin embargo, la colonización de los ratones GF a edades más tardías no normalizó la respuesta del HPA a los estresores²⁰.

e) Ácidos grasos de cadena corta

La MI puede favorecer la producción de ácidos grasos de cadena corta, como propionato, acetato o butirato, a partir de la hidrólisis de polisacáridos. Algunos estudios afirman la implicación de los ácidos grasos de cadena corta en la respuesta inflamatoria. Además, son capaces de atravesar la BHE regulando los niveles de GABA, glutamato y glutamina⁸.

3. OBJETIVOS

El objetivo de este TFG es mostrar el grado de evidencia clínica a cerca del efecto de los probióticos en el tratamiento de patologías como la ansiedad y la depresión, ya sea como terapia única o bien como coadyuvantes a otra terapia farmacológica. Para ello, se plantean los siguientes objetivos específicos:

1. Identificar aquellos estudios en humanos que hayan abordado este tema.
2. Valorar su evidencia científica.
3. Extraer las conclusiones sobre el estado actual de la evidencia científica sobre el tema.

4. MÉTODOS

En primer lugar, se ha realizado una intensiva búsqueda para tratar de explicar cuál es la relación que puede haber entre la microbiota intestinal y el

cerebro y sus vías de comunicación. Las fuentes de información con las que se ha trabajado han sido la base datos Pubmed, la Sociedad Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos (SEMiPyP) y SEFAC (Sociedad Española de Farmacia Familiar y Comunitaria). Las palabras clave usadas en Pubmed han sido “probiotics”, “depressive disorder”, “anxiety” y “gut-brain axis”. Se han incluido todo tipo de artículos (revisiones, ensayos clínicos, etc.) que estuviesen basados en humanos o animales.

En segundo lugar, para realizar la búsqueda de ensayos clínicos que mostrasen los efectos de los probióticos en el estrés, ansiedad y depresión (los ensayos clínicos expuestos en el apartado de resultados), los criterios de inclusión han sido que estos fuesen realizados con humanos, que los pacientes padeciesen algún grado de depresión, ansiedad o estrés y que fuesen lo más actuales posible, con un máximo de antigüedad de cinco años. Se han excluido los ensayos clínicos no realizados en humanos, con fecha de publicación anterior a 2015 y aquellos en los que la depresión, ansiedad o estrés fuese unido a una determinada patología o situación, como por ejemplo depresión postparto, o presentasen enfermedades inflamatorias (intestinales, autoinmunes, etc.) como colon irritable, por ejemplo. Tras aplicar estos criterios se obtuvieron inicialmente 18 trabajos. Teniendo en cuenta los trabajos con mejor diseño experimental, finalmente 3 artículos fueron seleccionados (**Figura 3**). Las ecuaciones de búsqueda fueron las siguientes:

- ("Probiotics"[Mesh]) AND "Depressive Disorder"[Mesh] Filters: Clinical Trial; published in the last 5 years; Humans → 6 artículos.
- ("Probiotics"[Mesh]) AND "Anxiety"[Mesh] Filters: Clinical Trial; published in the last 5 years; Humans → 12 artículos.

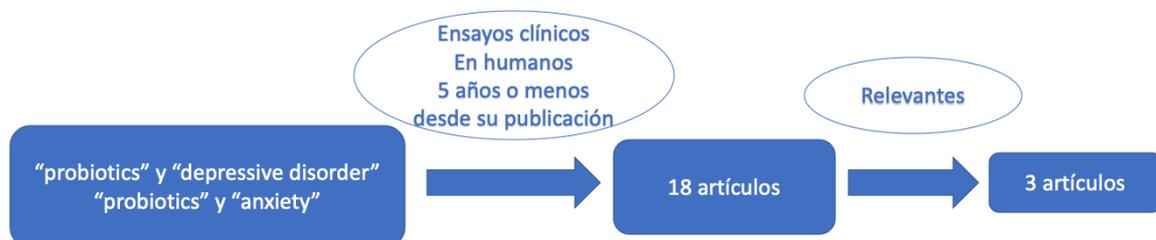


Figura 3: esquema y resultados de la búsqueda bibliográfica realizada.

La calidad metodológica de los tres ensayos clínicos fue valorada mediante la escala Jadad. Este método se basa en un sistema de puntuación dado según una serie de preguntas como:

- 1) ¿El estudio se describe como aleatorizado o randomizado?
- 2) ¿Se describe el método utilizado para generar la secuencia de aleatorización y este método es adecuado?
- 3) ¿Es adecuado el método utilizado para generar la secuencia de aleatorización?
- 4) ¿El estudio se describe como doble ciego?
- 5) ¿Se describe el método de enmascaramiento y este método es adecuado?
- 6) ¿Es adecuado el método de enmascaramiento?
- 7) ¿Hay una descripción de las pérdidas de seguimiento y los abandonos?

En las preguntas 1,2, 4, 5 y 7, si la respuesta es “sí”, se suma un punto y si es “no”, no se suma ninguno. En las preguntas 3 y 6 si la respuesta es “sí”, no se suma ningún punto, y si la respuesta es “no”, se resta un punto.

La puntuación total va de 0 a 5, siendo más riguroso cuanto más alta es la puntuación.

5. RESULTADOS: ENSAYOS CLÍNICOS

Los ensayos clínicos en humanos presentados a continuación han sido elegidos por su actualidad y relevancia en tratamiento del estrés, ansiedad y depresión de acuerdo con los criterios mostrados en la sección de metodología. En ellos se muestran los posibles beneficios sobre estos trastornos y la dosis a la que ejercen el efecto clínico deseado. También con ellos se pretende tener una visión más clara del funcionamiento y las vías de comunicación del eje intestino-cerebro y su relación con la ansiedad y depresión.

5.1 El probiótico *Lactobacillus plantarum* 299v (LP299v) disminuye la concentración de kineurina y mejora las funciones cognitivas en pacientes con depresión mayor: estudio de doble ciego, randomizado y controlado con placebo¹⁸.

El objetivo del estudio de Rudzki y colaboradores de 2018 es demostrar los efectos de *Lactobacillus plantarum* 299v sobre funciones cognitivas y sobre la regulación de la vía de la kineurina como coadyuvantes en pacientes con depresión mayor.

El ensayo se llevó a cabo en pacientes diagnosticados de depresión mayor y en tratamiento con inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS). A un grupo se le administró el probiótico LP299v y al otro, placebo. Finalmente se midieron las funciones afectivas y cognitivas y parámetros bioquímicos.

Las principales conclusiones obtenidas en este estudio fueron:

- Mejora de las funciones cognitivas en el grupo de pacientes deprimidos que recibieron el probiótico en comparación con el grupo que recibió placebo.
- Disminución significativa en la concentración de kineurina en el grupo que recibió el probiótico en comparación con el grupo que recibió el placebo.
- Aumento significativo en el ratio 3-hidroxikineurina:kineurina en el grupo que recibió el probiótico en comparación con el grupo que recibió el placebo.
- La disminución de kineurina en el grupo que recibió el probiótico podría contribuir a la mejora de las funciones cognitivas en comparación con el grupo que recibió el placebo.

5.1.1 Introducción

Las kineurinas tienen efectos neurotóxicos y neurodegenerativos en el SNC. Las citoquinas proinflamatorias (IL-6, IL-1b, TNF- α), los LPS bacterianos, los glucocorticoides y el estrés oxidativo, pueden activar enzimas que intervienen en la ruta de la kineurina, como la indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO) y la triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO). Éstas inician la conversión del triptófano (TRP) en catabolitos tóxicos de la kineurina (TRYCATs), impidiendo la conversión del TRP en serotonina (5-HT) y melatonina (**Figura 4**). Como consecuencia, el TRP se transforma en KYN y derivados de ella, que tienen efectos negativos a nivel

neuronal e inmunológico. Por ejemplo, el ácido quinolínico (QUIN) o el ácido kineurínico (KYNA) han demostrado tener efectos negativos en las funciones cognitivas²¹.

La elección de usar el probiótico *Lactobacillus Plantarum 299v* en este ensayo fue debida a su capacidad para sobrevivir en el tracto GI y colonizarlo²², ya que es un microorganismo natural de la MI humana, y porque ha demostrado que disminuye la permeabilidad intestinal y reduce la inflamación sistémica e intestinal²³. También por su posible modulación sobre la ruta de la kineurina, con especial interés en el efecto que ejerce sobre las funciones cognitivas, en la neuroprotección y sobre los síntomas de depresión y ansiedad.

