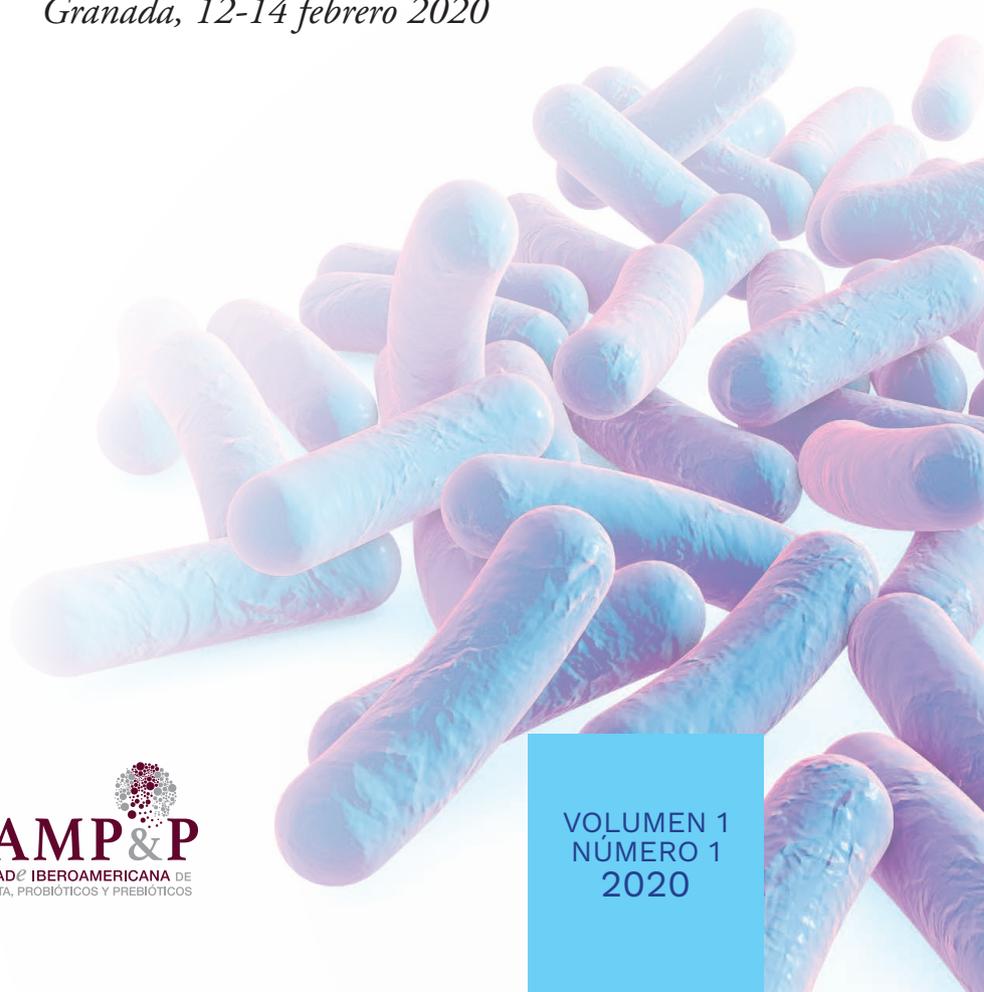


ANALES DE  
Microbiota  
& Probióticos  
& Prebióticos

SUMARIO

**XI Workshop Sociedad Española de  
Microbiota, Probióticos y Prebióticos**

*Granada, 12-14 febrero 2020*



  
**SIAMP&P**  
SOCIEDAD IBEROAMERICANA DE  
MICROBIOTA, PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS

  
**SEMIPyP**  
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE  
MICROBIOTA, PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS

**I CONGRESO**  
Sociedad Iberoamericana de Microbiota,  
Probióticos y Prebióticos

**XII WORKSHOP**  
Sociedad Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos



**ICROBIOTA**  
MADRID, 17-19-MARZO-2021

Órgano de expresión de la Sociedad Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos (SEMIPyP)  
Órgano de expresión de Sociedad Iberoamericana de Microbiota, Probióticos y Prebióticos (SIAMPyP)

## COMITÉ EDITORIAL

### Anales de Microbiota, Probióticos & Prebióticos

#### Director

Francisco Guarner

#### Director para Iberoamérica

Aldo Maruy

#### Subdirectores

Ascensión Marcos

Juan Miguel Rodríguez

Ana Teresa Abreu

#### Secretarios de Redacción

Guillermo Álvarez Calatayud

Teresa Requena

Christian Boggio-Marzet

#### Editores Territoriales

Luis Peña (España)

Jorge Amil (Portugal)

Rodrigo Vázquez (Norte y Centro América)

Fernando Medina (Sudamérica)

#### Coordinadores Secciones

*Investigación básica:* Evaristo Suárez

*Investigación clínica:* Rosaura Leis

*Docencia:* José Manuel Martín Villa

*Inmunonutrición:* Mónica de la Fuente

*Microbiología:* Abelardo Margolles

*Veterinaria:* Gaspar Pérez Martínez

*Redes Sociales:* Miguel Gueimonde

## CONSEJO EDITORIAL

### Junta Directiva de la Sociedad Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos (SEMIPyP)

**Presidente:** Guillermo Álvarez Calatayud

**Presidente saliente:** Francisco Guarner

**Vicepresidente:** Gaspar Pérez Martínez

**Secretario:** Abelardo Margolles

**Tesorero:** Alfonso Clemente

**Vocal de relaciones internacionales:** Fernando Azpiroz

**Vocal de relaciones institucionales:** Ascensión Marcos

**Vocal de Investigación Básica:** Evaristo Suárez

**Vocal de Investigación Clínica:** Rosaura Leis

**Vocal de Docencia:** Mónica de la Fuente

#### Vocales

Carmen Collado

Juan Miguel Rodríguez

David A. Beltrán Vaquero

Teresa Requena

Silvia Gómez Senent

José Manuel Martín Villa

**Webmáster y Vocal de redes sociales**

Miguel Gueimonde

### Junta Directiva de la Sociedad Iberoamericana de Microbiota, Probióticos y Prebióticos (SIAMPyP)

**Presidente:** Francisco Guarner (*Barcelona, España*)

**Vicepresidente:** Aldo Maruy Saito (*Lima, Perú*)

**Secretario:** Guillermo Álvarez Calatayud (*Madrid, España*)

**Vicesecretario:** Christian Boggio-Marzet (*Buenos Aires, Argentina*)

**Tesorero:** Luis Peña Quintana (*Gran Canaria, España*)

**Vicetesorero:** Ana Teresa Abreu (*Cd. de México, México*)

#### Vocales del Comité Asesor

Henry Cohen (*Montevideo, Uruguay*)

Luis Bustos (*Buenos Aires, Argentina*)

Juan Rivera (*Lima, Perú*)

Armando Madrazo (*Cd. de México, México*)

#### Vocales Regionales

##### México y Centro América

Rodrigo Vázquez Frías (*Cd. de México, México*)

León de Mezerville (*San José, Costa Rica*)

##### Sud América 1

Fernando Medina (*Bucaramanga, Colombia*)

Dimas Rosas (*Santa Marta, Colombia*)

##### Sud América 2

Vera Lucia Sdepanian (*Sao Paulo, Brasil*)

Rosa María Cruells (*Montevideo, Uruguay*)

##### Iberia

Evaristo Suárez (*Oviedo, España*)

Jorge Amil Díaz (*Oporto, Portugal*)

## XI Workshop Sociedad Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos

Granada, 12-14 febrero 2020

### COMITÉ ORGANIZADOR

#### Presidentes

José Maldonado Lozano. *Universidad de Granada*  
Alfonso Clemente Gimeno. *Estación Experimental del Zaidín, CSIC*

#### Vocales

Ángel Gil Hernández. *Universidad de Granada*  
Mónica Olivares Martín. *Biosearch Life*  
Federico Lara Villoslada. *Lactalis Puleva*  
Alejandro Belanche Gracia. *Estación Experimental del Zaidín, CSIC*  
Ricardo Rueda Cabrera. *Abbott Nutrition*  
Eduardo López-Huertas. *Estación Experimental del Zaidín, CSIC*

### COMITÉ CIENTÍFICO

#### Presidente

Guillermo Álvarez Calatayud

#### Vocales

Francisco Guarner Aguilar  
Gaspar Pérez Martínez  
Abelardo Margolles Barros  
M<sup>a</sup> Mónica de la Fuente del Rey  
Juan Evaristo Suárez Fernández  
Juan Miguel Rodríguez Gómez  
José Manuel Martín Villa  
Teresa Requena Rolanía  
Alfonso Clemente Gimeno  
Miguel Gueimonde Fernández  
Fernando Azpiroz Vidaur  
Ascensión Marcos Sánchez

### MIEMBROS DEL CONSEJO ASESOR INDUSTRIAL



## SUMARIO

### **XI Workshop Sociedad Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos**

*Granada, 12-14 febrero 2020*

#### EDITORIAL

- 1 **Anales de Microbiota, Probióticos & Prebióticos: Año cero**  
*F. Guarner Aguilar, G. Álvarez Calatayud*

#### 2 PROGRAMA CIENTÍFICO

##### CONFERENCIA INAUGURAL

- 6 **Identificación con ADN: crimen, medicina e historia**  
*J.A. Lorente Acosta*

##### MESA DE CONTROVERSA

- 9 **Diarrea aguda en niños evidencia que los probióticos no funcionan**  
*F. Medina Monroy*

- 12 **Probióticos en la diarrea aguda en la infancia. Evidencia científica**  
*R. Vázquez Frias*

- 15 **¿Existe colonización en el período neonatal?**  
*C. Boggio-Marzet*

- 18 **¿Existe colonización microbiana durante el periodo prenatal? Durante los embarazos fisiológicos, yo diría que no**  
*E. Suárez Fernández*

- 21 **Microbiota en el síndrome de intestino irritable. Experiencia argentina**  
*L.M. Bustos Fernández, J. Lasa, F. Man*

##### SESIÓN USOS CLÍNICOS

- 24 **Fecal Microbiota Transfer: procedures, indications and results in the Unit at the Amsterdam University Medical Centers**  
*H. Herrema*

##### TALLER 1. BACTERIOMA DE LA LECHE HUMANA EN LA SALUD Y EN LA ENFERMEDAD

- 27 **Bacterioma de la leche humana: origen y composición**  
*M. Olivares, A. Sañudo, F. García, O. Bañuelos*

- 32 **Funciones de las bacterias de la leche humana**  
*R. Leis, S. Valladares-Rodríguez, A. Pérez-Ferreirós, A. López-Rubio, R. Picáns*

## SUMARIO

---

- TALLER 2. VETERINARIA**
- 37** Modulación de la microbiota digestiva en rumiantes: Potenciando las ventajas y minimizando los inconvenientes  
*A. Belanche*
- TALLER 3. EL DESARROLLO DE UN PROBIÓTICO: DEL AISLAMIENTO AL ENSAYO CLÍNICO**
- 42** Designing a probiotic for eradication of group B streptococci (GBS) during pregnancy: from selecting a target-specific strain to providing clinical evidences  
*D.A. Beltrán, V. Martín, N. Cárdenas, J.M. Rodríguez, L. Fernández*
- TALLER 4. PSICOBÍOTICOS**
- 47** Microbiota-Intestino-Cerebro  
*M. De la Fuente*
- 54** Psicobióticos y trastornos mentales  
*M. Martín Carrasco*
- 58** Microbiota, psicobióticos y trastornos del espectro autista  
*G. Álvarez Calatayud, C. Sánchez, M. Tólin, C. Miranda, M. Zeferino, J. Pérez Moreno*
- SESIÓN DE INMUNONUTRICIÓN**
- 61** Mecanismo de acción de los probióticos  
*Á. Gil, J. Plaza-Díaz, F.J. Ruiz-Ojeda, C. Gómez-Llorente, L. Fontana*
- 66** Polifenoles y microbiota intestinal  
*F.A. Tomás-Barberán, R. García-Villalba, A. González-Sarrias, M.V. Selma, J.C. Espín*
- SESIÓN MICROBIOLOGÍA Y VETERINARIA**
- 70** Probiotic lactobacilli: new insights in ecology and evolutionary history drive new applications  
*S. Lebeer*
- OPINIÓN DEL EXPERTO**
- 73** Probióticos: productos monocepa frente a productos multicepa  
*J.M. Rodríguez Gómez*
- 76** COMUNICACIONES ORALES
- 84** POSTERS

# Anales de Microbiota, Probióticos & Prebióticos: Año cero

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):1

Durante décadas hemos considerado que los microorganismos que nos colonizan son una fuente permanente de problemas, por múltiples razones. La más preocupante era el reconocimiento de su carácter de reservorio de patógenos que podían aprovechar nuestra debilidad para invadirnos. Los microbios que se etiquetaban de flora saprófita o comensal tampoco eran bienvenidos. En tanto que, consumidores de nuestros recursos, su presencia era indeseable y en cierto modo indicativa de falta de higiene. La asepsia era objetivo prioritario para los médicos y subsiguientemente también para la opinión pública de la sociedad civilizada y debía conducirnos a un mundo sano y feliz. Los científicos alertaban desde las últimas décadas del pasado siglo recordando que las bacterias son mucho más que vectores de enfermedad, pero la medicina no ha escuchado sus voces hasta bien entrado el siglo XXI.

Todo ha cambiado en muy pocos años. Los microorganismos que colonizan plantas y animales son parte constitutiva, funcional y no prescindible del organismo anfitrión, y no es una excepción nuestro cuerpo humano. Una microbiota desequilibrada puede ser causa de enfermedad, afecta nuestro desarrollo corporal, altera la regulación de nuestro sistema inmunitario y nuestro metabolismo e, incluso, influye en nuestra conducta. Hay que reinterpretar toda la fisiología y patología humanas desde la primera hasta la última página teniendo en cuenta dónde, cómo y cuánto, la confluencia del microbioma está determinando los fenotipos. Microbiota, probióticos y prebióticos son conceptos e instrumentos nuevos. Los microorganismos han pasado de ser el problema a ser, al menos, parte de la solución.

*Anales de Microbiota Probióticos & Prebióticos* surge con el objetivo de proporcionar un cauce permanente de comunicación en lengua castellana entre científicos básicos y profesionales de la salud, con el fin de que los avances científicos se traduzcan y se plasmen en comportamientos prácticos para mejorar la salud y combatir la enfermedad. El mundo digital de las páginas web es un cauce de transmisión más rápido e inmediato, pero esencialmente de contenidos breves. La revista científica sigue ganando por la profundidad y el equilibrio de sus revisiones, matizando todos los datos disponibles y ponderando la fuerza de cada uno de ellos. *Anales* quiere ser un medio para transmitir las novedades de nuestros congresos en forma de resúmenes y publicar revisiones de expertos sobre temas que precisan ser abordados en profundidad. Inicialmente, no es nuestro objetivo primario publicar originales de investigación básica o clínica, que preferencialmente deben optar a órganos científicos internacionales con factor de impacto.

Fundada en 2020, el objetivo de *Anales* es el fomento y difusión del conocimiento científico y la investigación, la aplicación clínica y la divulgación sobre microbiota de las regiones corporales, probióticos y prebióticos y su impacto en la salud. También servirá como órgano de expresión de la Sociedad Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos (SEMiPyP) y de la, recientemente creada, Sociedad Iberoamericana de Microbiota, Probióticos y Prebióticos (SIAMPyP).

**Francisco Guarner Aguilar**  
*Presidente de la SIAMPyP*

**Guillermo Álvarez Calatayud**  
*Presidente de la SEMiPyP*

# Programa científico

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):2-5

## MIÉRCOLES 12 DE FEBRERO

15:00-20:00

ENTREGA DOCUMENTACIÓN

15:30-16:00

CONFERENCIA DE APERTURA

Sala Manuel de Falla

*Patrocinado por Lallemand*

MODERADOR: José Manuel Martín-Villa. *Universidad Complutense de Madrid.*

***Bridging the Gap Between Nutrition & Psychiatry using Probiotics***

*Caroline Wallace. Queen's University.*

16:00-17:00

SIMPOSIO SATÉLITE

Sala Manuel de Falla

*Patrocinado por Heel*

- **La microbiota y su modulación en el ámbito veterinario.** Juan Miguel Rodríguez Gómez. *Catedrático del Dpto. de Nutrición y Ciencia de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid.*
- **Selección de probióticos de origen canino y aplicación para la prevención de gastroenteritis.** Leonides Fernández Álvarez. *Profesora Titular del Dpto. de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Universidad Complutense de Madrid.*

17:00-18:00

SIMPOSIO SATÉLITE

Sala Manuel de Falla

*Patrocinado por Nutricia*

**Nuevos componentes bioactivos que modulan el sistema inmune a través de la microbiota**

- **Leche materna: probióticos, prebióticos y postbióticos.** María del Carmen Collado. *IATA-CSIC, Valencia.*
- ***Postbiotics, the last novelty in the biotics family.*** Jan Knol. *irector del Programa de Microbiota y Microbiología en Danone Nutricia Research Utrecht/ Singapur.*

18:00-18:30

***Pausa café***

18:30-19:30

SIMPOSIO SATÉLITE

Sala Manuel de Falla

*Patrocinado por Faes Farma*

**Probióticos y Mujer**

- **Concepción Navarro Moll.** *Doctora en Farmacia. Catedrática de Farmacología. Departamento de Farmacología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.*
- **Fernando Losa Domínguez.** *Ginecólogo, Clínica Sagrada Familia, Barcelona. Coordinador de Productos Naturales de la AEEM.*

---

19:30-20:30

## SIMPOSIO SATÉLITE

Sala Manuel de Falla

*Patrocinado por Grifols*

### Aplicaciones clínicas de los probióticos

MODERADOR: **Francisco Guarner**. *Unidad de Investigación del Sistema Digestivo en el Hospital Vall d'Hebron. Barcelona.*

- **¿Son útiles los probióticos en las enfermedades hepáticas?** **Germán Soriano Pastor**. *Servicio de Patología Digestiva. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Barcelona.*
- **Papel de los probióticos en la prevención y disminución de la diarrea asociada a quimio y radioterapia.** **Eduardo Sánchez**. *Unidad Gestión Clínica Medicina Interna y Onco-Hematología, Cuidados Paliativos y Enfermedades infecciosas del Hospital Puerta Europa de Algeciras, Cádiz.*

## JUEVES 13 DE FEBRERO

---

08:30-09:00

### BIENVENIDA E INAUGURACIÓN

Sala Manuel de Falla

---

09:00-10:00

### CONFERENCIA INAUGURAL

Sala Manuel de Falla

MODERADOR: **José Maldonado Lozano**. *Universidad de Granada. Unidad de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica, Hospital Materno-Infantil Virgen de las Nieves. Granada.*

### Identificación con ADN: crimen, medicina e historia

**José Antonio Lorente**. *Universidad de Granada.*

---

10:00-11:30

### MESA DE CONTROVERSIAS

Sala Manuel de Falla

### Sociedad Iberoamericana de Microbiota, Probióticos y Prebióticos (SIAMPyP)

MODERADORES: **Luis Peña Quintana**. *Servicio de Gastroenterología Pediátrica. Hospital Universitario Materno-Infantil. Las Palmas de Gran Canaria.*

**Jorge Amil**. *Servicio de Gastroenterología Pediátrica. Hospital Sao Joao. Oporto. Portugal.*

- **Probióticos en la diarrea aguda en la infancia. Evidencia científica.**

**Fernando Medina Monroy**. *Unidad de Gastroenterología, Nutrición y Endoscopia Pediátrica. Bucaramanga. Colombia.*

**Rodrigo Vázquez**. *Servicio de Gastroenterología Pediátrica. Hospital Infantil de México Federico Gómez. México DF.*

- **¿Existe colonización en el periodo prenatal?**

**Christian Boggio-Marzet**. *Gastroenterología Pediátrica. Buenos Aires. Argentina.*

**Juan Evaristo Suárez Fernández**. *Microbiólogo. Universidad de Oviedo. España.*

- **Microbiota en el síndrome de intestino irritable. Experiencia Argentina.**

**Luis Bustos Fernández**. *Ex-Presidente Sociedad Argentina de Gastroenterología. Ex-Presidente de la Sociedad Latinoamericana de Neurogastroenterología. Director Médico CMBF. Argentina.*

---

11:30-12:00

*Pausa café*

---

12:00-14:00

### SESIÓN USOS CLÍNICOS

Sala Manuel de Falla

MODERADOR: **Francisco Guarner Aguilar**. *Investigador de la Unidad de Sistema Digestivo. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona.*

### PONENCIA PLENARIA

**Faecal Microbiota Transfer: procedures, indications and results in the Unit at the Amsterdam Medical Centers**

**Hilde Herrema**. *Staff Experimental Vascular Medicine. Amsterdam University Medical Centers.*

### COMUNICACIONES ORALES

#### Usos clínicos

MODERADORES: **Ana Teresa Abreu y Abreu**. *Servicio de Gastroenterología. Hospital Angeles Pedregal. México DF.*

**Aldo Maruy Saito**. *Pediatra Gastroenterólogo. Perú.*

---

14:00-15:30

### Almuerzo de trabajo

Hall. Planta -2

15:30-17:00

## TALLERES SIMULTÁNEOS

### TALLER 1. Bacterioma de la leche humana en la salud y en la enfermedad

Sala Andalucía 2

COORDINADOR: José Maldonado Lozano. *Universidad de Granada. Unidad de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica, Hospital Materno-Infantil Virgen de las Nieves. Granada.*

- **Bacterioma de la leche humana: origen y composición.** Mónica Olivares Martín. *Directora de Investigación. Biosearch Life. Granada.*
- **Funciones de las bacterias de la leche humana.** Rosaura Leis Trabazo. *Profesora Titular de Pediatría. Universidad de Santiago de Compostela. Coordinadora de la Unidad de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica, Hospital Clínico Universitario de Santiago. Santiago de Compostela.*
- **Implicaciones del bacterioma de la leche humana en la enfermedad.** Cristina Campoy Folgoso. *Profesora Titular de Pediatría. Universidad de Granada. Centro de Excelencia de Investigación Pediátrica EURISTIKOS. Universidad de Granada.*

### TALLER 2. Veterinaria

Sala Andalucía 1

COORDINADOR: Gaspar Pérez Martínez. *Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición, ICTAN-CSIC.*

- **Modulación de la microbiota digestiva en rumiantes: Potenciando las ventajas y minimizando los inconvenientes.** Alejandro Belanche Gracia. *Investigador en nutrición de rumiantes. Estación Experimental del Zaidín (CSIC), Granada.*
- **Factores genéticos y ambientales que determinan la diversidad y composición de la microbiota digestiva en monogástricos.** Yulixaxis Ramayo-Caldas. *Investigador en genética animal. Institute of Agrifood Research and Technology (IRTA), Barcelona.*

### TALLER 3. El desarrollo de un probiótico: del aislamiento al ensayo clínico

Sala Manuel de Falla

*Patrocinado por Casen Recordati*

COORDINADOR: Juan Evaristo Suárez Fernández. *Catedrático de Microbiología, Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud. Universidad de Oviedo.*

- **Aislamiento y caracterización de lactobacilos con potencial probiótico para erradicar *Streptococcus***

*agalactiae* de vagina, durante el embarazo. Leónides Fernández Álvarez. *Profesora Titular de Tecnología de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid.*

- **Ensayo clínico: eficacia de *Lactobacillus salivarius* CECTV4II-90 para erradicar la colonización vaginal de embarazadas por *Streptococcus agalactiae*.** David Ángel Beltrán Vaquero. *Especialista en Obstetricia y Ginecología. Centro de Diagnóstico Médico. Ayuntamiento de Madrid.*

### TALLER 4. Psicobióticos

Sala Andalucía 3

*Patrocinado por Neuraxpharm*

COORDINADORA: Silvia Gómez Senent. *Hospital La Paz. Madrid.*

- **Microbiota-Intestino-Cerebro.** Mónica de la Fuente. *Catedrática de fisiología UCM.*
- **Psicobióticos y trastornos mentales.** Manuel Martín Carrasco. *Psiquiatra. Director médico Centros de Hermanas Hospitalaria. Navarra.*
- **Microbiota, psicobióticos y trastornos del espectro autista.** Guillermo Álvarez de Calatayud. *Unidad de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica del Hospital Gregorio Marañón. Madrid.*

17:00-18:30

## REUNIÓN CON EL EXPERTO

Sala Manuel de Falla

*Patrocinado por Zambon*

### Microbiota y antibióticos

MODERADOR: Francisco Guarner Aguilar. *Hospital del Vall d'Hebron. Barcelona.*

- **Cómo afectan los antibióticos a nuestra microbiota.** Disbiosis. Ana Teresa Abreu y Abreu. *Servicio de Gastroenterología. Hospital Ángeles Pedregal. México DF.*
- **Evidencia clínica y uso de probióticos en la diarrea asociada a antibióticos.** Henry Cohen Engelman. *Gastroenterólogo. Uruguay.*

18:30-19:30

## PRESENTACIÓN DE POSTERS

Zona Exposición Comercial

### POSTERS. Usos clínicos

MODERADORES: Luz Taboada. *Hospital San Rafael. Madrid.*  
Christian Boggio Marzet. *Sección de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica. División de Pediatría. Hospital General de Agudos Dr. I. Pirovan. Buenos Aires. Argentina.*

## POSTERS. Inmunonutrición

MODERADORES: José Manuel Martín-Villa. *Universidad Complutense de Madrid.*

Teresa Requena Rolanía. *Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación. CIAL (CSIC-UAM). Madrid.*

## POSTERS. Veterinaria

MODERADORES: José Manuel Martín-Villa. *Universidad Complutense de Madrid.*

Teresa Requena Rolanía. *Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación. CIAL (CSIC-UAM). Madrid.*

---

19:30-20:30

## ASAMBLEA GENERAL

Sala Manuel de Falla

---

21:30

## Cóctel de Bienvenida

Hotel Santos Saray. Salón Alhamar. Planta -1.

## VIERNES 14 DE FEBRERO

---

08:00-10:30

## SESIÓN DE INMUNONUTRICIÓN

Sala Manuel de Falla

MODERADORES: Ascensión Marcos Sánchez. *Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos y Nutrición (ICTAN). CSIC. Madrid.*

Mónica de la Fuente del Rey. *Universidad Complutense de Madrid.*

## PONENCIA PLENARIA

### Mecanismo de acción de probióticos

Ángel Gil Hernández. *Universidad de Granada.*

## COMUNICACIONES ORALES

### Inmunonutrición

## PONENCIA PLENARIA

### Polifenoles y microbiota

Francisco Tomás Barberán. *(CEBAS, CSIC).*

---

10:30-11:30

## PRESENTACIÓN DE POSTERS

Zona Exposición Comercial

## POSTERS. Microbiología 1

MODERADORES: Alfonso Clemente Gimeno. *Grupo de Salud Gastrointestinal. Departamento de Fisiología y Bioquímica de la Nutrición Animal. Estación Experimental del Zaidín (EEZ-CSIC). Granada.*

José Maldonado. *Departamento de Investigación de Biosearch Life. Granada.*

## POSTERS. Microbiología 2

MODERADORES: Patricia Ruas. *IPLA-CSIC. Gijón. (Asturias).*  
Leonides Fernández Álvarez. *Profesora Titular del Dpto. de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria, Universidad Complutense de Madrid.*

---

12:00-14:00

## SESIÓN MICROBIOLOGÍA Y VETERINARIA

Sala Manuel de Falla

MODERADORES: Gaspar Pérez Martínez. *Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos, IATA-CSIC.*

Abelardo Margolles Barros. *Instituto de Productos Lácteos de Asturias, IPLA-CSIC.*

## PONENCIA PLENARIA

### Probiotic lactobacilli: new insights in ecology and evolutionary history drive new applications.

Sarah Lebeer. *Associate Professor in Microbiology & Biotechnology, University of Antwerpen, Bélgica. Member of the Academic Board of the International Scientific Association on Probiotics & Prebiotics (ISAPP). Member of the Academic Board of the Belgian Society for Microbiology.*

## COMUNICACIONES ORALES

### Microbiología y Veterinaria

---

14:00-14:15

## ENTREGA DE PREMIOS

Sala Manuel de Falla

---

14:15-15:00

## CONFERENCIA DE CLAUSURA

Sala Manuel de Falla

MODERADORA: Teresa Requena Rolanía. *Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación. CIAL (CSIC-UAM). Madrid.*

### Probiotics are simple proxies for the vastly complex human microbiome – just now effective are they?

Nigel Plummer. *Cultech Limited.*

# Identificación con ADN: crimen, medicina e historia

José Antonio Lorente Acosta

*Catedrático de Medicina Legal y director de GENYO. Universidad de Granada.*

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):6-8

Hablaremos del ácido desoxirribonucleico, el ADN, esa apasionante molécula que es capaz de transmitir la información genética de modo fiel en el cuerpo de cada persona, lo que permite el desarrollo, la regeneración y el crecimiento, pero también va más allá de la persona, a través de los cigotos, para generar nueva vida.

Su estudio y aplicaciones no sólo tienen utilidad para la medicina, sino que con las mismas tecnologías de estudio y análisis somos capaces de resolver no sólo los misterios propios del ser humano, sino los que el ser humano es capaz de originar a lo largo del tiempo, en la historia, o en tiempos más recientes, como son los crímenes o delitos.

En relación al mundo de los delitos, del derecho penal del **crimen**, cuando una persona hace algo que está mal, o simplemente entiende que está mal, la primera reacción es la de negarlo u ocultarlo. Así lo hacen de modo instintivo los niños desde muy corta edad, cuando niegan lo que es evidente. Cometer un delito y huir o incluso intentar ocultarlo es, estadísticamente, lo más frecuente.

Por otra parte, hemos de considerar que los delitos contra las personas, sobre todo cuando provocan graves lesiones o la muerte, suelen dejar como indicios manchas de sangre, de semen, de saliva, pelos, etc., o sea, muestras biológicas que contienen células con su ADN y que nos permite identificar al presunto autor o autores, pero también descartar a personas de las que se sospechaba por motivos diversos, incluidas falsas acusaciones o identificaciones equivocadas por parte de testigos o de la víctima.

La tecnología actual aporta múltiples datos identificativos, del llamado ADN no codificante, que **permite** identificaciones con una altísima probabilidad (ahora se maneja en

términos de razón de verosimilitud en vez de porcentajes). Pero también nos da información fenotípica de la persona, por ejemplo, del color del cabello, de los ojos o de la piel, lo cual puede ser especialmente útil para comenzar una investigación y descartar posibles sospechosos. Los protocolos actuales permiten realizar esta predicción con una sensibilidad y certeza muy altos.

Además de esto, hoy en día hay investigaciones muy importantes en marcha, como las lideradas por el grupo de J. Craig Venter, que permiten predecir la forma de la cabeza y del rostro, lo que unido a los datos fenotípicos antes mencionados son capaces de, por ejemplo, generar un “retrato-robot” de la persona a partir de una gota de sangre o de semen, o de cualquier otro tipo de material biológico.

A todos estos avances se unen las llamadas bases de datos genéticas, en marcha desde hace ya casi 20 años, de hecho, las primeras fueron en el Reino Unido y en EE.UU., a finales del siglo pasado. De modo general, porque cada país las regula de modo diferente, podemos decir que las mismas permiten acumular datos genéticos de personas que han cometido delitos de una cierta entidad y datos de los indicios criminales encontrados en la llamada escena del crimen y que no se sabe de quienes son, porque o bien no hay sospechoso, o bien no pertenecen a los sospechosos inicialmente considerados.

Esto está permitiendo resolver delitos de hace ya bastantes años y, sobre todo, poder identificar a los delincuentes reincidentes. Imaginemos el caso en el que se detiene a una persona acusada de una presunta agresión sexual. Sus datos se introducen en la base de datos –que en España está adscrita a la Secretaría de Estado de Seguridad del Ministerio del Interior– y, de repente, el ADN de esa persona no sólo

coincide con el del delito por el que se le ha detenido, sino que coincide con una serie de delitos previos que no se habían podido resolver por falta de información.

Y si bien es cierto que el ADN no prueba la culpabilidad de nadie, ya que esta sólo puede ser determinada por un Juez tras un juicio con todas las garantías, sí que ofrece datos muy importantes capaces de orientar la investigación policial y de asegurar el origen de ciertas muestras.

Pero no sólo la resolución de crímenes y delitos de todo tipo tienen en el ADN un gran aliado, sino que hay otra aplicación en una esfera que llamamos “humanitaria”, para resolver temas que ante todo nos afectan como seres humanos. Son los casos de identificación de personas desaparecidas y de robo y trata de niños, incluidas las adopciones ilegales.

La Universidad de Granada (UGR), a través de su Laboratorio de Identificación Genética del Depto. de Medicina Legal ha sido pionera, en todo el mundo, en inventar y desarrollar 3 programas de aplicación universal en estas materias: el Programa Fénix, DNA-PROKIDS y DNA-Pro-ORGANS.

En 1999, la UGR puso en marcha el Programa FÉNIX, destinado a la identificación de personas desaparecidas, para identificar sistemáticamente a todos los cadáveres enterrados sin nombre y dar consuelo a las familias que buscan a personas que desaparecieron hace mucho tiempo y de las que no se sabe nada. Sin bien es cierto que más del 99% de las personas que desaparecen no han fallecido, también es un hecho innegable que hay miles de cadáveres enterrados a lo largo de los últimos 30 años sin identificar (no se consideran en este caso las víctimas pendientes de identificación en el contexto de la Guerra Civil española). Desde entonces, más de 1.000 cadáveres han podido ser identificados y entregados a sus familias.

En 2004 se puso en marcha por parte de la UGR el Programa DNA-PROKIDS, un programa humanitario con vocación universal destinado a identificar a los niños y niñas no identificados, que no se sabe quiénes son, aunque que se encuentran bajo protección de las autoridades y de organizaciones humanitarias. Sus familias los están buscando desesperadamente y ellos se encuentran en orfanatos y similares a cientos o miles de kilómetros de distancia, pero no hay modo de identificarlos porque son muy pequeños y no saben hablar, o en otros casos, aunque ya sepan hablar, no recuerdan quiénes son porque los robaron siendo muy pequeños. Los niños son robados para todo tipo de abusos y explotaciones: laborales, sexuales o mendicidad, y otras veces lo son para ser dados en adopciones ilegales o legalizadas de modo criminal.

En este momento nos encontramos trabajando en 7 países de Latinoamérica y 5 de Asia, y se han producido más de 1.800 identificaciones, y además se ha conseguido limitar y evitar adopciones ilegales.

En 2016, la Universidad de Granada, con el apoyo de la Organización Médica Colegial (OMC) y con la colaboración de la Organización Nacional de Trasplantes (ONT), puso en marcha el Programa DNA-Pro-ORGANS. Este programa

está en pleno pilotaje en este momento, y pretende obtener muestras biológicas de referencia para posteriores estudios de ADN, de los donantes, los receptores y los órganos trasplantados, de modo que se pueda establecer una trazabilidad de los órganos trasplantados y de los hospitales donde se hicieron.

Si nos referimos a las aplicaciones del ADN a la **medicina clínica**, entramos de lleno en la llamada era de la medicina de las 4-Ps: personalizada, participativa, predictiva y preventiva. Su desarrollo nos lleva hacia el campo de lo que podemos llamar medicina personalizada de precisión, medicina que no está basada sólo en los avances de las ciencias “ómicas”, pero que sí es una gran beneficiaria de la misma.

Las aplicaciones de la genómica en particular aportan datos para un más exacto diagnóstico, pronóstico y tratamiento (farmacogenómica), y esto se viene aplicando desde hace ya muchos años. Lo más importante con el avance futuro, sobre todo con la aplicación de la computación cuántica que multiplicará por miles la velocidad de procesamiento de los datos, será la prevención basada en la predicción, o sea, adaptar la prevención a cada persona de modo personal y preciso, y no sólo de modo general como en gran parte se ha venido haciendo hasta ahora en medicina.

Hay un campo de especial interés para nosotros y para nuestro trabajo en GENYO, Centro Pfizer – Universidad de Granada – Junta de Andalucía de Genómica e Investigación Oncológica, cual es el de la biopsia líquida, por la capacidad que este conjunto de tecnologías ofrece al médico de poder tener datos actualizados que ofrecen información clave e importante de la evolución de un paciente, como los derivados del estudio del ADN tumoral libre, de los exosomas, de los micro-RNAs (*miRNAs*), o de células tumorales circulantes (CTCs), incluso otro tipo de células circulantes, como pueden ser las que hemos llamado células pulmonares circulantes (CPCs) en pacientes con EPOC.

La información obtenida con estas tecnologías está en pleno desarrollo, aunque está ya aportando datos que permiten modificar y adaptar tratamientos al estado “en tiempo real” del paciente y a la respuesta a lo ya administrado, permitiendo igualmente cambiar criterios generales de atención sin esperar a pruebas cuya realización necesitaría más tiempo. Aumenta, pues, el arsenal diagnóstico médico en beneficio de los pacientes.

Finalmente, en el campo **histórico**, entendiendo como tal la identificación de personajes históricos por diversos motivos, el ADN también supuso una revolución. Hay que recordar que en este sentido se suele utilizar con cierta frecuencia el ADN mitocondrial y el del cromosoma Y, ya que ambos se transmiten de padres a hijos de modo exacto, sin recombinación, salvo mutaciones puntuales.

Así, el ADN mitocondrial es transmitido por las madres a todos los hijos (varones y hembras). Identifica a todos los hijos de una misma madre y de las personas con relación por

vía materna. Su limitación principal es que sólo se transmite por la madre, pero por sus características biológicas (pequeño tamaño y gran número de copias por célula) lo convierten en un medio ideal de análisis en casos históricos, ya que persiste mejor a lo largo del tiempo.

Por su parte, el cromosoma Y, que marca el sexo masculino, es lógicamente transmitido sólo por varones y sólo a hijos varones. En algunos casos históricos tiene una mayor facilidad para ser estudiado documentalmente, ya que se transmite del mismo modo que lo hace el apellido paterno, y esto suele constar en muchos documentos y archivos. No es tan resistente ante el paso del tiempo como el mitocondrial, pero tiene gran utilidad.

La principal limitación de ambos tipos de ADN mencionados es que no son propios de una persona, sino de un grupo familiar, por lo que tienen utilidad máxima en algunos casos y otras veces está limitada si nos encontramos con varios restos de la misma familia.

Nuestro equipo del Laboratorio de Identificación Genética del Depto. de Medicina Legal de la Universidad de Granada ha participado y participa en múltiples estudios de tipo histórico, como la identificación de Doña Blanca de Navarra y del Príncipe de Viana por encargo del Gobierno Foral de Navarra en 1995, o la de los restos de Cristóbal Colón, un proyecto que se inició en 2003 y que debe concluir en 2020.

El proyecto Cristóbal Colón tiene dos fases, una de las cuales ya concluyó. Teniendo en cuenta que Colón tiene dos tumbas oficiales, en Sevilla y en Santo Domingo (Rep. Dominicana), la primera fase consistía en verificar si los restos existentes en esas ubicaciones eran los del Almirante.

La segunda fase, ahora en marcha y mucho más apasionante es la de tratar de aportar datos científicos que permitan saber los orígenes de Colón, que aunque mayoritariamente se acepta de origen humilde italiano, hay otras muchas teorías con datos bastante consistentes que le otorgan origen en diversos lugares de España o de Portugal y en los que, en algunos casos, el ADN podría aportar información muy útil en caso de que se consiga obtener un ADN de calidad de las diferentes muestras.

Además, nuestro equipo ha trabajado en otros muchos casos, como la identificación de Simón Bolívar, o la de Francisco de Miranda, el gran precursor intelectual y militar de la independencia latinoamericana, cuya identificación está en marcha.

Para finalizar, aparte de otros muchos casos (de algunos de los cuales hemos de guardar en este momento absoluta confidencialidad), estamos trabajando desde el año 2016 con un grupo multidisciplinar italo-norteamericano de expertos y profesores de historia, historia del arte, arquitectura, genealogía, genética y medicina para poder llevar a cabo la identificación de los restos de Leonardo da Vinci y tratar de saber, a través de su ADN, más de uno de los mayores genios que ha dado la historia de la humanidad. Seguimos trabajando en ello a la espera de poder avanzar en los aspectos más importantes.

Y todo lo anterior usando una misma molécula, con las mismas tecnologías, que depende cómo se enfoque, con mínimas variaciones, el estudio nos da una información sobre la identificación, la enfermedad o el color del cabello. Todo un mundo de magia, el mundo del ADN.

# Diarrea aguda en niños evidencia que los probióticos no funcionan

Fernando Alonso Medina Monroy

*Pediatra gastroenterólogo. Centro Médico Nacional de la Raza, México. Universidad el Bosque, Colombia. Docente Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia. Maestría en Alergia pediátrica en la Universidad San Jorge, Salamanca, España. Presidente de la Asociación Colombiana de Probióticos y Prebióticos (ACOPYP). Miembro de SEMIPYP. Director médico y científico de la Unidad de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (UGANEP), Bucaramanga, Colombia.*

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):9-11

El crecimiento en la producción y del uso de los probióticos cada vez más van en aumento, las primera patentes fueron realizadas en 1978 y a partir de 1995 se considera como la etapa emergente de las patentes para los Probióticos, sin embargo este crecimiento se ha hecho exponencial observándose que para el año 2017 hay alrededor de 15.441 solicitudes de patentes en todo el mundo.

La revista *Forbes* data que los norteamericanos consumen por año cerca de 4 millones de probióticos con un costo de 45 mil millones de dólares estos mal contados son 40 mil millones de euros, logrando llegar a un crecimiento en el mercado mundial del 7%.

China es considerado como el país con mayor capacidad inventiva mientras que los Estados Unidos de Norteamérica (EE.UU.) es el país con mayor producción de patentes, seguidos de Rusia, Suiza y Corea de Sur, el segundo país europeo con mayor producción de patentes es Francia seguida de Alemania, respecto a las casas de industrias farmacéuticas se considera a Nestlé como la de mayor impacto industrial en el área de los probióticos seguido de Elan Pharma International.

Sin embargo, con este crecimiento desahogado no ha podido pasar incólume ante la ciencia que constantemente escudriña y verifica la efectividad y veracidad de las publicaciones de los productos con mayor venta en el mundo.

Uno de los pioneros en esta área de la contradicción es el Doctor **Oluf Pedersen**, de la Universidad de Copenhague, quien hace sus comentarios en la revista *Genome Medicine* y se publica en el año 2016, afirmando que los dos probióticos más utilizados por la industria farmacéutica a saber los lactobacilos y las bifidobacterias no tienen ningún tipo de efecto en la microbiota intestinal en individuos sin patologías.

El objetivo del estudio fue realizar una revisión sistemática de la evidencia potencial del uso de los probióticos en la composición de la microbiota fecal humana según lo evaluado mediante enfoques moleculares de alto rendimiento en ensayos controlados aleatorios (ECA) de adultos sanos, concluyéndose la falta de evidencia del impacto de los probióticos en la composición de la microbiota fecal en adultos sanos<sup>(1)</sup>.

El 22 de octubre del 2018 se publica una nueva arremetida contra el uso de los probióticos en el *New York Times* donde comentan: “los probióticos son suplementos alimenticios que su regulación es menor que la de los medicamentos, por lo que no necesitan demostrar su eficacia para ser comercializados, sino solo su inocuidad”, y ahondan la discusión respecto a este tema resaltando la importancia de que los consumidores comprendan que todos estos productos bien etiquetados en los estantes de las tiendas “no son examinados completamente por la FDA”<sup>(2)</sup>.

Sin embargo, durante demasiado tiempo hemos asumido que los probióticos están haciendo algo bueno y poco daño. Eso puede ser cierto para algunos, pero no está asegurado en el entorno actual para todos los probióticos que se encuentran a la venta al público, y esto apuntala los comentarios del Doctor Francisco Gaurner donde refiere: “los probióticos que se añaden a las leches, yogures como también champús y lociones están sin evidencias de sus verdaderos beneficios”.