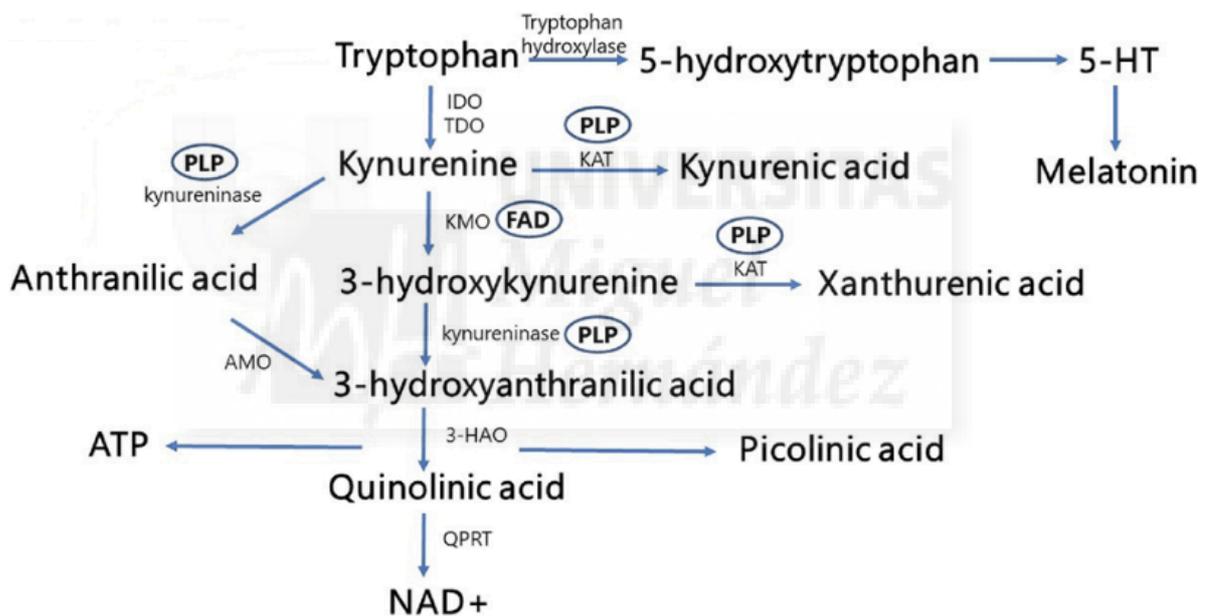


Figura 4: esquema del metabolismo del triptófano a través de la ruta de la kineurina¹⁸.

KAT: kineurina aminotransferasa; KMO: kineurina monooxigenasa; AMO: antranilato de 3-monooxigenasa; 3-HAO: ácido 3-hidroxiantranílico oxidasa; QPRT: ácido quinolínico fosforribosil transferasa; PLP: piridoxal 5'-fosfato (forma activa de la piridoxina-vitamina B6); FAD: dinucleótido flavina adenina (forma activa de la riboflavina-vitamina B2).

5.1.2 Diseño del estudio

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Universidad de Medicina de Bialystok (Polonia), llevado a cabo entre junio de 2014 y marzo de 2016 y, publicado en octubre de 2018. Según la escala de Jadad, la realización y validez de este estudio se puede considerar como muy rigurosa.

En total 79 participantes cumplieron los requisitos para participar en el ensayo. Todos ellos padecían depresión mayor según el Manual Diagnóstico y Estadístico de los Trastornos Mentales.

La duración del estudio fue de 8 semanas, y su diseño fue randomizado, doble ciego y controlado con placebo. Los participantes fueron distribuidos aleatoriamente en el grupo placebo (n= 39), el cual recibía ISRS + placebo, y el grupo del probiótico (n= 40), el cual recibía ISRS + el probiótico *LP299v*.

Los participantes añadieron a su tratamiento con ISRS, durante las 8 semanas que duró el estudio, el probiótico *LP299v* o bien el placebo. Ambos grupos recibieron 60 cápsulas de probiótico o de placebo (eran exactamente iguales en apariencia) para las primeras 4 semanas. La posología a seguir era una cápsula por la mañana y otra por la noche. Cada cápsula de probiótico contenía 10×10^9 CFU de *LP299v* mientras que las cápsulas de placebo contenían polvo de celulosa cristalino. Después de las 4 semanas se evaluó la adherencia de los participantes al tratamiento pidiendo que devolvieran los envases de las cápsulas vacíos. Otras 60 cápsulas les fueron dadas para las 4 semanas siguientes.

Finalmente, 60 de los 79 participantes finalizaron el estudio: 30 en el grupo del probiótico y 30 en el grupo del placebo. 9 participantes del grupo del probiótico y 7 del grupo control ya habían empezado el tratamiento con ISRS antes de ser incluidos en el estudio, aun así, no hubo diferencias estadísticas en este parámetro entre ambos grupos, al igual que tampoco las hubo en el tipo de ISRS tomado antes de la inclusión en el estudio entre el grupo placebo y el grupo probiótico, ni en el tipo de ISRS tomado durante el estudio entre ambos grupos.

La **severidad de los síntomas psiquiátricos** fue evaluada mediante la escala de depresión de Hamilton (HAM-D 17), el inventario de síntomas SCL-90 (*Symptom Check List-90*) y la escala de estrés percibido (*Perceived Stress Scale*, PSS-10). Las **funciones cognitivas** fueron evaluadas mediante el test de atención y percepción (*Attention and Perceptivity Test*, APT), el test de Stroop partes A y B, el test de fluidez de diseños de Ruff (*Ruff Figural Fluency Test*, RFFT), test del trazo (*Trail Making Test*, TMT) partes A y B y el test de aprendizaje verbal de California (*California Verbal Learning Test*, CVLT). Los

parámetros bioquímicos tales como triptófano, kineurina, ácido kineurínico, 3-hidroxicineurina (3HKYN), ácido antranílico (AA), ácido 3-hidroxiantranílico (3HAA), TNF- α , IL-6, IL-1b y la concentración de cortisol en plasma también fueron medidos, tanto al inicio como al final del tratamiento.

5.1.3 Resultados y análisis estadístico

Para valorar las diferencias en el efecto del tratamiento entre ambos grupos de tratamiento (probiótico vs. placebo) según el tiempo (semana 0 vs. semana 8), se empleó la prueba del análisis de la varianza (ANOVA). Para saber concretamente entre qué grupos había diferencias significativas se usó la posterior corrección de Bonferroni. Las comparaciones de las características (años, IMC, educación y resto de datos recogidos) entre ambos grupos se usó la prueba de la t de Student y las pruebas no paramétricas de Chi-cuadrado y la prueba U de Mann-Whitney. Se obtuvieron los resultados mostrados a continuación.

Resultados primarios: síntomas de depresión y ansiedad.

No hubo cambios significativos en las mediciones hechas con HAM-D 17, SCL-90, PSS-10.

Resultados secundarios: funciones cognitivas.

Se observaron cambios en los siguientes test:

- APT. Evalúa la atención selectiva, el mantenimiento de la atención, la vigilancia y la percepción visual. La puntuación se obtiene a partir de variables como la velocidad de trabajo, número de errores y número de omisiones. Se observó una mejora significativa en la variable *work speed* (velocidad de trabajo) en el grupo que recibió el probiótico ($p= 0.006$) (**Figura 5**).
- CVLT. Evalúa el aprendizaje verbal y la memoria mediante una prueba de aprendizaje llamada *total recall of trials 1-5*, mediante errores preservativos y de intrusión y, mediante una prueba llamada *semantic clustering*, consistente en el uso de estrategias de aprendizaje para reorganizar una lista de palabras según su categoría. Se observó una mejora significativa en la variable *total recall of trials 1-5* en el grupo de pacientes que recibió el probiótico ($p= 0.023$) (**Figura 5**).

Sin embargo, no hubo diferencias significativas en el test de Stroop partes A y B, en el RFFT y en el TMT partes A y B entre el grupo placebo y el grupo probiótico.

Resultados secundarios: kineurinas, citoquinas y cortisol.

Se observó una disminución significativa de la concentración de kineurinas en el grupo probiótico en comparación con el grupo placebo ($p=0.005$) (**Figura 5**) y un aumento significativo en el ratio 3HKYN:KYN en el grupo probiótico en comparación con el grupo placebo ($p=0.034$) (**Figura 5**).

También se observó un cambio significativo en la concentración de AA ($p=0.028$). Sin embargo, la posterior corrección de Bonferroni no alcanzó significatividad estadística en ninguno de los grupos.

No se observaron cambios significativos en TRP, 3HKYN, KYNA, 3HAA, KYNA:KYN, KYN:TRP, al igual que tampoco se observaron en la concentración de citoquinas proinflamatorias (TNF- α , IL-6, IL-1b) ni en la de cortisol.