Otro factor para tener en cuenta en el uso de los probióticos en diarrea son los problemas de medición en los ensayos, en una revisión sistemática donde se tomaron 138 estudios utilizaron hasta 64 diferentes definiciones únicas de diarrea, 60 definiciones únicas de resolución de la diarrea lo

cual orientó a diferentes criterios de incidencia y duración de la diarrea. La definición de la diarrea *per se* en ensayos metodológicamente sólidos siempre fueron heterogéneos y se centran en índices que pueden no ser importantes para los participantes.

Cuando se analizan los metaanálisis de diarrea/probióticos de la Doctora Szajewska hay varios ítems en los cuales hay que deparar para llegar a una verdad: 1) Los estudios incluidos no fueron significativamente heterogéneos desde el punto de vista metodológico; 2) Las conclusiones estadísticas con respecto a este tipo de heterogeneidad se relacionaron con un escaso número de estudios; 3) No se pudo excluir completamente el sesgo de la publicación; 4) La dosis diaria del producto en el estudio y su presentación que podría ser sachet, leches o cápsulas además de la duración de la intervención variaron entre todos los estudios<sup>(3)</sup>.

En 2017, un grupo de trabajo de la ESPGAHN publica un artículo donde hace un llamado para el mejor control de calidad de los productos con probióticos que se encuentran en el comercio, afirmando que los estudios realizados en todo el mundo han demostrado que hay inconsistencias y desviaciones de la información proporcionada en la etiqueta del producto, además que muchas de las cepas se identifican y se clasifican erróneamente y los productos se contaminan incluso con patógenos facultativos terminando siendo cepas no viables y finalmente que en las preparaciones de los probióticos se usan comúnmente una amplia gama de condiciones que hace a veces imposible verificar el número de unidades formadoras de colonias (UFC) o las propiedades funcionales y su respectivo beneficio para la salud originalmente propuesto<sup>(4)</sup>.

En los últimos años se ha incrementado la presencia de todo tipo de reacciones alérgicas y desde hace poco podemos observar que algunos probióticos son parte de los causantes. En un estudio publicado en la revista *Pediatric Allergy and Immunology*, donde revisan los contenidos de trazas de proteínas de leche de vaca y huevo en diferentes productos de probióticos comercializados de los cuales 7 fueron dietarios y 4 preparados farmacéuticos, se encontró contaminación con mayor frecuencia de trazas de leche, llegando a valores de 2,5 mg/kg en tres de ellos y sin ninguna advertencia clara en el etiquetado. Concluyéndose en este estudio de Martín Muñoz y colaboradores que: “Los compuestos probióticos pueden contener alérgenos ocultos de los alimentos y pueden no ser seguros para los sujetos con alergia a la leche de vaca o al huevo de gallina”<sup>(5)</sup>.

La gastroenteritis se ha considerado como una de las patologías más frecuentes que se presentan en la edad pediátrica; en los EE.UU. se reportan aproximadamente 1,7 millones de visitas al servicio de urgencias por año, y como herramienta para este constante flagelo en la salud de los infantes los probióticos han sido un recurso útil en los últimos años.

Dentro de las guías para el tratamiento de las infecciones gastrointestinales, 5 de las 12 guías conocidas respaldan el

uso de los probióticos como pilar en el tratamiento de la diarrea aguda, expandiéndose la industria de la producción de los probióticos que logran alcanzar a sumas importantes en ventas.

En 2018, el Doctor Stephen B. Freedman y sus colaboradores publican un trabajo multicéntrico en el servicio de urgencias pediátricas de la ciudad de Alberta, Canadá, con el fin de valorar la utilidad de los probióticos en niños de 3 a 48 meses de edad con diagnóstico de gastroenteritis aguda. El probiótico utilizado estaba compuesto de dos cepas y fue suministrado por Lallemand Health Solutions, el cual fue comparado con un placebo también suministrado por la misma casa farmacéutica. Los participantes recibieron durante 5 días un compuesto de *Lactobacilos rhamnosus* R0011 y *L. helveticus* R0052 a una dosis de  $4 \times 10^9$  UFC; la presentación fue en sachets donde polvo liofilizado se suministraba dos veces al día y fueron rociados en 30 ml del líquido preferido por el niño recibéndolo en forma aleatoria; la temperatura con que se mantuvo este producto fue de 0 a 25°C.

El primer resultado valorado en este estudio fue la gastroenteritis con presentación de moderada a severa, la cual fue definida de acuerdo a la escala de Vesikari modificada. Esta escala califica: 1) La duración de la diarrea en horas; 2) El máximo número de deposiciones líquidas en 24 horas; 3) La duración de los vómitos en horas; 4) El máximo número de episodios de vómitos en 24 horas; 5) La máxima temperatura rectal; y 6) El número de visitas al médico no programadas. Todos estos parámetros fueron analizados durante 14 días. El segundo resultado valorado fue la regresión a la normalidad de la diarrea y el vómito en horas.

Durante el estudio participaron 886 pacientes pediátricos, de los cuales 414 de los 444 fueron asignados a recibir probióticos (93,2%) y 413 de los 442 participantes fueron asignados a recibir placebo (93,4%), más del 70% recibieron la dosis prescrita. Llama la atención que no se presentó ninguna diferencia significativa en el 77% para el grupo manejado con probióticos *versus* 80,2% en el grupo placebo. El patógeno más frecuentemente encontrado fue el Rotavirus A en ambos grupos.

En el primer objetivo estudiado, donde se utilizó la escala de Vesikari modificada, el score fue similar en ambos grupos: 26,1% en el grupo que se utilizó los probióticos y de 24,7% en el grupo placebo, con una  $P=0,650$  y un  $CI= -4,5$  a  $7,3$ ; mostrando que no se presentó ningún tipo de beneficio con los probióticos, ni tampoco se presentó beneficio con el patógeno identificado.

El segundo objetivo valorado en este estudio tampoco presentó diferencias significativas para ambos grupos respecto a la duración de la diarrea. En el grupo que utilizaron los probióticos la duración media de la diarrea fue de 52,5 horas y en el grupo que utilizaron el placebo fue de 55,5 horas; respecto al vómito, 17,7 horas en el grupo que utilizó probióticos y

18,7 horas el grupo que utilizó el placebo; sin embargo, el número de episodios de vómitos sí fue significativamente mayor en el grupo que utilizó los probióticos *versus* el grupo que utilizó el placebo (CI: 1,13 a 1,63;  $P < 0,001$ ) (Fig. 1). No se presentaron diferencias significativas respecto a las visitas no programadas al médico, con 30,2% *vs.* 26,6%, y  $P = 0,27$ . Respecto a los eventos adversos tampoco se presentaron diferencias significativas.

En conclusión, este estudio nos revela que dos dosis diarias durante 5 días de una combinación de un probiótico con *L. rhamnosus* y *L. helveticus* con una concentración de  $4 \times 10^9$  UFC, no previene la gastroenteritis de moderada a severa después de 14 días de tratamiento en niños durante la primera infancia e infancia, quienes habían presentado síntomas de gastroenteritis por más de 72 horas<sup>(6)</sup>.

La calidad de la evidencia ha sido calificada por Szajewska como baja o muy baja, muchos expertos consideran que la diarrea aguda debe ser manejada con probióticos, la ESPGHAN recomienda en forma importante el uso de los probióticos para los eventos de gastroenteritis, estas recomendaciones están basadas ampliamente en meta-análisis realizadas por Cochrane en 2010.

Aunque los autores de esta revisión calificaron solo 10 de los 63 estudios elegibles por ser metodológicamente adecuados, siendo el principal hallazgo de estas revisiones la reducción de la duración de la diarrea a 25 horas.

Finalmente, otro estudio con el mismo tenor y publicado por el *New England Journal of Medicine* y realizado por el Doctor David Schnadower, publicado en 2018 y realizado en el servicio de Urgencias del Hospital pediátrico de Cincinnati, nos reporta en un estudio prospectivo, randomizado doble ciego en el que se suministró *L. rhamnosus* GG con dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC dos veces al día *vs.* placebo, durante 5 días.

Se lograron reclutar 971 participantes, de los cuales completaron el estudio 943 (97,1%), con una edad media de 1,4 años, el 52,9% fueron varones. Después de su análisis estadístico se logra concluir que no hay diferencias significativas entre el grupo manejado con *L. rhamnosus* GG y el grupo placebo; el tiempo de duración de la diarrea en el grupo manejado con probióticos fue de 49,7 horas y en el grupo placebo fue de 50,9 horas con una  $P = 0,17$ , no significativa; tampoco presentó diferencias reveladoras respecto a la presencia del vómito y el ausentismo a las guarderías<sup>(7)</sup>.

Con toda esta información es necesario replantearse la necesidad de realizar estudios mejor diseñados que nos den información más certera y también la importancia de mayores controles en los productos que encontramos a la venta libre, además de que las sociedades académicas deben hacer énfasis en la veracidad de sus contenidos *versus* lo ofrecido.

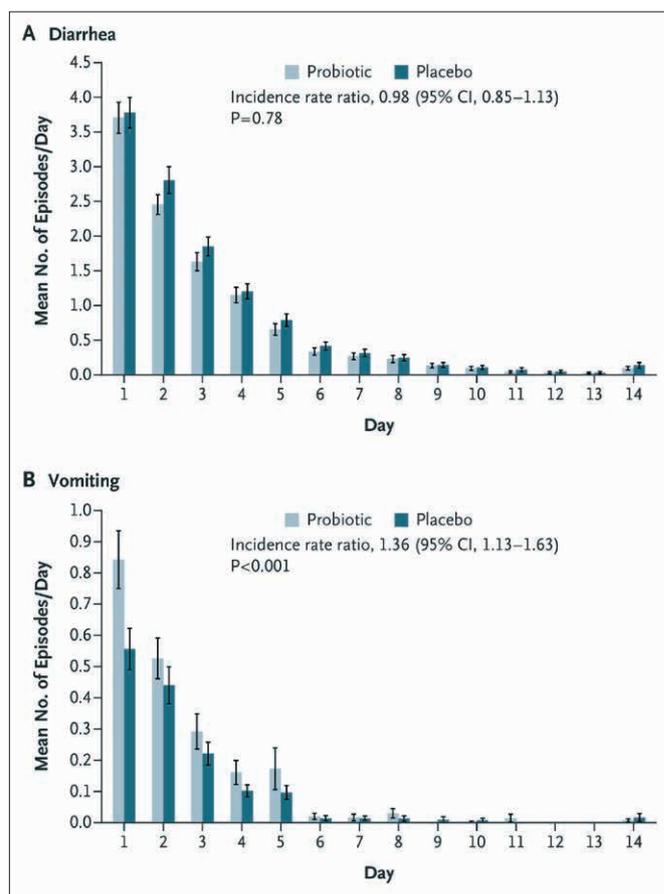


Figura 1.

## Bibliografía

- Kristensen NB, Bryrup T, Allin KH, Nielsen T, Hansen TH, Pedersen O. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome Med.* 2016; 8: 52.
- Cohen PA. Probiotic safety-No guarantees. *JAMA Intern Med.* 2018; 178:1577-8.
- Szajewska H, Skórka A, Dylag M. Meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* for treating acute diarrhoea in children. *Aliment Pharmacol Ther.* 2007; 25: 257-64.
- Kolaček S, Hojsak I, Berni Canani R, Guarino A, Indrio F, Orel R, et al. Commercial probiotic products: A call for improved quality control. A Position Paper by the ESPGHAN Working Group for Probiotics and Prebiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017; 65: 117-24.
- Martín-Muñoz MF, Fortuni M, Caminoa M, Belver T, Quirce S, Caballero T. Anaphylactic reaction to probiotics. Cow's milk and hen's egg allergens in probiotic compounds. *Pediatr Allergy Immunol.* 2012; 23: 778-84.
- Freedman SB, Williamson-Urquhart S, Farion KJ, Gouin S, Willan AR, Poonai N, et al. Multicenter trial of a combination probiotic for children with gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2018; 379: 2015-26.
- Schnadower D, Tarr PI, Casper TC, Gorelick MH, Dean JM, O'Connell KJ, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG versus Placebo for Acute Gastroenteritis in Children. *N Engl J Med.* 2018; 379: 2002-14.

# Probióticos en la diarrea aguda en la infancia. Evidencia científica

Rodrigo Vázquez Frias

*Gastroenterología y Nutrición Pediátrica, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Instituto Nacional de Salud, México. Asociación Mexicana de Gastroenterología A.C. Sociedad Latinoamericana de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (SLAGHNP). Sociedad Iberoamericana de Microbiota, Probióticos y Prebióticos (SYAMPyP)*

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):12-14

El objetivo principal del tratamiento de la enfermedad diarreica aguda (EDA), sobre todo en la etapa pediátrica, es evitar o tratar la deshidratación y evitar o tratar la desnutrición asociada<sup>(1)</sup>. El manejo clínico de la diarrea aguda en niños está bien establecido y la piedra angular lo constituyen la administración de las sales de rehidratación oral (SRO)<sup>(2)</sup>, sin embargo, estas no disminuyen la duración de la diarrea. Existen medicamentos adyuvantes al tratamiento estándar con SRO, que se han utilizado para disminuir la gravedad de la enfermedad, así como acortar el tiempo de duración de la diarrea, como lo son el zinc, el racecadotril, agentes adsorbentes como el carbón y la disomecita, probióticos, agentes antibacterianos y antivirales e inclusive la loperamida. Esta última está contraindicada en lactantes y niños pequeños, debido a sus eventos adversos graves, por lo que no está incluido dentro de las guías de práctica clínica en pediatría<sup>(3)</sup>. De acuerdo a una publicación relativamente reciente sobre un consenso internacional y con el objetivo de reducir el tiempo de duración de la EDA, se establece que se puede considerar el uso de algunos medicamentos con eficacia probada para tal objetivo; dentro de estos se encuentra el racecadotril, la diosmeccita y los probióticos<sup>(4)</sup>. En los últimos años se han incrementado los estudios acerca de la utilidad clínica de los probióticos, que basado en su definición de microorganismos vivos que, cuando se administran en una cantidad adecuada, confieren beneficios en la salud del hospedero, deben de mostrar evidencia clínica de su utilidad<sup>(5)</sup>. Diversas guías internacionales los colocan como adyuvantes eficaces en el tratamiento de la EDA<sup>(3,4,6,7)</sup>, sin embargo, aun no existe uniformidad en cuanto a su recomendación, inclusive,

algunas guías regionales no los consideran dentro del manejo de la EDA<sup>(8)</sup>.

Actualmente se reconoce que los efectos de los probióticos no pueden ser generalizados, por lo que se tiene que identificar claramente la evidencia sobre la eficacia cepa específica, en un padecimiento en específico, a una dosis específica. Es por lo anterior, que se deben de señalar las cepas probióticas que han sido evaluadas en ensayos clínicos con eficacia probada para el tratamiento de la EDA, dentro de los cuales se ha mostrado que *Lactobacillus (L) rhamnosus* GG, *Saccharomyces boulardii* y *L. reuteri*, son los que mayor evidencia publicada han mostrado para reducir el tiempo de duración de la diarrea en la EDA<sup>(6,7,9,10)</sup>.

De acuerdo a la información vertida de un metanálisis que conjuntó los datos de 11 ensayos clínicos controlados en 2,444 niños, muestra que *L rhamnosus* GG reduce la duración de la diarrea en comparación con placebo o no tratamiento, con una diferencia media -1,05 días, IC 95% -1,7 a -0,4 (convertido en horas: -25,02 h, IC 95% -40,8 a -0,96), pero con una heterogeneidad estadística alta entre los estudios incluidos ( $I^2 = 98\%$ ) y con mayor efecto cuando se utilizan dosis altas de LGG ( $> 10^{10}$  UFC/día)<sup>(11)</sup>. Sin embargo, recientemente se puso en duda la eficacia de los probióticos en general, pero en particular el de *L rhamnosus* GG, por la publicación de los resultados de un ensayo clínico controlado, aleatorizado, doble ciego placebo controlado reciente, en donde se evaluó la eficacia de *L. rhamnosus* GG a una dosis de  $1 \times 10^{10}$  UFC dos veces al día por 5 días, en 971 niños de 3 meses a 4 años de vida con EDA no mostró diferencia en la duración de la diarrea<sup>(12)</sup>. Este

estudio presenta consideraciones metodológicas importantes de hacer mención, en la mayoría de los pacientes enrolados la EDA llevaba alrededor de 2 días de evolución y sabemos que mucho del efecto esperado de los probióticos se da cuando se inician de forma temprana, por lo que este estudio podría corroborar que esta cepa probiótica, a esta dosis, no muestra diferencia en la eficacia para acortar la duración de la diarrea al compararlo con placebo si se inicia de forma tardía; además, se reportó que a la mayoría de los pacientes no se les dio ningún tratamiento para la EDA, cuando se sabe que la piedra angular del tratamiento de la EDA son las SRO. De forma adicional, se muestra que la etiología de la EDA de este estudio no fue principalmente de origen viral; el efecto terapéutico de los probióticos ha sido documentado principalmente en la EDA de origen viral<sup>(13-15)</sup>. De cualquier forma, incluyendo este estudio en una nueva revisión sistemática sobre la eficacia de *L. rhamnosus* GG en el manejo de la EDA, muestra que reduce la duración de la diarrea y en el tiempo de hospitalización por la misma, tanto en pacientes europeos como en otros sitios<sup>(16)</sup>. Con el uso de dosis altas de *L. rhamnosus* GG > 10<sup>10</sup> UFC/día, se mostró un efecto de reducción de la diarrea aguda, con una diferencia media -0,83 días, IC 95% -1,17 a -0,49 (convertido en horas: -19,92 h, IC 95% -28,08 a -11,76), aunque con una heterogeneidad estadística alta entre los estudios incluidos (I<sup>2</sup> = 99%). Todo lo anterior sin un incremento en la presencia de eventos adversos al ser comparados con el grupo control.

Otro ensayo clínico controlado, aleatorizado, doble ciego placebo controlado en donde se evaluó la eficacia de una combinación de dos cepas de probióticos *L. rhamnosus* R0011 (cepa diferente a la de *L. rhamnosus* GG, por lo que no se debe de extrapolar los resultados) y *L. helveticus* R0052, en una relación 95:5, a una dosis de 4x10<sup>9</sup> UFC dos veces al día, por 5 días, en 886 niños de 3 a 48 meses de vida con EDA, con una metodología muy similar al estudio previamente comentado, no mostró diferencia en la duración de la diarrea<sup>(17)</sup>. Las consideraciones metodológicas que presenta este estudio son similares al previamente mencionado, con una dosis del probiótico que podría ser considerada baja, por lo que estos resultados se deberán de interpretar con reservas.

Una revisión sistemática que incorporó los datos de 17 ensayos clínicos, tanto de pacientes hospitalizados como no hospitalizados, mostró que *Saccharomyces boulardii*, a una dosis entre 250 y 750 mg al día, en adición a la terapia de rehidratación, es efectiva para reducir la duración de la diarrea en comparación con placebo o ningún tratamiento adicionado, con una diferencia media -19,7 horas, IC 95% -26,05 a -13,34; con una heterogeneidad estadística moderada entre los estudios incluidos (I<sup>2</sup> = 64,5%)<sup>(18)</sup>.

La cepa *L. reuteri* ATCC 55730 cuenta con 3 estudios, de un total de 156 pacientes, mostrando el metanálisis una reducción del tiempo de duración de la diarrea (diferencia

media -18,83 horas, IC 95% -30,91 a -6,75); del mismo modo, la cepa *L. reuteri* DSM 17938, también mostró eficacia en el metanálisis de 2 estudios, que incluyó 196 pacientes hospitalizados, de entre 3 y 60 meses de vida, demostrando hasta el momento la mayor diferencia media de duración de la diarrea (diferencia media -32,41 horas, IC 95% -41,10 a -23,71) con una homogeneidad estadística excelente entre los estudios incluidos (I<sup>2</sup> = 0%)<sup>(19)</sup>.

Las cuatro cepas de *Bacillus clausii*, O/C, N/R, SIN, y T en conjunto, como adyuvante a la SRO ha sido utilizado para el manejo de la EDA. Una revisión sistemática con metanálisis de estudios, que no todos fueron ensayos clínicos controlados, aleatorizados, placebo control, cegados; incorporando los datos de 6 ensayos clínicos, con un total de 919 pacientes pediátricos entre 3 meses y 12 años (467 en el grupo experimental y 452 en el grupo control), con dosis que variaron entre 1-4 x 10<sup>9</sup> UFC/d por 5 días, mostró que reduce la duración de la EDA, diferencia media -9,12 horas (IC 95% -16,49 a -1,75), aunque con una heterogeneidad estadística moderada entre los estudios incluidos (I<sup>2</sup> = 63,4%)<sup>(20)</sup>.

Otras cepas que también han sido utilizadas y que han mostrada limitada evidencia son: *Bifidobacterium animalis lactis*<sup>(21)</sup>, *Bacillus coagulans*<sup>(22)</sup>, *Bacillus clausii* UBBC-07<sup>(23)</sup> y algunas otras combinaciones de cepas probióticas como *L. acidophilus* y *B. animalis*<sup>(24)</sup>.

La eficacia de las cepas probióticas mencionadas ha sido demostrada principalmente en el contexto de EDA causada por virus, por lo que en sitios donde la incidencia de infecciones parasitarias y bacterianas, y en poblaciones donde las deficiencias nutricionales son mayores, pudieran potencialmente no ser tan eficaces, por lo que se requieren de hacer más estudios en estos contextos<sup>(25)</sup>.

Se requieren desarrollar aún más estudios clínicos de alta calidad, principalmente con las cepas probióticas de evidencia limitada, para dar mayor certeza en las recomendaciones de su uso como adyuvantes en el tratamiento de la EDA.

## Conclusiones

Existe evidencia de que se puede considerar el uso de ciertas cepas probióticas para el manejo adyuvante de la EDA en niños, principalmente cuando se inicia de forma temprana. Recordar que es importante el concepto de cepa-especificidad y la dosis específica de cada uno de estas cepas probióticas.

## Bibliografía

1. Organización Panamericana de la Salud. Tratamiento de la diarrea: Manual Clínico para los Servicios de Salud. Washington, D.C.: OPS; 2008.
2. The Treatment of Diarrhoea – A manual for physicians and other senior health workers, WHO/CAH/03.7, Organización Mundial de la Salud, Ginebra. 2005: 1-44pp.
3. Guarino A, Ashkenazi S, Gendrel D, et al. European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Pediatric Infectious Diseases evidence-based guidelines for the management

- of acute gastroenteritis in children in Europe: update 2014. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014; 59: 132-52.
4. Lo Vecchio A, Vandenplas Y, Benninga M, et al. An international consensus report on a new algorithm for the management of infant diarrhoea. *Acta Pædiatrica* 2016; 105: e384-9.
  5. Hill C, Guarner F, Reid G, et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014; 11: 506-14.
  6. Cruchet S, Furnes R, Maruy A, et al. The use of probiotics in pediatric gastroenterology: A review of the literature and recommendations by Latin-American experts. *Pediatr Drugs.* 2015; 17: 199-216.
  7. Hojsak I, Fabiano V, Pop TL, et al. Guidance on the use of probiotics in clinical practice in children with selected clinical conditions and in specific vulnerable groups. *Acta Pædiatrica.* 2018; 107: 927-37.
  8. Guarino A, Guandailini S, Lo Vecchio A. Probiotics for prevention and treatment of diarrhea. *J Clin Gastroenterol.* 2015; 49(Suppl 1): S37-45.
  9. Valdovinos MA, Montijo E, Abreu AT, et al. The Mexican consensus of probiotics in gastroenterology. *Rev Gastroenterol Mex.* 2017; 82: 156-78.
  10. Guarino A, Lo Vecchio A, Dias JA, et al. Universal recommendations for the management of acute diarrhea in nonmalnourished children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018 N; 67: 586-93.
  11. Szajewska H, Skorka A, Ruszczynski M, et al. Meta-analysis: *Lactobacillus* GG for treating acute gastroenteritis in children--updated analysis of randomised controlled trials. *Aliment Pharmacol Ther.* 2013; 38: 467-76.
  12. Schnadower D, Tarr PI, Casper TC, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG versus placebo for acute gastroenteritis in children. *N Engl J Med.* 2018; 379: 2002-14.
  13. Berni Canani R. *Lactobacillus* for gastroenteritis in children. *N Engl J Med.* 2019; 380: e36.
  14. Alvarez-Calatayud G, Requena T, Margolles A. *Lactobacillus* for gastroenteritis in children. *N Engl J Med.* 2019; 380: e36.
  15. Weizman Z. *Lactobacillus* for gastroenteritis in children. *N Engl J Med.* 2019; 380: e36.
  16. Szajewska H, Kotodziej M, Gieruszczak-Biatek D, et al. Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG for treating acute gastroenteritis in children – a 2019 update. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019; 49: 1376-84.
  17. Freedman SB, Williamson-Urquhart S, Kin BS, et al. Multicenter trial of a combination probiotic for children with gastroenteritis. *N Engl J Med.* 2018; 379: 2015-26.
  18. Feizizadeh S, Salehi-Abargouei A, Akbari V. Efficacy and safety of *Saccharomyces boulardii* for acute diarrhea. *Pediatrics.* 2014; 134: e176-91.
  19. Szajewska H, Urbańska M, Chmielewska A, et al. Meta-analysis: *Lactobacillus reuteri* strain DSM 17938 (and the original strain ATCC 55730) for treating acute gastroenteritis in children. *Benef Microbes.* 2014; 5: 285-93.
  20. Ianiro G, Rizzatti G, Plomer M, et al. *Bacillus clausii* for the treatment of acute diarrhea in children: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients.* 2018; 10: E1074.
  21. El-Soud NH, Said RN, Mosallam DS, et al. *Bifidobacterium lactis* in treatment of children with acute diarrhea. A randomized double blind controlled trial. *Open Access Maced J Med Sci.* 2015; 3: 403-7.
  22. Maity C, Gupta AK. A prospective, interventional, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study to evaluate the efficacy and safety of *Bacillus coagulans* LBSC in the treatment of acute diarrhea with abdominal discomfort. *Eur J Clin Pharmacol.* 2019; 75: 21-31
  23. Sudha MR, Jayanthi N, Pandey DC, et al. *Bacillus clausii* UBBC-07 reduces severity of diarrhoea in children under 5 years of age: a double blind placebo controlled study. *Benef Microbes.* 2019; 10: 149-54.
  24. Rerksuppaphol S, Rerksuppaphol L. *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* stored at ambient temperature are effective in the treatment of acute diarrhoea. *Ann Trop Paediatr.* 2010; 30: 299-304.
  25. Lo Vecchio A, Buccigrossi V, Fedele MC, et al. Acute infectious diarrhea. *Adv Exp Med Biol.* 2019; 1125: 109-20.

# ¿Existe colonización en el período neonatal?

Christian Boggio-Marzet

*Médico Pediatra Gastroenterólogo. Director Maestría en Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica, Universidad del Salvador. Director Carrera de Especialista en Gastroenterología Pediátrica, Universidad de Buenos Aires. Coordinador Grupo de Trabajo Gastroenterología & Nutrición Pediátrica. Hospital "Dr. I. Pirovano". Buenos Aires. Argentina. Presidente Asociación de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica (GENUP)*

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):15-17

Desde hace muchos años se ha dicho que el intestino fetal se encuentra en un ambiente estéril en el útero y que la colonización del tracto gastrointestinal comienza durante y después del proceso de nacimiento. Sin embargo, este dogma de la esterilidad intestinal fetal ha sido cuestionado por diversos estudios recientes que informan la presencia de bacterias en placenta (Aagaard y cols., 2014), líquido amniótico (Collado y cols., 2016) y transferencia materna bacteriana (Jiménez y cols., 2008). Estos datos han provocado reacciones a favor y en contra, logrando desafiar nuestra comprensión actual del proceso de colonización microbiana y la ventana de oportunidad de exposición microbiana que imprime a largo plazo resultados de salud y desarrollo temprano del sistema inmune de la mucosa.

La barrera placentaria del ser humano es hemocorial, esto es, tejido fetal en contacto directo con sangre materna. La placenta transporta oxígeno, nutrientes y mediadores inmunes del torrente sanguíneo de la madre al feto en desarrollo, pero también sirve como barrera contra las infecciones. En los primeros momentos de la vida se establece una conexión microbiana madre-hijo, a través de la incorporación de microorganismos de piel y superficies mucosas de la madre. Esta exposición microbiana inicial establece una relación de mutualismo con el huésped, y deja una impresión duradera en el desarrollo infantil que puede controlar el equilibrio entre salud y enfermedad.

El feto se desarrolla en un medio ambiente uterino estéril, adquiriendo su microbiota a través del canal vaginal durante el nacimiento. Cualquier microbio encontrado en la cavidad uterina es patológico y peligroso para el feto. La mayoría de

los estudios en microbiología fetal se han desarrollado desde la perspectiva de lo infeccioso y patológico: evaluación de embarazos anormales y efectos infecciosos en el neonato.

Es por eso que surgen varias preguntas: ¿Cuál es el momento exacto de la colonización bacteriana del tracto digestivo fetal?, ¿De dónde provienen esos gérmenes?, ¿Qué tipo de microbios son? Y lo más importante ¿Qué significado tendrán en relación al desarrollo del sistema inmune y la salud?. Contestar estas preguntas no es una tarea fácil, sobre todo por la cantidad de estudios a favor y en contra en relación a la esterilidad microbiana fetal.

La placenta se compone de dos partes: *El Chorion frondosum (corion)* producido por el feto y la *Decidua basalis* derivada de tejido materno uterino. La placa basal separa las dos partes y es rodeada por una membrana que deriva del feto. Las vellosidades coriónicas son de origen fetal, pero están rodeadas por tejido materno. La presión arterial alta del lado materno llena el espacio entre las vellosidades, que baña las vellosidades fetales en sangre, permitiendo el intercambio de gases, nutrientes y detritus. Las dos circulaciones sanguíneas separadas de la madre y el niño están en contacto cercano por la decidua y las vellosidades coriónicas, que intercambian componentes por difusión. Por lo tanto, y de acuerdo a estos conceptos, el feto se desarrolla en un ambiente estéril y la presencia de bacterias es causa de parto prematuro o abortos.

Sin embargo, existe nueva evidencia que demuestra que el feto no es estéril ni inmunológicamente naïve como se creía. Amplias variedades de microbios han sido detectadas en sangre de cordón umbilical, líquido amniótico, placenta

y membranas fetales de embarazos normales sin indicación de inflamación o patología.

El estudio de Mysorekar y cols. (2011) analizó 200 placentas de mujeres que dieron a luz en el Hospital de St. Louis, Missouri. En un tercio de las muestras se hallaron bacterias que no impresionaban patógenos (inexistencia de células inmunes cerca de ellas ni signos de inflamación). Por su parte, Aagaard y cols. (2014) estudiaron 320 placentas (normales, con partos prematuros y con infecciones durante la gestación) utilizando secuenciación genómica en medio estéril. El resultado fue sorprendente: encontró presencia de DNA bacteriano en tejido placentario.

Surge entonces una gran pregunta: ¿Cuándo y de dónde se coloniza el microbioma fetal? Existen para ello diferentes vías a través de las cuales se origina la microbiota fetal:

1. Microbiota materna intestinal: Los microbios son trasladados del epitelio intestinal hacia el torrente sanguíneo y luego depositados en la placenta. Para ello es muy importante la presencia de las células dendríticas quienes penetran el epitelio intestinal y toman bacterias del lumen que son llevadas a ganglios linfáticos mesentéricos y luego a otras localizaciones del cuerpo.
2. Microbiota vaginal: Los microbios pueden ascender desde la vagina e invadir la cavidad amniótica a través de dos modelos: a) Las bacterias ascienden desde la vagina y contactan con la decidua, luego se esparcen por las membranas fetales antes de pasar al líquido amniótico y b) Las bacterias invaden el líquido amniótico primero penetrando discretamente las membranas fetales para luego proliferar e invadir el amnios y el corion.
3. Microbiota de la cavidad oral: Se ha propuesto como fuente de colonización fetal microbiana. Se detectó *Fusobacterium nucleatum* y *Porphyromonas gingivalis* en placenta y líquido amniótico de mujeres con enfermedad periodontal, favoreciendo el desarrollo de la hipótesis de la migración oportunista desde la cavidad oral a la cavidad intrauterina.

Entonces, ¿Qué determina si el resultado de la presencia bacteriana en la placenta y el líquido amniótico es bueno o malo? El resultado dependería del tipo de bacteria, ya sea por la presencia de patógenos que resultarían en enfermedad o por la presencia de patógenos oportunistas que podrían ser manejados por el sistema inmune para restringir el daño. Por

lo tanto, el efecto perjudicial no sería por la bacteria per se sino por la respuesta inmunológica que provoca.

Existen varios estudios realizados en meconio de pre-alimentación, que es la representación más exacta de la comunidad microbiana del tracto gastrointestinal fetal antes del nacimiento. La mayoría de los estudios han fracasado en relación a mediciones libres de contaminación (pañales, piel y muestras hasta 48 horas posnatales). El estudio de Jimenez y cols. (2008) fue realizado con muestras de meconio de pre-alimentación antes de las 2 horas de vida extrauterina demostrando la evidencia de especies predominantes de *E. faecalis*, *S. epidermidis*, *E. coli* predominantes del intestino adulto. Esta presencia sugiere una transferencia de bacterias del tracto gastrointestinal materno-fetal prenatal.

Otro estudio realizado por Collado y cols. (2016) comparó composición microbiana de heces maternas, placenta, líquido amniótico, calostro, meconio y heces del lactante en 15 binomios madre-hijo. La placenta y el líquido amniótico albergaban una microbiota de baja diversidad y baja biomasa con muchas características compartidas. Sin embargo, el meconio tenía un microbioma distinto al del líquido amniótico, placenta y calostro.

La edad gestacional tiene un efecto significativo en la estructura de la comunidad microbiana del meconio con prevalencia de *Proteobacteria* y *Firmicutes*. Ardissonne y cols. (2014) estudiaron bebés nacidos de menos de 33 semanas de edad gestacional los cuales presentaban mayores proporciones de *Enterococcus*, *Enterobacter*, *Lactobacillus*, *Photobacterium* y *Tannerella spp.*, asociados a parto prematuro e infecciones intrauterinas.

Sin embargo, Chernikova y cols. (2016) estudiaron los efectos de las complicaciones maternas (corioamnionitis y ruptura prematura de membranas en forma prolongada) en la microbiota gastrointestinal de nueve lactantes prematuros extremos. Para ello se tomaron muestras semanales de materia fecal comenzando con la primera muestra de meconio demostrando la presencia de *Serratia* y *Parabacteroides* (bacterias patógenas). El tratamiento antibiótico no corrigió el desequilibrio, aunque los autores señalan que la presencia de DNA bacteriano no necesariamente refleja organismos vivos. Y a partir de este concepto es que otros autores comenzaron a estudiar estas características.

De Goffau y cols. (2019) analizaron muestras de placenta de 537 mujeres (el mayor número de muestras utilizadas en un estudio de este tipo), utilizando un enfoque completo de secuenciación de ADN para búsqueda de contenido microbiano. Utilizaron para ellos el mismo kit de herramientas de extracción de ADN y procedimientos de secuenciación sobre controles negativos - "en blanco" (muestras que supuestamente estaban libres de material biológico). También usaron controles positivos, producido al aumentar las muestras de placenta con una cantidad conocida de la bacteria *Salmonella bongori*, para calibrar

la abundancia de otros microbios que podrían estar en la muestra. La secuenciación se realizó utilizando dos técnicas complementarias (shotgun metagenomics16 y 16S rRNA gene amplicon sequencing) para tener en cuenta sesgos potenciales. Los hallazgos fueron contundentes: La placenta no alberga microbios durante el embarazo sano y la presencia de bacterias detectadas están en relación a problemas de contaminación.

Estos resultados llevaron claridad a una discusión que parecía no encontrar su rumbo: Las bacterias a veces pueden estar presentes en el útero, como *S. agalactiae* (*S. grupo B*) hasta en un 5%. Las bacterias o el ADN bacteriano también frecuentemente contaminan la placenta durante el trabajo de parto (*Lactobacillus*), durante la recolección de muestras (*D. geothermalis*), durante el procesamiento de muestras (*B. silvatlantica* y *T. halophila*) o también puede ocurrir durante preparación de la secuencia de otros proyectos realizados (*V. cholerae* en la secuencia metagenómica).

En resumen: Los últimos hallazgos proporcionan una fuerte evidencia de que no hay una microbiota funcional en la placenta y sugiere que es altamente improbable que los bebés adquieran microbios de la placenta en condiciones fisiológicas normales. Las bacterias pueden vencer muchas barreras bajo ciertas condiciones, y solo una célula bacteriana que llega al intestino del feto podría comenzar potencialmente en la colonización del útero. La capacidad de los métodos de secuenciación moderna para detectar un bajo número de bacterias es un problema en algunos experimentos, porque pequeños niveles de contaminantes pueden provocar una detección de falsos positivos. Sin embargo, resultados nega-

tivos son difíciles de probar de manera concluyente, por lo que el dogma de que el útero está libre de microbios debe ser investigado en profundidad.

## Bibliografía

- Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med.* 2014; 6: 237ra65. doi: 10.1126/scitranslmed.3008599.
- Ardisson AN, de la Cruz DM, Davis-Richardson AG, Rechcigl KT, Li N, Drew JC, et al. Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth. *PLoS One.* 2014; 9: e90784.
- Chernikova DA, Koestler DC, Hoen AG, et al. Fetal exposures and perinatal influences on the stool microbiota of premature infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2016; 29: 99-105.
- Collado MC, Rautava S, Aakko J, Isolauri E, Salminen S. Human gut colonisation may be initiated in utero by distinct microbial communities in the placenta and amniotic fluid. *Sci Rep.* 2016; 6: 23129.
- de Goffau MC, Lager S, Sovio U, Gaccioli F, Cook E, Peacock SJ, et al. Human placenta has no microbiome but can contain potential pathogens. *Nature.* 2019; 572: 329-34. Erratum in: *Nature.* 2019; 574: E15.
- DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch E, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One.* 2008; 3: e3056.
- DiGiulio DB. Diversity of microbes in amniotic fluid. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2012; 17: 2-11.
- Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res. Microbiol.* 2008; 159: 187-93.
- McDonald B, McCoy KD. Maternal microbiota in pregnancy and early life. *Science.* 2019; 365: 984-5.
- Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome.* 2017; 5: 48.

# ¿Existe colonización microbiana durante el periodo prenatal? Durante los embarazos fisiológicos, yo diría que no

Evaristo Suárez Fernández

*Área de Microbiología. Universidad de Oviedo. España.*

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):18-20

Aagaard y cols. (2014) publicaron que la placenta alberga una microbiota bacteriana específica, tras detectar secuencias correspondientes al gen del ARN ribosómico 16S y experimentos de metagenómica.

Casi al mismo tiempo, Salter y cols. (2014) comunicaron que los reactivos utilizados para la amplificación/secuenciación estaban contaminados con ADN y enumeraron más de 50 especies bacterianas que habían detectado en reacciones sin sustrato, utilizadas como controles negativos. La evidencia de que los resultados proporcionados por las muestras biológicas y los controles no diferían significativamente y el hallazgo de que los cultivos de esas muestras eran casi invariablemente negativos, ha ido acumulándose (de Goffau y cols., 2018; Leiby y cols., 2018; Malmuthuge & Griebel, 2018; Perez-Muñoz y cols., 2017; Rehlinger y cols., 2018). A pesar de ello, los artículos que atestiguaban la presencia de microbiotas específicas en placenta, líquido amniótico, útero e incluso ovarios se han sucedido hasta el día de hoy, en un sorprendente ejercicio de “cuando la evidencia no soporta mi teoría, descártese la evidencia”. Imagino que en el resumen de mi oponente en esta sesión de controversia aparecerán algunos de dichos artículos, lo que me ahorra tener que citarlos.

¿Cuáles son las evidencias de que el ambiente fetal permanece estéril durante el embarazo sin complicaciones y de que, por tanto, la colonización microbiana se inicia durante el parto, sea este por vía vaginal o por cesárea?

La primera a la que me quiero referir es la baja diversidad interindividual, que sería indicativa de una colonización por una microbiota adaptada al nicho. Ahora bien, el predomi-

nio de unos pocos tipos taxonómicos puede considerarse como baja diversidad en ambientes muy poblados, pero no cuando ese ambiente alberga muy pocos microorganismos, como es en este caso. Adicionalmente, si bien es cierto que existe una clara predominancia de los mismos grupos bacterianos en las muestras descritas en cada artículo, no pasa lo mismo cuando se comparan las microbiotas citadas en artículos diferentes, lo que es extraño si sostenemos que hay una microbiota específica en el nicho. Una explicación alternativa sería que existen sesgos conducentes hacia resultados semejantes cuando se obtienen en un mismo laboratorio. Esto sugeriría que la metodología no es capaz de mantener la esterilidad del proceso, lo que redundaría en contaminación por los microorganismos predominantes en el ambiente particular o que los reactivos utilizados contenían ADN bacteriano. Si a ello unimos la extraordinaria sensibilidad y capacidad de discriminación de las técnicas moleculares, tendríamos las condiciones que provocan la obtención de resultados positivos incluso con grados de contaminación no detectables por otras técnicas.

La segunda fuente de confusión deriva de la falta de elaboración de los datos taxonómicos que se obtienen, a la luz de los conocimientos previos sobre el hábitat y las características fisiológicas de los organismos identificados. Es habitual que los microorganismos que se citan como más abundantes en la placenta y el líquido amniótico sean proteobacterias, especialmente *Escherichia coli*/*Shigella*. Dos extremos llaman la atención a este respecto; por un lado se dice que la microbiota placentaria está formada por organismos comensales (probablemente quieren decir mutualistas,

pero este es otro error de concepto en que no entraré). ¿*E. coli*/*Shigella* comensales? Cepas de la primera pueden considerarse mutualistas mientras se encuentran en el intestino grueso pero, invariablemente, se comportan como patógenas cuando aparecen en cualquier otra localización. ¿Habría que recordar que *E. coli* es el principal agente causal de infección urinaria y de sepsis por Gram negativos? Por otro lado, se dice que la concentración de microorganismos en placenta y tejidos adyacentes es muy baja. La principal misión en la vida de cualquier organismo es propagarse lo más deprisa posible porque de ello depende su éxito evolutivo, como ya estableció el abuelo Darwin. ¿Y resulta que un organismo que se divide cada 30 minutos con tan solo una fuente hidrocarbonada y unas cuantas sales inorgánicas permanece en estado quiescente en un ambiente tan rico como el medio interno? El argumento del mutualismo/patogenicidad dependiente de localización en el organismo sería también aplicable a otros y especialmente a los Bacteroidetes, que también se “detectan” en placenta.

Otros organismos que se reportan comúnmente, son habitantes de la piel como *Cutibacterium acnes* (previamente conocida como *Propionibacterium acnes*) y *Staphylococcus* (no suele indicarse la especie, pero vamos a suponer que se trate de *S. epidermidis*, porque pensar en *S. aureus* sería toda una provocación). Por su localización, abundancia en la epidermis y resistencia al ambiente hostil podrían fácilmente acceder a los reactivos/tubos de reacción durante la manipulación de las muestras. En este caso, estamos ante patógenos oportunistas (*S. epidermidis* es el principal productor de sepsis hospitalaria) cuya presencia en placenta implicaría, de nuevo, una multiplicación acelerada, salvo que se le opusiera, por parte de la embarazada, un antagonismo eficaz, un extremo al que nadie alude.

Una tercera categoría la constituirían bacterias ambientales como *Rhodococcus* o *Streptomyces*, cuya ubicuidad se sustenta en una formidable capacidad de producir enzimas hidrolíticos y que, por ello, contribuyen de forma significativa al funcionamiento de los ciclos de los elementos. Sin embargo, no se les encuentra nunca formando parte de las microbiotas residentes en la piel o en cualquiera de las cavidades colonizadas por ellas, ni tampoco se asocian a patología humana. ¿Cómo accederían a un lugar tan recóndito como el útero en ausencia de un traumatismo que les facilitara la entrada? Por cierto, a pesar de que los lactobacilos constituyen habitualmente más del 99% de los microorganismos vaginales, no suelen encontrarse en la placenta o en las membranas fetales, a pesar de que la vía ascendente sería la más obvia para alcanzarlas.

Por último, tenemos los organismos pertenecientes a los géneros *Streptococcus* y *Neisseria*, que se encuentran habitualmente en la cavidad orofaríngea y que serían responsables de que los métodos estadísticos empleados para determinar la relación entre microbiotas, encuentren la mayor analo-

gía entre las de la placenta y las de la cavidad oral (aunque ninguna de las bacterias citadas anteriormente forme parte de la microbiota nombrada en segundo lugar). Tengo que manifestar mi absoluta falta de conocimientos estadísticos, que no me permite juzgar si los algoritmos aplicados (¿se dice así?) son los apropiados para resolver las cuestiones que se plantean. Sin embargo, otra vez me planteo el principio de la patogenicidad dependiendo del territorio; puede que *S. pneumoniae* sea virtualmente inocuo en la cavidad oral, pero sigue siendo el principal agente productor de neumonía. Por otra parte, los estreptococos y las neiserias tienen una “manía” peculiar, tienden a lisarse espontáneamente cuando llegan a la fase estacionaria. Podríamos razonar que ese sería su comportamiento si colonizaran la placenta y/o el líquido amniótico, ya que se postula que sus microbiotas no se multiplican, para justificar las concentraciones tan bajas de microorganismos que se encuentran en ellos.

La tercera línea de evidencia de esterilidad de los fetos y sus anexos, deriva de las condiciones de los hospedadores de la microbiota hipotética. Las embarazadas sufren un proceso de atenuación de la respuesta inmune específica que elimina el rechazo de los antígenos paternos que expresa el niño. Esto las hace más susceptibles a las infecciones de cualquier tipo, a pesar de que la inmunidad innata se ve potenciada durante este periodo. Por tanto, sería esperable que una microbiota asentada en la placenta se multiplicara eficazmente, lo que, sabemos, no ocurre. Por otro lado, la placenta humana es de tipo hemocorial, que es el más permeable de los tres que presentan los mamíferos, por lo que los organismos asentados en la placenta deberían poder pasar al feto de manera tan eficaz como lo hacen la miríada de otros microorganismos que, tras infectar a la madre, atraviesan la barrera feto-placentaria y se asientan en el nonato. ¿Y cuál es la consecuencia de esta invasión? Invariablemente una infección devastadora que produce abortos, mortinatos y niños con secuelas graves (piénsese en las consecuencias de la rubeola, la listeriosis o la toxoplasmosis congénitas, por citar solo un caso de los producidos por organismos tan distintos como los virus, las bacterias y los protozoos respectivamente).

Por último, se postula que la microbiota de la placenta y del líquido amniótico pasan al feto durante el embarazo, constituyendo así la primera avanzadilla de la colonización del aparato digestivo y promoviendo la diferenciación *in utero* de su sistema inmunitario entérico. Si esto fuera así, debería ser imposible obtener animales libres de gérmenes, practicando simplemente una cesárea en condiciones estériles.

Espero que esta charla sirva para hacer reflexionar a muchos microbiólogos, que han apostatado del cultivo de microorganismos y del estudio de su fisiología e interacciones con el ambiente para abrazar la entelequia de que son las máquinas y no el sentido común, la inteligencia creativa y el pensamiento crítico, lo que hace avanzar la Ciencia, por muy caras y sofisticadas que sean aquellas.

## Bibliografía

- Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014; 6: 237ra65.
- de Goffau MC, Lager S, Salter SJ, Wagner J, Kronbichler A, Charnock-Jones DS, et al. Recognizing the reagent microbiome. *Nat Microbiol*. 2018; 3: 851-3.
- Leiby JS, McCormick K, Sherrill-Mix S, Clarke EL, Kessler LR, Taylor LJ, et al. Lack of detection of a human placenta microbiome in samples from preterm and term deliveries. *Microbiome*. 2018; 6: 196.
- Malmuthuge N, Griebel PJ. Fetal environment and fetal intestine are sterile during the third trimester of pregnancy. *Vet Immunol Immunopathol*. 2018; 204: 59-64.
- Perez-Muñoz ME, Arrieta MC, Ramer-Tait AE, Walter J. A critical assessment of the “sterile womb” and “in utero colonization” hypotheses: implications for research on the pioneer infant microbiome. *Microbiome*. 2017; 5: 48.
- Rehbinder EM, Lødrup Carlsen KC, Staff AC, Angell IL, Landrø L, Hilde K, et al. Is amniotic fluid of women with uncomplicated term pregnancies free of bacteria? *Am J Obstet Gynecol*. 2018; 219: 289.e1-e12.
- Salter SJ, Cox MJ, Turek EM, Calus ST, Cookson WO, Moffatt ME, et al. Reagent and laboratory contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *BMC Biol*. 2014; 12: 87.

# Microbiota en el síndrome de intestino irritable. Experiencia argentina

Luis M. Bustos Fernández<sup>1</sup>, Juan Lasa<sup>2</sup>, Fernando Man<sup>3</sup>

<sup>1</sup>CMBF. <sup>2</sup>Gastro. Buenos Aires. <sup>3</sup>CEMIC.

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):21-23

## Introducción

El síndrome del intestino irritable (SII) es una condición gastrointestinal crónica de etiología desconocida que se caracteriza por la presencia de malestar o dolor abdominal y hábitos intestinales alterados, en ausencia de signos clínicos de “alarma”, como anemia o pérdida de peso significativa. La base fisiopatológica de este síndrome es pobremente comprendida, pero se describen alteraciones de la función motora y sensorial, cambios inflamatorios de bajo grado, alteraciones de la microbiota intestinal, trastornos psicosociales y posibilidad de origen genético.

Actualmente, más del 10% de la población general padece el SII, lo que lleva a considerables gastos sanitarios. El SII se considera uno de los problemas clínicos más frecuentes en gastroenterología con una prevalencia estimada en el mundo occidental de hasta el 20%. La distribución de la edad es muy amplia, pero el 40% de los pacientes tienen entre 35 y 50 años. Los síntomas comienzan antes de los 35 años en el 50% de los pacientes. La proporción de mujeres a hombres en muestras comunitarias se ha estimado entre 1:1 y 2:1, pero el predominio femenino es más evidente en aquellos que buscan atención médica. El SII no es una afección potencialmente mortal; sin embargo, tiene un impacto relativamente grande en la calidad de vida de los pacientes, esto lleva a la necesidad de varios tratamientos médicos y a un aumento en el ausentismo laboral, con los consiguientes costos económicos.

La posibilidad de que la flora intestinal, o microbiota, pueda desempeñar un papel en la patogénesis del SII sólo ha comenzado a atraer la atención científica muy recientemente, aunque la evidencia para sugerir un vínculo ha

existido desde hace tiempo. Varios autores han encontrado microbiota alterada (“disbiosis”) en pacientes con SII y han mostrado diferencias en la composición de la microbiota entre pacientes con SII y controles saludables. Una revisión sistemática reciente concluyó que el riesgo general para el desarrollo del SII se multiplicó por 6 después de un episodio de gastroenteritis bacteriana, más en sujetos jóvenes, aquellos que tienen fiebre prolongada durante el episodio de gastroenteritis y aquellos que sufren de ansiedad o depresión.

El SII post-infeccioso proporcionó los primeros indicios de una asociación entre una respuesta inflamatoria persistente de bajo grado y este síndrome, un concepto que posteriormente se ha extendido al SII en general.

Los pacientes con SII pueden presentar una prueba de aliento de hidrógeno con lactulosa patológica, demostrando crecimiento excesivo bacteriano del intestino delgado (SIBO, por sus siglas en inglés), en comparación con los controles sanos. La idea de modular la microbiota intestinal con antibióticos/probióticos se desarrolló como consecuencia del concepto SIBO. Según este concepto, un alto porcentaje de pacientes con SII tienen un número anormal de microorganismos ubicados en el íleon distal, que a su vez producen una cantidad excesiva de subproductos biológicos que alteran la función intestinal, así como modulan una respuesta inflamatoria anormal, lo que conduce a una respuesta inflamatoria crónica de bajo grado, que constituye el hito fisiopatológico del SII. Como consecuencia, las alternativas terapéuticas que modulan la microbiota intestinal pueden erradicar el SIBO y así inducir una reversión de la respuesta inflamatoria antes mencionada.

El *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (*Sb*) es una levadura probiótica con eficacia probada en diarrea asociada a antibióticos y gastroenteritis aguda. Hay escasas pruebas sobre el impacto de *Sb* en pacientes con SII-D. El objetivo de nuestro estudio fue comparar la eficacia y seguridad de *Sb* más consejos dietéticos frente a consejos dietéticos en pacientes con SII-D y SIBO positivo y describir su impacto en la composición de la microbiota intestinal y la mejora clínica.

## Material y métodos

Se evaluaron pacientes adultos con un diagnóstico de SII-D (criterios Roma III) de dos centros de referencia en Buenos Aires, Argentina. Se recogió una muestra fecal por paciente para los análisis de microbiota y micobiota. Los pacientes completaron la Escala de Gravedad de Los Síntomas del SII (IBS-SSS), un cuestionario previamente validado que mide 5 elementos en un período de 10 días y con valores de 0 a 500 (enfermedad máxima). Se evaluaron las características demográficas, así como la consistencia de las heces a través de la escala de Bristol. Después de la extracción genómica de ADN y la purificación de la composición bacteriana y fúngica de muestras fecales se analizaron sobre la base de la secuenciación 16S rDNA y ITS2 *respectivamente*. La correlación entre la abundancia microbiana y fúngica y las características clínicas fue evaluada por la prueba de correlación de Pearson. 71 pacientes cumplieron los criterios de inclusión.

Se realizó en todo los pacientes un test de aliento con lactulosa. De acuerdo a este test, un 76% fue SIBO positivo.

Los pacientes SIBO positivos fueron randomizados para recibir *Saccharomyces boulardii* más dieta o dieta sola por 15 días. Al final del estudio se le volvió a evaluar la microbiota en materia fecal y se realizó un nuevo estudio de aire espirado con lactulosa. Los pacientes completaron nuevamente el IBS-SSS y la escala de Bristol.

Se realizó un análisis adicional con qPCR para cuantificar la abundancia de *F. prausnitzii*, *M. smithii*, *B. thetaiotomicron* y *P. aeruginosa*.

## Resultados

Los *Firmicutes* fueron la phyla predominante identificada (73,61%), seguida de *Bacteroidetes* (13%). Una proporción relativamente elevada de *Proteobacterias* (8%) fue identificada. *Alistipes* fue el género más representativo. No se encontró una correlación significativa entre los componentes de la microbiota y las características clínicas. (Fig. 1)

No se encontraron diferencias significativas demográficas entre los pacientes SIBO-positivos y SIBO-negativos. El análisis de diversidad alfa y beta en 16S rDNA mostró una composición de la microbiota comparable entre los pacientes SIBO positivos y negativos. El género *Akkermansia* fue más abundante (+672%,  $p=0.009$ ) en pacientes SIBO negativos.

Al día 15 los cambios en el área bajo la curva de  $H_2$  medido con el test de aire espirado, fueron mayores en el grupo tratado con *Sb*. Más pacientes disminuyeron el área bajo la curva en este grupo. Una tendencia a una mayor disminución del IBS-SSS y de la normalización de las características de la materia fecal medida por la escala de Bristol se encontró en el grupo tratado con *Sb*.

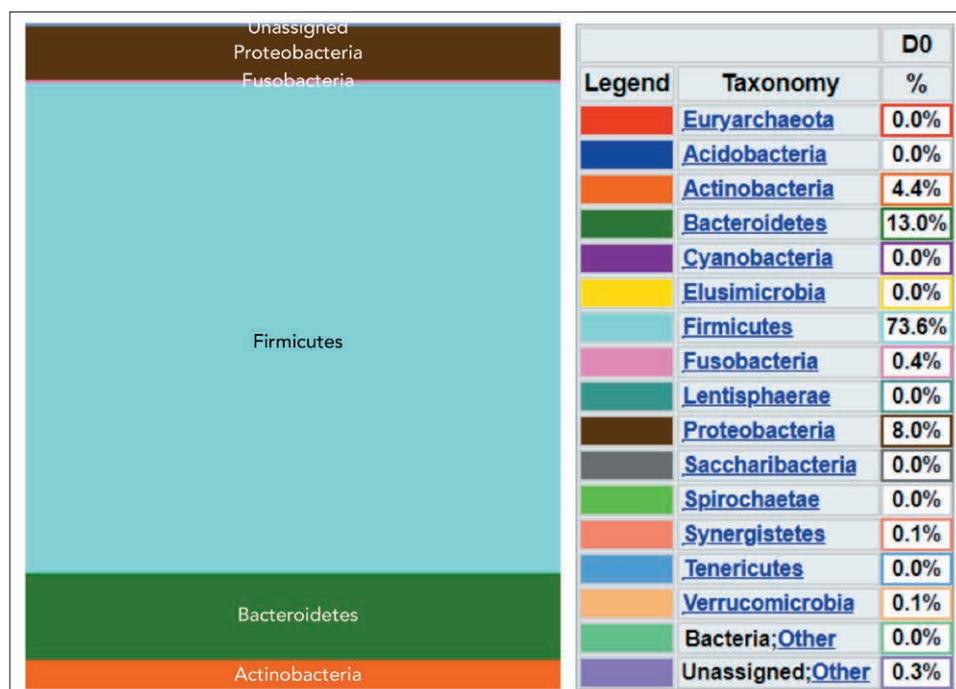


Figura 1.

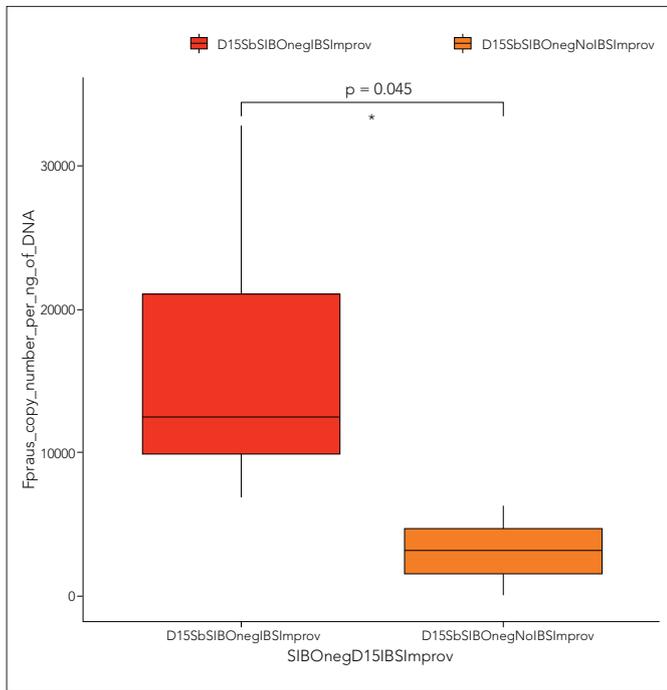


Figura 2.

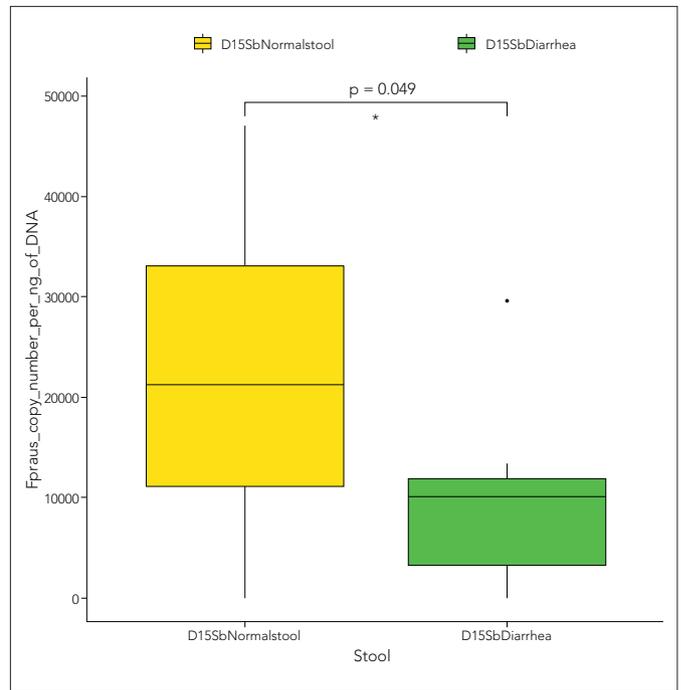


Figura 3.

En relación a la composición bacteriana, se encontró una disminución de *c\_Coriobacteriia* (-67%), *c\_Deltaproteobacteria* (-77,6%) y *g\_Hungatella* (-74,9%) al día 15 en el grupo tratados con SB. El aumento de Protobacterias puede ser un signo de disbiosis, su disminución relativa un intento de normalización.

Interesantemente la concentración de *F. prausnitzii* fue más abundante en pacientes con marcada mejoría clínica en el grupo tratados con *Sb*: normalización de la consistencia de la materia fecal (+120%), mejoría de los síntomas de IBS en pacientes que negativizaron el SIBO (+400%), así como reducción del dolor abdominal (+76,5%) (Figs. 2, 3 y 4)

El *Faecalibacterium prausnitzii* es considerado un miembro habitual de la microbiota habitual sana. Se le reconoce un efecto antiinflamatorio. Su reducción ocurre en varios desordenes intestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal.

## Conclusiones

Hemos descrito la composición microbiana en un grupo de pacientes con SII-D en la Argentina.

Aunque ciertas correlaciones con la severidad sintomática fue identificada, la implicancia de estos hallazgos necesitan más evaluación. Se encontraron diferencia clínicas y microbianas en los pacientes SIBO positivos y negativos. Los pacientes tratados con *Sb* redujeron (aunque no en forma estadísticamente significativa) el sobrecrecimiento bacteriano así como los síntomas en pacientes con IBS-D. Estos efectos

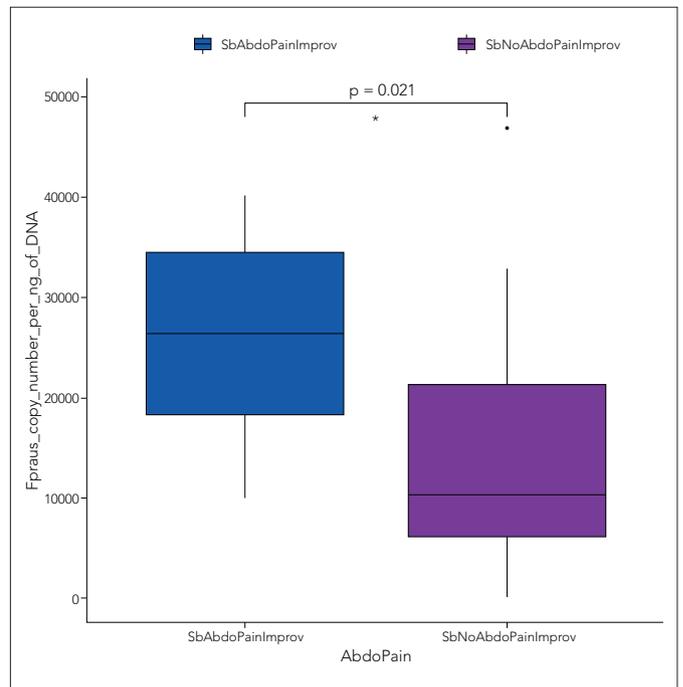


Figura 4.

se han asociado con modificaciones de la microbiota intestinal. El incremento en la abundancia del *F. prausnitzii* observado en los pacientes tratados con *S. boulardii* y resolución de síntomas requieren de futuras investigaciones.

# Fecal Microbiota Transfer: procedures, indications and results in the Unit at the Amsterdam University Medical Centers

Hilde Herrema

*Staff Experimental Vascular Medicine. Amsterdam University Medical Centers*

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):24-26

The human body harbors on average 10-100 trillion microbes, which is more than ten times the estimated number of human cells. The majority of these microbial cells (microbiota) reside in the gastrointestinal (GI) tract. The ancient view of gut microbiota being a pathogenic compartment underwent a paradigm shift over the past decades. The importance of the commensal microbiota to human health and well-being became increasingly evident, as the impact of a healthy and diverse intestinal microbiota on metabolic activities, the immune system and homeostasis of the intestine became evident. Furthermore, it has been shown that the gut microbiota influence the gut-brain axis, affecting brain function and development, and confer colonization resistance against pathogenic bacteria.

Many studies have shown that dysbiosis of the intestinal microbiota alters development of a wide range of diseases. Many of these diseases are characterized by decreased bacterial diversity or shifts in bacterial species (*e.g.*, a decrease in butyrate producers). However, for most diseases, it is currently not known if changes in microbiota are driving the disease (and to extend to which they do this) or are a consequence of the disease. For *Clostridioides difficile* infection (CDI), there is a clear causal relationship with disease phenotype. For other diseases such as obesity and metabolic disease, a causal relationship still needs to be clarified. In both scenarios, however, modulation of the intestinal microbiome to restore a balanced and diverse microbiota might hold merit to treat or prevent microbiome-related disease.

Fecal microbiota transplantation (FMT), also called “feces transplantation”, “human intestinal microbiota transfer” and

“fecal bacteriotherapy”, is the transfer of the fecal microbiota from a healthy screened subject to patients. FMT aims to restore a disrupted microbiota and amend imbalances through establishment of a stable, complex microbiota. The earliest documented administration of a fecal suspension was by the traditional Chinese doctor Ge Hong in the 4<sup>th</sup> century. He used so-called ‘yellow soup’ as a treatment for food poisoning and severe diarrhea. However, it wasn’t until the 16<sup>th</sup> century that another Chinese doctor named Li Shizhen recorded a range of fecal preparations for effective treatment of GI-diseases, such as constipation, fever, vomiting and pain. Subsequently during World War II, African Bedouins advised German soldiers stationed in Africa to consume fresh camel feces as a treatment for bacterial dysentery. Although the potential health benefits of microbes were already mentioned by Metchnikoff in 1907, it wasn’t until 1958 that fecal enemas were first described for the treatment of pseudomembranous enterocolitis by Dr. Eiseman, an American surgeon. Thereafter, a plethora of articles on FMT for the treatment of recurrent CDI (rCDI) have been written. The potential of FMT (beyond treatment of CDI), procedures to study the effect of FMT on human metabolism (as performed in the AMC in Amsterdam with particular focus on cardiometabolic diseases) and current insights in its effects will be discussed.

## Metabolic syndrome

There has been an increasing interest in the role of the gut microbiota in metabolic diseases, as microbes play a crucial role in digestion and absorption of nutrients from the diet.

In addition, gut bacteria produce metabolites with critical properties for host metabolism including –but not limited to– short-chain fatty acids (SCFA) and bile acids. Dysbiosis of the intestinal microbiota has been linked to an impaired mucosal barrier function, also known as a leaky gut, a proinflammatory state and a disturbed production of signaling molecules. Animal studies suggest a causal link between the intestinal microbiota and obesity. For example, mice colonized with an obesogenic microbiota have been shown to have increase body fat and insulin resistance compared to mice colonized with lean donor microbiota. Currently, two placebo-controlled RCTs (both performed in AMC, Amsterdam) have been published, which determined the effect of nasoduodenal FMT from lean donors on glucose metabolism in people with metabolic syndrome. Six weeks after nasoduodenal infusion of lean donor feces, insulin sensitivity was significantly increased. This coincided with an increase in butyrate-producing intestinal microbiota. Importantly, the effect on insulin sensitivity disappeared after 18 weeks and no long-term clinical effects were found. Furthermore, metabolic response to FMT was associated with a low microbial diversity at baseline suggesting that the microbiota can be used as predictor for efficacy of FMT. Although the mechanisms underlying the favorable effects on insulin sensitivity are yet to be determined, these studies highlight a role for the intestinal microbiota in metabolic diseases.

Nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) is characterized by accumulation of fat in the liver, which may lead to inflammation and liver damage, commonly known as nonalcoholic steatohepatitis (NASH). NASH is a major cause of liver cirrhosis and liver cancer; both primary indications for liver transplantation. Differences in microbiota composition have been observed in patients with NAFLD or NASH compared to subjects with healthy liver. In addition, increased intestinal permeability and a proinflammatory environment in the gut are frequently observed in NAFLD/NASH patients. Although human studies are yet to be performed, studies in high-fat diet-fed mice found that FMT reduced weight gain and nonalcoholic fatty liver score compared to controls. The AMC has started trials to address the effect of RYGB (gastric bypass with major effects on gut microbiota composition and function) on NAFLD and NASH.

Over the past years, accumulating evidence demonstrated the role of the intestinal microbiota and its metabolites in the development of cardiovascular disease such as atherosclerosis and hypertension. In an animal model, the introduction of a proinflammatory microbiota low in SCFA-producers enhanced systemic inflammation and accelerated atherogenesis. In another study, mice with myocarditis were subjected to FMT. This resulted in restoration of the microbiota composition and was accompanied by attenuation of myocarditis through reduced inflammatory infiltration. Currently one small RCT in

humans (AMC, Amsterdam) has studied the effect of a single lean vegan-donor FMT on vascular inflammation and trimethylamine-N-Oxide (TMAO) production. TMAO is a microbial metabolite which increases atherosclerotic burden and stimulates a prothrombotic phenotype. Although SCFA-producers were significantly enriched in the allogenic FMT group, no differences were detected in TMAO production or vascular inflammation at two weeks.

Interest in FMT to treat disease has risen over the last few years and its therapeutic benefit is currently being explored for a variety of diseases. For most diseases it is not fully known whether the changes in microbiota are causally related to the pathophysiology, disease modifiers or merely a result of the disorder. If the intestinal microbiota plays a causal role in disease pathophysiology, altering the microbiota may influence its course. In most cases, not one specific species is the causal pathogen or missing keystone. Therefore, an advantage of FMT over prebiotics and probiotics is the introduction of a complete healthy gut microbiota. FMT can be used as a tool to dissect association from causality in human intervention studies by assessing the effect of the microbiota on a disease.

Currently, FMT is an unstandardized treatment which should be optimized and standardized for specific indications. With the development of the FMT capsules, the therapy became less invasive, more standardized and less expensive. However, some microbes (or metabolites) critical for the efficacy of an FMT might not survive the processing required for capsulation. Therefore, it is important to determine the differences between fresh and processed fecal microbiota and efficacy in particular diseases. In addition, optimal location of delivery and ‘dose’ of FMT to treat microbiota-mediated diseases are largely unknown. Delivery of microbiota to a specific area of the intestine via targeted opening of a capsule might be an interesting future approach to further investigate.

FMT seems to be only a temporal approach to alter the intestinal microbiota since a standardized, stable composition of fecal material is near impossible to achieve. While the knowledge of the microbiota and host-commensal interactions in dysbiotic environments increases, it is to be expected that dietary manipulation and specific alteration of key microbes will be emerging in the future. Furthermore, it appears FMT is not a one-size-fits-all therapy and needs a more personalized approach for several disorders. For instance, donors with a specific microbiota profile are more likely to provide a beneficial effect for patients with IBD. One of our studies implicated that the microbiota profile of the recipient is predictive for the outcome of the FMT. Future studies should therefore focus more on donor-recipient compatibility and suitability prior to FMT.

The structure of the intestinal microbiota becomes more and more unravelled as novel techniques for analysis of the

microbiome are rapidly emerging. In most studies, however, the influence of bacteria on a certain pathophysiology is usually investigated. Besides bacteria, the microbiome consists of archaea, viruses (especially bacteriophages) and fungi. Bacteriophages, viruses that specifically infect and eliminate bacteria, were found to be 20 times more abundant than bacteria in mucosal samples. Given the high number of bacteriophages in an FMT (1-10 times the number of bacteria), these viruses might be important drivers of FMT efficacy. In a small prospective study, the effect of a sterile (bacteria-free) FMT was tested in rCDI patients. Although only five patients were included, all patients had resolution of their CDI-associated diarrhea. Interestingly, shifts in viral and bacterial composition towards the donor's microbiota profile were observed. Another prospective study observed highly individualized virus colonization patterns depending on specific donor-recipient pairings. We have recently started an RCT in humans addressing the effect of phage transplants on human glucose metabolism.

In addition, there is a significant knowledge gap in the link between the (small)intestinal microbiota and disease development and progression in humans. This is in large

because the accessible, fecal microbiome is usually used to analyze microbiome composition and associated with disease of interest (fecal bias). The small intestinal microbiome differs significantly from the fecal microbiome. Together with the fact that the small intestine plays a major role in human metabolism and disease development, it is critical to develop strategies to sample small intestinal microbiome. In line, nasoduodenal administration of FMT, as currently is standard operating procedure in the AMC, exposes the upper GI, which has a simple microbiota community, to a very complex fecal community. The effect of this exposure on local (immune) function of the small intestine are fully unknown. It will be critical to further develop initiatives aiming to sample small intestinal microbiota to unravel the extent to which FMT is capable of modifying the upper intestinal and mucosal microbiota.

In conclusion, FMT is a promising treatment strategy for many microbiota-related indications. With exception of rCDI, FMT is still experimental and should not be offered as treatment option. More controlled trials are needed to assess the potential benefit of FMT compared or in addition to standard therapy.

# Bacterioma de la leche humana: origen y composición

Mónica Olivares<sup>1</sup>, Ana Sañudo<sup>1</sup>, Federico García<sup>2</sup>, Óscar Bañuelos<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Investigación. Biosearch Life. Granada (España). <sup>2</sup>Servicio de Microbiología Clínica, Hospital Universitario San Cecilio, Granada (España).

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):27-31

Por bacterioma de la leche humana entendemos toda una comunidad de bacterias que existe en la leche. Hasta hace casi dos décadas, la presencia de bacterias en la leche humana se relacionaba con procesos infecciosos o de contaminación. Sin embargo, a principios del siglo XXI, se empieza a hablar de la presencia de un bacterioma propio de la leche humana (Martín y cols., 2003). Estas bacterias, presentes en la leche materna, son directamente transferidas al niño a través de la lactancia contribuyendo a la colonización de éste.

## Origen del bacterioma de leche humana

El origen del bacterioma de la leche ha sido muy discutido. Una de las hipótesis más antiguas es que existe un trasvase de microorganismos desde la cavidad oral del niño a los conductos de la glándula mamaria. Sin embargo, las muestras de precalostro de mujeres antes de dar a luz ya muestran un perfil bacteriano típico de leche humana (Ruiz y cols., 2019). También las bacterias de la piel de la madre se han considerado responsables en parte de las bacterias presentes en la leche materna. Pero, si bien hay determinadas especies que pueden cohabitar en ambos medios, nos encontramos determinadas especies que no suelen formar parte de la microbiota de la piel. Es el caso del género *Bifidobacterium*, que requiere entre otros factores de un ambiente anaeróbico que la piel no le puede proporcionar (Rodríguez, 2014). Por tanto, aunque pueda haber cierto papel del bacterioma de la cavidad oral del bebé y de la piel de la madre en la composición del bacterioma de la leche, la presencia de determinadas poblaciones apuntan también al origen intestinal de la madre (Martín y cols., 2004). Se plantea así un sistema dinámico de flujo de bacterias entre los diferentes bacteriomas que colonizan a la madre y al bebé lo que contribuye a la diversidad bacteriana en la leche materna (Rodríguez, 2014).

Es fácil imaginar cómo las bacterias de la boca del bebé o de la piel de la madre pueden llegar a alcanzar los conductos mamaros, sin embargo, cómo llegan las bacterias desde el intestino de la madre a la glándula mamaria supuso una gran incógnita. La primera hipótesis para tratar de explicar este fenómeno fue lanzada en 2004 y señaló a las células del sistema inmunológico como transportadoras de estas bacterias a través de la vía enteromamaria (Martín y cols., 2004). Un estudio posterior realizado en roedores mostró que el transporte de bacterias desde el intestino hasta la glándula se producía de forma fisiológica y era activado durante la última etapa del embarazo y lactancia (Pérez y cols., 2007). Además, el análisis de muestras de sangre y leche de mujeres en etapa de lactancia mostró células bacterianas adheridas a la superficie de células mononucleares (Pérez y cols., 2007). Estas evidencias se suman al ya conocido hecho de que durante la lactancia se produce en la mujer un importante flujo de células inmunes de origen intestinal a la glándula mamaria. El transporte de bacterias a través de esta vía parece dirigirse por células dendríticas y CD18+ que captarían bacterias comensales del lumen intestinal (Rescigno y cols., 2001; Macpherson y cols., 2004). En definitiva, la ruta enteromamaria no sólo permitiría el flujo de células del sistema inmune desde el intestino hasta la glándula mamaria sino que permitiría también el flujo de bacterias comensales que conformarán gran parte de lo que luego será el bacterioma de la leche.

El transporte de bacterias desde el intestino hasta la glándula mamaria ha sido demostrado en animales utilizando cepas de *Lactobacillus* marcadas genéticamente (de Andrés y cols., 2017). En humanos, la administración por vía oral a mujeres en periodo de lactancia de dos cepas de lactobacillus, *L. fermentum* CECT5716 y *L. salivarius* CECT5713, resultó en la detección de la cepa en la leche materna (Arroyo y cols., 2010).

Si bien la presencia de bacterias en la glándula mamaria se atribuyó a un fenómeno asociado a la gestación-lactancia, en los últimos años diversos estudios han descrito la presencia de un bacterioma en el tejido mamario de la mujer no relacionado con la lactancia (Urbaniak y cols., 2014). Sin embargo, los cambios fisiológicos, fundamentalmente hormonales, que tienen lugar durante embarazo-lactancia, de alguna manera favorecen el transporte de bacterias hasta la glándula mamaria provocando el enriquecimiento de la leche materna en estas bacterias de origen intestinal (Pérez y cols., 2007, Rodríguez, 2014).

### Composición del bacterioma de leche humana.

En los últimos años se han realizado un gran número de estudios destinados a caracterizar el bacterioma presente en la leche humana así como los factores que influyen en su composición. Los estudios que utilizan técnicas dependientes del cultivo aíslan fundamentalmente anaerobios facultativos de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium* y *Enterobacteriaceae* (Martín y cols., 2003; Martín y cols., 2009, Jeurink y cols., 2013; Jost y cols., 2013;). El uso de técnicas no dependientes de cultivo basadas en la detección del ADN, fundamentalmente el 16S rRNA, han permitido una caracterización más profunda de las poblaciones bacterianas que conforman el bacterioma de la leche humana. Estas técnicas demuestran la presencia de bacterias anaerobias estrictas típicamente asociadas al intestino como *Bacteroides*, *Blautia*, *Clostridium*, *Collinsella*, *Coprococcus*, *Eubacterium*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Ruminococcus* (Martín y cols., 2007; Jost y cols., 2013 y 2014; Murphy y cols., 2017). En total se han identificado en la leche humana hasta 50 géneros bacterianos (Ruiz y cols., 2019). Un estudio realizado con varias cohortes de mujeres procedentes de países pertenecientes a Europa, América y Asia reveló 10 géneros que se consideraron formar parte del núcleo del bacterioma de la leche humana por estar al menos en una de las cohortes en un 90% de las mujeres (Tabla 1) (Lackley y cols., 2019).

Fitzstevens y colaboradores (Fitzstevens y cols., 2017), llevaron a cabo una revisión sistemática en la que incluyeron 12 estudios que caracterizan las poblaciones bacterianas de la leche humana mediante técnicas no dependientes de cultivo. El estudio muestra la predominancia de los géneros *Streptococcus* y *Staphylococcus*. Recientemente, Togo y colaboradores (Togo y cols., 2019), publicaron una nueva revisión sistemática en la que incluyeron datos de 15.000 muestras de leche procedentes de 242 estudios realizados en 38 países. Se detectaron más de 800 especies. En este estudio mostraron cómo el bacterioma de la leche humana compartía el 49% de las especies con el bacterioma intestinal, 30% con el bacterioma vaginal, 28% con el del tracto urinario y 21% con la cavidad oral. Destacar que de las 800 especies

**Tabla 1.** Porcentaje de muestras de leche con cantidad cuantificable del género bacteriano.

Género	Porcentaje
<i>Staphylococcus</i>	98,7
<i>Streptococcus</i>	97,7
<i>Propionibacterium</i>	75,5
<i>Corynebacterium 1</i>	73,7
<i>Dyella</i>	67,4
<i>Acitenobacter</i>	50,3
<i>Kocuria</i>	40,7
<i>Rhizobium</i>	25,5
<i>Brevundimonas</i>	19,7
<i>Achromobacter</i>	12,4

Modificado de Lackey y cols., 2019.

que identificaron, aproximadamente 300 fueron encontradas únicamente en tejido mamario o leche humana y no en otros bacteriomas de la mujer, sugiriendo la peculiaridad de bacterioma de la leche.

Entre los géneros identificados se encuentran también *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* que, aunque se encuentran normalmente de forma minoritaria, tienen gran interés debido a que son géneros asociados a efectos beneficiosos sobre la salud. De hecho, algunas cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, originariamente aisladas de muestras de leche materna, han mostrado efectos beneficiosos sobre la salud, especialmente en bebés y en mujeres lactantes (Maldonado y cols., 2012 y 2019; Arroyo y cols., 2010, Hurtado y cols., 2017).

Analizando en más profundidad *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* encontramos en la leche numerosas especies pertenecientes a estos géneros. El análisis de muestras de leche procedentes de 493 mujeres españolas mostró que entre las especies de *Lactobacillus* cultivables dominaban *L. fermentum*, *L. gasseri* y *L. paracasei* entre otros. En cuanto a las especies de *Bifidobacterium* fueron más frecuentes *B. breve* y *B. longum* (Tabla 2) (Datos no publicados).

Estos datos son muy similares a los observados en una población alemana y austriaca en la que destaca la presencia de *L. gasseri*, *L. fermentum* y *L. salivarius*. Entre las especies de *Bifidobacterium* también destacaron *B. breve* y *B. longum* lo que además coincide con las especies dominantes en la microbiota fecal de los bebés (Soto y cols., 2014) (Tabla 2).

Un estudio realizado en mujeres Tailandesas y Chinas muestra sin embargo un perfil algo diferente mostrando predominancia de *L. paracasei*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus* y *L. vaginalis* en el caso de los *Lactobacillus*, y predominancia de

**Tabla 2.** Especies de *Lactobacillus* identificadas en muestras de leche humana.

Especie de <i>Lactobacillus</i>	Nacionalidad estudios (tamaño muestral)		
	Alemania/Austria (Soto y cols. 2014) (n= 66)a	España* (n= 493)b	Taiwan/China (Li y cols. 2017) (n= 133)c
<i>L. gasseri</i>	D	D	ND
<i>L. fermentum</i>	D	D	ND
<i>L. salivarius</i>	D	D	ND
<i>L. casei</i>	D	ND	ND
<i>L. paracasei</i>	ND	D	D
<i>L. plantarum</i>	D	D	ND
<i>L. reuteri</i>	D	D	D
<i>L. rhamnosus</i>	D	D	D
<i>L. vaginalis</i>	NI	D	D
<i>L. sakei</i>	NI	D	ND
<i>L. oris</i>	NI	D	ND
<i>L. curvatus</i>	NI	D	ND
<b>Especie de <i>Bifidobacterium</i></b>			
<i>B. breve</i>	D	D	ND
<i>B. longum</i>	D	D	D
<i>B. animalis</i>	NI	D	ND
<i>B. bifidum</i>	ND	D	ND
<i>B. scardovii</i>	NI	D	ND
<i>B. adolescentis</i>	ND	ND	D
<i>B. dentium</i>	ND	ND	D
<i>B. stercoris</i>	NI	ND	D
<i>B. pseudocatenulatum</i>	ND	D	ND

D: Detectada; ND: No Detectada; NI No Investigada. \*Datos de laboratorio no publicados.  
 aDetección por PCR cuantitativa a partir de ADN directamente obtenido de la muestra de leche. bCultivo previo de las muestras de leche para enriquecimiento en medios selectivos para los dos géneros. Las distintas morfologías presentes en cultivos sólidos fueron identificados mediante MALDI-TOF (MALDI Biotyper®, Bruker). cExtracción directa del ADN de las muestras de leche y pirosecuenciación del 16S rRNA.

*Bifidobacterium adolescentis*, *B. dentium*, *B. longum*, *B. longum* subsp. *infantis* y *B. stercoris* en el caso de *Bifidobacterium* (Li y cols., 2017) (Tabla 2). Estas diferencias sugieren factores geográficos y/o genéticos que afectan a la conformación del bacterioma.

### Factores moduladores de la composición del bacterioma de la leche humana

Al igual que el bacterioma intestinal, la composición bacteriana de la leche humana es dependiente de diversos factores. Entre estos factores se ha identificado el tipo de parto. Así, las mujeres que dieron a luz mediante cesárea mostraron mayor abundancia y diversidad bacteriana en la leche que

aquellas que dieron a luz por parto vaginal (Toscano y cols., 2017; Cabrera-Rubio y cols., 2016).

Del mismo modo que la composición nutricional de la leche va cambiando a lo largo de la lactancia, también se han observado diferencias en la composición del bacterioma. Las bacterias totales, y en especial *Bifidobacterium* y *Enterococcus* spp. aumentan a medida que avanza la lactancia (Khodayar-Pardo y cols., 2014). *Weissella*, *Leuconostoc*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Lactococcus* predominaron en calostro mientras que en leches de transición y madura se encontró mayor presencia de géneros típicos de la cavidad oral como *Veillonella*, *Leptotrichia* y *Prevotella* (Cabrera-Rubio y cols., 2012).

El tiempo de gestación es otro de los factores que influye en la composición del bacterioma de la leche observándose mayor abundancia de *Bifidobacterium* en las muestras de leche en los casos de partos a término en comparación con los casos de partos prematuros. Las diferencias son más acusadas durante los primeros días igualándose a medida que los niños prematuros comienzan a ser amamantados (Khodayar-Pardo y cols., 2014; Biagi y cols., 2017; Biagi y cols., 2018).

Otro de los factores que determina la composición de este bacterioma es la dieta. En un estudio realizado en 94 mujeres se distinguieron dos agrupaciones, una marcada por abundancia de *Streptococcus* y otra en la que predominaba *Staphylococcus*. Entre los nutrientes de la dieta que se relacionaron con determinados patrones destacó el consumo de vitamina C durante la lactancia que se relacionó con una mayor diversidad bacteriana especialmente en la segunda agrupación. También se observó una correlación positiva entre *Bifidobacterium* y el consumo de ácido linoleico (Padilha y cols., 2019).

Al igual que se ha relacionado la obesidad con un patrón determinado de microbiota intestinal caracterizado por una predominancia de Firmicutes sobre Bacteroidetes (Lei y cols., 2006), existe una relación entre la masa corporal y la composición del bacterioma de la leche humana observándose menos diversidad en el caso de mujeres obesas (Cabrera-Rubio y cols., 2012).

Los diferentes estudios realizados en los últimos años para caracterizar la composición del bacterioma de la leche humana muestran diferencias en la composición del bacterioma dependiendo de la región geográfica en la que se llevaron a cabo los estudios. Sin embargo, la variabilidad entre los diferentes estudios hacía difícil aclarar la verdadera influencia de la región geográfica. En un estudio realizado con 80 mujeres procedentes de diferentes regiones, España, Finlandia, Sur de África y China se pudieron identificar alguno de esos patrones asociados a la región. Por ejemplo, la dominancia de *Streptococcus* fue mayor en mujeres chinas. En España se observó una mayor abundancia de *Propionibacterium* y *Pseudomonas*. El estudio mostró también una mayor proporción de genes de origen bacteriano relacionados con metabolismo de lípidos, carbohidratos y aminoácidos en las mujeres de España y Sur de África en relación con las mujeres finlandesas. Esta observación es importante pues no sólo revela diferencias a nivel de poblaciones sino también a nivel de las funcionalidades que aportan estas poblaciones (Kumar y cols., 2016). Un estudio más reciente realizado con un tamaño muestral más representativo, 394 mujeres, repartidas entre regiones de África, Europa, Norte y Sur de América, mostró interesantes resultados. Se confirmó la dominancia de *Staphylococcus* y *Streptococcus* los cuales fueron detectados en el 98,7 y 97,7% de las muestras respectivamente. Sin embargo, en las distintas regiones se encontraron diferencias importantes en el resto de géneros que conformaban el

núcleo del bacterioma de la leche. Por ejemplo, el género *Kocuria* es muy frecuente en las muestras de mujeres de Etiopía y Gambia, pero apenas se encuentra en los países de Europa y América. *Rhizobium* y *Brevundimonas* caracterizan el núcleo del bacterioma de la Etiopía rural mientras que es mucho menos frecuente su presencia en el resto de regiones, incluyendo otros países de África. Estas observaciones ponen de manifiesto que incluso en regiones próximas y con genéticas similares se observan peculiaridades en el bacterioma que habrá que estudiar con más detalle (Lackey y cols., 2019).