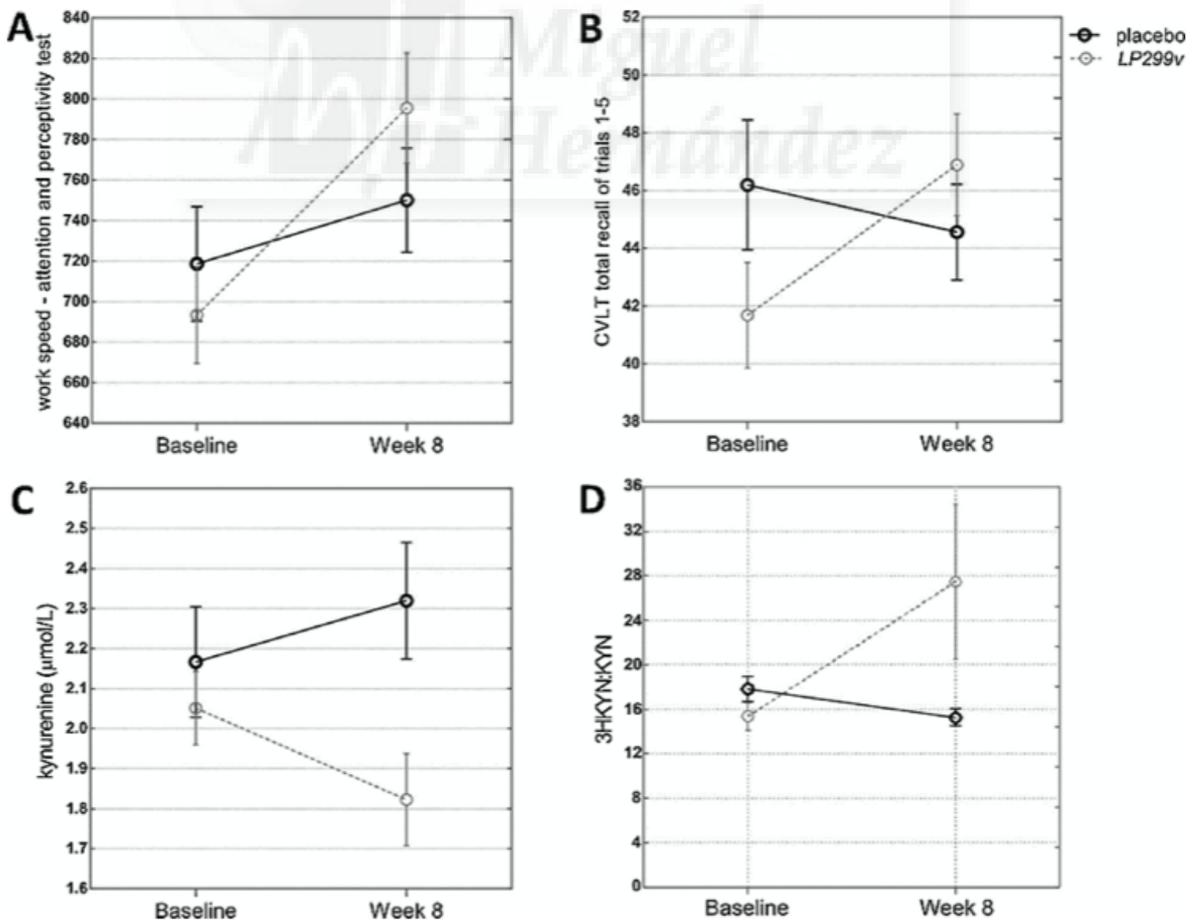


Figura 5: cambios significativos, tras 8 semanas de tratamiento, en comparación con el grupo placebo. A: mejora de la variable “work speed” en grupo probiótico *LP299v* en el test APT. B: mejora de la variable “total recall of trials 1-5” en el grupo probiótico *LP299v* en el test CVLT. C: disminución de la concentración de kineurina en el grupo probiótico *LP299v*. D: aumento del ratio 3HKYN: KYN en el grupo probiótico *LP299v*.

5.1.4 Discusión

Este ha sido el primer estudio en el que la administración del probiótico *LP299v* ha mostrado disminuir la concentración de kineurinas con la consecuente mejora de las funciones cognitivas en pacientes deprimidos. Se han planteado varias hipótesis para explicar este hecho.

El aumento de la permeabilidad intestinal, a causa del estrés, contribuye a la inflamación intestinal y sistémica, debido a un aumento de citoquinas proinflamatorias, y a un aumento de los niveles de kineurinas tóxicas. Cuando la permeabilidad se ve aumentada, los LPS bacterianos son capaces de atravesar la barrera intestinal y de inducir el enzima IDO, favoreciendo la conversión de TRP en KYN (**Figura 4**). Se cree que el *LP299v*, debido a su capacidad de adherirse a la mucosa intestinal por adhesinas específicas de manosa, puede mejorar la producción de mucina disminuyendo la permeabilidad e inhibiendo el crecimiento y la adhesión de bacterias y hongos potencialmente patógenos. Todo esto favorece la disminución de la concentración de KYN en los pacientes que toman *LP299v*.

Otro potencial mecanismo por el cual disminuye la concentración de KYN, está relacionado con la inhibición de la actividad del enzima IDO por el peróxido de hidrógeno, ya que se ha demostrado que la *LP299v* es capaz de acumular H_2O_2 ²⁴.

También puede ser que la reducción de KYN se deba al aumento de 5-HT, ya que una mayor concentración de TRP se ha utilizado para la síntesis de 5-HT y una menor concentración para la producción de KYN. De hecho, se sabe que el *LP299v* tiene efectos terapéuticos en el síndrome de colon irritable ya que produce alteraciones en la biosíntesis, liberación y recaptación de 5-HT²⁵.

El aumento observado en el ratio 3HKYN:KYN refleja la actividad de la enzima KMO (**Figura 4**). Esto indicaría que la activación de KMO en los pacientes que recibieron *LP299v* puede haber aumentado el metabolismo de KYN hacia la síntesis de NAD⁺ y ATP, sin acumulación de kineurinas tóxicas.

Una explicación a cómo la disminución de la concentración de KYN ha contribuido a la mejora de las funciones cognitivas es que cerca del 60% de la KYN que se encuentra en el cerebro proviene de la periferia, tras cruzar la BHE. Por tanto, es probable que los cambios en la concentración plasmática de KYN ejerzan una influencia significativa en el SNC.

Finalmente, los autores de este ensayo clínico llegaron a la conclusión de que debido a la falta de influencia de *LP299v* en la concentración plasmática de TRP, no ha habido cambios en la disponibilidad de TRP en el cerebro y, por tanto, en la síntesis de 5-HT. Este hecho podría explicar a la a falta de diferencias en los parámetros afectivos de la depresión mayor entre el grupo probiótico y placebo durante el tratamiento.

5.2 Respuesta clínica y metabólica a la administración de probióticos en pacientes con trastorno depresivo mayor: ensayo de doble ciego, randomizado y controlado con placebo²⁶.

El objetivo de de Ghodarz y colaboradores en sus estudio de 2015 fue demostrar los posibles beneficios de los probióticos en los síntomas depresivos y en parámetros de la homeostasis de la glucosa, concentraciones lipídicas y biomarcadores de inflamación y estrés oxidativo en pacientes con depresión mayor.

El estudio se llevó a cabo en pacientes diagnosticados con depresión mayor. A un grupo se le administró placebo y al otro grupo una cápsula compuesta por varias cepas de probióticos (*Lactobacillus acidophilus* 2×10^9 CFU/g, *Lactobacillus casei* 2×10^9 CFU/g y *Bifidobacterium bifidum* 2×10^9 CFU/g). Las principales conclusiones tras comparar ambos grupos fueron las siguientes:

- Disminución de los síntomas depresivos en el grupo probiótico en comparación con el grupo placebo.
- Disminución de los niveles de insulina, de la resistencia a la insulina (HOMA-IR) y de la concentración de proteína C reactiva (hs-CRP) en el grupo probiótico en comparación con el grupo placebo.
- Aumento de los niveles de glutatión (antioxidante) en plasma en el grupo probiótico en comparación con el grupo placebo.

5.2.1 Introducción

El estudio parte de la evidencia de que los pacientes con depresión mayor (DM) tienen una mayor predisposición a presentar comorbilidades, mortalidad, un mayor riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares, dislipidemias y alteraciones en la glucosa e insulina²⁷. Estudios previos han demostrado que existe una relación entre el perfil metabólico y biomarcadores de la inflamación y del estrés oxidativo con la depresión. La desregulación del cortisol, propia de los pacientes con depresión, puede tener efectos en la resistencia a la insulina en los pacientes que la padecen²⁸. Además, también se ha demostrado que niveles bajos de antioxidantes, especialmente glutatión (GSH), están asociados con un aumento de la anhedonia, que a su vez está relacionada con la neuroinflamación y el estrés oxidativo²⁹.

En el presente estudio, se compararon los resultados obtenidos en los pacientes que recibieron placebo y los que recibieron probiótico. Los parámetros medidos fueron los siguientes:

- Síntomas de depresión, para ello se usó el índice de Beck (BDI).
- Parámetros de la homeostasis de la glucosa: concentración plasmática de glucosa en ayunas (FPG), resistencia a la insulina mediante el modelo homeostático HOMA-IR, actividad de las células β mediante el modelo homeostático HOMA-B y sensibilidad a la insulina mediante la prueba QUICK.
- Perfil lipídico: concentraciones de triglicéridos, VLDL total, LDL y HDL.
- Biomarcadores de inflamación: concentración de proteína C reactiva (CRP) mediante hs-CRP.
- Estrés oxidativo: nivel de glutatión (GSH) en plasma y nivel de TAC (capacidad antioxidante total).

5.2.2 Diseño del estudio

El estudio se llevó a cabo entre julio y septiembre de 2014 por la Universidad de Ciencias Médicas de Kashan (Irán) y publicado en septiembre de 2015. Según la escala de Jadad la validez del ensayo se puede considerar como muy rigurosa.

El diagnóstico de DM se hizo en base al criterio DSM-IV y con una puntuación mayor o igual a 15 en la escala de depresión de Hamilton (HAM-D 17).

En total 40 participantes, de entre 20 y 55 años y que padecían DM, fueron reclutados para el estudio durante ocho semanas. Los participantes fueron distribuidos aleatoriamente en el grupo placebo (n= 20) y el grupo probiótico (n= 20). Durante estas 8 semanas los pacientes del grupo probiótico recibieron una cápsula al día compuesta por varias cepas de bacterias (*Lactobacillus acidophilus* 2×10^9 CFU/g, *Lactobacillus casei* 2×10^9 CFU/g y *Bifidobacterium bifidum* 2×10^9 CFU/g), y los pacientes del grupo placebo recibieron una cápsula que contenía almidón (igual en apariencia). Tanto los participantes, como los evaluadores desconocían la distribución de los grupos hasta el final del ensayo.

La adherencia al tratamiento fue revisada pidiendo a los participantes que devolvieran los envases de las cápsulas vacíos. También se hicieron registros de la dieta y de la actividad física en las semanas 2, 4 y 6.

Para comparar y poder evaluar los cambios en los participantes las medidas bioquímicas, pruebas o cuestionarios se realizaron al principio y al final del tratamiento.

Los resultados primarios, es decir, los síntomas depresivos, fueron evaluados mediante el cuestionario BDI, compuesto por 21 preguntas.