## Conclusión general

Las investigaciones llevadas a cabo durante los últimos años han revelado la presencia de un bacterioma característico en la leche materna. Sin embargo, todavía quedan muchas incógnitas, no sólo sobre su composición y los factores que la determinan sino también sobre el papel que juegan esas bacterias en el proceso de colonización del bebé y su futura salud.

## Bibliografía

- Arroyo R, Martín V, Maldonado A, Jiménez E, Fernández L, Rodríguez JM. Treatment of infectious mastitis during lactation: antibiotics versus oral administration of Lactobacilli isolated from breast milk. Clin Infect Dis. 2010; 50: 1551-8.
- Biagi E, Aceti A, Quercia S, Beghetti I, Rampelli S, Turrioni S, et al. Microbial community dynamics in mother's milk and infant's mouth and gut in moderately preterm infants. Front Microbiol. 2018; 9: 2512.
- Biagi E, Quercia S, Aceti A, Beghetti I, Rampelli S, Turrioni S, et al. The bacterial ecosystem of mother's milk and infant's mouth and gut. Front Microbiol. 2017; 8: 121.
- Cabrera-Rubio R, Collado MC, Laitinen K, Salminen S, Isolauri E, Mira A. The human milk microbiome changes over lactation and is shaped by maternal weight and mode of delivery. Am J Clin Nutr. 2012; 96: 544-51.
- Cabrera-Rubio R, Mira-Pascual L, Mira A, Collado MC. Impact of mode of delivery on the milk microbiota composition of healthy women. J Dev Orig Health Dis. 2016; 7: 54-60.
- de Andrés J, Jiménez E, Chico-Calero I, Fresno M, Fernández L, Rodríguez JM. Physiological translocation of lactic acid bacteria during pregnancy contributes to the composition of the milk microbiota in mice. Nutrients. 2017; 10: E14.
- Fitzstevens JL, Smith KC, Hagadorn JI, Caimano MJ, Matson AP, Brownell EA. Systematic review of the human milk microbiota. Nutr Clin Pract. 2017; 32: 354-64.
- Jeurink PV, van Bergenhenegouwen J, Jiménez E, Knippels LM, Fernández L, Garssen J, et al. Human milk: a source of more life than we imagine. Benef Microbes. 2013; 4: 17-30.
- Hurtado JA, Maldonado-Lobón JA, Díaz-Ropero MP, Flores-Rojas K, Uberos J, et al. Oral administration to nursing women of *Lactobacillus fermentum* CECT5716 prevents lactational mastitis development: A randomized controlled trial. Breastfeed Med. 2017; 12: 202-9.
- Jost T, Lacroix C, Braegger C, Chassard C. Assessment of bacterial diversity in breast milk using culture-dependent and culture-independent approaches. Br J Nutr. 2013; 110: 1253-62.
- Jost T, Lacroix C, Braegger CP, Rochat F, Chassard C. Vertical mother-neonate transfer of maternal gut bacteria via breastfeeding. Environ Microbiol. 2014; 16: 2891-904.
- Khodayar-Pardo P, Mira-Pascual L, Collado MC, Martínez-Costa C. Impact of lactation stage, gestational age and mode of delivery on breast milk microbiota. J Perinatol. 2014; 34: 599-605.

- Kumar H, du Toit E, Kulkarni A, Aakko J, Linderborg KM, Zhang Y, et al. Distinct patterns in human milk microbiota and fatty acid profiles across specific geographic locations. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1619.
- Lackey KA, Williams JE, Meehan CL, Zachek JA, Benda ED, Price WJ, et al. What's normal? Microbiomes in human milk and infant feces are related to each other but vary Geographically: The INSPIRE Study. *Front Nutr.* 2019; 6: 4.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature.* 2006; 444: 1022-3.
- Li SW, Watanabe K, Hsu CC, Chao SH, Yang ZH, Lin YJ, et al. Bacterial Composition and diversity in breast milk samples from mothers living in Taiwan and Mainland China. *Front Microbiol.* 2017; 8: 965.
- Macpherson AJ, Uhr T. Induction of protective IgA by intestinal dendritic cells carrying commensal bacteria. *Science.* 2004; 303: 1662-5.
- Maldonado J, Cañabate F, Sempere L, Vela F, Sánchez AR, Narbona E, et al. Human milk probiotic *Lactobacillus fermentum* CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2012; 54: 55-61.
- Maldonado J, Gil-Campos M, Maldonado-Lobón JA, Benavides MR, Flores-Rojas K, Jaldo R, et al. Evaluation of the safety, tolerance and efficacy of 1-year consumption of infant formula supplemented with *Lactobacillus fermentum* CECT5716 Lc40 or *Bifidobacterium breve* CECT7263: a randomized controlled trial. *BMC Pediatr.* 2019; 19: 361.
- Martín R, Heilig HG, Zoetendal EG, Jiménez E, Fernández L, Smidt H, et al. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res Microbiol.* 2007; 158: 31-7.
- Martín R, Jiménez E, Heilig H, Fernández L, Marín ML, Zoetendal EG, et al. Isolation of bifidobacteria from breast milk and assessment of the bifidobacterial population by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR. *Appl Environ Microbiol.* 2009; 75: 965-9.
- Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Olivares M, et al. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci Technol.* 2004; 15: 121-7.
- Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr.* 2003; 143: 754-8.
- Murphy K, Curley D, O'Callaghan TF, O'Shea CA, Dempsey EM, O'Toole PW, et al. The composition of human milk and infant faecal microbiota over the first three months of life: A pilot study. *Sci Rep.* 2017; 7: 40597.
- Padilha M, Danneskiold-Samsøe NB, Brejnrod A, Hoffmann C, Cabral VP, Iaucci JM, et al. The human milk microbiota is modulated by maternal diet. *Microorganisms.* 2019; 7: E502.
- Perez PF, Doré J, Leclerc M, Levenez F, Benyacoub J, Serrant P, et al. Bacterial imprinting of the neonatal immune system: lessons from maternal cells? *Pediatrics.* 2007; 119: e724-32.
- Rescigno M, Urbano M, Valzasina B, Francolin M, Rotta G, Bonasio R, et al. Dendritic cells express tight junction proteins and penetrate gut epithelial monolayers to sample bacteria. *Nat Immunol.* 2001; 2: 361-7.
- Rodríguez JM. The origin of human milk bacteria: Is there a bacterial entero-mammary pathway during late pregnancy and lactation? *Adv Nutr.* 2014; 5: 779-84.
- Ruiz L, Bacigalupe R, García-Carral C, Boix-Amoros A, Argüello H, Silva CB, et al. Microbiota of human precolostrum and its potential role as a source of bacteria to the infant mouth. *Sci Rep.* 2019; 9: 8435.
- Ruiz L, García-Carral C, Rodríguez JM. Unfolding the human milk microbiome landscape in the omics era. *Front Microbiol.* 2019; 10: 1378.
- Soto A, Martín V, Jiménez E, Mader I, Rodríguez JM, Fernández L. Lactobacilli and bifidobacteria in human breast milk: influence of anti-biotherapy and other host and clinical factors. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014; 59: 78-88.
- Togo A, Dufour JC, Lagier JC, Dubourg G, Raoult D, Million M. Repertoire of human breast and milk microbiota: a systematic review. *Future Microbiol.* 2019; 14: 623-41.
- Toscano M, De Grandi R, Peroni DG, Grossi E, Facchin V, Comberiat P, et al. Impact of delivery mode on the colostrum microbiota composition. *BMC Microbiol.* 2017; 17: 205.
- Urbaniak C, Cummins J, Brackstone M, Macklaim JM, Gloor GB, Baban CK, et al. Microbiota of human breast tissue. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80: 3007-14.
- Urbaniak C, Gloor GB, Brackstone M, Scott L, Tangney M, Reid G. The microbiota of breast tissue and its association with breast cancer. *Appl Environ Microbiol.* 2016; 82: 5039-48.

## Funciones de las bacterias de la leche humana

Rosaura Leis<sup>1</sup>, Santiago Valladares-Rodríguez<sup>2</sup>, Alexandra Pérez-Ferreirós<sup>3</sup>,  
Alicia López-Rubio<sup>2</sup>, Rosaura Picáns<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Profesora Titular de Pediatría –USC. Coordinadora de la Unidad de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica. Hospital Clínico Universitario de Santiago. Área Asistencial de Pediatría. Xerencia de Xestión Integrada de Santiago. GI Nutrición Pediátrica del Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago (IDIS-ISCIII). CiberObn. <sup>2</sup>Técnico Superior de apoyo en investigación en la Unidad de Nutrición y Metabolismo Pediátrico. Hospital Clínico Universitario de Santiago–USC. GI Nutrición Pediátrica del Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago (IDIS-ISCIII). <sup>3</sup>Investigadora en la Unidad de Nutrición y Metabolismo Pediátrico. Hospital Clínico Universitario de Santiago. GI Nutrición Pediátrica del Instituto de Investigaciones Sanitarias de Santiago (IDIS-ISCIII). CiberObn. <sup>4</sup>Médico Residente. Departamento de Pediatría. Hospital Clínico Universitario de Santiago. USC.

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):32-36

En los últimos años estamos asistiendo a un creciente interés por el microbioma humano (conjunto de genes de todos los componentes de la microbiota de un hábitat determinado), a pesar de que hace más de un siglo que se conocen los efectos beneficiosos que la microbiota de ocupación tiene en el organismo. Hoy sabemos que muchas enfermedades son el resultado de la pérdida del equilibrio entre nosotros y nuestras bacterias, disbiosis, por alteración en la composición, metabolismo o distribución. Esto se acompaña frecuentemente de sobrecrecimiento de bacterias u hongos patógenos y pérdida significativa de diversidad microbiana o grupos de bacterias clave, que se asocia a disregulación inmunológica y a una respuesta inflamatoria de bajo grado del huésped, que puede cronificarse y constituir la base de la enfermedad.

El organismo humano está constituido por un número semejante de bacterias que de células propias. Están presentes en todas las partes del cuerpo, aunque la mayoría se localizan en la piel y aquellas cavidades del organismo que se comunican con el exterior y que son, fundamentalmente, la vagina y el aparato digestivo, especialmente el intestino grueso. Es lo que llamamos microbiota autóctona, estableciéndose habitualmente una relación mutualista. Nuestra microbiota nos protege frente a agentes patógenos, favorece el desarrollo del sistema inmunitario, colabora en la digestión de componentes de la dieta y en la provisión de vitaminas y otros nutrientes esenciales.

Cada individuo posee una comunidad microbiana peculiar que depende de su genotipo y de la exposición temprana a los microorganismos de su entorno, pero también de la

dieta, los cambios en los estilos de vida o la terapéutica frente a las infecciones. Esto implica que la colonización desde el nacimiento será diferente dependiendo de factores como la alimentación de la mujer en edad fértil y gestante, la edad gestacional, la estancia en Unidades de Cuidados Intensivos neonatales, el tipo de parto, el modelo de lactancia, el entorno rural o urbano en que crecemos, el nivel de desarrollo del país de nacimiento, el uso de antibióticos, especialmente los utilizados para combatir infecciones durante el parto y en la primera infancia, etc., que son factores condicionantes de disbiosis. Al final del segundo año podemos tener una microbiota estable, similar a la del adulto, aunque ésta variará a lo largo de toda nuestra vida. Por tanto, los mil primeros días de vida van a ser fundamentales en el desarrollo de nuestro microbioma y en la programación de nuestra salud (Tabla 1).

La alimentación y la nutrición en las primeras etapas de la vida es capaz de modular el crecimiento y desarrollo funcional del organismo y ejercer efectos en la programación metabólica que perdurarán a lo largo de todo el ciclo vital, determinando la morbilidad y la mortalidad. Así, la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su Plan de aplicación integral sobre nutrición materna, del lactante y del niño pequeño, prioriza estas acciones para la mejora del desarrollo y la salud de los niños en el mundo antes de 2025<sup>(1)</sup>.

El conocimiento y la modulación de la microbiota abre la puerta a un gran número de investigaciones con el fin de prevenir y tratar muchas enfermedades que son hoy principales causas de morbi-mortalidad.

**Tabla 1.** Composición de la flora intestinal.

**Balance: inestable, sistema basado en interacciones cambiantes**

**1<sup>as</sup> bacterias aeróbicas, consumen el oxígeno y convierten el ambiente en un medio favorable para los anaerobios estrictos**

- Flora intestinal residual:
  - Flora dominante activa (bacilos, bifidobacterias...)
  - Flora subdominante (lactobacillus): bajo el control de la flora dominante y pocas variaciones a lo largo de la vida.
- Flora intestinal transitoria o temporal:
  - Variaciones causadas por cambios dietéticos y medioambientales, edad, zona geográfica....
  - Exógena
  - NO coloniza

*Difiere de un individuo a otro. Difiere en un mismo individuo a lo largo de la vida, pero las poblaciones dominantes suelen permanecer estables.*

## La programación metabólica y las enfermedades no transmisibles (ENTs)

El crecimiento y el desarrollo funcional del organismo puede ser modulado por la alimentación y la nutrición durante las etapas tempranas de la vida, teniendo lugar también una programación metabólica a lo largo de todo el ciclo vital<sup>(2)</sup>.

Los primeros estudios sobre esta programación fueron los de McCance<sup>(3)</sup>, pero los primeros datos en humanos se obtuvieron de estudios epidemiológicos, tanto sobre los efectos de la nutrición temprana en el neurodesarrollo como en el riesgo de enfermar a lo largo de la vida. Así, Barker observó una asociación entre datos antropométricos al nacimiento y al año de edad y el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular en la edad adulta<sup>(4)</sup>. Las últimas evidencias resultado de estudios de intervención en nutrición temprana, observan que la actuación en periodos críticos del desarrollo, especialmente en la etapa postnatal inmediata, se asocia a modificaciones en el crecimiento y la ganancia ponderal a medio y largo plazo. Por tanto, la alimentación de la mujer durante el embarazo y la del niño en los dos primeros años de vida (los primeros 1000 días) resultan cruciales para el desarrollo y la salud a lo largo de la vida. El objetivo principal de la alimentación en este periodo es aportar la cantidad suficiente de energía y macro y micronutrientes que puedan garantizar el crecimiento y desarrollo adecuados, consiguiendo “una saludable programación nutricional temprana”<sup>(2)</sup>.

Además de la alimentación, otros factores como la interacción entre el individuo y la microbiota intestinal parecen influir en la programación temprana de las funciones intestinales y de otros órganos. Así, una microbiota intestinal saludable se asocia con menor riesgo de enfermedad a corto, medio y largo plazo y a un mejor desarrollo del sistema inmune<sup>(5)</sup> (Tabla 2).

**Tabla 2.** Enfermedades relacionadas con alteraciones en la microbiota-Disbiosis.

### Enfermedades relacionadas

- Enfermedades autoinmunes
  - Enfermedad celíaca
  - Diabetes mellitus tipo 1
  - Enfermedad inflamatoria intestinal
- Enfermedades alérgicas
- Síndrome del colon irritable
- Enfermedades metabólicas
  - Obesidad
  - Diabetes tipo 2
- Infecciones bacterianas
- Cáncer colo-rectal

Las enfermedades no transmisibles (ENTs) son enfermedades crónicas no infecciosas que progresan lentamente. Son en gran parte prevenibles y la nutrición temprana, determinante del desarrollo y función de órganos y aparatos, constituye un factor preventivo fundamental.

La obesidad, la pandemia actual, constituye un importante factor de riesgo de otras muchas comorbilidades, consideradas también ENTs, presentes ya desde la infancia. La OMS en su informe “Ending Childhood obesity” destaca la importancia de los mil primeros días para establecer estrategias de intervención para la prevención de la obesidad y sus ENTs asociadas<sup>(6)</sup>. La alta prevalencia, que continúa en aumento, de las enfermedades alérgicas, en especial en edad pediátrica y adultos jóvenes, constituye otro importante problema de salud. Así en nuestro país alrededor del 25% presenta algún tipo de alergia. Por otra parte, el incremento de las enfermedades alérgicas en la edad pediátrica, así como de otras enfermedades inmunes, no parecen explicarse por factores genéticos, sino por la alta vulnerabilidad del sistema inmune a los cambios ambientales tempranos (exceso de higienes, patrones alimentarios, contaminación atmosférica, escasa exposición a agentes infecciosos, etc.)<sup>(7)</sup>. Parece existir una asociación entre la colonización intestinal en el recién nacido y el riesgo de padecer alergia y, por tanto, se abre un abanico de posibilidades para su prevención<sup>(8)</sup>.

Estudios recientes observan que algunos factores posibles causantes de alergia podrían formar parte también de la etiología de la obesidad<sup>(9)</sup>. La expresión génica puede verse modificada por factores ambientales, epigenética; e incrementar la susceptibilidad a padecer ENTs. La mayor plasticidad y flexibilidad de la expresión génica en las primeras etapas de la vida ofrece una ventana de oportunidad para revertir los cambios epigenéticos y prevenir el desarrollo de estas enfermedades<sup>(10)</sup>.

## Probióticos y prebióticos en la leche humana como elemento funcional

La microbiota intestinal humana está formada por una serie de microorganismos bacterianos que influyen en distintos procesos fisiológicos, metabólicos e inmunológicos a lo largo de la vida. Comienza a formarse durante el embarazo a partir de la microbiota materna, y tras la colonización inicial durante el parto, continúa su diversificación y desarrollo. Existen diversos factores que pueden afectar en este proceso. La nutrición, en este caso, se presenta como un elemento de suma importancia en la maduración de la microbiota del recién nacido. La relevancia del consumo de leche materna en el proceso de colonización bacteriana es un hecho contrastado científicamente. La leche materna es una fuente de microorganismos activos y compuestos probióticos y prebióticos que van a desempeñar un papel importante para el óptimo desarrollo de la microbiota intestinal.

Podemos definir los prebióticos como “ingredientes alimentarios que al ser fermentados selectivamente producen cambios específicos en la composición y/o actividad de la microbiota gastrointestinal confiriendo beneficios en la salud del individuo”<sup>(11)</sup>. La leche materna contiene entre 5 y 20 g/L de oligosacáridos que colaboran en la protección frente a bacterias y virus patógenos. Además, gracias al proceso de fermentación, sirven de alimento a las bacterias comensales (especialmente bifidobacterias), favoreciendo su crecimiento y actividad. Por otra parte, los probióticos son microorganismos vivos que se ingieren en la dieta y que se encargan de regular el crecimiento de las bacterias comensales de la microbiota. La leche materna se considera un alimento rico en este tipo de organismos. De hecho, un lactante que consuma entre 500-800 ml de leche materna puede llegar a ingerir entre 105 y 107 bacterias mutualistas y potencialmente probióticas<sup>(2)</sup>. Así mismo, se ha observado que casi un 30% de la microbiota intestinal de lactantes alimentados con leche materna provenía de las bacterias presentes en la leche y un 10% de la areola mamaria de la madre<sup>(12)</sup>. Aunque se ha encontrado la presencia de unas 700 especies de bacterias, la microbiota presente en la leche materna contiene principalmente *Streptococcus* y *Staphylococcus*, seguidos por *Enterobacterias*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus* y *Lactobacillus*<sup>(13)</sup>.

Estudios recientes ponen en evidencia el principal papel de la lactancia materna frente al tipo de parto en la colonización inicial del recién nacido, ya que las bacterias aisladas de las heces del neonato se asemejan más a las aisladas en la leche materna que a las del tracto vaginal. También debemos tener presente que la composición de la microbiota de la leche materna puede sufrir cambios a lo largo del día y a lo largo del tiempo de lactancia, existiendo también diferencias, al igual que ocurre con otros componentes, en función de los individuos, la localización geográfica, etc.<sup>(2)</sup>.

Además, la leche humana contiene diferentes oligosacáridos, que constituyen el tercer componente más abundante

de la misma, disminuyendo sus concentraciones a lo largo de la lactancia. Existen más de 1.000 tipos de oligosacáridos diferentes, y se han descrito más de 200 moléculas en los humanos. Poseen muchas funciones biológicas, incluida la protección contra bacterias y virus patógenos, acción inmunomoduladora, así como una acción prebiótica por su influencia en el crecimiento de bacterias beneficiosas, especialmente de *Bifidobacterias*. Los compuestos de oligosacáridos más comunes utilizados en la nutrición infantil que tienen efectos prebióticos similares a los alcanzados con la leche materna incluyen galactooligosacáridos de cadena corta (scGOS), fructooligosacáridos de cadena larga (lcFOS) y la combinación de ambos. Los datos clínicos han demostrado que el efecto de esta combinación de prebióticos en el lactante y los primeros años de vida puede apoyar el desarrollo del sistema inmune, disminuyendo el riesgo de alergia<sup>(14)</sup>. Se debe tener también presente que la leche materna contiene compuestos bioactivos (IgAs, leucocitos, lactoferrina, neuropéptidos, exosomas, factor de crecimiento, oligosacáridos complejos, péptidos de caseína, lisozimas, lactoperoxidasa y gangliósidos) que juegan un destacado papel en el mantenimiento y desarrollo del sistema inmune.

En definitiva, distintas investigaciones han aportado que se trata del alimento ideal ya que se adapta concretamente a las características digestivas, necesidades nutritivas y de crecimiento del recién nacido. De hecho, la leche de cada mujer tiene una composición bacteriana única, de manera análoga a lo que ocurre con la microbiota intestinal de niños y adultos<sup>(2)</sup>. Por eso, lo idóneo es alimentar a los recién nacidos con la leche de sus propias madres, aunque en algunas ocasiones pueden existir ciertas limitaciones. En estos casos, se debe considerar como una opción principal la posibilidad de utilizar el servicio de bancos de leche<sup>(15)</sup>.

## Los 1.000 primeros días de vida y la salud del adulto

La microbiota intestinal del recién nacido es un complejo ecosistema bacteriano que tiene una importante influencia sobre el sistema inmunitario, la fisiología intestinal y el metabolismo, que consecuentemente repercutirá de manera decisiva en el desarrollo del niño. Concretamente, en relación al sistema inmune, estas bacterias comensales poseen la capacidad de generar compuestos antibióticos y secretar vitaminas e inmunomoduladores que fortalecen la capacidad de defensa del individuo. Su desarrollo, una vez establecida la microbiota intestinal inicial, continúa durante aproximadamente los dos primeros años de vida, incluyendo los periodos de lactancia y de introducción a la alimentación complementaria. Por eso, una adecuada contribución a su mantenimiento y crecimiento precisamente durante esta primera etapa, puede contribuir a la generación de un sistema inmune más eficaz para el resto de las etapas vitales. Aunque existen distintos elementos que afectan a su maduración, la literatura científica ha evidenciado que su correcto desarrollo está estrechamente ligado a factores nutricionales. De hecho,

la alimentación del neonato, es considerada como uno de los factores clave para el correcto establecimiento y desarrollo de la microbiota intestinal. En este sentido, la leche materna es un alimento complejo y vivo, adaptado a las necesidades del recién nacido e ideal para su alimentación<sup>(2)</sup>.

### Microbiota intestinal e inmunidad

El intestino juega un papel crítico en el desarrollo y mantenimiento del equilibrio del sistema inmune. Las interacciones entre la microbiota intestinal y el sistema inmune son esenciales en su maduración. Los estudios que muestran que los niños que desarrollan una enfermedad alérgica tienen una composición diferente, y disbiótica de su microbiota intestinal, indican la importancia de su equilibrio en la programación inmune<sup>(16)</sup>.

La modulación de la microbiota intestinal durante los primeros meses de vida, cuando el establecimiento de la microbiota y la maduración del sistema inmune no se han completado aún, brinda una importante oportunidad de intervención en el entrenamiento inmunológico. Así, se ha observado que los prebióticos, probióticos y simbióticos, que actúan sobre la microbiota, pueden estimular la inmunidad innata y optimizar el funcionamiento de la inmunidad adquirida<sup>(17,18)</sup>.

La lactancia materna ha demostrado disminuir el riesgo de enfermedades infecciosas durante los primeros días y años de vida, incluso en los recién nacidos de muy bajo peso<sup>(19)</sup>, y en los últimos años se ha observado su asociación con un menor riesgo de desarrollo de adiposidad y sus ENTs asociadas y enfermedades alérgicas<sup>(20)</sup>.

### Lactancia materna y obesidad

Existe cierta controversia acerca del papel de la leche materna como factor protector en la aparición de sobrepeso y obesidad infantil. Algunos estudios parecen evidenciar su importancia como factor protector en la aparición del exceso de peso en la infancia y en la adolescencia<sup>(21)</sup>. Un metaanálisis reciente con una muestra de 226.508 participantes observó asociaciones entre la lactancia materna y una disminución significativa del riesgo de obesidad infantil (OR = 0,78, IC 95%, 0,74-0,81), que se incrementaba a medida que se alargaba la duración<sup>(22)</sup>. Sin embargo, en un ensayo clínico en el que se aumentó la duración y exclusividad de la lactancia materna en 13.557 sujetos, al evaluarlos a los 16 años de edad no se demostraron estas asociaciones<sup>(23)</sup>. Un estudio reciente observa que el uso de antibióticos en el primer mes de vida se asocia con un aumento del índice de masa corporal y porcentaje de masa grasa entre los 6 y 24 meses de vida<sup>(24)</sup>.

Dentro de las líneas de investigación de nuestro grupo se encuentra el estudio del efecto de la lactancia materna prolongada sobre la composición corporal. Desde 2002 se conoce la *fibronectin type III domain-containing protein 5* (FNDC5), pero en los últimos años se ha puesto en evidencia su posible papel protector frente a la obesidad. Nosotros

determinamos la expresión del FNDC5 en el estómago de rata y su potencial regulación de la composición corporal, demostrando su expresión en la mucosa gástrica y su secreción por el estómago. La prolongación del periodo de lactancia induce una disminución en la composición de grasa corporal en ratas adultas, a pesar de recibir una dieta alta en grasa, coincidiendo con un aumento de la secreción de FNDC5 por el estómago y de los niveles circulantes de su isoforma 4. Por tanto, demostramos por primera vez la secreción de esta proteína y la regulación de la composición corporal, sugiriendo su potencial papel en la homeostasis energética<sup>(25)</sup>.

Para explicar el efecto de la leche de mujer en la prevención de la obesidad del niño se postula la influencia del momento de introducción de la alimentación complementaria y/o el tipo y orden de alimentos que la integran. Así, recientemente se ha publicado que la ingesta láctea en este periodo se correlaciona con el índice de masa magra y negativamente con *bacteroides*<sup>(24)</sup>. Además, una menor ingesta energética y proteica en los primeros meses, factores hormonales como la insulina, la secreción de neurotransmisores del eje intestino-cerebro o componentes de la propia leche podrían explicar diferente regulación de los mecanismos de hambre y saciedad y de expresión génica, que supongan una programación metabólica más saludable.

Sin embargo, debemos tener presente que hay estudios que observan asociaciones entre una baja masa grasa en la etapa de lactancia y un mayor índice de obesidad en el adulto. Estas diferencias son más evidentes en minorías étnicas y en niveles socioeconómicos bajos<sup>(26)</sup>.

### Lactancia materna y enfermedades alérgicas

La leche humana contiene una variedad de sustancias inmunológicamente activas, incluyendo inmunoglobulinas, factores antimicrobianos y leucocitos, así como compuestos con propiedades anti-inflamatorias y promotoras de la tolerancia como los ácidos grasos polinsaturados de cadena larga, factor activador de plaquetas e interleucina 10. También contiene agonistas y antagonistas de las respuestas inmunes innatas, incluyendo CD-14 y factores que modulan la señalización de receptores toll-like. Desde hace algo más de una década se conoce que la leche humana contiene pequeñas glicoproteínas denominadas citocinas. Citocinas como ciertos factores de crecimiento (TGF-beta 1 y 2, esta última la más frecuente en leche materna), que pueden proteger frente a problemas inmunológicos (sibilancias, atopia, eccema), mediante su efecto en el desarrollo y mantenimiento del sistema inmune, la producción de IgA, y la generación de tolerancia en estudios experimentales y humanos. Se desconoce el mecanismo último por el que esos compuestos inmunológicamente activos interactúan con el sistema inmune del recién nacido<sup>(27)</sup>.

Los estudios epidemiológicos no han podido confirmar que la lactancia materna exclusiva durante 3 o 4 meses se

asocie a una disminución de la incidencia de eccema, aunque sí a la disminución en la frecuencia de sibilancias de repetición en los dos primeros años de vida<sup>(28)</sup>.

A pesar de que la leche materna puede influir en el desarrollo y reparación de los tejidos, la regulación inmune o establecimiento de la microbiota, no ha podido demostrarse un efecto preventivo sobre el desarrollo de enfermedades alérgicas. Es posible que, dado que son enfermedades recientes, la leche materna no haya tenido tiempo a adaptar su composición a esta nueva necesidad. Sin embargo, puede modificarse por el ambiente materno, lo que abre una ventana de oportunidad a la prevención a través de la modificación de su composición por la alimentación o nutrición de la madre<sup>(29)</sup>.

## Conclusiones

Dada la especial composición de la leche materna, su papel positivo en el crecimiento y desarrollo adecuado del niño, en la modulación de la microbiota y en la prevención de las ENTs, organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS), Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF), la Academia Americana de Pediatría (AAP) o la Asociación Española de Pediatría (AEP) recomiendan la lactancia materna exclusiva y a demanda durante los primeros 6 meses de vida. Por ello, la promoción de la lactancia materna constituye una estrategia prioritaria en la prevención e intervención para la salud a corto, medio y largo plazo.

## Bibliografía

1. Organización Mundial de la Salud. Plan de aplicación integral sobre nutrición materna, del lactante y del niño pequeño. OMS 2014. Disponible en [http://www.who.int/nutrition/publications/CIP\\_document/es/](http://www.who.int/nutrition/publications/CIP_document/es/) [último acceso 24 Agosto 2018].
2. Moreno-Villares JM, Collado MC, Larqué E, Leis-Trabazo MR, Sáenz-de-Piñero M, Moreno-Aznar LA. Los primeros 1000 días: una oportunidad para reducir la carga de las enfermedades no transmisibles. *Nutr Hosp*. 2019; 36: 218-32.
3. McCance RA. Food growth and time. *Lancet*. 1962; 2: 271-2.
4. Barker DJP. Fetal nutrition and cardiovascular disease in adult life. *Lancet*. 1993; 341: 938-41.
5. Nauta AJ, Ben Amor K, Knol J, Garssen J, van der Beek EM. Relevance of pre- and postnatal nutrition to development and interplay between the microbiota and metabolic and immune systems. *Am J Clin Nutr*. 2013; 98: 586S-93S.
6. Commission on Ending Childhood Obesity. World Health Organization. 2016. Disponible en <http://www.who.int/end-childhood-obesity/publications/echo-report/en/> [último acceso 23 Septiembre 2018].
7. Prescott SL. Early nutrition as a major determinant of 'Immune Health': Implications for allergy, obesity and other noncommunicable diseases. *Nestle Nutr Inst Workshop Ser*. 2016; 85: 1-17.
8. Sozańska B. Microbiome in the primary prevention of allergic diseases and bronchial asthma. *Allergol Immunopathol (Madr)*. 2019; 47: 79-84.
9. Visness CM, London SJ, Daniels JL, Kaufman JS, Yeatts KB, Siega-Riz AM, et al. Association of obesity with IgE levels and allergy symptoms in children and adolescents: results from the National Health and Nutrition Examination Survey 2005–2006. *J Allergy Clin Immunol*. 2009; 123: 1163-9.
10. Hanson M, Godfrey KM, Lillycrop KA, Burdge GC, Gluckman PD. Developmental plasticity and developmental origins of non-communicable disease: theoretical considerations and epigenetic mechanisms. *Prog Biophys Mol Biol*. 2011; 106: 272-80.
11. FAO. FAO technical meeting on prebiotics. Food Quality and Standards Services (AGNIS). Food and Agricultural Organisation of the United Nations. 2007 Sep 15.
12. Pannaraj PS, Li F, Cerini C, Bender JM, Yang S, Rollie A, et al. Association between breast milk bacterial communities and establishment and development of the infant gut microbiome. *JAMA Pediatr*. 2017; 171: 647-54.
13. Fitzstevens JL, Smith KC, Hagadorn JI, Caimano MJ, Matson AP, Brownell EA. Systematic review of the human milk microbiota. *Nutr Clin Pract*. 2017; 32: 354-64.
14. Oozeer R, van Limpt K, Ludwig T, Ben Amor K, Martin R, Wind RD, et al. Intestinal microbiology in early life: specific prebiotics can have similar functionalities as human-milk oligosaccharides. *Am J Clin Nutr*. 2013; 98: 561S-71S.
15. de Halleux V, Pieltain C, Senterre T, Rigo J. Use of donor milk in the neonatal intensive care unit. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2017; 22: 23-9.
16. Bjorksten B. Disease outcomes as a consequence of environmental influences on the development of the immune system. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2009; 9: 185-9.
17. Borruel N. Bacterial interactions with the intestinal immune system: immunomodulation. *Gastroenterol Hepatol*. 2003; 26 Suppl 1: 13-22.
18. Rendina DN, Lubach GR, Phillips GJ, Lyte M, Coe CL. Maternal and breast milk influences on the infant gut microbiome, enteric health and growth outcomes of Rhesus Monkeys. *JPGN* 2019; 69 (3): 363-9.
19. Ferreira DMLM, Oliveira AMM, De Leves DV, De Bem EB, Fatureto GG, Navarro NF et al. Randomized controlled trial of Oropharyngeal colostrum administration in very-low-birth-weight preterm infants. *JPGN* 2019; 69 (1): 126-30.
20. WHO. Effect of breastfeeding on infant and child mortality due to infectious diseases in less developed countries: a pooled analysis. WHO Collaborative Study Team on the role of breastfeeding on the prevention of infant mortality. *Lancet*. 2000; 355: 451-5.
21. Owen CG, Martin RM, Whincup PH, Smith GD, Cook DG. Effect of infant feeding on the risk of obesity across the life-course: a quantitative review of published evidence. *Pediatrics*. 2005; 115: 1367-77.
22. Yan J, Liu L, Zhu Y, Huang G, Wang PP. The association between breastfeeding and childhood obesity: a meta-analysis. *BMC Public Health* 2014; 14: 1267.
23. Martin RM, Kramer MS, Patel R, Rifas-Shiman SL, Thompson J, Yang S, et al. Effects of promoting long-term, exclusive breastfeeding on adolescent adiposity, blood pressure, and growth trajectories: a secondary analysis of a randomized clinical trial. *JAMA Pediatr*. 2017; 171: e170698.
24. Smith-Brown P, Morrison M, Krause L, Davies PSW. Microbiota and body composition during the period of complementary feeding. *JPGN*. 2019; 69: 726-32.
25. Barja-Fernandez S, Folgueira C, Castela O, Al-Massadi O, Bravo SB, Garcia-Caballero T, et al. FND5 is produced in the stomach and associated to body composition. *Sci Rep*. 2016; 6: 23067.
26. Andrea SB, Hooker ER, Messer LC, Tandy T, Boone-Heinonen J. Does the association between early life growth and later obesity differ by race/ethnicity or socioeconomic status? A systematic review. *Ann Epidemiol*. 2017; 27: 583-592.e5.
27. Groenewold RH, Tilling K, Moons KG, Hoes AW, van der Ent CK, Kramer MS, et al. Breast-feeding and health consequences in early childhood: is there an impact of time-dependent confounding? *Ann Nutr Metab*. 2014; 65: 139-48.
28. Lodge CJ, Tan DJ, Lau MX, Dai X, Tham R, Lowe AJ, et al. Breastfeeding and asthma and allergies: a systematic review and meta-analysis. *Acta Paediatr*. 2015; 104: 38.
29. Munblit D, Verhasselt V. Allergy prevention by breastfeeding: possible mechanisms and evidence from human cohorts. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 2016; 16: 427-33.

# Modulación de la microbiota digestiva en rumiantes: Potenciando las ventajas y minimizando los inconvenientes

Alejandro Belanche

*Estación Experimental del Zaidín (CSIC). Granada, España.*

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):37-41

## Introducción

Microbiológicamente el rumen es quizá el ecosistema digestivo más diverso y complejo existente el mundo animal. Este ecosistema alberga a una microbiota compuesta por bacterias, arqueas, protozoos, hongos y fagos proporcionando una ventaja evolutiva a los rumiantes permitiéndoles hacer un aprovechamiento eficiente de alimentos ligno-celulósicos y de fuentes de proteína de baja calidad (incluso nitrógeno no protéico), para ser transformados en alimentos de alto valor nutricional. Como consecuencia los rumiantes son capaces de digerir una amplia gama de alimentos, forrajes y subproductos, permitiendo así ser el único sector ganadero que puede no entrar en competición directa por alimentos de consumo humano. Sin embargo, la fermentación microbiana ruminal posee algunas desventajas. La degradación de la proteína dietética en el rumen por parte de los protozoos y ciertas especies bacterianas ocasiona una baja eficiencia de utilización nitrogenada por el rumiante (30% en el mejor escenario). Por lo tanto, el exceso de amonio ruminal es excretado a través de las heces y orina en forma de amonio y óxido nitroso que puede ocasionar problemas medioambientales. De forma similar, la fermentación anaerobia de los alimentos en el rumen libera hidrógeno que es utilizado por las arqueas metanógenas para generar metano entérico, acarreamo una pérdida energética para el animal (entre 2 y el 15% de la energía bruta), además de contribuir al calentamiento global por ser un gas de efecto invernadero (GEI).

El mantenimiento de elevados niveles productivos representa un reto fisiológico para el rumiante y su microbiota

como fruto del consumo de dietas con alta densidad energética, pudiendo acarrear patologías como la acidosis ruminal y las diarreas. Para prevenir dichos problemas tradicionalmente se recurrió al uso de antibióticos como moduladores de la función ruminal y con fines preventivos. Fruto de ese excesivo uso de antibióticos en producción animal el número de cepas bacterianas multi-resistentes ha aumentado considerablemente, y actualmente el 60% de los patógenos emergentes en humanos es de origen animal. Por ello, la Autoridad Europea en Seguridad Alimentaria (EFSA) ha prohibido taxativamente el uso de antibióticos en alimentación animal con fines preventivos, ocasionado un resentimiento en ciertos sistemas productivos (fase de arranque, destete y alta producción). Por lo tanto, existe una necesidad imperante de buscar alternativas al uso de antibióticos como moduladores de la función ruminal que permitan aprovechar las ventajas que ofrecen los rumiantes y minimizar los inconvenientes.

Debido al creciente rechazo por parte de los consumidores al uso de sustancias químicas en producción animal, el uso de extractos de plantas en alimentación animal está ganado presencia en el mercado de aditivos alimentarios. Dichas sustancias, una vez extraídas y concentradas, pueden ejercer un efecto modulador de la microbiota ruminal ofreciendo una interesante oportunidad como alternativa a los antibióticos. A continuación describiremos los principales grupos de extractos de plantas, así como otras estrategias nutricionales que hoy en día se consideran prometedoras para optimizar la función ruminal con el objetivo de incrementar la productividad y/o reducir el impacto ambiental de la producción de rumiantes (Fig. 1).

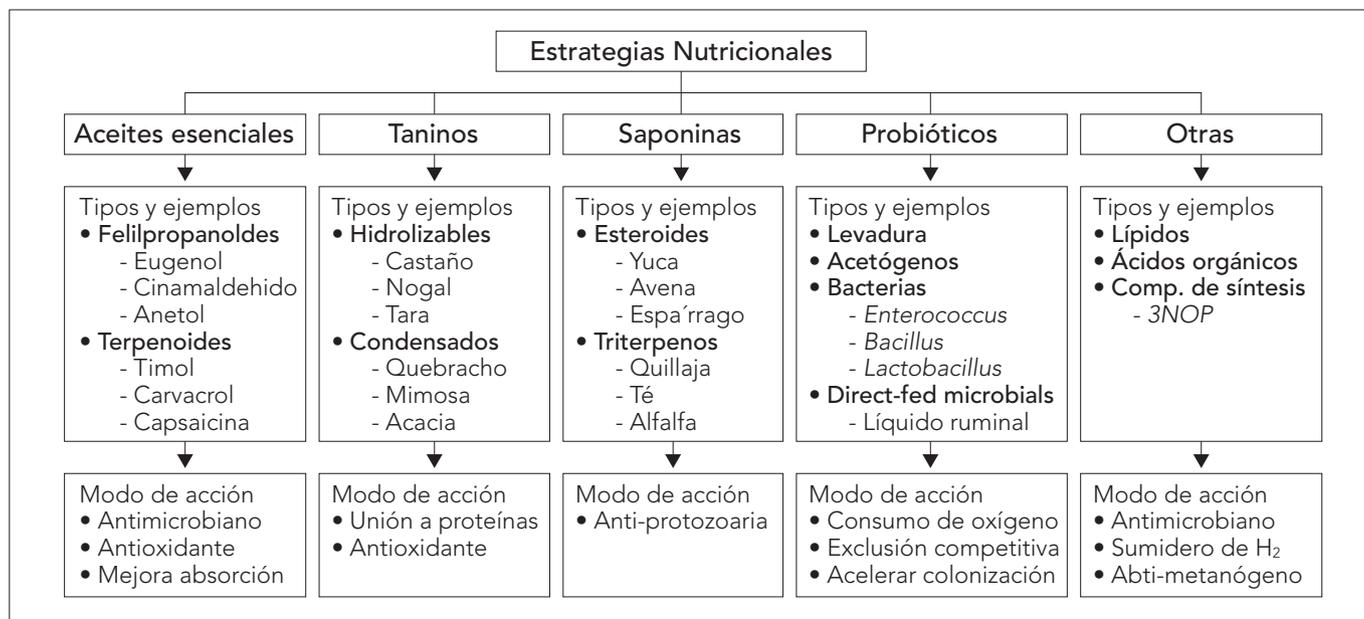


Figura 1. Descripción de las estrategias nutricionales y su modo de acción.

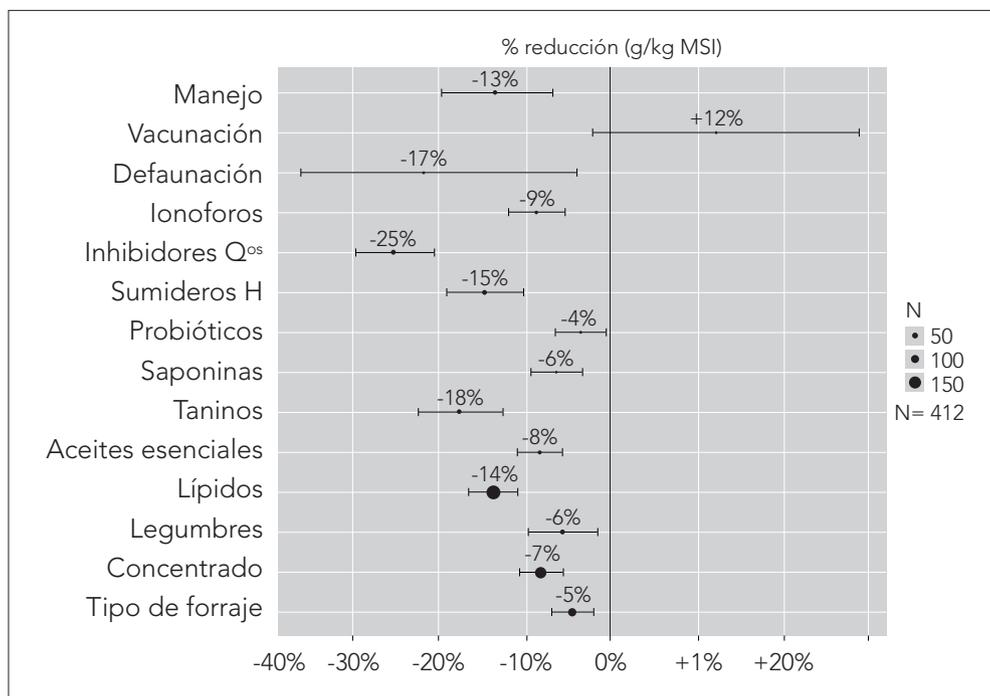
## Aceites esenciales

Los aceites esenciales (AE) son mezclas complejas de metabolitos secundarios hidrofóbicos y volátiles. Químicamente, la mayoría de los aceites esenciales son metabolitos secundarios del terpeno y fenilpropano (Fig. 1). Los terpenoides más comunes destacando el linalool, carvacrol, timol y limoneno, mientras que dentro de los fenilpropanoides se encuentran el cinamaldehído, eugenol y anetol. Aunque la actividad biológica de los AE depende ampliamente del tipo de compuesto, su concentración y sus actividades simbióticas y/o antagónicas, es generalmente aceptado que gran parte de su actividad deriva de su naturaleza hidrofóbica, ocasionando un incremento en la permeabilidad de la membrana bacteriana y mitocondrial a iones y otros compuestos citoplasmáticos. En este sentido, las bacterias Gram-positivas suelen presentar una mayor sensibilidad a los AE debido a la ausencia de una lipopolisacáridos de membrana, si bien el efecto no puede considerarse específico frente a especies bacterianas concretas del ecosistema ruminal. Dado que los AE suelen poseer un agradable olor, cabría esperar que su principal efecto como aditivo en dietas para rumiantes fuese un incremento en la ingestión de alimento. Sin embargo, tras revisar 33 de los últimos ensayos in vivo (Yáñez-Ruiz & A, 2020) observamos que únicamente en el 20% de ellos mostró un incremento en la ingestión, si bien, la eficiencia alimentaria aumentó en un 87% de estudios. Entre los posibles modos de acción se encuentra la modulación de la fermentación ruminal, efecto anti-protozoario y anti-oxidante, mejora de la absorción de nutrientes como el calcio y el amonio a través de la pared ruminal. En un meta-análisis incluyendo 24 estudios (Fig. 2), se concluyó que la suplementación con saponinas redujo de media un 8% las emisiones de metano

de origen entérico, aunque con una elevada discrepancia entre ensayos (Veneman y cols., 2016). Esta inconsistencia de resultados, en lo referido al uso de AE puede deberse a diferencias en el tipo de compuesto, dosis o duración del tratamiento. En este sentido, recientemente en un meta-análisis hemos observado un incremento en la producción de leche del 3,8% cuando las vacas reciben una mezcla de AE a razón de 1g/d, si bien los efectos solamente son significativos tras al menos 4 semanas de administración de AE (Belanche y cols., 2019). Ello sugiere, que los animales precisan de un cierto tiempo de tratamiento para mostrar consecuencias productivas.

## Taninos

Los taninos son poli-fenoles de alto peso molecular y de estructura variable que poseen una capacidad para formar complejos reversibles e irreversibles con proteínas, aunque también en menor medida con polisacáridos, alcaloides, minerales y otros compuestos. Los taninos se clasifican en dos grupos: los taninos condensados (TC) son compuestos no ramificados y de mayor peso molecular (1.000-20.000 Da) que los taninos hidrolizables (TH, 500-3.000 Da). El quebracho y el castaño son los máximos representantes de TC y TH, respectivamente, aunque otras especies como el la acacia, el roble, el argán y algunas leguminosas también son fuentes de taninos. El principal modo de acción de los taninos en nutrición de rumiantes se basa en la reducción de la degradación de la proteína dietética en el rumen. El pH neutro del rumen favorece la formación de complejos tanino-proteína, ocasionando un descenso en su degradación a amonio y aumentando del flujo duodenal de proteína. Estos compuestos se disocian cuando el pH es menor a 3,5,



**Figura 2.** Resumen de algunas estrategias de mitigación de metano entérico (Veneman y cols., 2016).

como ocurre en el abomaso, o pH superior a 8 como ocurren en el duodeno, por lo que la mayor parte de la proteína de dichos complejos es liberada en el intestino para su posterior absorción. Además de este mecanismo de acción, los taninos también pueden ejercer una inhibición de ciertas enzimas bacterianas y fúngicas, además de poseer actividad anti-microbiana a nivel ruminal. A diferencia de los AE, los taninos suelen ocasionar un descenso en el consumo de alimento por parte del rumiante debido a su sabor amargo y astringente, especialmente cuando los TC son utilizados a dosis altas. En este sentido, las cabras parecen tolerar mejor los taninos que las ovejas y las vacas. La suplementación con taninos mostró un descenso del 18% de las emisiones de metano entérico en base a un meta-análisis de 40 estudios (Fig. 2). Dicho descenso parece deberse a un efecto anti-microbiano directo sobre los metanógenos, así como al descenso en la digestión de fibra en el rumen fruto de su efecto anti-protozoario. Sin embargo, dada la variabilidad observada, se precisa de más ensayos para validar esta estrategia de mitigación. En cuanto a los efectos sobre el animal, los taninos reducen la digestibilidad del alimento ocasionando un incremento de la excreción de nitrógeno fecal, así como una disminución del nitrógeno urinario, aspecto, este último que podría minimizar la volatilización nitrogenada y las emisiones de amoníaco y óxido nítrico a la atmósfera. El efecto de los taninos sobre la productividad es variable, en general es aceptado que elevadas dosis de taninos (> 5% de la dieta) repercute negativamente sobre la ingestión, digestibilidad y productividad, sin embargo niveles moderados (1-3% de la dieta) parecen no presentar efectos perjudiciales a nivel productivo.

## Saponinas

Las saponinas son compuestos secundarios, principalmente de origen vegetal, que son capaces de reaccionar con soluciones acuosas generando una espuma estable similar al jabón. Químicamente, se trata de glucósidos de alto peso molecular en los que el azúcar está unido a una aglicona hidrofóbica (sapogenina) que puede ser de origen triterpenoide o esteroideo. Las saponinas triterpenoides se encuentran en algunas legumbres como el quillay, alfalfa, guisantes, judías y soja, así como en otras plantas como la quinoa, té, espinacas, girasol o el ginseng. Mientras que las saponinas esteroideas están presentes en la yuca, avena, espárrago, berenjena y el pimiento, entre otros. El quillay y la yuca son las fuentes más comunes de saponinas y sus extractos se encuentran comercialmente disponibles para alimentación animal. En cuanto al modo de acción, las saponinas dañan la membrana protozoaria reduciendo el número de protozoos ruminales (hasta el 50%) y su actividad. Algunas saponinas también parecen tener cierta actividad anti-microbiana frente a las arqueas metanogénicas ruminales (Belanche y cols., 2016). Como consecuencia de ello, se ha observado que la suplementación con saponinas reduce un 6% las emisiones de metano de origen entérico (Fig. 2). Dichos efectos, aunque variables, parecen ser más obvios cuando los rumiantes son alimentados con dietas forrajeras que con dietas ricas en concentrado. Sin embargo, existe amplia evidencia de que los efectos anti-protozoarios de las saponinas son transitorios debido a que las bacterias ruminales se adaptan a la presencia de saponinas inactivándolas por desglicosilación. Para prevenir este fenómeno se ha sugerido varias estrategias como: i) suplementación intermitente para

evitar la adaptación bacteriana, ii) uso combinado de varios tipos de saponinas y, iii) uso de saponinas modificadas químicamente para incrementar su resistencia a la degradación. Aunque algunos estudios han mostrado efectos positivos de la suplementación de saponinas sobre la producción de leche y ganancia de peso en rumiantes en crecimiento (Yáñez-Ruiz & A, 2020), los resultados dependen del tipo de saponina, dosis, duración del tratamiento y tipo de animal y dieta. Algunos ensayos han mostrado un efecto beneficioso de las saponinas sobre el flujo de proteína microbiana al intestino (Santoso y cols., 2007), posiblemente debido al descenso de la depredación bacteriana por parte de los protozoos ruminales. Sin embargo, este efecto beneficioso a nivel protéico puede verse compensado por un descenso en la degradación de fibra por parte de los protozoos, ocasionando un efecto negativo a nivel energético. Por lo tanto, se considera que las saponinas puede resultar beneficiosas en rumiantes con altas necesidades proteicas, como animales en crecimiento alimentados con bajos niveles de proteína pero donde la energía no es el factor limitante en la dieta. Por contrario, las saponinas no estarían aconsejadas cuando el forraje, especialmente si es de baja calidad, representa la principal fuente de alimento para el rumiante, o cuando la dieta satisface sobradamente las necesidades proteicas del animal.

### Probióticos

El uso de probióticos en alimentación de rumiantes posee una larga trayectoria. Entre ellos, la levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) ha sido el más ampliamente utilizado para prevenir la acidosis ruminal. Dado que es un microorganismo anaerobio facultativo, es capaz de utilizar oxígeno incluso cuando se encuentra a baja concentración, por lo que su principal modo se basa en la reducción de la presión parcial de oxígeno a nivel ruminal favoreciendo el crecimiento de microorganismo anaerobios estrictos como la mayoría de las bacterias fibrolíticas (Newbold y cols., 1996). Fruto de ello, se ha observado que la suplementación con levadura puede aumentar la digestibilidad del alimento en rumiantes adultos, sin embargo el efecto sobre las emisiones de metano es despreciable (Fig. 2).

El uso de acetógenos como probióticos también se ha propuesto como una estrategia para reducir las emisiones de metano. La acetogénesis reductiva es un mecanismo natural de captación de hidrógeno dominante en varios mamíferos de fermentación post-gástrica (roedores y humanos), y en algún fermentador pre-gástrico (canguros). El producto final de dicha ruta metabólica es el acetato que representa una fuente de energía para el animal. Sin embargo los resultados han sido poco prometedores porque las bacterias acetógenas son poco abundantes en el rumen y son menos eficientes que los metanógenos en la captación de hidrógeno. Por ello los acetógenos a nivel ruminal compiten en desventaja con los metanógenos, incluso aunque sean suplementados como probiótico.

Además de la levadura, hoy en día también se utilizan otros probióticos en alimentación animal como algunas de pepas de *Enterococcus*, *Bacillus* y *Lactobacillus*, sin bien su uso esta principalmente destinado a rumiantes jóvenes para prevenir problemas digestivos a nivel intestinal. En nuestro grupo de investigación también estamos estudiado el uso de especies autóctonas del rumen a modo de probióticos. En concreto hemos observado que la inoculación directa de líquido ruminal de rumiantes adultos a animales jóvenes permite acelerar el desarrollo microbiológico y fisiológico ruminal, facilitando el paso de alimentación líquida a sólida y favoreciendo el proceso de destete (Belanche y cols., 2019). A pesar de que los animales inoculados presentaron una mayor ingestión de forraje tras el destete, queda por dilucidar la persistencia de dichos efectos en el animal adulto bajo diferentes situaciones productivas. De forma similar, también estamos estudiando el concepto de trasplante de microbiota fecal en animales jóvenes para prevenir y/o tratar situaciones de disbiosis intestinal como consecuencia del uso de antibióticos orales.

### Lípidos

La suplementación de la dieta con lípidos permite incrementar la densidad energética de la dieta sin incrementar el aporte de carbohidratos fácilmente fermentables (almidón). Por lo tanto es una estrategia apropiada para animales de alta producción donde la ingestión de alimento puede ser limitante (e.g. pico de lactación bajo estrés por calor). Dicha estrategia permite cubrir las necesidades energéticas del animal, así como prevenir descensos en el contenido graso de la leche. Sin embargo, la suplementación con lípidos también es un método eficaz para reducir las emisiones de metano de origen entérico. Un meta-análisis de 179 estudios mostró una reducción consistente de aproximadamente el 14% en las emisiones de metano cuando la dieta fue suplementada con lípidos (Fig. 2). Además se han descrito ecuaciones de predicción que sugieren una reducción en la emisiones de metano del 2,2% en vacas lecheras y del 5,6% en vacas de carne y ovejas por cada 1% de inclusión de lípidos en la dieta, independientemente del tipo de lípido (Martin y cols., 2010). Sin embargo, existen evidencias que los ácidos grasos (AG) de cadena media como el ácido láurico (C12:0) y el mirístico (C16:0) son especialmente efectivos (7.3% de descenso por unidad porcentual de lípidos añadidos), así como los AG poli-insaturados como el linoleico y el linolénico (4,3% de descenso). En base a ello, los efectos varían dependiendo si se utilizan fuentes ricas en AG insaturados (girasol, colza, lino y soja) o saturados (coco y plama). El mecanismo de acción de los lípidos como aditivo es múltiple: i) al no ser fermentados en el rumen disminuyen la producción de hidrógeno, que unido a la incorporación de hidrógeno durante el proceso de bio-hidrogenación ocasiona un descenso en la producción de metano ruminal, ii) los AG de cadena media poseen ciertos efectos anti-metanógenos, iii) los AG polinsa-

turados son tóxicos para bacterias celulíticas y protozoos, iv) y los AG de cadena larga alteran la membrana de bacterias Gram-positivas. Todos estos cambios microbiológicos suelen favorecer una fermentación propiónica, y por consiguiente más eficiente. Sin embargo, no se recomienda añadir más de un 5% de lípidos en las dietas de rumiantes debido a puede comprometer la función ruminal, además de poder modificar el perfil lipídico de la leche y carne de dichos animales.

### Ácidos orgánicos

La utilización de ácidos orgánicos como el malato, fumarato, aspartato y acrilato ha mostrado resultados muy prometedores *in vitro*. Todo ellos son precursores del propionato y butirato, por lo tanto pueden actuar como aceptores de hidrógeno compitiendo con los metanógenos ruminales (Newbold y Rode, 2006). Estos ácidos orgánicos, o sus metabolitos, son reducidos por la acción de las bacterias ruminales que usan hidrógeno o formato como fuente de electrones para producir succinato y finalmente propionato. Aunque un meta-análisis mostró un descenso medio del 15% en las emisiones de metano mediante al adición de sumideros de hidrógeno (Fig. 2), la mayoría de los 40 estudios fueron realizados *in vivo*. La utilización de ácidos orgánicos *in vivo* presenta algunos retos, en primer lugar se precisa de cantidades relativamente altas de esos sustratos para que su efecto sea visible (hasta 200 g al día en vacuno), lo que puede hacerlo económicamente inviable, y en segundo lugar algunos de estos ácidos orgánicos (e.g. fumarato) pueden ocasionar problemas de palatabilidad y reducir el consumo de alimento por parte del rumiante.

### Compuestos de síntesis

Además de los extractos de plantas, uno de los compuestos más prometedores para reducir la metanogénesis ruminal ha sido el 3-nitroxilpropanol (NOP). Esta molécula de síntesis es un análogo de la sub-unidad metil-coenzima M de la enzima metil-coenzima M níquel reductasa existente en las arqueas ruminales. Esta enzima cataliza el último paso de la ruta de formación de metano en las arqueas, por lo que su inhibición suele acarrear una reducción en las emisiones de metano de hasta el 30% sin ocasionar efectos negativos en el animal (Hristov y cols., 2015). Sin embargo, los efectos sobre la productividad suelen ser mínimos debido a que el hidrógeno que no es transformado en metano se acumula en el rumen sin ser aprovechado. Por ello, una de nuestras líneas de investigación se centra en la redirección de este exceso de hidrógeno hacia sumideros alternativos que puedan redirigirlo hacia productos de fermentación utilizables por el animal. Además del 3NOP, se han utilizado otros compuestos de síntesis con actividad inhibitoria de la metanogénesis ruminal como el bromoclorometano, 2-bromoetanosulfonato y el cloroformo. En este sentido, un meta-análisis de 52 estudios mostró un descenso medio del 25% en las emisiones de metano, si bien la mayoría de dichos

estudios también fueron realizados *in vitro* (Fig. 2). Por ello, hoy en día el uso de inhibidores químicos parece representar una de las estrategias de mitigación más prometedoras en alimentación de rumiantes.

### Conclusión

La presencia de una compleja microbiota ruminal permite a los rumiantes fermentar alimentos fibrosos y subproductos en productos de fermentación asimilables por los rumiantes. Aunque este proceso ha sido evolutivamente optimizado durante miles de años, existe un potencial de mejora sustancial para adaptarlo a los actuales modelos de producción. La utilización de extractos de plantas como aceites esenciales, taninos y saponinas, así como la suplementación de la dieta con lípidos, ácidos orgánicos, probióticos y compuestos de síntesis, representan alternativas para incrementar la productividad o reducir el impacto ambiental derivado de la metanogénesis ruminal e ineficiencia de los procesos digestivos. El desarrollo de técnicas de secuenciación masiva está permitiendo describir el modo de acción de dichas estrategias, así como avanzar en el conocimiento de la modulación del microbioma ruminal para satisfacer las actuales exigencias en la producción de rumiantes.

### Bibliografía

- Belanche A, Zweifel B, Yáñez-Ruiz D. Effects of an essential oils blend on the productivity and methane emissions in dairy cows: meta-analysis. Foz do Iguassu, Brazil: GGAA; 2019
- Belanche A, Pinloche E, Preskett D, Newbold CJ. Effects and mode of action of chitosan and ivy fruit saponins on the microbiome, fermentation and methanogenesis in the rumen simulation technique. FEMS Microbiol Ecol. 2016; 92: fiv160.
- Belanche A, Palma-Hidalgo JM, Martín-García AI, Yáñez-Ruiz DR. Efecto de la presencia de animales adultos con cabritos durante la lactancia sobre la fermentación ruminal. Zaragoza: AIDA-ITEA; 2019.
- Hristov AN, Oh J, Giallongo F, Frederick TW, Harper MT, Weeks HL, et al. An inhibitor persistently decreased enteric methane emission from dairy cows with no negative effect on milk production. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015; 112: 10663-8.
- Martin C, Morgavi D, Doreau M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. Animal. 2010; 4: 351-65.
- Newbold CJ, Rode L. Dietary additives to control methanogenesis in the rumen. Int Congr Ser. 2006; 1293: 138-47.
- Newbold CJ, Wallace R, McIntosh F. Mode of action of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a feed additive for ruminants. Br J Nutr. 1996; 76: 249-61.
- Santoso B, Kilmaskossu A, Sambodo P. Effects of saponin from *Biophytum petersianum* Klotzsch on ruminal fermentation, microbial protein synthesis and nitrogen utilization in goats. Anim Feed Sci Technol. 2007; 137: 58-68.
- Veneman JB, Saetnan ER, Clare AJ, Newbold CJ. MitiGate; an online meta-analysis database for quantification of mitigation strategies for enteric methane emissions. Sci Total Environ. 2016; 572: 1166-74.
- Yáñez-Ruiz DR & A B. Plant secondary compounds: Their role in ruminant nutrition and productivity. Improving rumen function. En: McSweeney C, Mackie R (eds.). Cambridge: Burleigh Dodds Science Publishing; 2020.

# Designing a probiotic for eradication of group B streptococci (GBS) during pregnancy: from selecting a target-specific strain to providing clinical evidences

David A. Beltrán<sup>1</sup>, Virginia Martín<sup>2†</sup>, Nivia Cárdenas<sup>3‡</sup>, Juan M. Rodríguez<sup>2</sup>, Leónides Fernández<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Diagnóstico Médico; Ayuntamiento de Madrid, Spain. <sup>2</sup>Dpt. Nutrition and Food Science; Complutense University of Madrid; Madrid, Spain. <sup>3</sup>Dpt. Galenic Pharmacy and Food Technology; Complutense University of Madrid, Madrid, Spain. <sup>†</sup>Current address: Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III; Majadahonda, Madrid, Spain. <sup>‡</sup>Current address: ProbiSearch S.L.U.; Tres Cantos, Madrid, Spain.

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):42-46

## Abstract

*Streptococcus agalactiae* (Group B Streptococci, GBS) is one of the microorganisms that are most frequently associated to neonatal infections. Antenatal culture-based screening of pregnant women allows identifying GBS carriers. In case of positive recto-vaginal culture for GBS, intrapartum antibiotic prophylaxis (IAP) is used to prevent vertical transmission of GBS to the neonate. Alternatives to antibiotics are needed due to limitations associated to such strategy, including its negative impact on the acquisition, composition and development of infant microbiota. First, the vaginal microbiota of non-pregnant (n= 30) and pregnant (n= 24) women was studied, including the assessment of GBS colonization. A total of 89 *Lactobacillus* isolates were obtained and, then, 10 *Lactobacillus salivarius* strains from healthy women were selected for further characterization. The best candidate for GBS eradication after *in vitro* characterization, including the inhibition of different *S. agalactiae* strains, was *L. salivarius* CECT 9145. Next, a pilot trial involving 57 healthy pregnant women was designed to test the efficacy of *L. salivarius* CECT 9145 to eradicate GBS from the intestinal and vaginal tracts of pregnant women. GBS-positive women in the probiotic group (n= 25) consumed ~9 log<sub>10</sub> cfu of *L. salivarius* CECT 9145 daily from week 26 to week 38. The rectal and vaginal GBS colonization was reversed in 72% and 68% of

the women in this group, respectively, at the end of the trial (week 38). In conclusion, oral administration of *L. salivarius* CECT 9145 seems to be an efficient method to reduce the number of GBS-positive women during pregnancy. This will reduce the number of women receiving IAP during delivery.

**Key Words:** *Lactobacillus salivarius*, *Streptococcus agalactiae*, GBS, probiotic, pregnancy.

## The burden of neonatal sepsis

Neonatal sepsis is a systemic infection occurring in infants at ≤ 28 days of life. The World Health Organization estimates that 1 million deaths per year (10% of all under-five mortality) are due to neonatal sepsis and that 42% of these deaths occur in the first week of life<sup>(1)</sup>. Neonatal sepsis contributes substantially to neonatal morbidity and mortality, and is a major global public health challenge worldwide<sup>(2)</sup>.

According to the age of onset, neonatal sepsis is divided into early-onset sepsis (EOS) and late-onset sepsis (LOS). EOS has been variably defined based on the age at onset, with bacteremia or bacterial meningitis occurring at ≤ 72 h in infants hospitalized in the neonatal intensive care unit versus < 7 days in term infants. EOS reflects transplacental or ascending infections from the maternal genitourinary tract,

whereas LOS is associated with the postnatal nosocomial or community environments.

The characteristics of the microorganisms causing neonatal sepsis are of primary importance in guiding clinical practice, and strategies to prevent and treat them may influence, in turn, the pattern of pathogens involved in such infections. In fact, the etiology of neonatal sepsis varies with geographical location and changes over time. The microorganisms most frequently involved in EOS, taking in account both term and preterm infants together, are *Streptococcus agalactiae* (group B streptococci, GBS) and *Escherichia coli*, which account for approximately 70% of infections<sup>(3)</sup>. Additional pathogens to consider, which account for the remaining minority of cases, are other streptococci (most commonly *viridans* group streptococci but also *Streptococcus pneumoniae*), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* spp., other Gram-negative enteric bacilli (such as *Enterobacter* spp.), *Haemophilus* spp., and *Listeria monocytogenes*<sup>(3)</sup>. However, when only preterm infants are considered, the burden of disease attributable to *E. coli* and other Gram-negative rods increases, making Gram-negative sepsis the most common etiology of EOS in this population<sup>(4)</sup>.

The distribution pattern of causative pathogens varies across regions and may change over time within the same hospital due to demographic characteristics of patients, host and environmental microbiota and the policy of feeding and antibiotic use. It should be noted that the wide (and often empirical) use of broad-spectrum antibiotics in the past decades has contributed to an increasing incidence of multi-drug (MDR)-resistant Gram-negative bacilli, which account for approximately 20% of bacteremia cases, and are associated with a 2.8-fold increase in neonatal mortality rate when compared to cases of sepsis caused by non-MDR strains<sup>(5)</sup>.

Globally, preterm birth is a significant contributor to neonatal death. Every year, approximately 6,000,000 births are preterm, and more than 500,000 neonates die due to prematurity, accounting for 44% of all deaths under the age of 5 years<sup>(6,7)</sup>. The majority of early preterm births are due to microbial infection<sup>(8)</sup>, and approximately 10% are attributable to GBS<sup>(9,10)</sup>.

### **The case of *Streptococcus agalactiae*: a challenge during pregnancy and delivery**

*S. agalactiae* is one of the microorganisms most frequently involved in severe neonatal EOS cases. Women, men and children of all ages in both developed and developing countries can be colonized with GBS without having any symptoms. The gastrointestinal tract, vagina and urethra serve as reservoirs for GBS. In other words, *S. agalactiae* is a pathobiont that is often part of the normal microbiota found in the gastrointestinal and genitourinary tracts of healthy women<sup>(11)</sup>. Since the 1970s, GBS is considered one of the main risk factors for preterm birth<sup>(12)</sup> and one of the most

common causes of neonatal infectious morbidity and mortality in Europe, North America and Australia<sup>(13, 14)</sup>.

GBS serotypes Ia, II, III and V are responsible for early onset episodes caused by this species<sup>(15)</sup>. In contrast, late onset disease is caused predominantly by serotype III<sup>(14)</sup>. The maternal colonization rate usually ranges from 12 to 28%, independently of the countries or socio-economic status of the screened women<sup>(16)</sup>, while such rate has been reported to oscillate from 12 to 20% in Spain<sup>(17)</sup>. However, only 1-2% of the neonates born from non-treated GBS-positive women develop GBS sepsis<sup>(18)</sup>.

The relevance of GBS as an agent of neonatal infections prompted the finding of strategies for its eradication from the intestinal and genitourinary mucosal surfaces of pregnant women. To date, four approaches have been recommended for the prevention of neonatal GBS infections: (a) a risk-based strategy; (b) an universal GBS screening-based strategy (vaginal/rectal GBS cultures); (c) a combined risk/screening-based strategy; and (d) a combined risk/screening-based strategy using the PCR test<sup>(19)</sup>.

In Spain, recto-vaginal GBS screening at week 35-38 of pregnancy, and subsequent intrapartum antibiotic prophylaxis (IAP), to GBS-positive and unknown GBS status women is the most common strategy used to prevent neonatal GBS neonatal infections. However, such strategy does not prevent GBS-related abortions, stillbirths and preterm births, and may lead to increasing rates of antibiotic resistance among clinically relevant microorganisms<sup>(20,21)</sup>. In addition, it has a very negative impact on the acquisition, composition and development of the infant microbiota<sup>(22-25)</sup>. GBS vaccines are not available at present and, therefore, there is a need for alternative strategies to avoid GBS colonization during pregnancy. In this context, the general objective of this work was the selection of a safe probiotic strain with the ability to eradicate GBS from the intestinal and genitourinary tracts of pregnant women. The work was divided in three partial objectives, which will be briefly described below (for a detailed description of the study, see<sup>(26)</sup>).

### **Objective 1: Assessment of the vaginal microbiota of pregnant and non-pregnant women**

The first partial objective of this work was the study of the vaginal microbiota of pregnant and non-pregnant women, including the assessment of the GBS colonization rates and the preliminary selection of lactobacilli strains from GBS-negative women. A total of 54 fertile healthy women (30 non-pregnant women and 24 pregnant ones) participated in this study. Non-pregnant women provided 4 vaginal exudate samples (days 0, 7, 14 and 21 of their menstrual cycles) while pregnant women provided a single sample collected at week 35-37 of pregnancy. Samples were cultured on a wide variety of culture media and the identification of the isolates was performed by PCR sequencing of the 16S rDNA gene or

MALDI-TOF. The percentage of GBS positive women was 19% and 25% among pregnant and non-pregnant women, respectively.

A total of 89 *Lactobacillus* isolates were obtained from the vaginal swabs and, subsequently, submitted to RAPD genotyping to avoid duplication of isolates. Among them, 10 *Lactobacillus salivarius* strains were selected for further characterization on the basis of the following criteria: (1) absence of *S. agalactiae*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida* spp., *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma* spp. in the vaginal samples from which the lactobacilli were originally isolated; (2) Qualified Presumption of Safety (QPS) status conceded by the European Food Safety Authority (EFSA); and (3) ability of the strain to grow rapidly in MRS broth under aerobic conditions ( $\geq 1 \times 10^6$  cfu/mL after 16 h at 37°C).

## Objective 2: *In vitro* and *in vivo* characterization of the pre-selected strains

Initially, an overlay method was used to determine the ability of the lactobacilli strains to inhibit the growth of 12 different *S. agalactiae* strains, 6 isolated from blood or cerebrospinal fluid in clinical cases of neonatal sepsis and the remaining 6 from vaginal samples of pregnant women. Clear inhibition zones (ranging from 2 to 20 mm) were observed around the lactobacilli streaks. In relation to the antimicrobial compounds that may be responsible for such activity, the concentration of L-lactic acid in the supernatants obtained from MRS cultures was similar (~10 mg/mL) for all the lactobacilli. In contrast, D-lactic acid was not detected in the supernatants of the tested strains. All the strains acidified the MRS-broth medium to a final pH of ~4 after 16 h of incubation. No bacteriocin-like activity could be detected against the tested *S. agalactiae* strains and two strains (*L. salivarius* CECT 9145 and V7IV-1) were able to produce hydrogen peroxide (~7.4 µg/mL). The capacity of the lactobacilli strains to form large, well defined co-aggregates with *S. agalactiae* was strain-dependent.

Co-culture with *S. agalactiae* seemed not to affect the growth of any of the *L. salivarius* strains. In contrast, most of the *L. salivarius* strains were able to interfere at a higher or lower degree with the growth of the different *S. agalactiae* strains included in this assay. Among them, *L. salivarius* CECT 9145 showed the highest ability to inhibit the growth of *S. agalactiae* since the presence of two of the four *S. agalactiae* strains was not detectable in the co-cultures and the concentration of the other two showed a ~2.5 log<sub>10</sub> decrease after an incubation period of only 6 h at 37°C. No viable streptococci could be detected when the co-cultures were incubated for 24 h.

The lactobacilli strains tested were strongly adhesive to both Caco-2 and HT-29 cells and, in addition, all of them showed adhesion to vaginal epithelial cells. *L. salivarius* CECT 9145 globally displayed the highest ability to

adhere to both intestinal and vaginal epithelial cells. The lactobacilli strains tested showed a variable ability to adhere to porcine mucin. *L. salivarius* CECT 9145 was the strain that showed the highest adherence ability followed by *L. salivarius* V7IV-1. None of the strains were able to degrade gastric mucin *in vitro*.

The viability of the strains after exposition to conditions simulating those found in the gastrointestinal tract varied from ~64% (*L. salivarius* CECT 9145) to 30% (*L. salivarius* V3III-1). All the lactobacilli strains were sensitive to most of the antibiotics tested, including those with a special clinical relevance such as gentamycin, tetracycline, clindamycin, chloramphenicol, and ampicillin, showing MICs equal to, or lower than, the breakpoints defined by EFSA<sup>(27)</sup>. All the strains were resistant to vancomycin and kanamycin, which are intrinsic properties of the *L. salivarius* species. The *L. salivarius* strains neither produced biogenic amines nor harbored the genes required for the biosynthesis of this type of compounds.

Globally, *L. salivarius* CECT 9145 was the strain that showed the best results as a candidate for future clinical trials<sup>(26)</sup>. Subsequently, its potential acute and repeated dose (4 weeks) oral toxicity was evaluated in a rat model. In addition, the potential translocation of this strain to blood and some organs was also investigated in the same animal model. In the acute (limit test) study, 24 rats (12 males, 12 females) were distributed into two groups of 6 males and 6 females each. Each rat received skim milk (500 µL) orally (control group or Group 1), or a single oral dose of  $1 \times 10^{10}$  colony-forming units (cfu) of *L. salivarius* CECT 9145 dissolved in 500 µL of skim milk (treated group or Group 2). Animals were checked for clinical signs and mortality twice a day. At the end of a 14 days observation period, the rats were weighed, euthanized and necropsied. No abnormal clinical signs, behavioural changes, body weight changes, macroscopic findings, or organ weight changes were observed. All animals survived the 2-week observation period. There were no statistical differences in body weights among groups. Similarly, no statistically significant differences in body weight gain, food and water consumption were noted. The hematological and clinical chemistry parameters assessed after 2 weeks of administration of the strain were not significantly different compared with those of controls. There were no statistical differences in organ weight or organ body weight ratios related to the test strain. *L. salivarius* CECT 9145 was not associated with any incidence of macroscopic and microscopic changes. Therefore, *L. salivarius* CECT 9145 has a low order of acute toxicity and the oral lethal dose (LD<sub>50</sub>) for male and female rats is higher than  $1 \times 10^{10}$  cfu.

The repeated dose (4 weeks) (limit test) study was conducted in 48 rats (24 males, 24 females) divided in four groups of 6 males and 6 females each (control group or group 3; treated group or group 4; satellite control group or group

5; and satellite treated group or group 6). Rats received a daily dose of either skim milk (500 µL) (groups 3 and 5) or  $1 \times 10^9$  cfu of *L. salivarius* CECT 9145 dissolved in 500 µL of skim milk (groups 4 and 6) orally once a day over 4 weeks. Animals were checked for clinical signs and mortality twice a day. All rats of the groups 3 and 4 were euthanized and necropsied on day 29. All animals of the satellite groups (groups 5 and 6) were kept a further 14 days without treatment to detect delayed occurrence of toxic effects. All rats of the groups 5 and 6 were euthanized and necropsied on day 42. No mortality was observed. No treatment-related changes in the general condition and external appearance were observed in the treated rats. The development of the animals during the experimental period corresponded to their species and age. There was no significant difference in body weight, body weight gain, and water and food consumption among groups treated with *L. salivarius* CECT 9145 in comparison to the control groups at any time point of the experimental period. All hematology data were within normal limits and differences between groups were no observed. Clinical chemistry data showed no treatment-related alterations at the end of the 4-weeks treatment period. Individual values and group mean values were within the physiologic ranges. Necropsies did not reveal any gross pathological changes or any differences in organ weights in comparison to the corresponding control groups. The no-observed-adverse-effect level in this repeated dose oral toxicity study was the dose tested, i.e.  $1 \times 10^9$  cfu of *L. salivarius* CECT 9145.

In order to determine changes in the antioxidant defense because of the probiotic treatment, liver GSH concentration was determined. No significant differences in liver GSH concentration were observed between control and treated groups. This indicates that treatment with *L. salivarius* CECT 9145 did not cause oxidative stress to rats and is consistent with the absence of bacteremia since no lactobacilli could be isolated from blood, liver or spleen of the rats. *L. salivarius* CECT 9145 could be isolated from colonic material and vaginal swabs samples of all the treated animals (probiotic groups) at the end of the treatment while it could not be detected in any sample from the placebo groups.

### Objective 3: Clinical trial to assess the efficacy of *L. salivarius* CECT 9145 for GBS eradication during pregnancy

Finally, the efficacy of *L. salivarius* CECT 9145 to eradicate GBS from the intestinal and vaginal tracts of pregnant women was evaluated in a human clinical trial. A total of 57 healthy pregnant women (39 rectal and/or vaginal GBS-positive women; 18 rectal and vaginal GBS-negative women at the start of the intervention) participated in this study. Volunteers were distributed into 3 groups. All the volunteers in the probiotic group ( $n= 25$ ) were GBS-positive and consumed a daily sachet with ~50 mg of freeze-dried probiotic

(~ $9 \log_{10}$  cfu of *L. salivarius* CECT 9145) from week 26 to week 38 of pregnancy. Recto-vaginal GBS screening was performed at 28, 32 and 36-38 weeks. Placebo subgroup 1 ( $n= 14$ ) included GBS-positive women that were going to receive IAP because they had a previous baby that suffered a GBS sepsis. Placebo subgroup 2 ( $n= 18$ ) included GBS-negative women.

All the women of the placebo subgroup 1 remained positive while all the women of the placebo subgroup 2 remained negative at the different sampling points. Women of the probiotic group also tested positive for GBS at 28 weeks, but an increasing number of GBS-negative results appeared in the successive swabs collected until delivery. At 30 weeks, culture of rectal swabs taken from four women of this group rendered a negative result and the number of these samples increased to 18 (72% of the participants) at 38 weeks. Similar results were obtained culturing vaginal swabs obtained from this group, although the proportion of women testing negative for GBS were always slightly higher when analyzing the rectal swabs than in the vaginal ones. In this group, the mean value for *S. agalactiae* counts decreased significantly with the administration time of *L. salivarius* CECT 9145, from a mean value of  $5.14 \log_{10}$  cfu/mL at 26 weeks ( $n= 25$ ) to  $3.80 \log_{10}$  cfu/mL at 38 weeks ( $n= 9$ ). No adverse effects arising from the intake of *L. salivarius* CECT 9145 were reported by any of the women that participated in this study. Therefore, the clinical trial indicates that *L. salivarius* CECT 9145 is a safe and efficient method to reduce the number of GBS-positive women during pregnancy<sup>(26)</sup>.

In summary, our study includes the whole process from strain isolation to a pilot clinical study specifically targeting GBS eradication in pregnant women. The criteria followed for the selection of the best candidate for such a target (*L. salivarius* CECT 9145) allowed a notable reduction in the rate of GBS-colonized women and led to a reduction in the use of antibiotics during the peripartum period. As a conclusion, the administration of *L. salivarius* CECT 9145 to GBS-positive pregnant women is a safe and successful strategy to significantly decrease the rates of GBS colonization during pregnancy and, therefore, to reduce the exposure of pregnant women and their infants to intrapartum prophylaxis.

### References

1. Lawn JE, Cousens S, Zupan J; Lancet Neonatal Survival Steering Team. 4 million neonatal deaths: when? Where? Why?. *Lancet*. 2005; 365: 891-900.
2. Qazi SA, Stoll BJ. Neonatal sepsis: a major global public health challenge. *Pediatr Infect Dis J*. 2009; 28(1 Suppl): S1-2.
3. Simonsen KA, Anderson-Berry AL, Delair SF, Davies HD. Early-onset neonatal sepsis. *Clin Microbiol Rev*. 2014; 27: 21-47.
4. Hornikab CP, FortaP, Clark RH, Watabb K, Benjamin DK, Smith PB. Early and late onset sepsis in very-low-birth-weight infants from a large group of neonatal intensive care units. *Early Hum Dev*. 2012; 88(Suppl 2): S69-74.

5. Tsai MH, Hsu JF, Chu SM, Lien R, Huang HR, Chiang MC, et al. Incidence, clinical characteristics, and risk factors for adverse outcome in neonates with late onset sepsis. *Pediatr Infect Dis J.* 2014; 33: e7-13.
6. Liu I, Oza S, Hogan D, Perin J, Rudan I, Lawn JE, et al. Global, regional, and national causes of child mortality in 2000–13, with projections to inform post-2015 priorities: an updated systematic analysis. *Lancet.* 2015; 385: 430-40.
7. Mokdad AH, Forouzanfar MH, Daoud F, Mokdad AA, El Bcheraoui C, Moradi-Lakeh M, et al. Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet.* 2016; 387: 2383-401.
8. Romero R, Dey SK, Fisher SJ. Preterm labor: one syndrome, many causes. *Science.* 2014; 345: 760-5.
9. DiGiulio DB, Romero R, Amogan HP, Kusanovic JP, Bik EM, Gotsch F, et al. Microbial prevalence, diversity and abundance in amniotic fluid during preterm labor: a molecular and culture-based investigation. *PLoS One.* 2008; 3: e3056.
10. Han YW, Shen T, Chung P, Buhimschi IA, Buhimschi CS. Uncultivated bacteria as etiologic agents of intra-amniotic inflammation leading to preterm birth. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 38-47.
11. Edwards MS, Nizet V, Baker CJ. Group B streptococcal infections. In: Remington JS, Klein JO, Wilson CB, et al (Eds.). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 7<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011.
12. Lawn JE, Gravett MG, Nunes TM, Rubens CE, Stanton C; GAPPS Review Group. Global report on preterm birth and stillbirth (1 of 7): definitions, description of the burden and opportunities to improve data. *BMC Pregnancy Childbirth.* 2010; 10 Suppl 1: S1.
13. Stoll BJ, Hansen NI, Sanchez PJ, Faix RG, Poindexter BB, Van Meurs KP, et al. Early onset neonatal sepsis: the burden of group B streptococcal and *E. coli* disease continues. *Pediatrics.* 2011; 127: 817-26.
14. Le Doare K, Heath PT. An overview of global GBS epidemiology. *Vaccine.* 2013; 31(Suppl. 4): D7-12.
15. Weisner AM, Johnson AP, Lamagni TL, Arnold E, Warner M, Heath PT, et al. Characterization of group B streptococci recovered from infants with invasive disease in England and Wales. *Clin Infect Dis.* 2004; 38: 1203-8.
16. Stoll BJ, Schuchat A. Maternal carriage of group B streptococci in developing countries. *Pediatric Infectious Dis J.* 1998; 17: 499-503.
17. Alós Cortés JI, Andreu Domingo A, Arribas Mir L, Cabero Roural L, De Cueto López M, López Sastre J, et al. Prevención de la infección perinatal por estreptococo del grupo B. Recomendaciones españolas. Actualización 2012. Documento de consenso SEIMC/SEGO/SEN/SEQ/SEMFYC. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2013; 31: 159-72.
18. Baker CJ, Edwards MS. Group B streptococcal infections. In: Remington J, Klein J (Eds.). *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*, 4<sup>th</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 1995.
19. Akker-van Marle ME, Rijnders MEB, Dommelen P, Fekkes M, Wouwe JP, Amelink-Verburg MP, et al. Cost-effectiveness of different treatment strategies with intrapartum antibiotic prophylaxis to prevent early-onset group B streptococcal disease. *BJOG.* 2005; 112: 820-6.
20. Dinsmoor MJ, Vilorio R, Leif L, Elder S. Use of intrapartum antibiotics and the incidence of postnatal maternal and neonatal yeast infections. *Obstet Gynecol.* 2005; 106: 19-22.
21. Barcaite E, Bartusevicius A, Tameliene R, Kliucinskas M, Maleckiene L, Nadisauskiene R. Prevalence of maternal group B streptococcal colonisation in European countries. *Acta Obstetr Gynecol Scand.* 2008; 87: 260-71.
22. Tanaka S, Kobayashi T, Songjinda P, Tateyama A, Tsubouchi M, Kiyohara C, et al. Influence of antibiotic exposure in the early postnatal period on the development of intestinal microbiota. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009; 56: 80-7.
23. Aloisio I, Quagliarello A, de Fanti S, Luiselli D, de Filippo C, Albanese D, et al. Evaluation of the effects of intrapartum antibiotic prophylaxis on newborn intestinal microbiota using a sequencing approach targeted to multi hypervariable 16S rDNA regions. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016; 100: 5537-46.
24. Arboleya S, Sánchez B, Solís G, Fernández N, Suárez M, Hernández-Baranco AM, et al. Impact of prematurity and perinatal antibiotics on the developing intestinal microbiota: a functional inference study. *Int J Mol Sci.* 2016; 17: E649.
25. Cotten CM. Adverse consequences of neonatal antibiotic exposure. *Curr Opin Pediatr.* 2016; 28: 141-9.
26. Martín V, Cárdenas N, Ocaña S, Marín M, Arroyo R, Beltrán D, et al. Rectal and vaginal eradication of *Streptococcus agalactiae* (GBS) in pregnant women by using *Lactobacillus salivarius* CECT 9145, a target-specific probiotic strain. *Nutrients.* 2019; 11: E810.
27. EFSA Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed additives or as production organisms. *EFSA J.* 2018; 16: e05206.