Los resultados secundarios fueron los niveles de glucosa es ayunas y concentraciones de triglicéridos, VLDL total, LDL y HDL, que se utilizaron para evaluar la resistencia a la insulina (HOMA-IR), la actividad de las células β (HOMA-B) y la sensibilidad a la insulina (QUICKI). También se midió la CRP de alta sensibilidad (hs-CRP), en nivel de glutatión es plasma (GSH) y los niveles de TAC (capacidad antioxidante total).

5.2.3 Resultados y análisis estadístico

El análisis de los resultados se basó en el análisis por intención a tratar (AIT), por lo que no se tuvieron en cuenta los abandonos durante el ensayo. Para valorar las diferencias dentro de un mismo grupo de tratamiento (punto inicial vs. punto final) se usó la prueba de la t de Student. Para valorar las diferencias de

efectividad entre ambos grupos según el tiempo (grupo de tratamiento x tiempo) se usó la prueba del análisis de la varianza (ANOVA).

Durante el estudio, 5 personas abandonaron el estudio, 3 en el grupo probiótico y 2 en el grupo placebo. Sin embargo, siguiendo el análisis AIT, los 40 participantes fueron incluidos en el análisis final.

No se observaron diferencias significativas en el IMC e ingesta diaria de alimentos entre ambos grupos según las medidas tomadas al inicio y al final del tratamiento.

Resultados primarios: depresión.

Tras 8 semanas de intervención, los pacientes que recibieron probióticos mostraron una disminución significativa en el BDI en comparación con los pacientes que tomaron placebo ($p= 0.02$) (**Figura 6**).

Resultados secundarios: glucosa, lípidos, proteína C reactiva y glutatión.

Se observó una disminución significativa en los niveles de insulina ($p= 0.03$), en el HOMA-IR ($p=0.03$) y en los de hs-CRP ($p= 0.03$) en los pacientes que recibieron los probióticos en comparación con los que recibieron el placebo. También se observó un aumento significativo en los niveles plasmáticos de GSH ($p= 0.02$) (**Figura 6**).

No se observaron cambios significativos en HOMA-B, QUICKI, los niveles de TAC y los niveles de glucosa en ayunas tras la suplementación con probióticos.

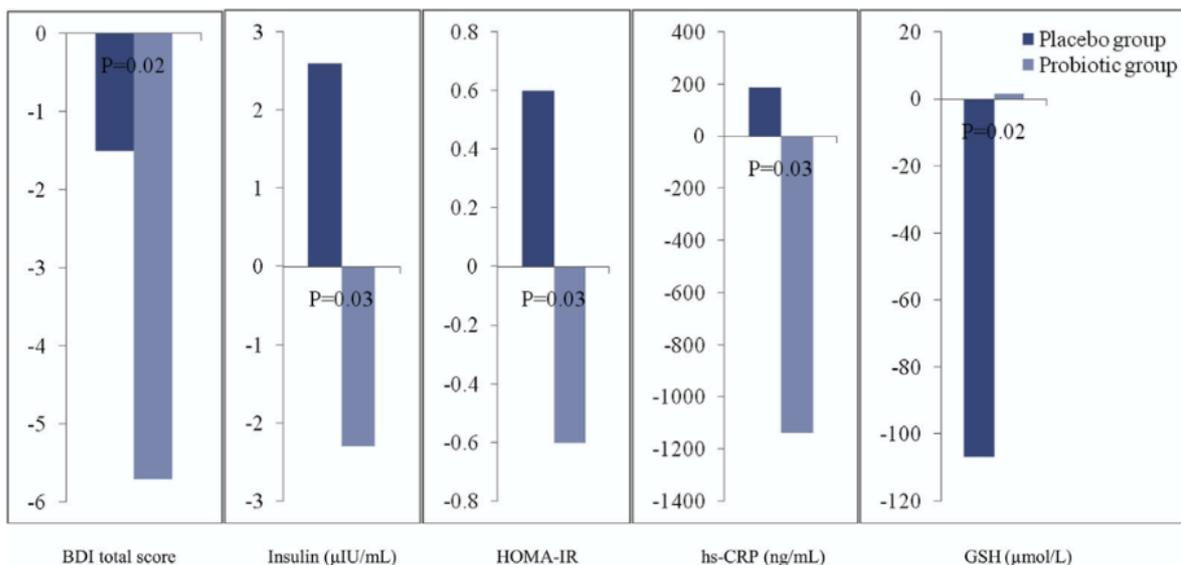


Figura 6: cambios tras 8 semanas de intervención en el BDI, HOMA-IR, Hs-CRP y GSH entre el grupo probiótico y el grupo placebo.

5.2.4 Discusión

Este estudio ha mostrado que la suplementación con probióticos en pacientes con DM durante ocho semanas ha disminuido los síntomas depresivos.

No se sabe ciertamente a que se debe la reducción en los niveles de insulina y HOMA-IR observada, si bien es cierto que un estudio de Firouzi³⁰ en animales demostró una mejora en al menos uno de los parámetros homeostáticos medidos, otros estudios previos realizados en humanos no han demostrado ningún cambio significativo en los perfiles lipídicos. Según un estudio realizado en ratones, podría deberse a un aumento en las células natural killer (NK) y a una reducción de la señalización inflamatoria³¹.

La disminución en los niveles de hs-CRP indican el posible efecto antiinflamatorio de los probióticos. Este efecto podría explicarse por la producción de ácidos grasos de cadena corta en el colon y por la disminución de la citoquina proinflamatoria IL-6.

Se desconocen los mecanismos por los que la administración de probióticos puede afectar a los biomarcadores de estrés oxidativo, como el aumento observado en el GSH. Este aumento podría ser explicado por una mejora en la actividad de la ligasa glutamato-cisteína (CGL), un aumento en la

expresión del mRNA de las subunidades de la CGL y, por tanto, en la síntesis de GSH³².

5.3 *Lactobacillus plantarum* DR7 alivia el estrés y ansiedad en los adultos: ensayo de doble ciego, randomizado y controlado con placebo³³.

El objetivo del estudio de Chong y colaboradores de 2018 es evaluar los efectos de *Lactobacillus plantarum* DR7 sobre el estrés, ansiedad y depresión en adultos estresados, así como los efectos sobre la memoria y funciones cognitivas, intentando explicar los mecanismos de acción implicados.

Las principales conclusiones obtenidas tras comparar el grupo que recibió *Lactobacillus plantarum* DR7 con el grupo que recibió placebo, fueron las siguientes:

- La administración de DR7 redujo el estrés y la ansiedad.
- La administración de DR7 redujo los niveles de cortisol plasmático, los niveles de citoquinas proinflamatorias, como IFN- γ y TNF- α , y aumentó los niveles de citoquinas antiinflamatorias, como IL-10.
- La administración de DR7 mejoró la memoria y las funciones cognitivas en los sujetos mayores de 30 años.
- La administración de DR7 favoreció la síntesis de serotonina y disminuyó la síntesis de dopamina y norepinefrina.

5.3.1 Introducción

El estudio parte de trabajos anteriores en ratones que habían señalado que la inactivación de la vía de la AMPK (proteína quinasa activada por AMP) era uno de los mecanismos inductores de ansiedad y comportamientos depresivos en personas con estrés crónico leve. La elección de *Lactobacillus plantarum* DR7 se basó en un estudio previo, el cual aisló este microorganismo a partir de leche de vaca y demostró mayores niveles de AMPK fosforilada en los individuos a los que les fue administrado en comparación con el grupo placebo³⁴. Teniendo en cuenta esta información, los autores han indagado sobre los posibles mecanismos de acción de este probiótico.

Antes de comenzar el ensayo se llevaron a cabo estudios para comprobar la viabilidad de *Lactobacillus plantarum* DR7 en el intestino humano. DR7 mostró capacidad para adherirse a la mucina y toleró simulaciones con ácido gástrico y

bilis, aunque la viabilidad en esta última fue un 50% menor que en el ácido gástrico. Además, demostró la utilización de azúcares como L-arabinosa, D-ribosa, D-galactosa o D-fructosa entre otros. De esta manera, este microorganismo podría utilizar oligosacáridos prebióticos de cadena más corta basados en galactosa, como galactooligosacáridos (GOS), esto sería útil para el diseño de simbióticos que aunaran el prebiótico y el probiótico.

5.3.2 Diseño del estudio

El presente estudio fue realizado por la Universidad de Yeungnam (Corea) y publicado en diciembre de 2018. Según la escala de Jadad, la realización y validez de este estudio es rigurosa.

El cálculo del tamaño muestral se basó en un estudio paralelo³⁵ en el que se incluían dos tipos de tratamiento (intervención y placebo) cuyo diseño de estudio estaba basado en un análisis de la potencia estadística. Ese estudio mostró que la administración de un determinado suplemento natural era capaz de aliviar el estrés, ansiedad y depresión con una reducción de 2.33 puntos en el cuestionario DASS-21 en el grupo de la intervención respecto al grupo placebo tras 4 semanas.

Se seleccionaron mujeres y hombres de entre 18 a 60 años con una valoración de estrés moderado en la escala de estrés percibido PSS-10. En total, 124 participantes fueron reclutados para el estudio durante 12 semanas. Finalmente 111 participantes acabaron el estudio ya que 13 abandonaron el mismo.

Los participantes fueron distribuidos aleatoriamente en el grupo probiótico (*Lactobacillus plantarum* DR7 1×10^9 CFU/día, n= 56) o en el grupo placebo (maltodextrina, n= 55). Tanto los participantes como los médicos desconocían la distribución hasta la completa realización del estudio.