# Microbiota-Intestino-Cerebro

Mónica De la Fuente

*Departamento de Genética, Fisiología y Microbiología. Universidad Complutense de Madrid.*

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):47-53

## Resumen

El eje microbiota-intestino-cerebro se basa en la comunicación neuroinmunoendocrina, la cual se establece tanto a nivel general como en cada órgano, permitiendo una adecuada homeostasis y, consecuentemente, la salud del individuo. La microbiota intestinal se va a comunicar con los sistemas homeostáticos (el nervioso, el endocrino y el inmunitario) en el intestino y desde esa localización, a través de diferentes vías, con el cerebro, influyendo en su funcionamiento. Dada la bidireccionalidad del eje, todo lo que sucede en el cerebro va a influir en el intestino, modificando su actividad y a la microbiota residente. El adecuado diálogo de todos los componentes del eje, el cual se establece de forma muy temprana tras el nacimiento, va a permitir el mantenimiento de una buena salud a lo largo de toda la vida. Muchos factores que pueden alterar ese eje, y lo hacen aumentando la oxidación-inflamación, están en la base de numerosas patologías.

## Introducción

Para entender cómo se establece el eje microbiota-intestino-cerebro y su repercusión en la salud y la enfermedad, hay que considerar el papel que tienen en el organismo los sistemas homeostáticos, el sistema nervioso, el endocrino y el inmunitario, y la comunicación bidireccional que establecen entre ellos. El estado funcional de esos sistemas y de su comunicación, lo que constituye el gran sistema neuroinmunoendocrino, es lo que va a permitir el mantenimiento de la homeostasis corporal y consecuentemente de la salud de los individuos<sup>(1-7)</sup> (Fig. 1).

## La Psiconeuroinmunoendocrinología como base del eje intestino-cerebro

Desde las neurociencias y la inmunología actualmente es plenamente aceptada la comunicación que existe entre esos complejos sistemas fisiológicos que controlan la homeostasis. De hecho, la ciencia que estudia esas interconexiones, la psiconeuroinmunoendocrinología, es también denominada “la ciencia de la salud”. No obstante, esta nueva disciplina (las primeras aportaciones científicas que iniciaron su constitución provienen de los años setenta del pasado siglo) sigue causando asombro con cada nuevo descubrimiento<sup>(8)</sup>.

La comunicación entre los sistemas reguladores, ya verificada con numerosas investigaciones, puede establecerse gracias a que los mediadores típicos de cada uno de los tres sistemas, los neurotransmisores (NT) del sistema nervioso, las hormonas (H) del endocrino y las citoquinas del inmunitario, encuentran receptores en las células de los otros sistemas y actúan sobre ellas. Además, otro hecho curioso es que las células de esos sistemas producen todos los mediadores específicos de los demás. Así, los leucocitos producen NT y H, y las células nerviosas y endocrinas pueden producir citoquinas.

La existencia de esta comunicación neuroinmunoendocrina ha permitido comprender, desde la perspectiva científica, toda una serie de hechos que continuamente se observan en la vida cotidiana. Por ejemplo, las situaciones de estrés emocional, tristeza, ansiedad o depresión se suelen acompañar de un peor sistema inmunitario, lo que supone una mayor propensión a padecer desde procesos infecciosos hasta cánceres o enfermedades autoinmunes. Por el contrario, situaciones agradables o una “visión optimista” de la vida

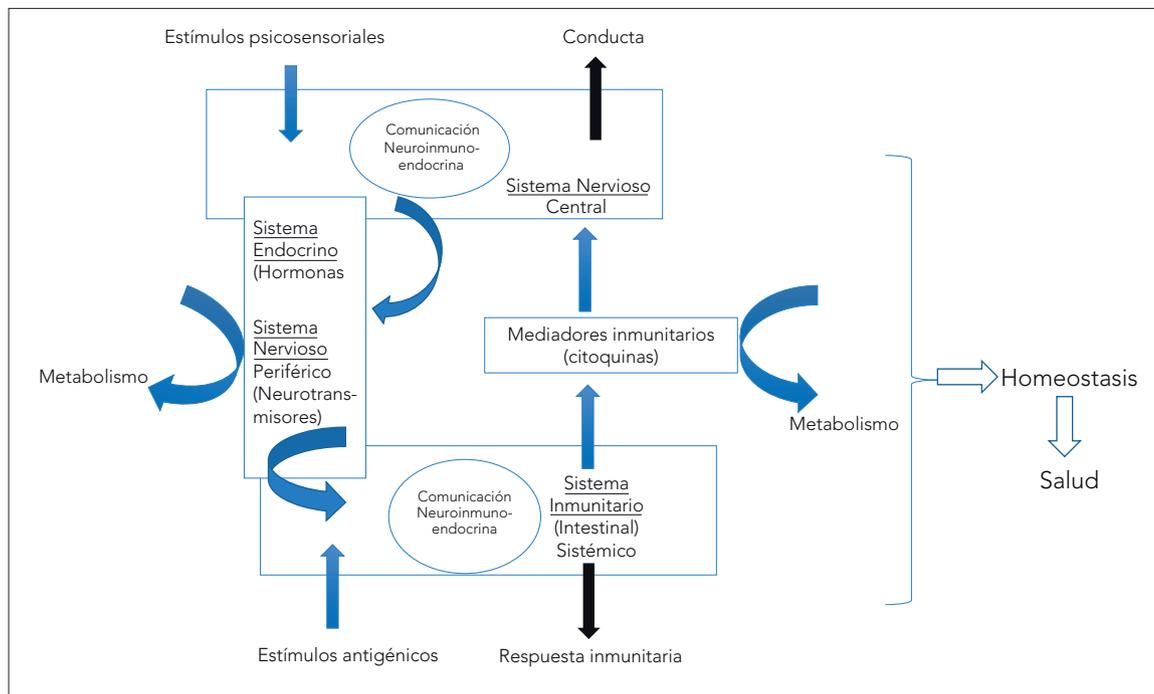


Figura 1.

ayudan a tener un mejor sistema inmunológico y, en general, a presentar un estado más saludable<sup>(9)</sup>.

En base a la bidireccionalidad de la comunicación se puede explicar cómo las alteraciones que experimenta el sistema inmunitario, por ejemplo cuando se tiene un proceso infeccioso, llegan a modificar la funcionalidad del sistema nervioso, pudiéndose, en determinadas situaciones, desarrollar estados depresivos o incluso psicóticos.

La comunicación entre los tres sistemas homeostáticos se establece tanto a nivel general del organismo (mediante lo que se han denominado circuitos largos), como a nivel local (circuitos cortos). Así, cuando se modifica, nuestro sistema nervioso o endocrino, por ejemplo por estímulos psico-sensoriales, tenemos no sólo los efectos típicos de cambios conductuales, también hay modificaciones a nivel del sistema inmunitario que existe en el cerebro y de la inmunidad sistémica. Por su parte, el sistema inmunitario responde frente a las continuas infecciones y tumores de las que tiene que defendernos generando fundamentalmente citoquinas. Estas moléculas no sólo ejercen su típica función defensiva, también llegarán y modificarán el funcionamiento de los sistemas nervioso y endocrino. Como consecuencia de esa comunicación también se afecta el metabolismo general del individuo<sup>(10)</sup> (Fig. 1).

### La comunicación neuroinmunoendocrina en el intestino y su repercusión a nivel general del organismo

La comunicación bidireccional neuroinmunoendocrina se establece en todos los órganos, permitiendo el control de

la homeostasis en cada uno de ellos y de las interacciones entre los mismos<sup>(11)</sup>.

El intestino es una localización en la que los sistemas homeostáticos, el nervioso, el endocrino y el inmunitario, así como sus interrelaciones presentan una enorme complejidad<sup>(12)</sup>.

El sistema nervioso intestinal es tan completo que se le ha denominado el segundo cerebro. Tenemos un sistema nervioso intrínseco, el entérico (SNE), con sus plexos neuronales y sus células de glía, y un sistema nervioso extrínseco, el sistema nervioso autónomo (SNA) constituido por el simpático y el parasimpático (nervio vago). Gracias a ellos se pueden controlar todas las funciones intestinales, pero además lo que sucede en el intestino llega al sistema nervioso central (SNC), incidiendo así en los sentimientos, emociones, motivaciones y funciones cognitivas superiores, incluyendo la toma de decisiones intuitivas. Por otra parte, lo que pase en nuestro cerebro repercute a nivel intestinal<sup>(12)</sup>.

El sistema inmunitario intestinal es la localización inmunitaria más compleja y peculiar de todo el organismo. El denominado tejido linfóide asociado al intestino (GALT) tiene constituyentes que llevan a cabo la inducción de la respuesta inmunitaria (placas de Peyer, el apéndice, nódulos linfoides) y otros que realizan el papel efector de la misma (lámina propia y linfocitos intra-epiteliales). Todo un conjunto de células de la inmunidad innata y adquirida van a ejercer una delicada función de defensa frente a los patógenos que llegan así como de tolerancia para los antígenos de los alimentos y la microbiota intestinal.

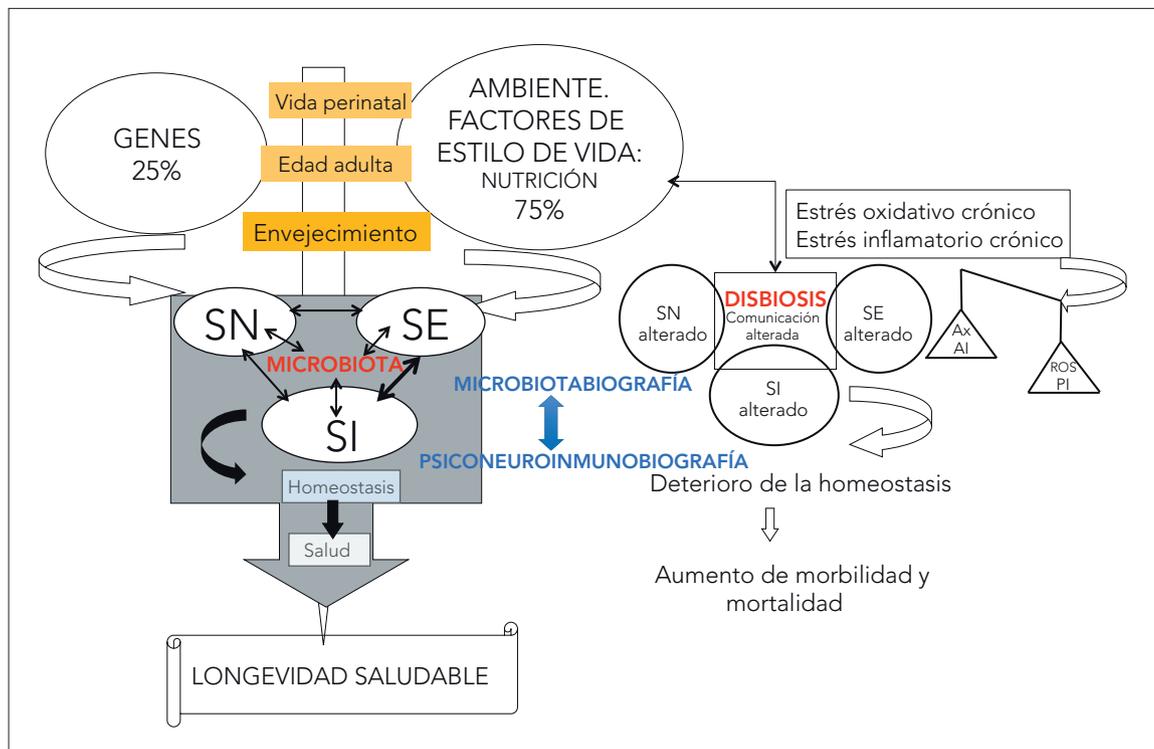


Figura 2.

También actualmente se considera a la compleja barrera epitelial como parte del sistema defensivo de la mucosa intestinal, pues no sólo dispone de células típicamente inmunitarias (células M, linfocitos intra-epiteliales, etc), también los otros componentes (enterocitos, las células de Paneth, etc.) pueden participar en esa función defensiva<sup>(13)</sup>.

Los mediadores que generan todas esas células inmunitarias van a actuar a nivel intestinal, pero también a nivel sistémico y llegar al cerebro, utilizando la vía nerviosa y la sanguínea.

El intestino también dispone de un potente sistema endocrino, con células, como las enteroendocrinas, productoras de hormonas que van a controlar múltiples procesos digestivos. Estas hormonas, por tanto, va a actuar a nivel intestinal y también general del organismo<sup>(14)</sup>.

Esos tres sistemas homeostáticos van a poder comunicarse, lo que hacen en localizaciones estratégicas del intestino, permitiendo una adecuada homeostasis. Además, los mediadores de esos sistemas y los generados tras su comunicación pueden llegar al resto del organismo y al SNC<sup>(12)</sup>.

Todas esas comunicaciones son bidireccionales, y en este contexto también hay que tener presente que los procesos cerebrales van a repercutir en la red neuroinmunoendocrina intestinal. Recordemos, por ejemplo, que el nervio vago tiene aferencias que llevan información desde el intestino al cerebro y eferencias que lo hacen en el sentido contrario<sup>(15)</sup>. También señales eferentes que desde el cerebro llegan al intestino por vías adrenérgicas y ejes neuroendocrinos como el que cons-

tituye el hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) establecen esas comunicaciones. Todo ello explica cómo las emociones, la inadecuada respuesta a situaciones de estrés, o numerosas alteraciones neurológicas, puede repercutir en la función intestinal<sup>(16)</sup>.

### Interacción de la microbiota con los sistemas homeostáticos en el intestino y su repercusión en el cerebro

En la comunicación neuroinmunoendocrina intestinal que se va a proyectar al SNC, hay que introducir un nuevo elemento: la microbiota intestinal, la cual va a incidir en los tres sistemas homeostáticos (Fig. 2).

#### Interacción de la microbiota y el sistema inmunitario

La comunicación entre la microbiota intestinal y las células de la inmunidad innata y adquirida de esa mucosa es compleja y se establece mediante diversas vías, en las que siempre está presente una bidireccionalidad, y en la que participan también los componentes de la barrera epitelial y de la capa de moco<sup>(17-23)</sup>.

Esa comunicación puede ser directa, pero con mayor frecuencia es indirecta. Se realiza a través de los numerosos metabolitos<sup>(24,25)</sup> y las microvesículas<sup>(26)</sup> que genera la microbiota. Todo ello, directamente o mediante la estimulación de otras células (como las epiteliales) puede llegar a las células inmunitarias.

Las células de la inmunidad innata y las de la adquirida van a ser afectadas por la microbiota en su desarrollo y posteriormente en el número de cada uno de sus componentes y en la capacidad funcional de los mismos. De hecho, en animales de experimentación libres de gérmenes se ha comprobado que la falta de microbiota hace que esos animales tengan un sistema inmunitario deficiente. También la presencia de disbiosis supone una alteración inmunológica que subyace a numerosas patologías.

Una cuestión difícil de entender es cómo el sistema inmunitario, que se encarga de reconocer lo extraño y eliminarlo, puede respetar a los componentes de la microbiota autóctona y no a otros microorganismos que, perteneciendo incluso al mismo género que los constituyentes de la misma, son potencialmente patógenos. Actualmente, a pesar de los avances recientes, no son totalmente conocidos los mecanismos utilizados por el sistema inmunitario para estar reconociendo y discriminando entre lo propio, lo ingerido con los alimentos, los microorganismos comensales y los patógenos, en una manera que permita la homeostasis intestinal.

Básicamente, lo que hace la microbiota es influir en el control de la respuesta de oxidación e inflamación que genera el sistema inmunitario para destruir a los patógenos. De hecho, se sabe que muchos de los microorganismos de la microbiota autóctona tienen propiedades antioxidantes y antiinflamatorias, gracias a los mediadores que producen y al aumento de ese tipo de compuestos que generan en otras células<sup>(27)</sup>.

En la respuesta de tolerancia a la microbiota autóctona participan la respuesta inmunitaria innata y la adquirida o adaptativa. Esta última tiene un papel crítico en la tolerancia y en la integridad de la barrera intestinal, mientras que la innata inicia la respuesta y regula el funcionamiento de tolerancia por parte de la adaptativa.

Tras el reconocimiento de los microorganismos autóctonos por las células de la inmunidad intestinal y la posterior secreción de determinadas citoquinas, se da una modulación del equilibrio entre inflamación/anti-inflamación, fundamentalmente por parte de las subpoblaciones de células T. Así, el balance Th17/Treg se deriva a favor de las Treg, esto es, de la anti-inflamación, ya que los Treg, cuya presencia en la mucosa intestinal es más relevante que en otras localizaciones, producen citoquinas anti-inflamatorias, como la IL-10, que controlan la inflamación y permiten la tolerancia. De hecho, se ha comprobado que los metabolitos de la microbiota, como los ácidos grasos de cadena corta (AGCC), especialmente el butirato, pueden expandir a esas células, al hacer que las de la inmunidad innata ayuden en esa red de regulación y permitan el control de la inflamación<sup>(28,29)</sup>.

Además, la microbiota hace que esas células inmunitarias se reprograman epigenéticamente y metabólicamente, adquiriendo de esta manera características de “memoria” que les posibilita aumentar su posterior capacidad de respuesta<sup>(30)</sup>.

Todo ello permite entender como unos adecuados microorganismos intestinales pueden favorecer tanto la tolerancia a los mismos, al enseñar a las células inmunitarias a modular su respuesta inflamatoria, como reforzar y ampliar la adquisición de una potente respuesta protectora y defensiva frente a los patógenos.

Este aprendizaje inmunitario, paralelo al desarrollo ontogénico del sistema defensivo, en el que participa de forma relevante la microbiota, se lleva a cabo de forma muy temprana, en los primeros años tras el nacimiento. Este periodo es fundamental y representa una ventana crítica de susceptibilidad para la salud o las enfermedades que se tendrán a lo largo de la vida<sup>(31)</sup>.

Se sabe que en el periodo neonatal el sistema inmunitario presenta una baja capacidad de producir citoquinas pro-inflamatorias teniendo un sesgo a respuestas reguladoras. Esto permite que aunque haya más susceptibilidad a infecciones se asiente la microbiota sin abierta inflamación, lo que, como se ha indicado, es favorecido por la propia microbiota. De hecho, los componentes de las paredes bacterianas hacen, en esos momentos de la vida, que las células epiteliales y las inmunitarias sean menos respondedoras a la estimulación vía TLRs, dándose una integración epigenética de estas modificaciones. Todo ello permite que el sistema inmunitario se desarrolle, pero no genere fuerte respuesta inflamatoria frente a la microbiota autóctona.

Factores como la exposición a antibióticos, la dieta que se haga, la actividad física, el estado de ánimo, el contacto con el ambiente, las relaciones sociales, entre otros, van a condicionar el estado de la microbiota y del sistema inmunitario de cada individuo, así como el dialogo entre ambos.

La microbiota intestinal no sólo va a condicionar el sistema inmunitario de las mucosas, también el sistémico. Una de las vías por las que los microorganismos que hay en el intestino pueden llegar a afectar a las células inmunitarias más allá de esa localización, es a través de los metabolitos y las microvesículas que producen. De hecho, estos metabolitos pueden llegar a la médula ósea y participar en la hematopoyesis, regulando la diferenciación, supervivencia y actividad de las células mieloides que van a recircular por el organismo. Además, el paso de las células inmunitarias de la mucosa intestinal a la sangre que riega esa mucosa es un hecho evidente, por lo que el estado funcional adquirido en el intestino tras su dialogo con la microbiota va a repercutir en el resto del organismo.

Por ello, una microbiota adecuada se asocia con una mejor inmunidad y consecuentemente una mejor salud, mientras que un estado de disbiosis se relaciona con una inadecuada inmunidad y la presencia de patologías (Fig. 2).

### ***Interacción de la microbiota y el sistema nervioso***

La microbiota determina el adecuado desarrollo y funcionamiento del SNE, afectando no sólo a las neuronas, también

a las células gliales entéricas, como se ha podido observar en animales de experimentación libres de gérmenes.

Los microorganismos intestinales producen toda una serie de neurotransmisores, como GABA, serotonina, dopamina, norepinefrina y acetilcolina entre otros, así como de neuropéptidos<sup>(32)</sup>. Estos mediadores pueden actuar en el SNE, pero también llegar al SNC por vía sanguínea o a través del nervio vago<sup>(15)</sup>. De esta manera los mediadores de la microbiota pueden alcanzar el cerebro y modificar el desarrollo y actividad de sus células, tanto de las neuronas como de la glia y, consecuentemente, inciden en el funcionamiento cerebral<sup>(33,34)</sup>.

Además de los neurotransmisores microbianos, muchas células presentes en la mucosa intestinal producen mediadores nerviosos, como lo hacen las células de SNE y también las células inmunitarias y de la barrera epitelial. Todas esas células pueden ser modificadas en esta capacidad de producción de neurotransmisores por la presencia de los diversos mediadores de la microbiota, y pueden llegar, fundamentalmente vía nervio vago al SNC.

### **Interacción de la microbiota y el sistema endocrino**

La microbiota también produce mediadores típicos del sistema endocrino, como hormonas, los cuales van a llegar a las células de la mucosa intestinal y modificarlas. Estas hormonas microbianas y las generadas en las células intestinales (inmunitarias y enteroendocrinas) pueden alcanzar, por vía sanguínea, el cerebro<sup>(35,36)</sup>.

### **El eje microbiota-intestino-cerebro**

Por lo indicado es evidente que el eje microbiota-intestino-cerebro supone un complejo sistema de interconexiones multidireccionales que constituye la vía de comunicación entre la microbiota y el cerebro<sup>(37)</sup>.

El eje utiliza diferentes vías, la humoral (mediante la circulación intestinal, sistémica y la barrera hematoencefálica) y la neural (fundamentalmente vía nervio vago). Así, mediante los metabolitos, neurotransmisores y hormonas de los microorganismos intestinales, estos se pueden comunicar con el cerebro. Posiblemente una de las vías mejor estudiada de esta comunicación es la de los metabolitos de la microbiota intestinal, como los AGCC<sup>(38)</sup>, que atraviesan la barrera hematoencefálica y modifican la producción de factores producidos por la células nerviosas, tanto neuronas como gliales. Por ejemplo, se ha comprobado que el butirato, al incidir en la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) en el hipocampo, altera la activación del mismo en respuesta a estímulos emocionales.

Evidentemente esa comunicación no es sólo directa. Dada la comunicación neuroinmunoendocrina intestinal, esos mediadores producidos por la microbiota contactarán con las células nerviosas, endocrinas e inmunitarias del intes-

tino, y todas ellas, con su liberación de neurotransmisores, hormonas y especialmente de citoquinas, podrán intervenir en ese mensaje que llega al cerebro. Además, se ha comprobado que los productos generados por esos microorganismos intestinales modulan la permeabilidad de la barrera hematoencefálica, la cual puede ser defectuosa si esta microbiota no es apropiada.

Dado que todas esas comunicaciones son bidireccionales, los mediadores generados en el SNC van a llegar al SNE y modificar el dialogo neuroinmunoendocrino intestinal y con la microbiota. Esto explica que la respuesta inadecuada a situaciones de estrés, los estados emocionales y un largo etc, repercutan en el estado funcional del intestino y en toda la comunicación entre microorganismos y sistemas homeostáticos de esa localización.

Como se ha comentado anteriormente sobre el momento en el que se establecen los diálogos entre la microbiota y los sistemas homeostáticos, también para el establecimiento del eje microbiota-intestino-cerebro se ha sugerido que existen “periodos sensibles” o “ventanas críticas” en su consolidación, generalmente tempranas, las cuales van a condicionar el buen funcionamiento del eje a lo largo de la vida del individuo<sup>(39)</sup>.

### **El eje microbiota-intestino-cerebro y su repercusión en la conducta individual y social**

En este contexto, es entendible que se haya comprobado como la microbiota, al poder modificar el funcionamiento cerebral, pueda incidir en las conductas individuales. De hecho, se han observado cambios conductuales tras modificarse esa microbiota, y también a la inversa, la microbiota puede modificarse tras cambiarse la conducta<sup>(40)</sup>.

En el caso de las especies sociales, como la humana, se ha comprobado que la microbiota puede condicionar las relaciones con otros individuos, llegándose a sugerir su participación en la elección de las personas con las que nos relacionamos y en la de la pareja<sup>(41)</sup>.

Como siempre existe una bidireccionalidad, no sólo la microbiota intestinal influencia la conducta social, esta y la estructura social configura la composición de la microbiota de los individuos.

### **El eje microbiota-intestino-cerebro y el estrés fisiológico y psicológico**

La inadecuada respuesta de un individuo a las situaciones de estrés con las que tiene que enfrentarse supone un desajuste de la comunicación neuroinmunoendocrina, asociada a un estrés oxidativo e inflamatorio, lo que conlleva un importante riesgo de morbilidad<sup>(42)</sup>.

Las situaciones de estrés induce alteraciones en la permeabilidad de la barrera epitelial, lo que permite la translocación de microorganismos y sus productos, especialmente de LPS. Este es reconocido por los TLR de las células inmunitarias y se desencadena una respuesta inflamatoria por parte de

dichas células, con una elevada producción de citoquinas pro-inflamatorias que afectan al intestino, al organismo y llegan al SNC. También en el cerebro, las células de microglia se activan en respuesta a estos mediadores y producen una elevada cantidad de oxidantes y citoquinas pro-inflamatorias lo que predispone a la neuroinflamación y todas las patologías asociadas a la misma<sup>(43)</sup>.

Como es sabido, en respuesta a situaciones de estrés, se establece la activación del eje simpático-adreno-medular (SAM) y del eje neuroendocrino hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA). En el estrés psicológico y psicosocial, se encuentra más implicado el eje HHA y la consecuente producción de glucocorticoides como el cortisol. Dado el carácter de cronicidad que tienen estos tipos de estrés, el eje HHA se encuentra desregulado, lo que supone un importante riesgo de enfermedades mentales, como se ha comprobado para la ansiedad y depresión. La microbiota intestinal permite una buena regulación de este eje HHA. De hecho, animales libres de gérmenes presentan una respuesta exagerada del eje a las situaciones de estrés.

También el nervio vago se encuentra implicado en las respuestas al estrés y como se ha indicado la microbiota utiliza este nervio en su comunicación con el cerebro. De hecho se ha comprobado que la información que desde la microbiota intestinal va, vía vago, al núcleo cerebral del tracto solitario, es luego proyectada a diferentes partes del cerebro, incluido el núcleo hipotalámico en el que se origina el eje HHA. Las situaciones en que se da un aumento de citoquinas inflamatorias intestinales, como sucede en las disbiosis, alteran ese nervio vago impidiendo su acción reguladora.

## El eje microbiota-intestino-cerebro en la salud y la enfermedad

En los últimos años se ha comprobado como los cambios en la microbiota intestinal pueden estar en la base de cientos de enfermedades, las cuales no se circunscriben únicamente al ámbito digestivo, afectan a todos los órganos y sistemas<sup>(44)</sup>. Estas patologías suelen tener como base el inadecuado funcionamiento de los sistemas homeostáticos. En muchas de ellas se aprecia claramente que el sistema inmunitario está siendo el principalmente afectado<sup>(45,46)</sup>.

Concretándonos en las que implican de forma más evidente al sistema nervioso, hay un gran abanico de enfermedades mentales en las que se ha detectado la incidencia de la microbiota<sup>(47,48)</sup>.

En enfermedades psiquiátricas como la ansiedad y la depresión, las más estudiadas en este contexto, la microbiota intestinal parece tener un papel importante en su etiología<sup>(49)</sup>. Pero también en otras enfermedades como la esquizofrenia<sup>(50)</sup>, el trastorno bipolar, el autismo<sup>(51)</sup>, e incluso en las neurodegenerativas<sup>(52)</sup> como el Parkinson o el Alzheimer<sup>(53)</sup>, esa microbiota se está considerando como factor de riesgo.

## El estrés oxidativo e inflamatorio en el eje microbiota-intestino-cerebro y factores que inciden en el mismo

A través del eje intestino-cerebro, la microbiota puede incidir en el estado de estrés oxidativo del sistema nervioso central, bien directa o indirectamente y tanto en la producción de ROS/RNS como en el sistema antioxidante del SNC. Moléculas microbianas con potencial neurotóxico, como el LPS, pueden llegar al cerebro vía sanguínea o nerviosa y, activando la microglia para producir citoquinas pro-inflamatorias y oxidantes, generar neuroinflamación y estrés oxidativo. Por su parte, los AGCC, especialmente el butirato, se ha comprobado que disminuye la inflamación cerebral<sup>(27)</sup>.

Numerosos factores, entre los que se puede destacar de forma importante la dieta, pero también la actividad física, las relaciones sociales y los contactos con el ambiente, además del hecho de que se sea macho o hembra, van a incidir en el eje microbiota-intestino cerebro<sup>(54,55)</sup>. Así, dado que todos esos factores son diferentes en cada individuo a lo largo de su existencia, se puede hablar de que cada persona tiene su “microbiotabiografía” al igual que tiene una “psiconeuroinmunobiografía” (Fig. 2).

Es sabido que el adecuado funcionamiento de los sistemas homeostáticos, y por tanto el estado de salud, va a depender de los genes que tenga cada individuo, pero de manera fundamental va a ser el ambiente y el estilo de vida lo que se encuentra más implicado en ese funcionamiento<sup>(6)</sup>. (Fig. 2). Por ello, la incidencia de esos factores, muy relevante en los primeros momentos de la vida, va a tener una repercusión importante en la capacidad del individuo para mantener su salud o por el contrario presentar un alto riesgo de morbilidad.

## Bibliografía

1. Besedovsky HO, Del Rey A. Central and peripheral cytokines mediate immune-brain connectivity. *Neurochem Res.* 2011; 36: 1-6.
2. Daruna J (Ed.). *Introduction to Psychoneuroimmunology*, 2<sup>nd</sup> ed. Londres: Academic Press; 2012
3. McCusker RH, Kelley KW. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behaviour. *J Exp Biol.* 2013; 216: 84-98.
4. Pacheco G, De la Fuente M. Psiconeuroinmunología. En: Alvarez G, Marcos A, Margolles A (Eds). *Probióticos, Prebióticos y Salud*. Evidencia Científica. Madrid: Ergon; 2016. p. 173-81.
5. Ashley NT, Demas GE. Neuroendocrine-immune circuits, phenotypes, and interactions. *Horm Behav.* 2017; 87: 25-34.
6. De la Fuente M. Bio-psycho-social bridge: the psychoneuroimmune system in successful aging. En: Fernández-Ballesteros R, Benetos A, Robine JM (Eds.). *Cambridge Handbook of Successful Aging*. New York: Cambridge University Press; 2018. p: 265-80.
7. Taams LS. Neuroimmune interactions: how the nervous and immune systems influence each other. *Clin Exp Immunol.* 2019; 197: 276-7.
8. Kelley KW, McCusker RH. Getting nervous about immunity. *Semin Immunol.* 2014; 26: 389-93.
9. Barak Y. The immune system and happiness. *Autoimmun Rev.* 2006; 5: 523-7.
10. Besedovski HO, Del Rey A. Physiology of psychoneuroimmunology: a personal view. *Brain Behav Immun.* 2007; 21: 34-44.

11. Huh JR, Veiga-Fernandes H. Neuroimmune circuits in inter-organ communication. *Nat Rev Immunol*. 2019 [En prensa]. doi: 10.1038/s41577-019-0247-z
12. Stakenborg N, Viola MF, Boeckstaens GE. Intestinal neuro-immune interactions: focus on macrophages, mast cells and innate lymphoid cells. *Curr Opin Neurobiol*. 2020; 62: 68-75.
13. Goto Y. Epithelial cells as a transmitter of signals from commensal bacteria and host immune cells. *Front Immunol*. 2019; 10: 2057.
14. Yue B, Luo X, Yu Z, Mani S, Wang Z, Dou W. Enterocrine cells: sensing gut microbiota and regulating inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2020; 26: 11-20.
15. Bonaz B, Bazin T, Pellissier S. The vagus nerve at the interface of the microbiota-gut-brain axis. *Front Neurosci*. 2018; 12: 49.
16. Panduro A, Rivera-Iñiguez I, Sepulveda-Villegas M, Roman S. Gens, emotions and gut microbiota: the next frontier for the gastroenterologist. *World J Gastroenterol*. 2017; 23: 3030-42.
17. Belkaid Y, Hand T. Role of the microbiota in immunity and inflammation. *Cell*. 2014; 157: 121-41.
18. Spenser SP, Fragiadakis GK, Sonnenburg JL. Pursuing human-relevant gut microbiota-immune interactions. *Immunity*. 2019; 51: 225-39.
19. Schroeder BO. Fight them or feed them: how the intestinal mucus layer manages the gut microbiota. *Gastroenterol Report*. 2019; 7: 3-12.
20. Wang L, Zhu L, Qin S. Gut microbiota modulation on intestinal mucosal adaptive immunity. *J Immunol Res*. 2019;2019: 4735040.
21. Yissachar N. Menege a trois: regulation of host immunity by enteric neuro-immune-microbiota cross talks. *Curr Opin Neurobiol*. 2019; 62: 26-33.
22. Yue B, Luo X, Yu Z, Yu Z, Mani S, Wang Z, Dou W. Inflammatory bowel disease: a potential result from the collusion between gut microbiota and mucosal immune system. *Microorganisms*. 2019; 7: 440-61.
23. Bain CC, Cerovic V. Interactions of the microbiota with de mucosal immune system. *Immunology*. 2020; 159: 1-3.
24. Sittipo P, Shim J, Lee YK. Microbial metabolites determine host health and the status of some diseases. *Int J Mol Sci*. 2019; 20: 5296.
25. Wang G, Huang S, Wang Y, Cai S, Yu H, Liu H, et al. Bridging intestinal immunity and gut microbiota by metabolites. *Cell Mol Life Sci*. 2019; 76: 3917-37.
26. Stentz, R, Carvalho AL, Jones EJ, Carding SR. Fantastic voyage: the journey of intestinal microbiota-derived microvesicles through the body. *Biochem Soc Transact*. 2018; 46: 1021-7.
27. Dumitrescu L, Popescu-Olaru I, Cozma L, Tulba D, Hinescu ME, Ceafalan LC, et al. Oxidative stress and the microbiota-gut-brain axis. *Oxid Med Cell Long*. 2018; 2018: 2406594.
28. Li M, van Esch BCAM, Wagenaar GTM, Garssen J, Folkerts G, Henricks AJ. Pro- and anti-inflammatory effects of short chain fatty acids on immune and endothelial cells. *Eur J Pharmacol*. 2018; 831: 52-9.
29. Russo E, Giudici F, Fiorindi C, Ficari F, Scaringi S, Amedei A. Immunomodulating activity and therapeutic effects of short chain fatty acids and tryptophan post-biotics in inflammatory bowel disease. *Front Immunol*. 2019 10, 2754.
30. Negi S, Das DK, Pahari S, Nadeem S, Agrewala JN. Potential role of gut microbiota in induction and regulation of innate immune memory. *Front Immunol*. 2019 10:2441.
31. Amenogbe N, Kollmann TR, Ben-Othman R. Early-life host-microbiome interphase: the key frontier for immune development. *Front Pediatr*. 2017; 5: 1-12.
32. Aresti-Sanz J, El Aidey S. Microbiota and gut neuropeptides: a dual action of antimicrobial activity and neuroimmune response. *Psychopharmacol*. 2019; 236: 1597-609.
33. Liang S, Wu X, Jin F. Gut-brain psychology:rethinking psychology from the microbiota-gut-brain axis. *Front Integr Neurosci*. 2018; 12: 33.
34. Liu RT. The microbioma as a novel paradigm in studying stress and mental health. *Am Psychol*. 2017; 72: 655-67.
35. Farzi A, Fröhlich E, Holzer P. Gut microbiota and the neuroendocrine system. *Neurotherapeutics*. 2018; 15: 5-22.
36. Watnick PI, Jugder BE. Microbial control of intestinal homeostasis via enteroendocrine cell innate immune signalling. *Trends Microbiol*. 2019 [En prensa]. doi: 10.1016/j.tim.2019.09.005.
37. Fung TC. The microbiota-immune axis as a central mediator of gut-brain communication. *Neurobiol Dis*. 2020; 136: 104714.
38. Dalile B, Van Oudenhove L, Vervliet B, Verbeke K. The role of short-chain fatty acids in microbiota-gut-brain communication. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019; 16: 461-78.
39. Cowan CSM, Dinan TG, Cryan JF. Annual Research review: critical windows-the microbiota-gut-brain axis in neurocognitive development. *J Child Psychol Psychiatry*. 2019 [En prensa]. doi: 10.1111/jcpp.13156.
39. Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci*. 2012; 13: 701-12.
39. Cusotto S, Sandhu KV, Dinan TG, Cryan JF. The neuroendocrinology of the microbiota-gut-brain axis: a behavioural perspective. *Front Neuroendocrinol*. 2018; 51: 80-101.
40. Münger E, Montiel-Castro AJ, Langhans W, Pacheco-Lopez G. Reciprocal interactions between gut microbiota and host social behavior. *Front Integr Neurosci*. 2018; 12: 21.
41. De la Fuente M. Oxidation and inflammation in the immune and nervous systems, a link between aging and anxiety. En: Fulop T, Franceschi C, Hirokawa K, Pawelec G (Eds.). *Handbook of Immunosenescence*. Springer Nature; 2018.
42. Foster JA, Rinaman L, Cryan JF. Stress & the gut-brain axis: regulation by the microbiome. *Neurobiol Stress*. 2017; 7: 124-36.
43. Labanski A, Langhorst J, Engler H, Elsenbruch S. Stress and the brain-gut axis in functional and chronic-inflammatory gastrointestinal diseases: a transdisciplinary challenge. *Psychoneuroendocrinology*. 2020; 111: 104501.
44. Rojo D, Méndez-García C, Raczowska BA, Bargiela R, Moya A, Ferrer M, et al. Exploring the human microbiome from multiple perspectives: factors altering its composition and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2017; 41: 453-78.
45. Lazar V, Dity LM, Pircalabioru GG, Gheorhe I, Curutiu C, Holban AM, et al. Aspects of gut microbiota and immune system interactions in infectious diseases, immunopathology, and cancer. *Front Immunol*. 2018; 9: 1830.
46. Xu H, Liu M, Cao J, Li X, Fan D, Xia Y, et al. The dynamic interplay between the gut microbiota and autoimmune diseases. *J Immunol Res*. 2019; 2019: 7546047.
47. Codagnone MG, Spichak S, O'Mahony SM, O'Leary OF, Clarke G, Stanton C, et al. Programming bugs: microbiota and the developmental origins of brain health and disease. *Biol Psychiatry*. 2019; 85: 150-63.
48. Grochowska M, Laskus T, Radkowski M. Gut microbiota in neurological disorders. *Arch Immunol Ther Exp*. 2019; 67: 375-83.
49. Kelly JR, Keane VO, Cryan JF, Clarke G, Dinan TG. Mood and microbes: gut to brain communication in depression. *Gastroenterol Clin North Am*. 2019; 48: 389-405.
50. Golofast B, Vales K. The connection between microbiome and schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev*. 2019; 108: 712-31.
51. Lasheras I, Seral P, Latorre E, Barroso E, Gracia-García P, Santabárbara J. Microbiota and gut-brain axis dysfunction in autism spectrum disorder: evidence for functional gastrointestinal disorders. *Asian J Psychiatr*. 2019; 47: 101874.
52. Roy-Sarkar S, Banerjee S. Gut microbiota in neurodegenerative disorders. *J Neuroimmunol*. 2019; 328: 98-104.
53. De JR De-Paula V, Forlenza AS, Forlenza OV. Relevance of gut microbiota in cognition, behavior and Alzheimer's disease. *Pharmacol Res*. 2018; 136: 29-34.
54. Cerdo T, Dieguez E, Campoy C. Early nutrition and gut microbioma: interrelationship between bacterial metabolism, immune system, brain structure and neurodevelopment. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2019; 317: E617-30.
55. Jaggat M, Rea K, Spicak S, Dinan TG, Cryan JF. You've got male: sex and the microbiota-gut brain axis across the lifespan. *Front Neuroendocrinol*. 2019 [En prensa]. doi: 10.1016/j.yfrne.2019.100815.

# Psicobióticos y trastornos mentales

Manuel Martín Carrasco

*Psiquiatra. Clínica Psiquiátrica Padre Menni. Pamplona.*

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):54-57

## Introducción

El intestino humano contiene alrededor de 100 millones de neuronas, el mayor contingente neuronal fuera del cerebro, con el que guarda similitudes estructurales y funcionales. Esta red neuronal intestinal está conectada con el cerebro de forma bidireccional, tanto por vía nerviosa (especialmente a través del nervio vago) como por vía plasmática (metabólica, hormonal, inflamatoria), constituyendo el denominado eje intestino-cerebro.

El intestino, además de poseer un sistema nervioso propio, también alberga un ecosistema propio, la flora o microbiota intestinal, que interactúa con dicho sistema neural y, por lo tanto, con el cerebro, que regula a su vez el resto del organismo. Por ello, existe la posibilidad, demostrada por una creciente investigación, de actuar sobre los mecanismos de homeostasis y regulación corporal a través de la modificación de la flora intestinal mediante la administración de probióticos –microorganismos que confieren una determinada ventaja al huésped– o prebióticos –ingredientes de la comida no digeribles que favorecen el crecimiento de determinadas estirpes de la microbiota intestinal–.

En 2013, Dinan y cols. establecieron el concepto de psicobióticos como el conjunto de probióticos y prebióticos que, ingeridos en las cantidades adecuadas, tienen un efecto favorable sobre la salud mental. La acción de los psicobióticos no se limita a la regulación de los ejes neuroinmunes (hipotálamo-hipofisario-adrenal, inflamatorio), y por lo tanto en las enfermedades del sistema nervioso central (SNC) relacionadas con la alteración de los mismos, sino en la modulación de la respuesta emocional, memoria, aprendizaje y comportamiento. Se abre así un amplio panorama de intervención en las funciones del SNC, que cambia el paradigma clásico de una relación simbiótica entre la microbiota y el ser humano,

hacia un tipo de relación que puede interpretarse mejor como un comensalismo (Bermúdez-Humaran y cols., 2019).

## Neurodesarrollo

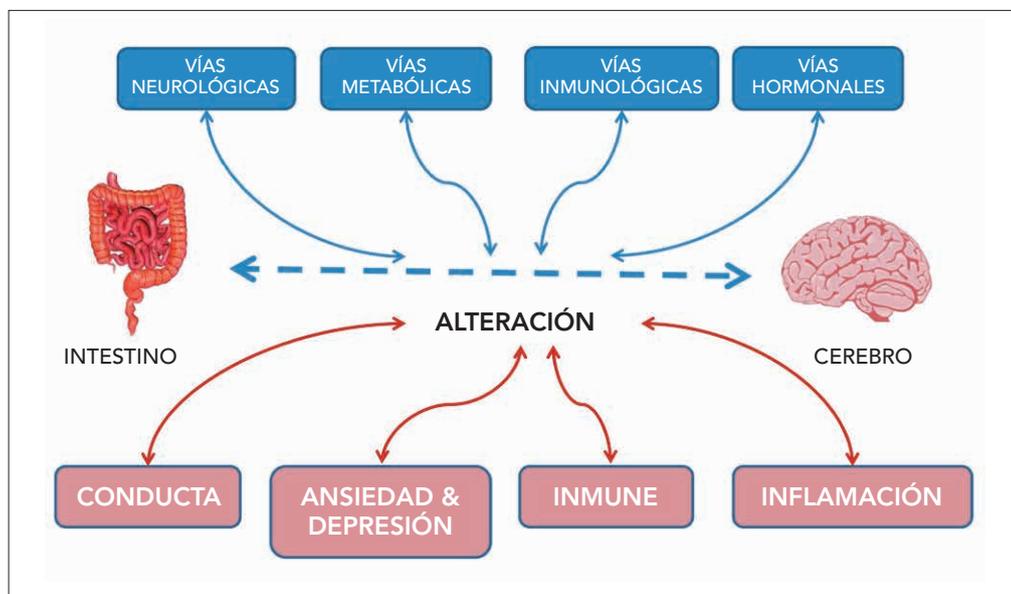
Los trabajos en modelos animales han demostrado la importancia de la integridad del eje intestino-cerebro y de la microbiota para un correcto neurodesarrollo, de manera que la administración de prebióticos mejora la capacidad cognitiva, tanto en la infancia como en la madurez (Oliveros y cols., 2016). Sin embargo, estos resultados difieren de lo encontrado en humanos.

Por ejemplo, un estudio analizó si la administración de prebióticos (scGOS/lcFOS/pAOS) v. placebo producía mejoras en el neurodesarrollo en neonatos pretérmino. Aunque el resultado fue negativo, el estudio mostró que un mayor número de infecciones, menor presencia de bifidobacterias en heces, y mayores niveles de citoquinas en plasma se asociaban con una progresión más baja en el neurodesarrollo a los 24 meses, lo que sugiere la importancia del microbioma y la respuesta inmune en el neurodesarrollo en humanos (van der Berg y cols., 2016). El mismo resultado se apreció en un trabajo similar (LeCouffe y cols., 2014).

Por otra parte, la administración de prebióticos también ha mejorado la evolución de enfermedades neurodegenerativas en modelos animales de esclerosis lateral amiotrófica (Song y cols., 2013) y enfermedad de Alzheimer (Chen y cols., 2017).

## Aspectos cognitivos, emocionales y comportamentales

Existen sólidas evidencias de que la comunicación bidireccional entre intestino y cerebro involucra vías de señalización neurológica, metabólica, hormonal e inmunológica, y que



**Figura 1.** Homeostasis Intestino-Cerebro.

la alteración en estos sistemas puede dar lugar a trastornos psiquiátricos o alteraciones de conducta, entre otras manifestaciones clínicas (Rhee y cols., 2009) (Fig. 1). La alta comorbilidad que existe entre el estrés, las manifestaciones de ansiedad y depresión y patologías gastrointestinales, como el síndrome de colon irritable, muestra una conexión importante entre estas alteraciones.

El estrés ha sido definido como un estado dinámico complejo en el que la homeostasis o el estado de equilibrio interno se ve alterado o amenazado. A lo largo del ciclo vital, todos los organismos se ven expuestos a factores que amenazan el estado de equilibrio, dando lugar a la respuesta de estrés (psíquico, físico, inmunológico...), que en condiciones normales, da paso de nuevo al estado de equilibrio u homeostasis. La regulación de la respuesta al estrés puede ser uno de los mecanismos fundamentales por los que la microbiota puede influir en la presentación de trastornos psiquiátricos (Rea y cols., 2016).

De hecho, el estrés está implicado como factor de riesgo en la aparición de numerosos trastornos psiquiátricos, tanto como factor predisponente como desencadenante. Por ejemplo, en el caso de la depresión, la exposición a niveles elevados de estrés en etapas iniciales de la vida se asocia a la aparición posterior de depresión, lo que puede estar mediado por la desregulación de eje hipotálamo-hipofisario-adrenal (HHA) y de la respuesta al estrés mediada por el cortisol. A su vez, estas anomalías se correlacionan con alteraciones en la amígdala y el hipocampo, áreas cerebrales estrechamente conectadas con el sistema límbico y la corteza prefrontal (Lupien y cols., 2009).

Estas hipótesis están bien sustentadas en la investigación en modelos animales, lo que sugiere que los psicobióticos pueden ser útiles en los trastornos afectivos en humanos. Por

ejemplo, en un estudio con ratones, tras la administración de *L. rhamnosus*, se produjo una disminución significativa con respecto al grupo control de los síntomas de ansiedad y depresión a través de tests como la natación forzada, y mejoras en el rendimiento cognitivo en la prueba del laberinto, incluso controlando los niveles de corticosterona, lo que sugiere que el probiótico tiene un efecto de regularización del eje HHA. Además, los animales expuestos presentaban una menor expresión en hipocampo del gen del receptor GABAB1b y una mayor expresión del mismo en el córtex cingulado y en regiones límbicas. El GABA es el neurotransmisor más importante en el SNC, de forma que este resultado sugiere que el probiótico puede modular el equilibrio entre inhibición/excitación en el SNC y así modular la respuesta sistémica al estrés (Bravo y cols., 2011). Otras vías mediante la que la microbiota puede modular la aparición de síntomas emocionales son la regulación de la secreción de BDNF (Bercik y cols., 2011) y de neurotransmisores (GABA, serotonina, noradrenalina, acetilcolina), y la modulación del metabolismo del triptófano.

Sin embargo, la traslación de estos resultados a humanos sigue siendo un reto fundamental (Tabla 1), aunque existe un número creciente de trabajos en los últimos años, a partir de un trabajo inicial realizado en estudiantes, que encontró que el tratamiento con un preparado probiótico mejoraba la respuesta inmune al estrés previo a los exámenes, aunque no tenía efecto sobre la ansiedad (Marcos y cols., 2004). Existen otros trabajos de índole variada realizados en voluntarios sanos. En uno de ellos (Tillisch y cols., 2013), un grupo de mujeres consumió un producto lácteo fermentado con una mezcla de probióticos, incluyendo *Bifidobacterium animalis*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* y *Lactococcus lactis* durante 4 semanas. Los resultados

**Tabla 1.** Dificultades para trasladar la investigación sobre microbiota de animales a humanos.

**Dificultades**

No hay un modelo equivalente en humanos a los modelos “libres de gérmenes” en animales.

El microbioma animal y el humano son diferentes  
– Ej. *Prevotella* y *Ruminococcus* son infrecuentes en ratones y comunes en humanos.

La dieta animal es muy diferente de la humana.

Dificultad para medir la composición del microbioma en humanos.

La composición del microbioma en humanos cambia a lo largo de la vida y existen numerosas variables que influyen en él: dieta, agua, estilo de vida, entorno, enfermedades, etc.

Existe un número muy escaso de estudios sobre el microbioma en humanos adultos.

mostraron que el consumo de probióticos influyó en la actividad cerebral de centros relacionados con el control emocional. Otro estudio encontró una mejoría del estado de ánimo en voluntarios sanos tras el consumo durante 3 semanas de una bebida láctea que contenía probióticos (*Lactobacillus casei*), aunque no en el rendimiento cognitivo (Benton y cols., 2007). Más recientemente, otro estudio encontró que tras 30 días de consumo de una mezcla probiótica que contenía *Lactobacillus helveticus* y *B. longum* se encontraron efectos beneficiosos sobre las medidas de ansiedad y depresión, así como niveles más reducidos cortisol (Messaoudi y cols., 2011). Asimismo, otro estudio valoró la administración de prebióticos en voluntarios sanos, resultando en niveles más bajos de cortisol al despertar y atención mejorada a estímulos positivos en tareas de categorización emocional y reconocimiento emocional (Schmidt y cols., 2015). Otro estudio realizado en trabajadores de la industria petroquímica en Irán encontró resultados similares (Mohammadi y cols., 2016), al igual que un trabajo realizado en Holanda en el que se comparaba la reactividad cognitiva a la tristeza en sujetos sanos (Steenberger y cols., 2015). En general, estos estudios en individuos sanos proporcionan evidencia favorable a la existencia de un vínculo entre microbiota y procesamiento emocional (Zhou y Foster, 2015)

Sin embargo, los estudios en muestras clínicas son menos frecuentes, aunque contamos con cuatro trabajos, todos procedentes del mismo país, Irán. Un estudio examinó específicamente la asociación entre alteraciones del microbioma y depresión mediante el análisis de la microbiota fecal de 37 pacientes diagnosticados de depresión comparado con 18 controles encontró una serie de correlaciones significativas, entre ellas la menor presencia general de *Bacteroidetes* en los casos de depresión, junto con una presencia excesiva de

*Alistipes*, un genus en el filum de *Bacteroidetes*. También se ha encontrado una presencia aumentada de *Alistipes* en el síndrome de fatiga crónica y el colon irritable, lo que sugiere un rasgo común en estos trastornos que tienen una comorbilidad alta de ansiedad y depresión (Naseribafrouei y cols., 2014). Otro trabajo fue realizado en una muestra de 40 sujetos diagnosticados de depresión mayor según el DSM-IV, y mostró una eficacia significativamente superior al placebo en la escala de depresión de Beck tras la administración de un preparado probiótico compuesto por cepas de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, y *Bifidobacterium bifidum*. Asimismo, se apreciaron mejoras en el metabolismo de los glúcidos y en el estrés oxidativo (Akkakesh y cols., 2016). Otro estudio se realizó sobre 40 pacientes diagnosticados de depresión mayor comparó el efecto coadyuvante de una mezcla de probióticos y prebiótico tras la administración de fluoxetina durante 4 semanas, comparado con placebo, apreciándose un resultado significativo en la reducción de la puntuación en la HAM-D (Ghorbani y cols., 2018). Finalmente, Kazemi y cols. (2019) realizaron un estudio controlado con placebo sobre la aplicación de probióticos y prebióticos a una muestra de 110 sujetos con depresión mayor durante 8 semanas, apreciándose una mejoría significativa en la escala BDI en el grupo al que se le administró probióticos (*Lactobacillus helveticus* y *Bifidobacterium longum*).

Existen también varios trabajos de metaanálisis sobre este conjunto de trabajos (Huang y cols., 2016). En el último estudio de este tipo publicado, Liu y cols. (2019) realizaron un metanálisis de efectos aleatorios de 34 ensayos clínicos controlados que evaluaban los efectos de los prebióticos y probióticos sobre los síntomas depresivos y ansiosos, tanto en muestras clínicas como en otro tipo de poblaciones. Los resultados no encontraron diferencias entre los prebióticos y placebo para la depresión ( $d = -0,08$ ;  $p = 0,51$ ) o la ansiedad ( $d = 0,12$ ;  $p = 0,11$ ), mientras probióticos produjeron efectos pequeños pero significativos para la depresión ( $d = -0,24$ ;  $p < 0,01$ ) y la ansiedad ( $d = -0,10$ ;  $p = 0,03$ ). Se apreció un efecto superior en las muestras clínicas, de manera que la escasez de estas –solo dos estudios, ya citados anteriormente cumplían este criterio– afectó a la intensidad del efecto). Existe un respaldo general para los efectos antidepresivos y ansiolíticos de los probióticos, pero los efectos combinados se redujeron por la escasez de ensayos con muestras clínicas.

## Conclusiones

El eje intestino-cerebro ha abierto un nuevo paradigma de intervención en el campo de los trastornos mentales que ha sido recibido con optimismo, dado los excelentes resultados en estudios preclínicos y la necesidad de mejorar las intervenciones existentes en el campo de la salud mental. No obstante, se trata de un área todavía en desarrollo, y debe ser contemplada con cautela. Se necesitan ensayos clínicos aleatorios adicionales con muestras psiquiátricas para evaluar

plenamente su potencial terapéutico tanto de probióticos como de prebióticos. A pesar de los desafíos, la idea de que el tratamiento de la enfermedad psiquiátrica podría implicar, en el futuro, una receta psicobiótica o nutricional junto con un medicamento psicotrópico tradicional es ciertamente plausible.

## Bibliografía

- Akbari E, Asemi Z, Daneshvar Kakhaki R, Bahmani F, Kouchaki E, Tamtaji OR, et al. Effect of probiotic supplementation on cognitive function and metabolic status in Alzheimer's disease: A randomized, double-blind and controlled trial. *Front Aging Neurosci.* 2016; 8: 256.
- Akkasheh G, Kashani-Poor Z, Tajabadi-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.* 2016; 32: 315-20.
- Benton D, Williams C, Brown A. Impact of consuming a milk drink containing a probiotic on mood and cognition. *Eur J Clin Nutr.* 2007; 61: 355-61.
- Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotrophic factor and behavior in mice. *Gastroenterology.* 2011; 141: 599-609.
- Bermúdez-Humarán LG, Salinas E, Ortiz GG, Ramirez-Jirano LJ, Morales JA, Bitzer-Quintero OK. From probiotics to psychobiotics: Live beneficial bacteria which act on the brain-gut axis. *Nutrients.* 2019; 11: E890.
- 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 USA.* 2011; 108: 16050-5.
- Butler MI, Mörkl S, Sandhu KV, Cryan JF, Dinan TG. The gut microbiome and mental health: What should we tell our patients? *Can J Psychiatry.* 2019; 64: 747-60.
- Chen D, Yang X, Yang J, Lai G, Yong T, Tang X, et al. Prebiotic effect of fructooligosaccharides from *Morinda officinalis* on Alzheimer's disease in rodent models by targeting the microbiota-gut-brain axis. *Front Aging Neurosci.* 2017; 9: 403.
- Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: A novel class of psychotropic. *Biol Psychiatry.* 2013; 74: 720-6.
- Ghorbani Z, Nazari S, Etesam F, Nourimajid S, Ahmadpanah M, et al. The effect of synbiotic as an adjuvant therapy to fluoxetine in moderate depression: A randomized multicenter trial. *Arch Neurosci.* 2018; 5: e60507.
- Huang R, Wang K, Hu J. Effect of probiotics on depression: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrients.* 2016; 8: 483.
- Kazemi A, Noorbala AA, Azam K, Eskandari MH, Djafarian K. Effect of probiotic and prebiotic vs placebo on psychological outcomes in patients with major depressive disorder: a randomized clinical trial. *Clin Nutr.* 2019; 38: 522-8.
- LeCouffe NE, Westerbeek EA, van Schie PE, Schaaf VA, Lafeber HN, van Elburg RM. Neurodevelopmental outcome during the first year of life in preterm infants after supplementation of a prebiotic mixture in the neonatal period: A follow-up study. *Neuropediatrics.* 2014; 45: 22-9.
- Liu RT, Walsh RFL, Sheehan AE. Prebiotics and probiotics for depression and anxiety: A systematic review and meta-analysis of controlled clinical trials. *Neurosci Biobehav Rev.* 2019; 102: 3-23.
- Lupien SJ, McEwen BS, Gunnar MR, Heim C. Effects of stress throughout the lifespan on the brain, behaviour and cognition. *Nat Rev Neurosci.* 2009; 10: 434-45.
- Marcos A, Wärnberg J, Nova E, Gómez S, Alvarez A, Alvarez R, et al. The effect of milk fermented by yogurt cultures plus *Lactobacillus casei* DN-114001 on the immune response of subjects under academic examination stress. *Eur J Nutr.* 2004; 43: 381-9.
- Messaoudi M, Lalonde R, Violle N, Javelot H, Desor D, Nejd A, et al. Assessment of psychotropic-like properties of a probiotic formulation (*Lactobacillus helveticus* R0052 and *Bifidobacterium longum* R0175) in rats and human subjects. *Br J Nutr.* 2011; 105: 755-64.
- Mohammadi AA, Jazayeri S, Khosravi-Darani K, Solati Z, Mohammadpour N, Asemi Z, et al. The effects of probiotics on mental health and hypothalamic-pituitary-adrenal axis: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial in petrochemical workers. *Nutr Neurosci.* 2016; 19: 387-95.
- Naseribafrouei A, Hestad K, Avershina E, Sekelja M, Linløkken A, Wilson R, et al. Correlation between the human fecal microbiota and depression. *Neurogastroenterol Motil.* 2014; 26: 1155-62.
- Oliveros E, Ramirez M, Vazquez E, Barranco A, Gruart A, Delgado-García JM, et al. Oral supplementation of 2'-fucosyllactose during lactation improves memory and learning in rats. *J Nutr Biochem.* 2016; 31: 20-7.
- Rea K, Dinan TG, Cryan JF. The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. *Neurobiol Stress.* 2016; 4: 23-33.
- Rhee SH, Pothoulakis C, Mayer EA. Principles and clinical implications of the brain-gut-enteric microbiota axis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2009; 6: 306-14.
- Schmidt K, Cowen PJ, Harmer CJ, Tzortzis G, Errington S, Burnet PW. Prebiotic intake reduces the waking cortisol response and alters emotional bias in healthy volunteers. *Psychopharmacology (Berl).* 2015; 232: 1793-801.
- Seitz J, Trinh S, Herpertz-Dahlmann B. The microbiome and eating disorders. *Psychiatr Clin North Am.* 2019; 42: 93-103.
- Steenbergen L, Sellaro R, van Hemert S, Bosch JA, Colzato LS. A randomized controlled trial to test the effect of multispecies probiotics on cognitive reactivity to sad mood. *Brain Behav Immun.* 2015; 48: 258-64.
- Song L, Gao Y, Zhang X, Le W. Galactooligosaccharide improves the animal survival and alleviates motor neuron death in SOD1G93A mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroscience.* 2013; 246: 281-90.
- Tillisch K, Labus J, Kilpatrick L, Jiang Z, Stains J, Ebrat B, et al. Consumption of fermented milk product with probiotic modulates brain activity. *Gastroenterology.* 2013; 144: 1394-401.
- van den Berg JP, Westerbeek EA, Bröring-Starre T, Garssen J, van Elburg RM. Neurodevelopment of preterm infants at 24 months after neonatal supplementation of a prebiotic mix: A randomized trial. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2016; 63: 270-6.
- Zhou L, Foster JA. Psychobiotics and the gut-brain axis: in the pursuit of happiness. *Neuropsychiatr Dis Treat.* 2015; 11: 715-23.

# Microbiota, psicobióticos y trastornos del espectro autista

Guillermo Álvarez Calatayud, César Sánchez, Mar Tolín, Carmen Miranda, Matheus Zeferino, Jimena Pérez Moreno

*Sección de Gastroenterología y Nutrición Pediátrica. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.*

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):58-60

## Introducción

El ser humano ha evolucionado conjuntamente con su microbioma y en este contexto ha tenido lugar también la evolución de su cerebro cuyo desarrollo tras el nacimiento concuerda con la adquisición y establecimiento de la microbiota intestinal. El concepto del eje intestino-cerebro data de los siglos XIX-XX con observaciones de científicos de la talla de Darwin, Beaumont o Cannon. Recientemente, con el conocimiento de la importancia de la microbiota en la promoción de la salud, el eje se amplía a cerebro-intestino-microbiota. Este eje explica cómo la microbiota modula el sistema inmune, el sistema gastrointestinal y el sistema nervioso central (SNC).

La microbiota juega un papel importante en el neurodesarrollo cerebral en edades tempranas de la vida, sobre todo en la primera infancia y este hecho puede tener sus consecuencias en edades posteriores. El eje cerebro-intestino-microbiota es una reconocida vía de comunicación bidireccional. El estrés puede alterar funciones gastrointestinales (retortijones antes de un examen) mientras que las sensaciones procedentes del aparato digestivo pueden afectar a las emociones y la conducta (una buena comida). La comunicación del microbioma intestinal y el cerebro tiene lugar a través de múltiples rutas que incluyen el nervio vago, los neuropéptidos secretados en el intestino, citoquinas, triptófano y productos de fermentación del metabolismo microbiano como son los ácidos grasos de cadena corta. Por otro lado, el cerebro también modula respuestas microbianas intestinales a través de la secreción de moléculas señalizadoras al interior intestinal. De esta manera, se ha postulado el importante papel que jugaría la microbiota en el funcionamiento del SNC, tanto en condiciones de salud como de enfermedad, a nivel del

desarrollo cerebral, del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal, en la expresión de receptores de serotonina y en el recambio de neurotransmisores que regulan el desarrollo y la función de las sinapsis neuronales.

Por lo tanto, además de ayudar a mantener las funciones cerebrales, la microbiota intestinal también podría influir en el desarrollo de trastornos psiquiátricos y neurológicos, incluyendo patologías relacionadas con el estrés como la ansiedad y la depresión o trastornos del comportamiento como el autismo. Diversos estudios científicos han demostrado que los ratones libres de microorganismos (*germ-free*; obtenidos experimentalmente de manera que carecen de microbiota), poseen una conducta anormal (hiperactividad, respuesta exagerada al estrés), con niveles bajos de serotonina y falta de regulación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal. A través de estos mecanismos, se postula que las alteraciones en la microbiota intestinal (sobre todo en edades tempranas, pero también en la adolescencia) pueden contribuir a alteraciones del neurodesarrollo y a enfermedades mentales en edades posteriores. Distintos factores, tan diversos como la dieta, el genotipo, el consumo de antibióticos o la ingesta de probióticos pueden cambiar la balanza entre la homeostasis/disbiosis de la microbiota intestinal y afectar a la función cerebral.

En 2013, Timothy G. Dinan, profesor de Psiquiatría y director del Departamento de Psiquiatría del University College en Cork (Irlanda), en una publicación conjunta con sus colegas Catherine Stanton y John F. Cryan, lanzaron un nuevo concepto: “los psicobióticos”. Los autores definían el término psicobiótico como un “organismo vivo que, cuando se consume en cantidades adecuadas, produce un beneficio en la salud de pacientes con trastornos mentales”. Es obvio que la definición recorre un cauce paralelo a la definición de

probiótico propuesta por la FAO/OMS en 2002 y en ella se recalca que precisamente se trata de una clase de probióticos capaces de producir y liberar sustancias neuroactivas (GABA, serotonina) que actúan a través del eje cerebro-intestino. Por ese motivo, en un principio, su empleo podría estar indicado en pacientes con patología neurológica (cefaleas, esclerosis múltiple o enfermedad de Parkinson) o en los trastornos del comportamiento (ansiedad, depresión, autismo, TDAH, enfermedad de Alzheimer, etc.) El grado de evidencia científica de su utilización en muchas de estas patologías todavía es muy limitado siendo la mayoría de los estudios experimentales aunque por la tipología de los pacientes se han creado muchas expectativas.

### Trastornos del espectro autista

Una de las principales líneas de investigación que se está desarrollando en la última década trata sobre el posible e importante papel que podría jugar la microbiota intestinal en el comportamiento social, como se lleva observando desde hace varios años en numerosos estudios en animales de experimentación y, cada vez, con más frecuencia en ensayos clínicos en humanos. Esto ha traído consigo muchas expectativas, tanto para los profesionales sanitarios como para los familiares de los pacientes con trastornos del espectro autista (TEA), ya que uno de los objetivos principales en estos niños y adolescentes es el de mejorar su calidad de vida.

El origen de los TEA parece que tiene lugar en la etapa prenatal que supone una ventana de tiempo en la que se forman importantes conexiones neurológicas. Aunque se desconoce su etiología, se han involucrado factores como las infecciones maternas durante la gestación que pueden traer como resultado una elevada tasa de citoquinas tanto en madres como en niños con TEA. Se han hecho diversos estudios que describen la microbiota intestinal en estos pacientes y, en general, los resultados parecen indicar un mayor contenido de grupos clostridiales productores de toxinas y menor del género *Prevotella* en los TEA. También se ha comprobado una menor proporción de bacterias beneficiosas como bifidobacterias y eubacterias. En un reciente metanálisis que incluía 254 pacientes se encontró que los niños con TEA presentaban porcentajes más bajos de *Akkermansia*, *Bacteroides*, *Bifidobacterium* y *Parabacteroides* y más elevados de *Faecalibacterium* cuando se comparaban con los controles. Además en los niños autistas se ha observado una disminución de la diversidad bacteriana.

Este desequilibrio, con mayor abundancia de proteobacterias y menor de bifidobacterias, también se halla en trastornos funcionales digestivos infantiles como el cólico del lactante o el síndrome del intestino irritable y es probable que se relacione con los problemas gastrointestinales que son frecuentes en los pacientes con TEA, como diarrea, estreñimiento, meteorismo, distensión abdominal y diversas intolerancias alimentarias. De hecho, tras el neuropediatra, es el gastroente-

rólogo infantil el subespecialista que más interconsultas recibe por parte de los psiquiatras ya que los problemas digestivos y nutricionales son los que con más frecuencia presentan estos niños tras los trastornos del comportamiento.

### Empleo de probióticos

Como se ha ido documentando de forma amplia que en muchos de estos trastornos está implicada una alteración de la microbiota intestinal, teóricamente, estos niños podrían beneficiarse con suplementos de probióticos. Sin embargo, al igual que ha ocurrido con otras terapias que se han empleado de una manera indiscriminada y con poco rigor científico en los pacientes con TEA, como ciertas dietas restrictivas (por ejemplo, dieta sin gluten/caseína o sin azúcares) y múltiples terapias alternativas (se han probado casi todos los suplementos nutricionales), no deberíamos caer en el error de crear falsas esperanzas a pacientes y familiares. Por ese motivo, es muy importante que tanto el papel que pueda jugar la microbiota en este tipo de trastornos como su posible modulación con el empleo de la dieta, los probióticos o el trasplante fecal estén basados en ensayos clínicos contrastados con evidencia científica.

Así, la utilización de probióticos podía mejorar no solo los síntomas gastrointestinales de estos pacientes sino también las alteraciones en la conducta y comportamiento. En estudios experimentales realizados por el grupo de Elaine Hsiao en la Universidad de California en ratones MIA (modelos de autismo) se ha observado que la disbiosis ocasionada genera metabolitos (4 etil-fenil-sulfato) detectables en el suero, que están relacionados con los síntomas de la enfermedad. Se ha demostrado que esto se puede corregir con la administración de la bacteria *Bacteroides fragilis* mejorando los problemas de comportamiento y restableciendo la permeabilidad digestiva y los cambios en la composición de la microbiota. Esta relación parece que es dependiente del nervio vago.

Existen varios metaanálisis que han valorado la eficacia de diversas cepas en estos pacientes. En general, parece que además de aminorar su sintomatología digestiva, se aprecia una mejora en los atributos de comportamiento de la escala ATEC de evaluación de severidad del autismo, donde se valoran parámetros como el lenguaje, la sociabilidad, el aprendizaje o la conducta. En el metanálisis realizado por Patusco y cols., publicado en septiembre de 2018 se revisaron 186 artículos aunque solo cumplían criterios de inclusión con suficiente fiabilidad científica cinco de ellos con un total de 117 niños autistas con problemas gastrointestinales observándose una mejoría tanto en los síntomas digestivos como del comportamiento.

Más exhaustiva parece la revisión sistemática realizada por Ng y cols. en 2019. Tras examinar 1592 artículos y una vez descartados resultados duplicados, abstracts o proceedings, casos clínicos aislados, cartas al editor, ensayos experimentales o erróneos diagnósticos de TEA y/o tratamientos inadecua-

dos, llegaron a la conclusión que solo 8 estudios cumplían con los requisitos de calidad suficientes para ser incluidos, 2 con prebióticos y 6 con probióticos. Aunque las cepas o mezclas de ellas y el tiempo de administración fueron distintos, la mayoría de los ensayos mostraron mejoría tanto de los síntomas gastrointestinales como del comportamiento.

Mención aparte merece un reciente estudio aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo realizado en Taiwan por Liu y cols. El objetivo del ensayo fue valorar la mejora clínica tras la administración durante 4 semanas de *Lactobacillus plantarum* PS128 en 72 niños de 7 a 15 años que cumplieron con los criterios para el diagnóstico de TEA de DSM-V. Los resultados mostraron que la cepa probiótica mejoró significativamente diversos síntomas de comportamiento como el de oposición/desafío en comparación con el grupo placebo. Además en varias escalas y cuestionarios los niños del grupo probiótico dieron mejores resultados después de 28 días de consumo del preparado. A pesar de lo exitoso del tratamiento, los autores se muestran cautos y afirman que se necesitan más estudios para aclarar mejor los efectos de *Lactobacillus plantarum* PS128, sobre todo, en los niños más pequeños con TEA que presentan mayor sintomatología.

### Trasplante fecal

También se han desarrollado ensayos en estos pacientes empleando un trasplante fecal con buena seguridad y resultados prometedores. El estudio que ha tenido mayor impacto fue publicado online en enero de 2017 en la revista *Microbiome* y llevado a cabo en la Universidad del Estado de Arizona en Estados Unidos por Dae-Wook Kang y cols. en 18 niños con diagnóstico de TEA y clínica gastrointestinal moderada o severa. La terapia consistía en la administración a lo largo de dos semanas de tratamiento antibiótico (vancomicina), limpieza intestinal, y administración oral o rectal a dosis iniciales altas de microbiota fecal, seguido de dosis diarias de mantenimiento a lo largo de 7 a 8 semanas. Según los resultados del estudio, los pacientes lograron mejoría en la clínica gastrointestinal fundamentalmente, y, en menor medida, en un 25% de los casos, se objetivó mejoría de los síntomas relacionados con el lenguaje, la interacción social y las estereotipias. Según las escalas aportadas por los familiares, los niños también se mostraron menos hiperactivos, irritables y letárgicos. Tras cinco semanas de tratamiento, experimentaron una reducción del 80% de los síntomas gastrointestinales, principalmente dolor abdominal, indigestión, diarrea y estreñimiento.

Las limitaciones fundamentales del trabajo tienen que ver con que se trata de un estudio abierto, no aleatorizado, sin grupo control, con una muestra muy pequeña y donde no podemos realmente discernir qué porcentaje del efecto terapéutico observado corresponde a cada uno de los elementos del tratamiento realizado. Por lo tanto, a pesar de ser una línea de investigación aparentemente prometedora, no hay la

evidencia necesaria para hacer una recomendación terapéutica en este sentido. Sin embargo, los autores publicaron los resultados del ensayo un año después y el porcentaje de niños que seguían con mejoría clínica no había variado a pesar de no volver a hacer ninguna intervención terapéutica, lo que nos plantea que un tratamiento a largo plazo basado en la modificación del microbioma y del viroma intestinal mejoraría los síntomas gastrointestinales y conductuales de estos pacientes. Aun así, la mayoría de los estudios realizados con trasplante de microbiota fecal en estos niños no son ensayos doble ciego y controlados frente a placebo y, además, hay que tener en cuenta la subjetividad en la percepción de la mejora de los síntomas psicológicos por parte de los cuidadores.

### Conclusiones

La utilización de dietas especiales, el uso del trasplante fecal pero, sobre todo, por su mayor evidencia científica en la actualidad, el empleo de psicobióticos, abre una puerta a la esperanza al beneficio que puede aportar la modificación de la microbiota intestinal en estos pacientes. Aun así, es necesario mantener la cautela, ya que uno de los objetivos principales en estos niños y adolescentes es el de mejorar su calidad de vida y no debemos caer en el error de crear falsas esperanzas a pacientes y familiares.

### Bibliografía general

- Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol Psychiatry*. 2014; 19:146-8.
- Dinan TG, Stanton C, Cryan JF. Psychobiotics: a novel class of psychotropic. *Biol Psychiatry*. 2013; 74: 720-6.
- Hsiao EY, McBride SW, Hsien S, Sharon G, Hyde ER, McCue T, et al. Microbiota modulate behavioral and physiological abnormalities associated with neurodevelopmental disorders. *Cell*. 2013; 155: 1451-63.
- Kang DK, Adams JB, Gregory AC, Borody T, Chittick L, Fasano A, et al. Microbiota Transfer Therapy alters gut ecosystem and improves gastrointestinal and autism symptoms: an open-label study. *Microbiome*. 2017; 5: 10.
- Kang DW, Adams JB, Coleman DM, Pollard EL, Maldonado J, McDonough-Means S, et al. Long-term benefit of Microbiota Transfer Therapy on autism symptoms and gut microbiota. *Sci Rep*. 2019; 9: 5821.
- Kelly JR, Minuto C, Cryan JF, Clarke G, Dinan TG. Cross talk: The microbiota and neurodevelopmental disorders. *Front Neurosci*. 2017; 11: 490.
- Li Q, Han Y, Dy ABC, Hagerman RJ. The gut microbiota and autism spectrum disorders. *Front Cell Neurosci*. 2017; 11: 120.
- Liu YW, Liang MT, Chung YE, Huang HY, Peng WS, Cheng YF, et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* PS128 on children with autism spectrum disorder in Taiwan: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Nutrients*. 2019; 11: E820.
- Misra S, Mohanty D. Psychobiotics: A new approach for treating mental illness? *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2019; 59: 1230-6.
- Ng QX, Loke W, Venkatanarayanan N, Lim DY, Soh AYS, Yeo WS. A systematic review of the role of prebiotics and probiotics in autism spectrum disorders. *Medicina (Kaunas)*. 2019; 55: E129.
- Patusco R, Ziegler J. Role of probiotics in managing gastrointestinal dysfunction in children with autism spectrum disorder: An update for practitioners. *Adv Nutr*. 2018; 9: 637-50.

# Mecanismo de acción de los probióticos

Ángel Gil, Julio Plaza-Díaz, Francisco Javier Ruiz-Ojeda, Carolina Gómez-Llorente, Luis Fontana

*Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada; Instituto de Nutrición y Tecnología de los Alimentos “José Mataix”, Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada; Instituto de Investigación Biosanitaria IBS. GRANADA, Complejo Hospitalario Universitario de Granada; CIBEROBN (CIBER Fisiopatología de la Obesidad y Nutrición, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.*

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):61-65

## Introducción

El término probiótico se refiere a microorganismos vivos que aportan efectos beneficiosos a la salud del hospedador cuando se administran en cantidades adecuadas aunque los microorganismos muertos o fragmentos de los mismos también pueden exhibir propiedades probióticas<sup>(1,2)</sup>. Al ser administrados a seres humanos deben ser completamente seguros y libres de vectores, como por ejemplo los que generan resistencia a antibióticos, así como tener capacidad de supervivencia a condiciones intestinales tales como el pH, acidez gástrica, enzimas digestivas, sales biliares, entre otras características<sup>(3,4)</sup>.

Las principales cepas usadas como probióticos pertenecen a las llamadas bacterias del ácido láctico (LAB), un grupo heterogéneo de microorganismos presentes de forma habitual en numerosos productos fermentados y en el intestino humano. Cepas del género *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* y *Streptococcus* así como especies de *Saccharomyces boulardii* y *Escherichia coli* Nissle 1917 son utilizadas como probióticos<sup>(4,5)</sup>.

La Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y la “Food and Drug Administration” de Estados Unidos (FDA) han reconocido que muchas cepas con capacidad probiótica son seguras, como por ejemplo las cepas del género *Lactobacillus*, aunque se debe tener en cuenta que no se les han atribuido capacidad para prevenir o tratar enfermedades. Sin embargo, los probióticos han demostrado tener un papel muy importante en algunas patologías intestinales como la diarrea causada por infecciones, diarrea asociada a tratamiento antibiótico y síndrome del intestino irritable<sup>(1,2,6,7)</sup>, ya sea por los cambios que se producen, tanto a nivel cuantitativo como

cuantitativo en la composición de la microbiota intestinal, así como también por la repercusión sobre la salud del hospedador en términos de inflamación asociada a enfermedades crónicas no transmisibles<sup>(8)</sup>, con el fin último de generar una mayor diversidad microbiana asociada al estado de salud<sup>(9)</sup>.

Los mecanismos mediante los cuales los probióticos ejercen sus efectos beneficiosos son variados y se exponen a continuación.

## Colonización y normalización de la microbiota intestinal

### Niños

La colonización de la microbiota intestinal comienza en el nacimiento y continúa durante la infancia. Varios factores influyen en la colonización intestinal inicial, como la constitución genética del recién nacido, el tipo de parto, la administración de antibióticos, la alimentación recibida y factores de la propia madre, por ejemplo situaciones de estrés o alguna condición inflamatoria. Bacterias aisladas desde la placenta, sangre de cordón umbilical y meconio (*Enterococcus faecium*, *Propionibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis* y *Escherichia coli*) se encuentran entre las cepas que podrían afectar la colonización. Sin embargo, las bacterias presentes en la vagina y en la leche humana parecen ser más importantes para la colonización del intestino infantil. Estas bacterias pueden propagarse desde el tracto digestivo a sitios extradigestivos a través de las células dendríticas, que pueden ingresar al epitelio y tomar las bacterias directamente de la luz intestinal. Una vez dentro, las bacterias pueden ser transportadas a otras áreas por la circulación de células

inmunitarias a través del torrente sanguíneo. La adhesión de las bacterias a las superficies del hospedador es un aspecto crucial para la colonización, ya que puede prevenir de manera mecánica la adhesión de patógenos<sup>(1,2)</sup>.

Estudios en niños a los que se administraron cepas con actividad probiótica han encontrado resultados positivos en la normalización de la composición intestinal alterada, maduración intestinal, disminución de la carga patógena e infecciones, y un aumento en la respuesta inmunitaria; sin embargo, solo algunos de estos estudios han documentado cambios específicos en la composición de la microbiota. En estudios clínicos en niños, cepas probióticas específicas han demostrado atenuar la gravedad de diferentes patologías como la enterocolitis necrotizante, la enfermedad inflamatoria intestinal, especialmente la colitis ulcerosa, la diarrea nosocomial, la diarrea asociada a antibióticos y las alergias<sup>(10)</sup>.

### Adultos

En adultos sanos, la administración de cepas probióticas aumenta la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC), la humedad fecal, la frecuencia de defecación y el volumen de las heces. La gran mayoría de estudios en adultos sanos o con alguna patología de base evalúa la seguridad y la tolerancia de las cepas administradas; algunos de ellos, además, evalúan ciertos efectos sobre el sistema inmunitario al terminar la intervención, la cual suele tener una duración que oscila de las 4 hasta las 8 semanas<sup>(11-14)</sup>.

### Exclusión competitiva de patógenos y producción de bacteriocinas

La exclusión competitiva se refiere a la situación en la que una especie bacteriana compite por los alimentos y por los sitios receptores ubicados en el tracto gastrointestinal de manera más efectiva que otras especies. Las vías específicas y los mecanismos regulatorios clave de estos efectos de las cepas con actividad probiótica son en gran medida desconocidos. La reducción en el pH luminal gracias a la producción de ácidos, la competencia por fuentes nutricionales, y la producción de bacteriocinas (péptidos antimicrobianos) o sustancias similares a las bacteriocinas se encuentran entre los principales mecanismos propuestos para la competencia exclusiva de patógenos.

La mayoría de los estudios se han centrado en la reducción de la adhesión de patógenos como *Salmonella typhi* y *Escherichia coli*, en presencia de cepas probióticas. Dichos estudios revelan que algunos metabolitos probióticos parecen jugar un papel importante en la modulación de diversas señales y vías metabólicas. De hecho, los componentes del metaboloma probiótico (ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno y aminos, entre otras) interactúan con múltiples vías metabólicas que regulan la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, inflamación, angiogénesis y metástasis. Algunas cepas de lactobacilos y bifidobacterias

pueden producir bacteriocinas que previenen la proliferación de patógenos. Las bacteriocinas son pequeñas moléculas catiónicas compuestas de alrededor de 30 a 60 aminoácidos. Estas moléculas actúan en las membranas bacterianas, destruyendo la pared celular por formación de un poro o por inhibición de la síntesis de la pared celular, dando como resultado la muerte bacteriana. Diferentes estudios han demostrado que las cepas *L. plantarum* y *L. acidophilus* son capaces de generar estas moléculas e inhibir el crecimiento de *Helicobacter pylori*, *Clostridioides difficile*, y especies de *Shigella* y *E. coli* resistentes, así como rotavirus, que son algunos de los microorganismos relacionados con varias afecciones gastrointestinales<sup>(15)</sup>.

### Producción de mucinas

Para que un microorganismo sea catalogado como probiótico debe cumplir ciertos requisitos. Uno de ellos es la adhesión a la mucosa intestinal para colonizar el intestino e interactuar con el hospedador. Es necesario que se produzca una interacción específica para así modular el antagonismo contra patógenos y futuras acciones en el sistema inmunitario. Las células epiteliales intestinales secretan mucina para evitar la adhesión de bacterias patógenas. Variadas cepas de *Lactobacillus* han demostrado esta acción aumentando proteínas que promueven la adhesión y exhibiendo adhesinas superficiales que facilitan la unión a la capa mucosa<sup>(1,2,15)</sup>.

### Actividad enzimática y producción de ácidos grasos de cadena corta

#### Actividad enzimática

La actividad enzimática de las cepas con actividad probiótica puede desempeñar un papel en los efectos biológicos de estos en la luz intestinal. Lactobacilos y bifidobacterias exhiben más de 20 actividades enzimáticas diferentes, siendo la actividad  $\beta$ -galactosidasa la más descrita.

*Bifidobacterium longum* contribuye a generar cambios específicos en la microbiota intestinal y además es capaz de disminuir la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa, asociada con la formación de criptas aberrantes y marcador preneoplásico temprano de carcinogénesis de colon. Los probióticos interactúan con los ácidos biliares en la luz intestinal, modificando el metabolismo de los ácidos biliares y a su vez influyendo en la absorción de colesterol. La hidrolasa de sales biliares es una enzima producida por especies bacterianas de varios géneros y por la mayoría de las cepas de probióticos conocidas; esta enzima puede participar en la primera reacción de desconjugación de sales biliares. Dicha reacción en las sales biliares es uno de los principales mecanismos por los que los probióticos podrían tener un efecto hipocolesterolemiante<sup>(1,2,7)</sup>.

#### Ácidos grasos de cadena corta

Los AGCC producidos por las bacterias como consecuencia de su actividad metabólica ejercen numerosos efectos

en muchos tejidos, incluyendo el intestino, el hígado, y los tejidos adiposo, muscular y cerebral. Se conocen 8 AGCC, siendo los más relevantes el ácido acético, propiónico y butírico. Se ha propuesto que el acetato producido por las bifidobacterias puede mejorar la defensa intestinal mediada por células epiteliales y proteger al hospedador contra infecciones letales. Los AGCC son una fuente importante de energía para los enterocitos y son moléculas clave de señalización para el mantenimiento de la salud del intestino. Además, pueden ingresar a la circulación sistémica e interactuar con los receptores celulares en los tejidos periféricos. De hecho, los AGCC tienen un papel importante en la regulación de la energía y el mantenimiento de la homeostasis. Los AGCC pueden interactuar con sus receptores acoplados a proteínas G aumentando la secreción intestinal del polipéptido YY y péptido similar al glucagón 1, mejorando la saciedad. Por otro lado, los AGCC podrían llegar al tejido adiposo y contribuir en la disminución de grasa al interactuar con su receptor, disminuyendo la lipólisis y la inflamación, con un posterior aumento de la adipogénesis y liberación de leptina<sup>(2)</sup>.

Se ha propuesto que el acetato, el propionato y el butirato, especialmente los dos últimos, podrían reducir la secreción de citoquinas y quimioquinas proinflamatorias, probablemente por una reducción en la infiltración local de macrófagos. Otras actividades biológicas diversas de los AGCC producidos por algunas cepas con actividad probiótica podrían estar mediadas por sus acciones epigenéticas, que pueden explicar la amplia gama de efectos anticancerígenos atribuido a los probióticos. Sin embargo, se necesitan estudios adicionales en este aspecto, particularmente en humanos<sup>(2)</sup>. Además, los AGCC se han propuesto como moléculas implicadas en la interacción intestino-cerebro, que se describe más abajo<sup>(16)</sup>.

### Modulación del sistema inmunitario

La microbiota intestinal es capaz de modular el sistema inmunitario. Estos efectos inmunomoduladores se deben a la interacción de las bacterias probióticas con las células epiteliales, las células dendríticas, los monocitos, los macrófagos y los linfocitos. Estudios realizados tanto en animales como en humanos (sanos o con alguna comorbilidad) han demostrado que se produce una alteración en la respuesta inmunitaria tras la administración de cepas probióticas, disminuyendo la secreción de citoquinas proinflamatorias y aumentando la de citoquinas antiinflamatorias<sup>(11,17-19)</sup>. Se ha descrito que la modulación del sistema inmunitario se produce gracias al reconocimiento de patrones a través de los receptores tipo *Toll* y los receptores NOD, los cuales a su vez modulan moléculas claves como el factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B y las quinasas activadas por mitógenos (MAPK)<sup>(1)</sup>.