Los parámetros evaluados durante el estudio fueron:

- Estrés, ansiedad y depresión mediante los cuestionarios PSS-10 y DASS-42. Ambos fueron realizados en las semanas 0, 4, 8 y 12.
- Niveles de cortisol y citoquinas en plasma (IL-1B, IL-4, IL-10, TNF- α , IFN- γ). Fueron medidos en la semana 0 y en la semana 12.

- Memoria y funciones cognitivas mediante el test informatizado CogState Brief Battery (CBB). Este test consta de diversas pruebas o tareas y fue realizado al finalizar el estudio, en la semana 12.
- Los neurotransmisores plasmáticos β -hidroxilasa (DBH), tirosina hidroxilasa (TH), indolamina 2,3-dioxigenasa (IDO), triptófano 2,3-dioxigenasa (TDO), triptófano hidroxilasa-1 (TPH1), triptófano hidroxilasa-2 (TPH2) y 5-hidroxitriptamina receptor-6 (5-HT6) fueron medidos en la semana 12.

Una vez tomadas estas medidas se compararon los resultados entre ambos grupos y dentro del mismo grupo para ver la evolución a lo largo de las 12 semanas.

5.3.3 Análisis estadístico y resultados

Para evaluar las diferencias entre ambos grupos de tratamiento (probiótico vs. placebo) y entre diferentes puntos en el tiempo se usó la prueba de la t de Student. Las comparaciones entre los grupos de tratamiento según el tiempo (grupo de tratamiento x tiempo) se evaluaron mediante la prueba del análisis de la varianza (ANOVA).

Para una mejor interpretación de los resultados se dividió a la muestra en adultos jóvenes (menos de 30 años), adultos maduros (mayores de 30 años) y sujetos en general (toda la población muestral).

Resultados primarios: estrés, ansiedad y depresión.

El estrés fue evaluado mediante los cuestionarios PSS-10 y DASS-42.

- Cuestionario PSS-10. Tanto el grupo placebo como el grupo DR7 (probiótico) mostraron una reducción en la puntuación total tras las 12 semanas. Sin embargo, aunque el grupo tratado con DR7 presentó mejores resultados, las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas (**Figura 7A**).
- Cuestionario DASS-42. La administración de DR7 benefició menos a adultos maduros que a los adultos jóvenes, en los que se observó una reducción significativa entre el grupo DR7 y el grupo placebo en las semanas 8 ($p=0.016$) y 12 ($p=0.033$). No se observó ninguna reducción significativa entre ambos grupos en los adultos maduros. En todos los sujetos en general sí que hubo una reducción significativa en el grupo DR7 respecto al grupo placebo en la semana 8 ($p=0.024$) (**Figura 7B**).

La ansiedad fue evaluada mediante el cuestionario DASS-42. Tanto en los adultos jóvenes como en los maduros hubo una reducción significativa de la ansiedad en el grupo DR7 con respecto al grupo placebo en las semanas 8 ($p=0.017$) y 12 ($p=0.083$) (**Figura 7C**).

La depresión fue evaluada mediante el cuestionario DASS-42. No se observaron diferencias significativas entre ambos grupos.

Respecto a la puntuación total del DASS-42 sin diferenciar entre estrés, ansiedad y depresión, se observaron diferencias significativas entre los grupos en los adultos jóvenes en las semanas 8 ($p=0.044$) y 12 ($p=0.046$) y en los sujetos en general en las semanas 8 ($p=0.022$) y 12 ($p=0.044$). No hubo cambios significativos de la puntuación en los adultos maduros (**Figura 7E**).

Resultados secundarios: niveles plasmáticos cortisol y citoquinas.

En los adultos jóvenes hubo una reducción significativa de los niveles de cortisol ($p=0.040$) y en los de citoquina proinflamatoria IFN- γ ($p=0.015$) en el grupo DR7 en comparación con el grupo placebo. También se produjo un aumento en los niveles de citoquina antiinflamatoria IL-10 ($p=0.033$) en el grupo DR7 en comparación con el grupo placebo (**Figura 8A**).

En los adultos maduros se observó una disminución significativa de los niveles de IFN- γ ($p<0.01$), TNF- α ($p=0.03$) e IL-1B ($p=0.02$) en el grupo DR7 con respecto al grupo placebo. A diferencia del grupo de adultos jóvenes, no se observaron diferencias significativas en los niveles de cortisol e IL-10 (**Figura 8B**).

En los sujetos en general, hubo una disminución significativa en los niveles de cortisol ($p=0.008$), IFN- γ ($p<0.01$) y TNF- α ($p=0.06$) y un aumento en los niveles de IL-10 ($p=0.035$) en los pacientes a los que se administró DR7 en comparación con aquellos a los que se administró placebo (**Figura 8C**).

Resultados secundarios: funciones cognitivas y memoria.

Los cambios producidos en las funciones cognitivas y memoria fueron evaluados mediante el test CogState Brief Battery. Esta prueba consta de diferentes tareas a realizar por el participante para evaluar el aprendizaje, la memoria, la comunicación, etc.

Globalmente, se observaron mayores mejoras en los adultos maduros que en los adultos jóvenes. En los sujetos en general, la administración de DR7 mejoró significativamente la velocidad necesaria para la cognición emocional social ($p=0.001$) y el aprendizaje verbal y memoria ($p=0.021$) en los pacientes del grupo DR7 en comparación con el grupo probiótico.

La velocidad necesaria para la atención básica, la cognición social emocional y el aprendizaje por asociación mejoró más en los adultos maduros que en los jóvenes, aunque hubo mejoras significativas en ambos.

Resultados secundarios: neurotransmisores plasmáticos.

La administración de DR7 redujo significativamente la expresión DBH ($p<0.001$), TH ($p=0.02$), IDO ($p=0.01$) y TDO ($p<0.001$) y aumentó significativamente la expresión de TPH2 ($p<0.001$) y 5-HT6 ($p=0.001$) en los sujetos en general en comparación con el grupo placebo tras 12 semanas.



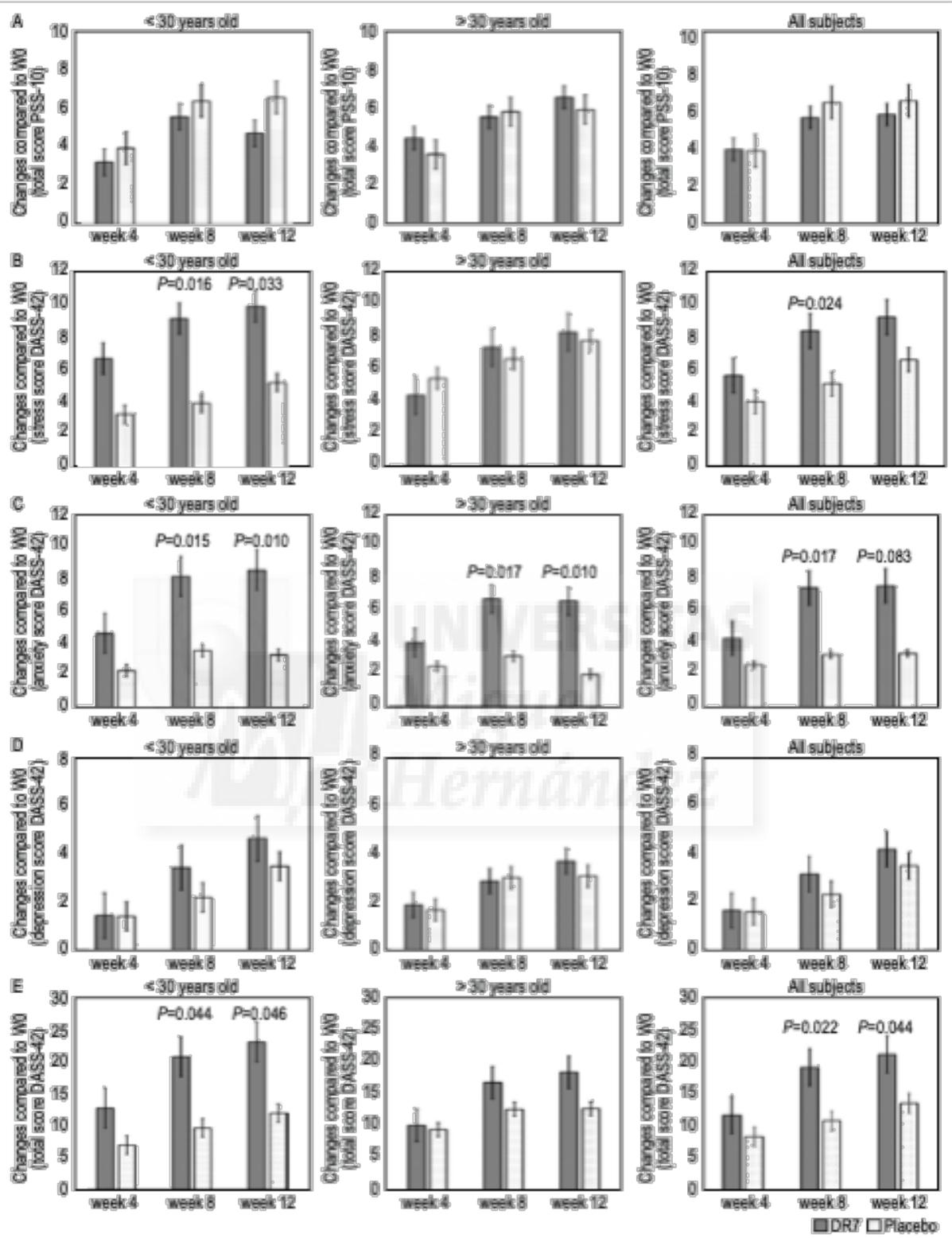


Figura 7: efectos tras 12 semanas de administración de DR7 o placebo en las puntuaciones de las escalas PSS-10 y DASS-42 para valorar el estrés, ansiedad y depresión en las semanas 0, 8 y 12 en menores de 30 años, mayores de 30 años y en los sujetos en general.

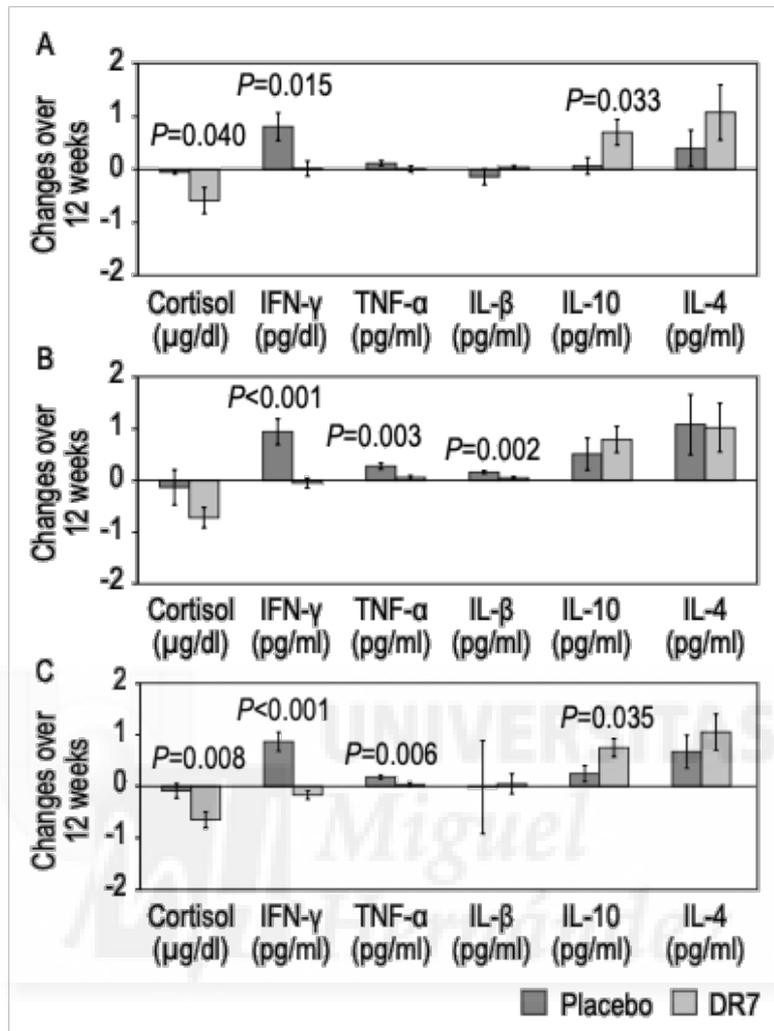


Figura 8: cambios en los niveles plasmáticos de cortisol y citoquinas tras 12 semanas de administración de DR7 o placebo, diferenciando entre menores de 30 años, mayores de 30 años y los sujetos en general. Los valores de p indican la diferencia entre tratamientos.

5.3.4 Discusión

Tras la administración de DR7 se observaron cambios en el estrés y ansiedad en el DASS-42 pero no en el PSS-10. Esto podría deberse a que el DASS-42 comprende elementos de naturaleza más amplia que son sensibles a diversos niveles de excitación crónica inespecífica, como la dificultad para calmarse, la estimulación nerviosa y el hecho de ser fácilmente perturbable, irritable e intolerante. Por lo que el DASS-42 tiene una mayor consistencia interna para producir discriminaciones significativas en diversos entornos.

Respecto a la depresión, DR7 no demostró tener ningún efecto. La depresión es un trastorno psicológico más profundo que implica funciones

mentales deterioradas que requieren tratamiento farmacológico. Por lo que la administración de probióticos podría servir para tratar trastornos menos graves que la depresión, como el estrés y la ansiedad, debido a sus efectos en la relajación, la capacidad de calmarse y reducción del nerviosismo.

Los resultados obtenidos han demostrado que a pesar de que la reducción de la ansiedad afectó tanto a adultos jóvenes como a adultos maduros, la reducción del estrés se produjo sólo en los adultos jóvenes, lo que probablemente se deba a una mayor percepción del estrés entre los jóvenes que entre los mayores de 30 años.

Respecto a los niveles de citoquinas, DR7 aumentó las citoquinas antiinflamatorias y disminuyó las proinflamatorias en los adultos jóvenes, mientras que en los adultos maduros sólo redujo las citoquinas proinflamatorias. Debido a que el estrés es uno de los principales desencadenantes de la respuesta inflamatoria y, como se ha dicho anteriormente, los adultos jóvenes presentaron una mayor reducción de los niveles de estrés que los adultos maduros, es normal que se observe una mayor disminución de citoquinas proinflamatorias y un aumento de citoquinas antiinflamatorias en los adultos jóvenes que en los adultos maduros.

Por otro lado, DR7 mostró un mayor efecto positivo en las funciones cognitivas y en la memoria en los adultos maduros que en los jóvenes. Esto podría deberse a que estas funciones están más deterioradas en los mayores de 30 años, por lo que hay más posibilidades de mejora que en los adultos jóvenes.

Respecto a los niveles de neurotransmisores plasmáticos, los resultados obtenidos han mostrado que la administración de DR7 en sujetos estresados ha provocado un aumento de la expresión de TPH y 5-HT6 canalizando, por tanto, el triptófano disponible hacia la producción de serotonina, en comparación con el grupo placebo. El receptor de serotonina 5-HT6 regula la vía serotoninérgica implicada en los procesos de aprendizaje y memoria y mejora las funciones cognitivas. El grupo placebo mostró un aumento en la expresión de IDO y TDO provocando un aumento de la producción de kineurina con respecto al grupo DR7. Además, se ha demostrado que el enzima IDO actúa como conector entre

el sistema inmune y la vía de las kineurinas, activándose por citoquinas proinflamatorias como IFN- γ , y como muestran los resultados hay mayores niveles plasmáticos de esta citoquina en los pacientes del grupo placebo que en los del grupo DR7. Esta influencia en la ruta de la kineurina, si bien mediada por otro microorganismo diferente, se vio también en el primero de los estudios incluidos en el presente Trabajo de Fin de Grado.

Por otro lado, el sistema noradrenérgico del cerebro es activado por niveles elevados de cortisol, donde los niveles post sinápticos de la norepinefrina desencadenan el estado de alerta y las manifestaciones de estrés. Los resultados obtenidos han mostrado que el grupo placebo tenía mayores niveles de cortisol junto con niveles altos de TH y BDH, enzimas que convierten la tirosina en dopamina, y ésta en norepinefrina, lo que justifica la que mayores niveles de estas enzimas provoquen mayor estrés (**Figura 9**).

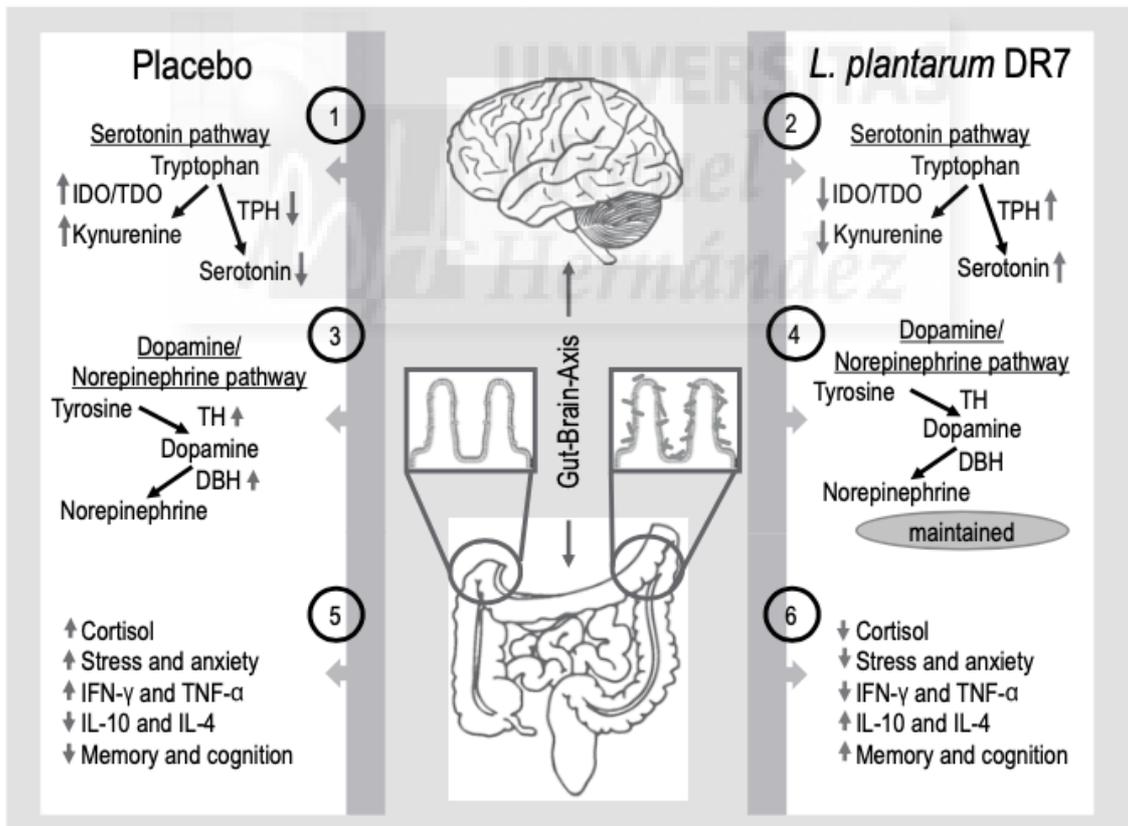


Figura 9: regulación de las vías de los neurotransmisores cerebrales, comparando entre los sujetos que recibieron *Lactobacillus plantarum* DR7 y los que recibieron placebo, y su asociación con las medidas plasmáticas tomadas, con el estrés, ansiedad y con la memoria y cognición. El triptófano es el inicio de la biosíntesis de kineurina y serotonina. La enzima TPH convierte el triptófano en serotonina, mientras que las enzimas IDO y TDO lo convierten en kineurina. Los sujetos estresados que recibieron placebo

experimentaron un aumento de IDO, TDO y, por tanto, de kineurina (1), mientras que los que recibieron DR7 experimentaron un aumento de TPH, 5-HT6 y, por tanto, de serotonina (2). La TH convierte la tirosina en dopamina y la DBH en norepinefrina. Los sujetos estresados que recibieron placebo experimentaron una mayor expresión de las enzimas TH y DBH, lo que supuso un incremento de la dopamina y la noradrenalina (3), en comparación con los sujetos que recibieron DR7, que mantuvieron los niveles de dopamina y noradrenalina (4). El aumento de los niveles de norepinefrina está asociado con un incremento del estrés y ansiedad en los pacientes que recibieron placebo (5) en comparación con los que recibieron DR7, en los que se produjo una disminución del estrés y ansiedad (6).

6. DISCUSIÓN

Aunque en ninguno de los estudios la administración de probióticos ha producido efectos positivos significativos en la sintomatología de la depresión ni un aumento directo de las concentraciones de serotonina a nivel central, sí se han observado cambios positivos en procesos celulares implicados en su regulación, como la disminución de kineurinas y de sus derivados tóxicos, la disminución de los niveles de cortisol o la disminución de la respuesta inflamatoria. Por otra parte, la administración de probióticos sí que ha producido mejoras en la sintomatología del estrés y ansiedad, siendo estos dos, en muchas ocasiones, desencadenantes para sufrir posteriormente trastornos de tipo depresivo.

Los cambios observados en ciertos parámetros bioquímicos como la disminución de los niveles de citoquinas proinflamatorias y el aumento de citoquinas antiinflamatorias, la disminución de los enzimas y metabolitos implicados en la ruta de las kineurinas, la reducción de los niveles de cortisol o el aumento de enzimas implicadas en la síntesis de serotonina y de dopamina y norepinefrina, indican que hay una clara evidencia de la influencia que los probióticos tienen en la modulación de las vías de comunicación del eje intestino-cerebro. En la tabla resumen se muestran los resultados obtenidos en los tres estudios analizados (**Tabla 1**).

| Estudio de Rudzki de 2019 | Estudio de Ghodarz de 2015 | Estudio de Chong de 2018 |
|--|---|--|
| <i>Lactobacillus plantarum</i> 299v (10x10 ⁹ CFU) | <i>Lactobacillus acidophilus</i> (2x10 ⁹ CFU/g), <i>Lactobacillus casei</i> (2x10 ⁹ CFU/g) y <i>Bifidobacterium bifidum</i> (2x10 ⁹ CFU/g) | <i>Lactobacillus plantarum</i> DR7 (1x10 ⁹ CFU) |
| Pacientes con depresión mayor (en tratamiento con ISRS) | Pacientes con depresión mayor | Pacientes con estrés moderado |
| 2 cápsulas/día | 1 cápsula/día | 1 cápsula/día |
| 8 semanas | 8 semanas | 12 semanas |
| 60 participantes | 40 participantes (sin tener en cuenta los abandonos) | 111 participantes |
| Sin cambios en ansiedad y depresión | Mejoría de la depresión (BDI) | <u>Adultos jóvenes:</u> ↓ estrés (DASS-42) ↓ puntuación test DASS-42 en total <u>Sujetos en total:</u> ↓ estrés (DASS-42) ↓ puntuación DASS-42 en total Sin cambios en la depresión |
| Mejoras en las funciones cognitivas (APT, CVLT) ↓ kineurinas ↑ ratio 3HKYN:KYN | ↓ insulina ↓ HOMA-IR ↓ proteína C reactiva ↑ glutatión | <u>Adultos jóvenes:</u> ↓ cortisol ↓ IFN-gamma ↑ IL-10 <u>Adultos maduros:</u> ↓ IFN-gamma ↓ TNF-alfa ↑ IL-10 ↓ IL-1b <u>Sujetos en total:</u> ↓ cortisol ↓ IFN-gamma ↓ TNF-alfa ↑ IL-10 Mejora funciones cognitivas ↓ DBH ↓ TH ↓ IDO ↓ TDO ↑ TPH2 ↑ 5-HT6 |

Tabla 1: tabla resumen que muestra las características y resultados obtenidos en los estudios de Rudzki de 2019, de Ghodarz de 2015 y de Chong de 2018.

Los estudios de Rudzki de 2019 y de Chong de 2018, ambos llevados a cabo con cepas distintas de *Lactobacillus plantarum*, coinciden en que esta especie tiene efectos sobre las concentraciones de kineurinas, sus metabolitos y los enzimas implicados en la ruta de las kineurinas, resultando en una mejora de las funciones cognitivas en los pacientes a los que se les administra.

El estudio de Ghodarz de 2015 muestra acciones positivas sobre la homeostasis de la glucosa y los niveles del antioxidante glutatión. Aunque se necesitarían intervenciones más largas para poder determinar los efectos beneficiosos sobre los lípidos y, además, también habría que estudiar los efectos sobre otros biomarcadores de estrés oxidativo a parte del glutatión. Por otro lado, debido a la utilización de varias especies, no se puede saber a cuál de ellas corresponde cada efecto.

Tanto el estudio de Ghodarz de 2015 como el de Chong de 2018 muestran efectos positivos en la respuesta inflamatoria, disminuyendo los niveles de citoquinas inflamatorias y de la proteína C reactiva. Estos efectos positivos recalcan el importante papel que la inflamación tiene sobre la sintomatología del estrés y ansiedad.

Respecto a la dosis adecuada de probiótico, como se observa en la tabla 1, hay variaciones entre los estudios, aunque todos coinciden en que la dosis mínima efectiva deber ser 10^9 CFU.

En el estudio de Chong es en el que más cambios significativos se han observado tras la administración del probiótico. Esto puede deberse a que los pacientes sometidos al estudio no padecían depresión mayor como en los otros dos estudios, sino que padecían estrés moderado. Por lo que los beneficios se aprecian más en personas con sintomatología leve/moderada que en pacientes con depresión mayor.

Aunque la valoración de Jadad en los tres estudios es bastante alta, existen muchas diferencias entre ellos, como se puede apreciar en la tabla 1. Esto dificulta la comparación entre ellos y constituye uno de los aspectos a mejorar por estudios futuros.

Mientras que los estudios de Rudzki de 2019 y de Chong de 2018 siguen el análisis por protocolo, es decir, se eliminó del estudio a aquellos participantes que lo abandonaron, el de Ghodarz de 2015 sigue el análisis por intención de tratar (AIT), en el que se tiene en cuenta a todos los participantes que iniciaron el estudio, independientemente de que lo hayan abandonado o no. Se tratan de diferentes formas de analizar los estudios, pero no tiene porqué afectar a la validez de los mismos.

El estudio de Chong de 2018 muestra que los efectos varían en función de la edad, pues en personas mayores de 30 años se observa una mayor mejora de las funciones cognitivas, mientras que en las menores de 30 se observa un mayor beneficio sobre el estrés. Esto hace pensar que el tipo de probiótico o dosis podría variar según la edad para obtener una mayor mejora.

Algo que facilitaría mucho la comparación de la efectividad entre distintas cepas de microorganismos sería llegar a un consenso acerca de la duración del tratamiento y parámetros a medir. Respecto a la dosis, se podría estudiar si un aumento de la dosis produciría un aumento de los efectos.

Por otra parte, la permeabilidad juega un papel muy importante en las acciones de los probióticos. En la selección de los ensayos revisados, se excluyeron aquellos realizados en personas con enfermedades inflamatorias, como patologías autoinmunes o intestinales. Sin embargo, tiene sentido incluir a pacientes con este tipo de patologías ya que en muchas ocasiones estos pacientes tienen mayor predisposición a padecer depresión. Además, es probable que estos tengan una mayor permeabilidad intestinal, por lo que se podrían observar mayores efectos producidos por probióticos.

En general, el campo de indicaciones clínicas de los probióticos es bastante amplio, pero la cantidad de indicaciones basadas en la evidencia científica no es tan numerosa. Dependiendo de la enfermedad a tratar, su uso está más o menos recomendado. De lo que más evidencia científica se dispone hasta el momento, es para el tratamiento de la diarrea infecciosa y asociada a antibióticos, la alergia a las proteínas de la leche de vaca en niños, síndrome del intestino irritable y la enfermedad inflamatoria pélvica. Por otro lado, se está investigando su efecto protector en el cáncer de colon y de vesícula biliar, su

efecto hipolipemiante, su uso en el tratamiento de la artritis reumatoide o en la encefalopatía hepática, entre otros³⁶.

En lo que al tratamiento del estrés, ansiedad y depresión se refiere, aún quedan muchas cuestiones por resolver, como si se podría administrar una dosis mayor para observar más efecto, o a partir de cuántos días estos se empiezan a observar, la biodisponibilidad, etc., y más estudios en humanos son necesarios para que llevarlos a la práctica clínica.

7. CONCLUSIONES

- La especie *Lactobacillus plantarum* posee acciones favorables sobre la ruta de las kineurinas, con la consecuente mejora de las funciones cognitivas. No obstante, sería necesario más estudios sobre la distribución de la kineurinas en el SNC y sus funciones específicas en cada región para establecer la relación de la ruta de las kineurinas en la neurofisiología.
- La administración de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum* no ha demostrado tener efectos sobre la concentración de serotonina central.
- Las especies *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum* han demostrado reducir la inflamación sistémica.
- La combinación de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum* tiene efectos beneficiosos sobre el perfil lipídico y sobre los niveles del antioxidante glutatión.

Finalmente, con los efectos observados en los tres estudios analizados, se puede concluir que *Lactobacillus plantarum* 299v, *Lactobacillus plantarum* DR7 y la combinación de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* y *Bifidobacterium bifidum* pueden ser útiles para el tratamiento del estrés y ansiedad leve o moderada como terapia única y, como coadyuvantes al tratamiento farmacológico de la depresión.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J Nutr.* 1995; 125(6): 1401-12.
- 2) Foster JA, Rinaman L, Cryan JF. Stress and the gut-brain axis: regulation by the microbiome. *Neurobiol Stress* 2017; 7: 124-36.
- 3) Dinan TG, Cryan JF, Stanton C. Gut microbes and brain development have black box connectivity. *Biol Psychiatry.* 2018; 83(2):97-99.
- 4) Bravo JA, Forsythe P, Chew MV, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:16050-5.
- 5) Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett CM, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project. *Nature* 2007; 449(7164): 804-810.
- 6) Arbolea S, Solís G, Fernández N, de los Reyes-Gavilán CG, Gueimonde M. Facultative to strict anaerobes ratio in the preterm infant microbiota: a target for intervention? *Gut Microbes.* 2012;3:583–588.
- 7) Vlainić J, Šuran J, Vlainić T, Vukorep AL. Probiotics as an Adjuvant Therapy in Major Depressive Disorder. *Curr Neuropharmacol.* 2016; 14(8): 952-58.
- 8) Gómez-Eguílaz M, Ramón-Trapero JL, Pérez-Martínez L, Blanco JR. El eje microbiota-intestino-cerebro y sus grandes proyecciones. *Rev Neurol.* 2019;68:111-117.
- 9) Tojo R, Suárez A, Clemente MG, De los Reyes-Gavilán CG, Margolles A, Gueimonde M, et al. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 15163-76.
- 10) Noble EE, Hsu TM, Kanoski SE. Gut to brain dysbiosis: mechanisms linking western diet consumption, the microbiome, and the cognitive impairment. *Front Behav Neurosci.* 2017; 11:9.
- 11) Guarner Aguilar F, Álvarez Calatayud G. Anales de microbiota, probióticos y prebióticos: año cero. *An Microbiota Probióticos Prebióticos.* 2020;1(1):1.
- 12) Jenkins TA, Nguyen JC, Polglaze KE, Bertrand PP. Influence of tryptophan and serotonin on mood and cognition with a possible role of the gut-brain axis. *Nutrients* 2016; 8(1):56.
- 13) Hata T, Asano Y, Yoshihara K, Kimura-Todani T, Miyata N, Zhang XT, et al. Regulation of gut luminal serotonin by commensal microbiota in mice. *PLoS One.* 2017; 12 (7): e0180745.
- 14) Cataldo LR, Cortés VA, Galgani JE, Olmos PR, Santos JL. Papel de la serotonina periférica en la secreción de insulina y la homeostasis de la glucosa. *Nutr Hosp.* 2014; 30(3): 498-508.
- 15) O'Mahony S.M., Clarke G., Borre Y.E., Dinan T.G., Cryan J.F. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. *Behav. Brain Res.* 2015;277:32–48. doi: 10.1016/j.bbr.2014.07.027
- 16) Bilbo S.D., Schwarz J.M. The immune system and developmental programming of brain and behavior. *Front. Neuroendocrinol.* 2012;33:267–286. doi: 10.1016/j.ynstr.2017.03.001
- 17) Sampson TR, Mazmanian SK. Control of brain development, function, and behavior by the microbiome. *Cell Host Microbe* 2015; 17: 565-76. doi: 10.1016/j.ynstr.2017.03.001
- 18) Leszek Rudzki, Lucyna Ostrowska, Dariusz Pawlak, Aleksandra Małus, Krystyna Pawlak, Napoleon Waszkiewicz, et al. Probiotic *Lactobacillus Plantarum* 299v decreases kynurenine concentration and improves cognitive functions in patients with major depression: A double-blind,

- randomized, placebo controlled study. *Psychoneuroendocrinology* (2018). doi: 10.1016/j.psyneuen.2018.10.010
- 19) Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biol. Psychiatry*. 2013;74:720-726.
 - 20) Anna Herman. Probiotics supplementation in prophylaxis and treatment of depressive and anxiety disorders-review of current research. *Psychiatr. Pol.* 2019; 53(2): 459–473.
 - 21) Stone, T.W., Darlington, L.G., 2013. The kynurenine pathway as a therapeutic target in cognitive and neurodegenerative disorders. *British journal of pharmacology* 169, 1211-1227.
 - 22) Klarin, B., Johansson, M.-L., Molin, G., Larsson, A., Jeppsson, B., 2005. Adhesion of the probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum* 299v onto the gut mucosa in critically ill patients: a randomised open trial. *Critical Care* 9, R285-R293.
 - 23) White, J.S., Hoper, M., Parks, R.W., Clements, W.D., Diamond, T., Bengmark, S., 2006. The probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum* species 299 reduces intestinal permeability in experimental biliary obstruction. *Letters in applied microbiology* 42, 19-23.
 - 24) Murphy, M.G., Condon, S., 1984. Correlation of oxygen utilization and hydrogen peroxide accumulation with oxygen induced enzymes in *Lactobacillus plantarum* cultures. *Archives of microbiology* 138, 44-48.
 - 25) Ducrotte, P., Sawant, P., Jayanthi, V., 2012. Clinical trial: *Lactobacillus plantarum* 299v (DSM 9843) improves symptoms of irritable bowel syndrome. *World journal of gastroenterology* 18, 4012-4018.
 - 26) Akkasheh G, Kashani-Poor Z, Tajadadi-Ebrahimi M, Jafari P, Akbari H, Taghizadeh M, et al. Clinical and metabolic response to probiotic administration in patients with major depressive disorder: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial, *Nutrition* (2015). doi: 10.1016/j.nut.2015.09.003.
 - 27) Martinac M, Pehar D, Karlovic D, Babic D, Marcinko D, Jakovljevic M. Metabolic syndrome, activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and inflammatory mediators in depressive disorder. *Acta Clin Croat.* 2014;53:55-71.
 - 28) Yokoyama K, Yamada T, Mitani H, Yamada S, Pu S, Yamanashi T, et al. Relationship between hypothalamic-pituitary-adrenal axis dysregulation and insulin resistance in elderly patients with depression. *Psychiatry Res.* 2015;226:494-8.
 - 29) Lapidus KA, Gabbay V, Mao X, Johnson A, Murrough JW, Mathew SJ, et al. In vivo (1)H MRS study of potential associations between glutathione, oxidative stress and anhedonia in major depressive disorder. *Neurosci Lett.* 2014;569:74-9.
 - 30) Firouzi S, Barakatun-Nisak MY, Ismail A, Majid HA, Nor Azmi K. Role of probiotics in modulating glucose homeostasis: evidence from animal and human studies. *Int J Food Sci Nutr.* 2013;64:780-6.
 - 31) Ma X, Hua J, Li Z. Probiotics improve high fat diet-induced hepatic steatosis and insulin resistance by increasing hepatic NKT cells. *J Hepatol.* 2008;49:821-30.
 - 32) Lutgendorff F, Trulsson LM, van Minnen LP, Rijkers GT, Timmerman HM, Franzen LE, et al. Probiotics enhance pancreatic glutathione biosynthesis and reduce oxidative stress in experimental acute pancreatitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008;295:G1111-21.
 - 33) H.X. Chong, N.A. A. Yusoff, Y.-Y. Hor, L.-C. Lew, M.H. Jaafar, S.-B. Choi, et al. *Lactobacillus plantarum* DR7 alleviates stress and anxiety in adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Benef Microbes.* 2019 Apr 19;10(4):355-373. doi: 10.3920/BM2018.0135.

- 34) Lew, L.C., Hor, Y.Y., Khoo, B.Y., Sasidharan, S. and Liong, M.T., 2018. *Lactobacillus plantarum* DR7 reduces cholesterol via phosphorylation of AMPK that down-regulated the mRNA expression of HMGCR. Korean Journal for Food Science of Animal
- 35) Daryani, F.E., Charandabi, S.M.A., Mirghafourvand, M., Taghizadeh, M. and Mohammadi, A. Effect of lavender cream, with or without foot bath on anxiety, stress and depression in pregnancy: a randomized, placebo-controlled trial. Journal of Caring Science.2015; 4: 63-73.
- 36) Romero M, Menchén L. Probióticos: nuevas líneas de investigación y aplicaciones terapéuticas en patología digestiva. Nutr. Hosp. 2013;28.