### Interacción con el eje intestino-cerebro

Se ha demostrado que la microbiota intestinal, el sistema de señalización intestino-cerebro y la interacción de la

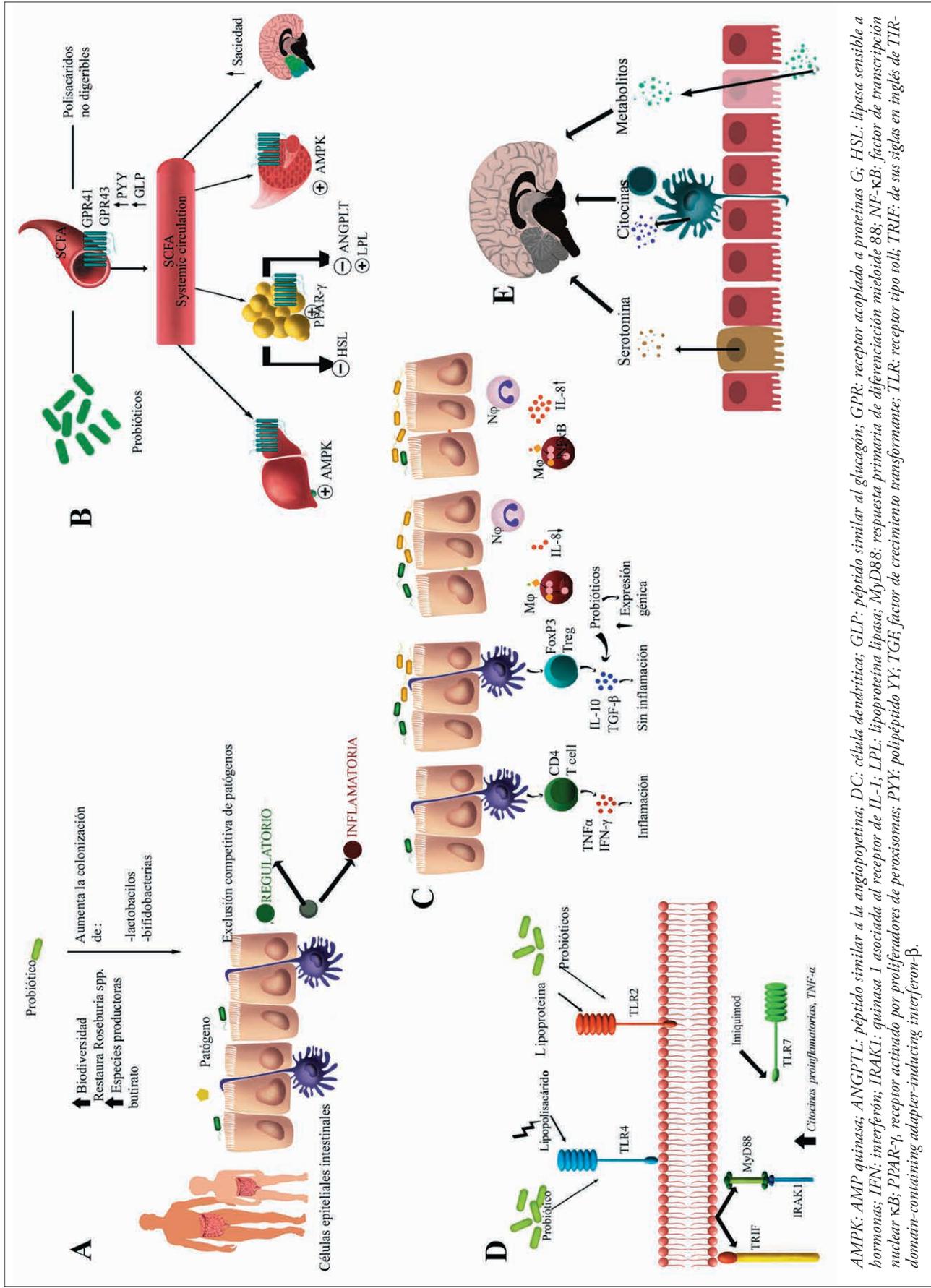
microbiota con receptores genéticos están relacionados con la salud de los niños y con el desarrollo del comportamiento a corto y largo plazo. El papel de la microbiota intestinal en la salud y la enfermedad en los primeros años de vida se ha vuelto muy relevante porque existe evidencia de que la microbiota intestinal puede influir en muchos aspectos del comportamiento humano<sup>(2)</sup>.

Los recién nacidos prematuros son particularmente más vulnerables al estrés y al dolor que los recién nacidos a término. El estrés se activa en el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal y el sistema nervioso simpático, que aumenta la permeabilidad intestinal y permite que las bacterias y los antígenos bacterianos crucen el epitelio, activan la respuesta inmunitaria de la mucosa y alteran la composición del microbioma. Por otro lado, el estrés oxidativo en el intestino modula el proceso del establecimiento de la microbiota en los recién nacidos prematuros. Por otra parte, niños con trastornos en el neurodesarrollo, incluido el síndrome del espectro autista, se ven afectados regularmente por problemas gastrointestinales y una disminución de la diversidad bacteriana en la microbiota intestinal. Se ha demostrado que *Bacteroides fragilis* puede desempeñar un papel importante en la mejora de los comportamientos asociados al síndrome del espectro autista.

La figura 1 resume los principales mecanismos de acción de los probióticos señalados anteriormente.

### Bibliografía

1. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab.* 2012; 61: 160-74.
2. Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Mechanisms of action of probiotics. *Adv Nutr.* 2019; 10(suppl\_1): S49-66.
3. Food, Organization AOWH. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 2001.
4. Roberfroid MB. Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr.* 2000; 71: 1682S-7S.
5. Fontana L, Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gil A. Sources, isolation, characterisation and evaluation of probiotics. *Br J Nutr.* 2013; 109(S2): S35-S50.
6. Saez-Lara MJ, Gomez-Llorente C, Plaza-Díaz J, Gil A. The role of probiotic lactic acid bacteria and bifidobacteria in the prevention and treatment of inflammatory bowel disease and other related diseases: a systematic review of randomized human clinical trials. *Biomed Res Int.* 2015; 2015.
7. Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Vilchez-Padial LM, Gil A. Evidence of the anti-inflammatory effects of probiotics and synbiotics in intestinal chronic diseases. *Nutrients.* 2017; 9: 555.
8. Byndloss MX, Bäumlér AJ. The germ-organ theory of non-communicable diseases. *Nat Rev Microbiol.* 2018; 16: 103.
9. Plaza-Díaz J, Fernández-Caballero J, Chueca N, García F, Gómez-Llorente C, Saez-Lara M, et al. Pyrosequencing analysis reveals changes in intestinal microbiota of healthy adults who received a daily dose of immunomodulatory probiotic strains. *Nutrients.* 2015; 7: 3999-4015.
10. Plaza-Díaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil A. Immune-mediated mechanisms of action of probiotics and synbiotics in treating pediatric intestinal diseases. *Nutrients.* 2018; 10: 42.



AMPK: AMP quinasa; ANGPTL: péptido similar a la angiotensina; DC: célula dendrítica; GLP: péptido similar al glucagón; GPR: receptor acoplado a proteínas G; HSL: lipasa sensible a hormonas; IFN: interferón; IRAK1: quinasa 1 asociada al receptor de IL-1; LPL: lipoproteína lipasa; MyD88: respuesta primaria de diferenciación mieloide 88; NF-κB: factor de transcripción nuclear κB; PPAR-γ, receptor activado por proliferadores de peroxisomas; PYY: polipeptido YY; TGF: factor de crecimiento transformante; TLR: receptor tipo toll; TRIF: receptor tipo toll; TRIF: de sus siglas en inglés de TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β.

**Figura 1.** Mecanismos de acción probióticos. A) Colonización y normalización de microbiota intestinal, exclusión competitiva de patógenos y producción de bacteriocinas; B) actividad enzimática y producción de ácidos grasos de cadena corta; C) adhesión celular, antagonismo celular y producción de mucinas; D) modulación del sistema inmunitario; y E) interacción con el eje intestino-cerebro.

11. Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Campaña-Martin L, Matencio E, Ortuño I, Martínez-Silla R, et al. Safety and immunomodulatory effects of three probiotic strains isolated from the feces of breast-fed infants in healthy adults: SETOPROB study. *PLoS One*. 2013; 8: e78111.
12. Tenorio-Jiménez C, Martínez-Ramírez M, Tercero-Lozano M, Arraiza-Irigoyen C, Del Castillo-Codes I, Olza J, et al. Evaluation of the effect of *Lactobacillus reuteri* V3401 on biomarkers of inflammation and cardiovascular risk in obese adults with metabolic syndrome: A randomized clinical trial (PROSIR). *Clin Nutr*. 2018; 37: S15.
13. Tenorio-Jiménez C, Martínez-Ramírez MJ, Tercero-Lozano M, Arraiza-Irigoyen C, Del Castillo-Codes I, Olza J, et al. Evaluation of the effect of *Lactobacillus reuteri* V3401 on biomarkers of inflammation, cardiovascular risk and liver steatosis in obese adults with metabolic syndrome: a randomized clinical trial (PROSIR). *BMC Complement Altern Med*. 2018; 18: 306.
14. Tenorio-Jiménez C, Martínez-Ramírez MJ, Castillo-Codes D, Arraiza-Irigoyen C, Tercero-Lozano M, Camacho J, et al. *Lactobacillus reuteri* V3401 Reduces Inflammatory Biomarkers and Modifies the Gastrointestinal Microbiome in Adults with Metabolic Syndrome: The PROSIR Study. *Nutrients*. 2019; 11: 1761.
15. Muñoz-Quezada S, Bermudez-Brito M, Chenoll E, Genovés S, Gomez-Llorente C, Plaza-Diaz J, et al. Competitive inhibition of three novel bacteria isolated from faeces of breast milk-fed infants against selected enteropathogens. *Br J Nutr*. 2013; 109(S2): S63-S9.
16. van de Wouw M, Boehme M, Lyte JM, Wiley N, Strain C, O'Sullivan O, et al. Short-chain fatty acids: microbial metabolites that alleviate stress-induced brain-gut axis alterations. *J Physiol*. 2018; 596: 4923-44.
17. Plaza-Diaz J, Gomez-Llorente C, Abadia-Molina F, Saez-Lara MJ, Campaña-Martin L, Muñoz-Quezada S, et al. Effects of *Lactobacillus paracasei* CNCM I-4034, *Bifidobacterium breve* CNCM I-4035 and *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-4036 on hepatic steatosis in Zucker rats. *PLoS One*. 2014; 9: e98401.
18. Plaza-Díaz J, Robles-Sánchez C, Abadía-Molina F, Morón-Calvente V, Sáez-Lara MJ, Ruiz-Bravo A, et al. Adamdec1, Ednrb and Prgs1/Cox1, inflammation genes upregulated in the intestinal mucosa of obese rats, are downregulated by three probiotic strains. *Sci Rep*. 2017; 7: 1939.
19. Plaza-Díaz J, Robles-Sánchez C, Abadía-Molina F, Sáez-Lara MJ, Vilchez-Padial LM, Gil Á, et al. Gene expression profiling in the intestinal mucosa of obese rats administered probiotic bacteria. *Sci Data*. 2017; 4: 170186.

## Polifenoles y microbiota intestinal

Francisco A. Tomás-Barberán, Rocío García-Villalba, Antonio González-Sarrías, María Victoria Selma, Juan Carlos Espín

*Laboratorio de Alimentos y Salud. Grupo de Calidad, Seguridad y Bioactividad de Alimentos Vegetales, CEBAS-CSIC, Murcia.*

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):66-69

Durante la década de los 90, la epidemiología señaló a los polifenoles como unos componentes esenciales de la dieta relacionados con la disminución del riesgo de padecer enfermedades crónicas, sobre todo cardiovasculares (Hertog y cols., 1993). Sin embargo, los estudios de intervención para evaluar el efecto de distintos tipos de polifenoles sobre marcadores de riesgo cardiometabólico han conducido a resultados poco concluyentes mostrando una gran variabilidad en la respuesta de los diferentes individuos tras la ingesta de diferentes tipos de polifenoles, encontrando algunos voluntarios que responden claramente mientras que otros no lo hacen (Morand y cols., 2020). Como la biodisponibilidad de los polifenoles es generalmente muy baja, o incluso completamente nula en el caso de los polifenoles oligoméricos y poliméricos, las cantidades que se encuentran en el lumen intestinal pueden llegar a ser muy altas.

Desde comienzos de este siglo se ha demostrado la relevancia que tiene la microbiota intestinal en el metabolismo de los polifenoles y por tanto en su biodisponibilidad y efectos potenciales en la salud. Se sabe que los polifenoles oligoméricos son convertidos en metabolitos con una actividad biológica relevante, que además se absorben mucho mejor que los polifenoles que hay originalmente en el alimento, y que persisten por un largo tiempo (hasta 2 o 3 días) en el organismo probablemente debido a su limitada solubilidad y lenta liberación en los fluidos intestinales, y a su demostrada re-circulación entero-hepática (Selma y cols., 2009; González-Sarrías y cols., 2017).

Recientemente se ha demostrado la extraordinaria variabilidad en la composición y función de la microbiota intestinal, que puede variar en la prevalencia de determinados grupos bacterianos frente a otros (Arumugan y cols., 2011), en la

diversidad de la microbiota (número de unidades taxonómicas operativas) (Yatsunenko y cols., 2012) y en la cantidad de la misma (la carga microbiana de las muestras fecales) (Vandeputte y cols., 2017). Se ha intentado clasificar a los individuos por su microbiota describiendo los conocidos como enterotipos (Arumugan y cols., 2011). Sin embargo existen opiniones científicas contradictorias que proponen que la situación real es que se observan gradientes de microorganismos en los diferentes individuos, y no verdaderos enterotipos que pudieran ser claramente diferenciadores de los individuos de una población determinada (Jeffery y cols., 2012). Pero sí que podemos afirmar que hay diferencias sustanciales en el microbioma de diferentes individuos lo que afecta al metabolismo de los polifenoles de la dieta, y también de muchos fármacos y otros xenobióticos, y por tanto modula su actividad biológica (Spagiannopoulos y cols., 2017). Podemos concluir afirmando que la microbiota intestinal de los diferentes individuos que participan en un estudio de intervención con polifenoles debería de ser evaluada y considerada para estudios de correlación con el metabolismo y biodisponibilidad de los polifenoles y los efectos de salud observados (Morand y Tomás-Barberán, 2019).

La correlación de la microbiota intestinal con determinados estados de salud también se ha documentado en numerosos estudios durante los últimos años (De Vos y De Vos, 2012). Más recientemente se han llevado a cabo algunos estudios que han demostrado que la microbiota está dentro de los factores que podrían causar enfermedades metabólicas y que además modula la eficacia de determinados fármacos lo que hace que el papel de la microbiota en la salud humana adquiera una dimensión mucho más relevante (Spagiannopoulos y cols., 2016).

Sabemos que hay grandes cantidades de polifenoles de la dieta que no se absorben en el intestino delgado y llegan al colon prácticamente inalterados. Éstos pueden entonces interactuar con la microbiota intestinal modulando la configuración del ecosistema y la producción de metabolitos bioactivos, e intervenir además en la interacción de la microbiota con el hospedador (inflamación, inmunidad, etc.) lo que puede dar lugar a efectos muy relevantes en la salud.

### **Modulación de la microbiota por los (poli)fenoles**

Los polifenoles, y sobre todo los oligoméricos y poliméricos que son englobados en el grupo de los taninos, tanto hidrolizables (galotaninos y elagitaninos) como condensados (proantocianidinas) son muy activos modulando la microbiota intestinal (Dueñas y cols., 2015). Es interesante que estos grupos de polifenoles, que muestran grandes diferencias químicas, biosintéticas y de metabolismo, ejercen efectos similares sobre la microbiota, lo que probablemente se deba a las propiedades generales que se asocian a los taninos como son las interacciones con las proteínas (fundamentalmente la capacidad de ligarse a ellas y de precipitarlas). La evidencia indica que todos estos polifenoles, aunque son químicamente muy complejos y estructuralmente muy diversos, favorecen *in vivo* el crecimiento de los lactobacilos y las bifidobacterias, inhibiendo por otra parte el crecimiento de las enterobacterias y en general los patobiontes, lo que se conoce como un efecto parecido al 'prebiótico' ('*prebiotic-like*') de estos polifenoles. De hecho, los prebióticos *sensu stricto* (carbohidratos complejos que forman parte de la fibra dietética), no se digieren, promueven el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias y llegan al colon donde son fermentados por la microbiota dando lugar a metabolitos microbianos (ácidos grasos de cadena corta principalmente) que tienen relevantes actividades biológicas. Por su parte los polifenoles se comportan de una forma similar a los prebióticos pues tampoco son digeridos ni absorbidos en el intestino delgado, promueven el crecimiento de lactobacilos y bifidobacterias, y son fermentados en el colon dando lugar a metabolitos (postbióticos) que tienen relevantes actividades biológicas.

Respecto al mecanismo de acción de esta modulación diferencial de la microbiota intestinal poco se conoce, aunque hay varias hipótesis y algunas evidencias recientes. Entre ellas se ha sugerido que los polifenoles, que en general exhiben una ligera actividad antimicrobiana, pudieran inhibir el crecimiento de aquellas bacterias más sensibles a estos metabolitos. También los polifenoles podrían servir de fuente de energía para aquellas bacterias que tengan capacidad de catabolizar estas moléculas complejas para dar lugar a moléculas que pudieran ser utilizadas para nutrir a las bacterias que las metabolizan. Además, algunos de estos polifenoles, o los metabolitos producidos durante la fermentación intestinal, pueden interferir con el mecanismo de '*quorum sensing*'

dando lugar a una inhibición de la formación de biofilms de determinadas especies, inhibiendo su desarrollo y capacidad de colonización del intestino (Truchado y cols., 2009). También se ha hipotetizado que estos polifenoles pudieran favorecer la formación de mucina en el intestino, promoviendo la colonización de bacterias que se benefician de una mayor cantidad de mucina (por ejemplo, *Akkermansia*) (Desjardins y cols., 2019). Sin embargo, estudios recientes se inclinan hacia el hecho de que el efecto antimicrobiano que modula la configuración del ecosistema intestinal parece una causa más probable que el efecto sobre la producción de mucina por las 'goblet cells' en el incremento del crecimiento de *Akkermansia* que se observa (Hojo y cols., 2019). Se podría concluir que, aunque se ha comprobado en numerosos estudios que los polifenoles modulan la microbiota intestinal, se conoce muy poco de los mecanismos por los cuales ejercen este efecto. Esta investigación es esencial para seleccionar tratamientos de intervención dietética con fibra y polifenoles para desplazar la microbiota hacia perfiles más saludables.

### **Metabolismo de los (poli)fenoles por la microbiota intestinal**

Las bacterias que colonizan el intestino también llevan a cabo un intenso metabolismo de los polifenoles que, en general, se absorben muy poco y se encuentran disponibles para ser metabolizados por diferentes grupos bacterianos (Selma y cols., 2009). En general, los catabolitos microbianos son mucho más biodisponibles que los polifenoles presentes en los alimentos de los que parten. Esto se ha demostrado claramente en las proantocianidinas oligoméricas y poliméricas, las flavanonas de los cítricos y del lúpulo y la cerveza, los elagitaninos y el ácido elágico y sus conjugados presentes en muchos frutos, las isoflavonas de la soja, y los lignanos de los cereales integrales y de las semillas de lino. Dada la variabilidad en el microbioma de diferentes individuos, cabría pensar *a priori* que no todos producirían *in vivo* los mismos metabolitos de polifenoles ni la misma cantidad. De hecho, se han descrito diferentes metabotipos para la producción de metabolitos microbianos a partir de los polifenoles. Así, tras la ingesta de isoflavonas de soja, se ha encontrado que hay voluntarios con una microbiota intestinal que puede producir equol, mientras que otros no lo producen, y recientemente se ha descrito que la producción o no de la O-desmethyl-angolensin también da lugar a claras diferencias entre los individuos (Frankenfeld, 2017). En el caso de los metabolitos del ácido elágico para producir urolitinas, tres robustos metabotipos (A, B y 0) han sido descritos, se correlacionan con diferencias en el microbioma intestinal (Tomás-Barberán y cols., 2014; Romo-Vaquero y cols., 2019), y pueden depender de la edad (Cortés-Martín y cols., 2018). También hay en muchos casos diferencias cuantitativas en la producción de determinados metabolitos microbianos, lo que se observa en la mayoría de los polifeno-

les, habiéndose descrito en los metabolitos de las flavanonas del lúpulo y de los cítricos, en las valerolactonas producidas a partir de las proantocianidinas y en los enterolignanos producidos a partir de los lignanos (Espín y cols., 2017). En estos casos, cuando se estudia la producción de metabolitos en una población determinada, se observa un gradiente de producción de los mismos pudiendo identificar voluntarios con diferentes niveles de producción/absorción/excreción (altos, medios y bajos productores). Estas diferencias en la producción de metabolitos reflejan claras discrepancias en la función de la microbiota intestinal y además se podrían correlacionar con diferencias en la respuesta al tratamiento con polifenoles en diferentes individuos.

Estas diferencias en respuesta a tratamientos se han demostrado claramente en los casos en que se existen verdaderos metabotipos, como es el caso de los productores de equol que muestran una mejora en los biomarcadores de riesgo cardiometabólico tras el tratamiento con isoflavonas de soja mientras que los no-productores no muestran ese efecto beneficioso (Frankenfeld, 2017). También, en los metabotipos A, B y 0 que se observan en la producción de urolitinas tras la ingesta de elagitaninos, se ha evidenciado que los voluntarios del metabotipo B responden, mientras que los otros no producen efectos significativos en los marcadores de riesgo cardiometabólico tras la ingesta de extractos de granada ricos en elagitaninos (González-Sarrías y cols., 2017). Sin embargo, en los casos en que los metabolitos se producen en forma de gradiente entre diferentes individuos, todavía no se ha publicado ningún estudio en el que se correlacionen los efectos sobre marcadores de riesgo cardiometabólico, con los niveles de exposición a metabolitos microbianos de polifenoles, que son potencialmente bioactivos, como es el caso de las flavanonas de cítricos, las valerolactonas producidas tras la ingesta de proantocianidinas, o la mayoría de los metabolitos microbianos de los polifenoles.

Podemos concluir, que para poder conocer el papel que tienen los polifenoles en la salud humana es necesario tener en cuenta la microbiota intestinal. Esta puede ser la que explique las grandes diferencias que se observan en la respuesta a los tratamientos de los diferentes individuos y debería ser considerada en la nutrición y farmacología de precisión llevando hacia tratamientos personalizados. La identificación de las bacterias responsables del metabolismo de los polifenoles en el intestino, permitirá utilizarlas en el futuro para asegurar la eficacia de tratamientos con polifenoles mediante el suministro de estos probióticos de nueva generación o mediante tratamientos que conduzcan a una mayor implantación de estas bacterias en el intestino del individuo que no llega a producir los metabolitos activos.

## Agradecimientos

Los autores agradecen a los proyectos BACCHUS (FP7-KBBE-2012-6-single stage, European Commission

Grant Agreement 312090), 19900/GERM/15 (Fundación Séneca, Murcia) y AGL2015-64124 y AGL2015-73107-EXP (MINECO) por la financiación de los trabajos de investigación del grupo. También agradecen el apoyo de D. Beltrán, A. Martínez-Blázquez, M. Romo, M. D. Frutos, J. A. Giménez-Bastida, A. Cortés-Martín y M.A. Ávila-Gálvez.

## Bibliografía

- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature*. 2011; 473: 174-80.
- Cortés-Martín A, García-Villalba R, González-Sarrías A, Romo-Vaquero M, Loria-Kohen V, Ramírez-de-Molina A, et al. The gut microbiota urolithin metabolites revisited: the human metabolism of ellagic acid is mainly determined by aging. *Food Funct*. 2018; 9: 4100-6.
- Desjardins Y, et al. Polyphenols affect the genetic and morphological response of *Akkermansia muciniphila* a bacterium playing a central role in the etiology of cardiometabolic disorders. ICoFF conference, Kobe 2019. SY13-2.
- de Vos WM, de Vos EA. Role of the intestinal microbiome in health and disease: from correlation to causation. *Nutr Rev*. 2012; 70 Suppl 1: S45-56.
- Dueñas M, Muñoz-González I, Cueva C, Jiménez-Girón A, Sánchez-Patán F, Santos-Buelga C, et al. A survey of modulation of gut microbiota by dietary polyphenols, *Biomed Res Int*. 2015; 2015: 850902.
- Espín JC, González-Sarrías A, Tomás-Barberán FA. The gut microbiota: a key factor in the therapeutic effects of (poly)phenols. *Biochem Pharmacol*. 2017; 139: 82-93.
- Frankenfeld CL. Cardiometabolic risk and gut microbial phytoestrogen metabolite phenotypes. *Mol Nutr Food Res*. 2017; 61: 1500900.
- González-Sarrías A, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Non-extractable polyphenols produce gut microbiota metabolites that persist in circulation and show anti-inflammatory and free radical-scavenging effects. *Trends Food Sci Technol*. 2017; 69(Part B): 281-8.
- González-Sarrías A, García-Villalba R, Romo-Vaquero M, Alasalvar C, Örem A, Zafrilla P, et al. Clustering according to urolithins metabolites explains the interindividual variability in the improvement of cardiovascular risk biomarkers in overweight-obese individuals consuming pomegranate: A randomized clinical trial. *Mol Nutr Food Res*. 2017; 61: 1600830.
- Hertog MG, Feskens EJ, Hollman PC, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: the Zutphen Elderly Study. *Lancet*. 1993; 342: 1007-11.
- Hojo A, et al. Prebiotic mechanistic study of phlorizin, phloretin and chlorogenic acid in *Akkermansia muciniphila*. ICPH 2019 Conference, Kobe 2019.
- Jeffery IB, Claesson MJ, O'Toole PW, Shanahan F. Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? *Nat Rev Microbiol*. 2012; 10: 591-2.
- Morand C, Tomás-Barberán FA. Interindividual variability in absorption, distribution, metabolism, and excretion of food phytochemicals should be reported. *J Agric Food Chem*. 2019; 67: 3843-4.
- Morand C, et al. Why interindividual variation in response to consumption of plant food bioactives matters for future precision nutrition? *Proc Nutr Soc*. 2020 [En prensa].
- Romo-Vaquero M, Cortés-Martín A, Loria-Kohen V, Ramírez-de-Molina A, García-Mantrana I, Collado MC, et al. Deciphering the human gut microbiome of urolithin metabolites: Association with enterotypes and potential cardiometabolic health implications. *Mol Nutr Food Res*. 2019; 63: e1800958.
- Selma MV, Espín JC, Tomás-Barberán FA. Interaction between phenolics and gut microbiota: Role in human health. *J Agric Food Chem*. 2009; 57: 6485-501.

- Spanogiannopoulos P, Bess EN, Carmody RN, Turnbaugh PJ. The microbial pharmacists within us: a metagenomic view of xenobiotic metabolism, *Nat Rev Microbiol.* 2016; 14: 273-87.
- Tomás-Barberán FA, García-Villalba R, González-Sarriás A, Selma MV, Espín JC. Ellagic acid metabolism by human gut microbiota: Consistent observation of three urolithin phenotypes in intervention trials, independent of food source, age, and health status. *J Agric Food Chem.* 2014; 62: 6535-8.
- Truchado P, López-Gálvez F, Gil MI, Tomás-Barberán FA, Allende A. Quorum sensing inhibitory and antimicrobial activities of honeys and the relationship with individual phenolics. *Food Chem.* 2009; 115: 1337-44.
- Vandeputte D, Kathagen G, D'hoë K, Vieira-Silva S, Valles-Colomer M, Sabino J, et al. Quantitative microbiome profiling links gut community variation to microbial load. *Nature.* 2017; 551: 507-11.
- Yatsunenko T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography, *Nature.* 2012; 486: 222-7.

# Probiotic lactobacilli: new insights in ecology and evolutionary history drive new applications

Sarah Lebeer

*University of Antwerp, Department of Bioscience Engineering, Research Group Environmental Ecology and Applied Microbiology (ENdEMIC). Belgium.*

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):70-72

Lactobacilli form the largest group of bacteria with documented probiotic activities. Since Nobel-laureate Eli Metchnikoff hypothesized that lactic acid bacteria can promote human health in the gut, the research on lactobacilli and probiotics has mainly focused on the human gut and fermented dairy foods. However, a major knowledge gap exists on the beneficial potential of lactobacilli in other human body sites, such as the vagina, skin and respiratory tract. In addition, lactobacilli have potential as probiotics in animals, such as chicken and pigs. Similarly, lactobacilli are used on plants, for example as crop-protecting agents, and even on abiotic surfaces, generally based on trial-and-error selection. Lactobacilli also play a key role in many plant- and vegetable-based fermentations, where they promote the shelf life and nutritional value of food and feed. They are used for centuries for these applications, without much molecular knowledge of their action. This versatility of lactobacilli and their applications is thus remarkable, but why and how lactobacilli can be beneficial in such a wide variety of habitats is currently underexplored. Recent new whole genome and microbiome amplicon sequencing tools now allow for novel studies on lactobacilli (e.g. <sup>(1-3)</sup>). A few examples of our own research will be presented during the lecture<sup>(4-6)</sup>.

The term lactobacilli refers to the family of the Lactobacillaceae, because of the recent revision of the taxonomy of the *Lactobacillus* genus complex, with the genus being split in more than 20 new genera. These taxonomy changes were driven by recent new insights in the evolution, ecology and function of this large group of bacteria, which have been speed up by the increasing availability of whole genome

sequences. Although it will take time before the field gets used to the new names, the new insights have also stimulated various new areas of research. In my recently granted ERC project 'Lacto-Be: advancing *Lactobacillus*' beneficial potential', we will also address various questions fundamental to the *Lactobacillus* biology.

- Where do lactobacilli originate from in our evolutionary history & in the life of one individual?
- In which habitats do lactobacilli dominate? And in which niches do they exert keystone functions (independently of dominant abundance)?
- How do lactobacilli colonize different body sites in humans and other new habitats?
- How can lactobacilli exert beneficial functions in so many different hosts and habitats?

With my team, we aim to follow an unconventional approach situated at the intersections of molecular microbiology (focusing on a single microbe), molecular ecology (focusing on microbial communities) and comparative genomics with an evolutionary perspective on habitat adaptation of lactobacilli. By looking deeper into biology of lactobacilli, a paradigm shift can be made moving from a classical *ad hoc* base to a unique knowledge-based framework for strain selection and analysis of fitness and performance of lactobacilli.

Special attention is dedicated towards probiotic lactobacilli for the female reproductive tract and thus also towards the lactobacilli dominating the vagina under healthy conditions<sup>(7)</sup>: *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus jensenii*, and *Lactobacillus iners*. These species still belong to the *Lactobacillus* genus in the new taxonomy,

because of their close relationship to *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* or Beijerinck 1901, the first *Lactobacillus* ever described. Who do humans promote/ depend on this (symbiotic) bacterial relationship? What are the molecules governing this beneficial relationship? Several parts of the communication can be puzzled together based on earlier molecular studies, such as the oestrogen-glycogen-lactic acid relationship<sup>(8)</sup>, a wide arsenal of antimicrobial production to inhibit pathogens (e.g. <sup>(8-12)</sup>) and immunoregulatory interactions between cell surface components of the lactobacilli and immune receptors such as Toll-like receptor 2/6<sup>(13,14)</sup>, but many aspects still need to be uncovered. Therefore, we have recently set up and planned all the logistics for a large Citizen Science project, termed Isala, to collect vaginal microbiome samples and lactobacilli from more than 1000 healthy Belgian women. The start of the sampling campaign is foreseen in spring 2020. In addition, we study the probiotic and ecological function of lactobacilli on the human skin<sup>(6)</sup> and upper respiratory tract<sup>(4,15)</sup>, for which we found some interesting new modes of host interaction. For example, we have found indications for a special type of fimbriae promoting interaction with respiratory epithelial cells in the *L. casei* group<sup>(3)</sup>. These putatively glycosylated fimbriae are currently studied in more molecular detail.

The second major new habitat of lactobacilli we focus on in my labs are crops and especially the vegetables that lactobacilli can dominate during fermentation, such as carrots (e.g. <sup>(16)</sup>). These fermented vegetables are man-made microbial ecosystems, but really fascinating to study, because only minimal manipulations are needed (e.g. adding salts and oxygen deprivation) to turn lactobacilli into ecological winners. The lactobacilli that are able to dominate often belong to the *Leuconostoc* and *L. plantarum* group<sup>(17,18)</sup>. By a combination of comparative genomics, experimental ecology and molecular biology, we are identifying unique and more conserved genes and molecules that help to explain why certain taxa of this group are such 'ecological winners'. For example, we have recently discovered a cellulose-degrading enzyme in the *L. mudanjiangensis* species. This fundamental research line has also practical applications for the development of alternative non-dairy functional foods with probiotics that are suitable for lactose-intolerant, milk-allergic or vegan people. Fermentation of vegetables is especially appealing, since vegetables are a source of essential nutrients, vitamins, minerals, anti-oxidants and fibres, and they have a low sugar content. In addition, fermenting vegetables is also a way of reducing vegetable waste and revalorizing vegetables (sustainable agriculture). In addition, these lactobacilli have also potential as crop-protecting and bee-protecting agents. By studying also phyllosphere bacteria in greenhouse crops, we also found by serendipity an interesting intimate ecological relationship between insect bacteria and leave bacteria, with a potential for lactobacilli to reduce pathogen load on leaves.

To summarize, following a multi-faceted, but molecular biology-driven approach on lactobacilli from different habitats and environments and for different probiotic applications, we are convinced that the best probiotic candidates have a combination of conserved probiotic molecules<sup>(19)</sup> and unique effector molecules<sup>(20)</sup>. A detailed understanding of the various modes of action can be anticipated to benefit and further drive the translational pipeline towards more reliable health benefits for probiotic lactobacilli<sup>(21)</sup>.

## References

1. Wittouck S, Wuyts S, Meehan CJ, van Noort V, Lebeer S. A Genome-based species taxonomy of the *Lactobacillus* genus complex. *mSystems*. 2019; 4: e00264-19.
2. Petrova MI, Macklaim JM, Wuyts S, Verhoeven T, Vanderleyden J, Gloor GB, et al. Comparative genomic and phenotypic analysis of the vaginal probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GR-1. *Front Microbiol*. 2018; 9: 1278.
3. Wuyts S, Wittouck S, De Boeck I, Allonsius CN, Pasolli E, Segata N, et al. Large-scale phylogenomics of the *Lactobacillus casei* group highlights taxonomic inconsistencies and reveals novel clade-associated features. *mSystems*. 2017; 2: e00061-17.
4. De Boeck I, van den Broek MFL, Allonsius CN, Martens K, Wuyts S, Wittouck S, et al. Lactobacilli have a niche in the human nose. *SSRN Electron J*. 2019; 10.2139/ssrn.3422481.
5. Martens K, Pugin B, De Boeck I, Spacova I, Steelant B, Seys SF, et al. Probiotics for the airways: Potential to improve epithelial and immune homeostasis. *Allergy*. 2018; 73: 1954-63.
6. Lebeer S, Oerlemans E, Claes I, Wuyts S, Henkens T, Spacova I, et al. Topical cream with live lactobacilli modulates the skin microbiome and reduce acne symptoms. *bioRxiv*. 2018. doi: <https://doi.org/10.1101/463307>.
7. Petrova MI, Lievens E, Malik S, Imholz N, Lebeer S. *Lactobacillus* species as biomarkers and agents that can promote various aspects of vaginal health. *Front Physiol*. 2015; 6: 81.
8. Petrova MI, van den Broek M, Balzarini J, Vanderleyden J, Lebeer S. Vaginal microbiota and its role in HIV transmission and infection. *FEMS Microbiol Rev*. 2013; 37: 762-92.
9. Malik S, Petrova MI, Imholz NCE, Verhoeven TLA, Noppen S, Van Damme EJM, et al. High mannose-specific lectin Msl mediates key interactions of the vaginal *Lactobacillus plantarum* isolate CMPG5300. *Sci Rep*. 2016; 6: 37339.
10. Petrova MI, Lievens E, Verhoeven TLA, MacKlaim JM, Gloor G, Schols D, et al. The lectin-like protein 1 in *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 mediates tissue-specific adherence to vaginal epithelium and inhibits urogenital pathogens. *Sci Rep*. 2016; 6: 37437.
11. Allonsius CN, van den Broek MFL, De Boeck I, Kiekens S, Oerlemans EFM, Kiekens F, et al. Interplay between *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Candida* and the involvement of exopolysaccharides. *Microb Biotechnol*. 2017; 10: 1753-63.
12. Allonsius CN, Vandenheuvel D, Oerlemans EFM, Petrova MI, Donders GGG, Cos P, et al. Inhibition of *Candida albicans* morphogenesis by chitinase from *Lactobacillus rhamnosus* GG. *Sci Rep*. 2019; 9: 2900.
13. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008; 72: 728-64.
14. Lebeer S, Vanderleyden J, De Keersmaecker SCJ. Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8: 171-84.
15. van den Broek MFL, De Boeck I, Kiekens F, Boudewijns A, Vanderveken OM, Lebeer S. Translating recent microbiome insights in otitis media into probiotic strategies. *Clin Microbiol Rev*. 2019; 32: e00010-18.

16. Wuyts S, Van Beeck W, Oerlemans EFM, Wittouck S, Claes IJJ, De Boeck I, et al. Carrot juice fermentations as man-made microbial ecosystems dominated by lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2018; 84: e00134-18.
17. Wuyts S, Van Beeck W, Allonsius CN, van den Broek MF, Lebeer S. Applications of plant-based fermented foods and their microbes. *Curr Opin Biotechnol.* 2019; 61: 45-52.
18. Wuyts S, Allonsius CN, Wittouck S, Thys S, Lievens B, Weckx S, et al. Comparative genome analysis of *Lactobacillus mudanjiangensis*, an understudied member of the *Lactobacillus plantarum* group. *Microb Genomics.* 2019; 5. doi: 10.1099/mgen.0.000286.
19. Sanders ME, Benson A, Lebeer S, Merenstein DJ, Klaenhammer TR. Shared mechanisms among probiotic taxa: implications for general probiotic claims. *Curr Opin Biotechnol.* 2018; 49: 207-16.
20. Lebeer S, Bron PA, Marco ML, Van Pijkeren J-P, O'Connell Motherway M, Hill C, et al. Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. *Curr Opin Biotechnol.* 2018; 49: 217-23.
21. Kleerebezem M, Binda S, Bron PA, Gross G, Hill C, van Hylckama Vlieg JE, et al. Understanding mode of action can drive the translational pipeline towards more reliable health benefits for probiotics. *Curr Opin Biotechnol.* 2019; 56: 55-60.

# Probióticos: productos monocepa frente a productos multicepa

Juan Miguel Rodríguez Gómez

Catedrático del Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos. Universidad Complutense de Madrid

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):73-75

Los probióticos se definen como “*microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un beneficio para la salud del huésped*”<sup>(1,2)</sup>. Las propiedades probióticas pueden ser comunes a distintas cepas pertenecientes incluso a especies y géneros diferentes o pueden ser propiedades muy específicas de una cepa concreta<sup>(2,3)</sup>. En cualquier caso, la demostración de la presencia de cualquier propiedad probiótica debe hacerse cepa a cepa ya que no se puede extrapolar una propiedad de una cepa a otras cepas, ni siquiera entre las que pertenezcan a la misma especie. Por otra parte, la demostración de una propiedad no se puede limitar a ensayos *in vitro* sino que se deben evidenciar en ensayos clínicos bien diseñados y enfocados a una diana concreta. Por ejemplo, una cepa puede demostrar actividad antimicrobiana *in vitro* frente un presunto patógeno, por ejemplo *Staphylococcus aureus* o *Listeria monocytogenes*, pero no ser eficaz para la prevención o tratamiento de una infección estafilocócica o de la listeriosis, respectivamente.

Los probióticos se pueden clasificar en función de distintos criterios. Uno de ellos es la presencia de una sola cepa (probiótico monocepa) o de varias cepas (probiótico multicepa) en un mismo producto. Algunos estudios han mostrado efectos positivos en la salud cuando se usan probióticos multicepa y tales efectos se han achacado a la posible actividad sinérgica entre las distintas cepas<sup>(4)</sup>. Sin embargo, muy pocos trabajos han valorado si realmente existe una actividad sinérgica entre las distintas cepas de un mismo probiótico multicepa. Para ello, **son necesarios ensayos clínicos donde se comparen los efectos de cada cepa por separado y de la mezcla, además del placebo correspondiente.**

Hasta la fecha, el origen filogenético de los probióticos se ha limitado a algunas especies de bacterias lácticas (mayoritariamente del género *Lactobacillus*) y a unas pocas especies

del género *Bifidobacterium*, además de alguna levadura del género *Saccharomyces*. Se trata de microorganismos que, en algunos casos, pueden manifestar fenómenos de sinergismo. El caso más representativo y bien documentado es el que se establece entre las actividades metabólicas de las dos especies presentes en el yogur: *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (el microorganismo con efecto probiótico) y *Streptococcus thermophilus* (el microorganismo “tecnológico”). Sin embargo, las bacterias lácticas y bifidobacterias también pueden mostrar actividades antagónicas entre sí, bien mediante la producción de sustancias antimicrobianas y/o mediante otros mecanismos de exclusión competitiva, como puede ser la competición por los mismos receptores en el hospedador. En este sentido, **no es válida la máxima “cuantos más, mejor” sino que depende de los integrantes de la mezcla y, en cualquier caso, hay que reiterar que tales relaciones se tienen que demostrar científicamente.**

Además, puede existir una incompatibilidad tecnológica y que unas cepas se impongan a otras durante los procesos de producción (cuando se realizan conjuntamente en los mismos fermentadores) y/o almacenamiento de la mezcla final. La estabilidad de las distintas cepas también puede ser distinta y, en consecuencia, la composición cualitativa y/o cuantitativa de un producto se puede ver notablemente alterada a lo largo de su vida teóricamente útil. Por este motivo, debe existir un estricto control externo de la calidad de este tipo de productos, circunstancia que apenas se produce en la actualidad.

Por otra parte, **una mezcla de cepas no tiene por qué funcionar mejor que una única cepa. La función va a venir determinada por la diana a la que vaya dirigida el probiótico.** Los medicamentos convencionales pueden servir como ejemplo. Si una persona padece diabetes que requiere



cularmente relevante en relación a los probióticos multicepa: los controles de calidad en los que se demuestre la presencia de las distintas cepas que constan en el etiquetado y a las concentraciones que igualmente constan en el etiquetado<sup>(6)</sup>. En este sentido, todos los estudios enfocados en comparar la composición teórica (etiquetado) y real de productos probióticos han encontrado desviaciones relevantes en un porcentaje elevado de los productos analizados<sup>(7-11)</sup>.

Finalmente, en caso de que un probiótico cause un efecto adverso para la salud, la posibilidad de conocer cuál o cuáles de las cepas que contiene un producto multicepa es responsable de tal efecto es realmente remota, tal como sucedió en el ensayo de un producto multicepa para la profilaxis de la pancreatitis aguda, en el que el grupo probiótico mostró un mayor riesgo de mortalidad que el placebo<sup>(12)</sup>. En cualquier caso, y al igual que se ha comentado para la evaluación de un posible efecto probiótico, son igualmente necesarios ensayos clínicos donde se evalúe la seguridad de cada cepa por separado y de la mezcla, además del placebo correspondiente.

En conclusión, tanto los productos probióticos monocepa como los multicepa deben demostrar la eficacia y seguridad de los mismos en ensayos clínicos correctamente diseñados. En el caso de los productos multicepa se deberían proporcionar evidencias de la necesidad de incluir más de una cepa en un mismo producto. Finalmente, tanto las empresas comercializadoras como las administraciones públicas deberían garantizar que la información, tanto cualitativa (especie y cepa) como la cuantitativa (concentración de unidades formadoras de colonia por gramo o por dosis), que consta en el etiquetado se corresponda fielmente con la que realmente contenga el producto comercializado.

## Conclusiones

- Son necesarios ensayos clínicos donde se comparen los efectos de cada cepa por separado y de la mezcla, además del placebo correspondiente.
- No es válida la máxima “cuantos más, mejor” sino que depende de los integrantes de la mezcla y hay que reiterar que tales relaciones se tienen que demostrar científicamente.
- Una mezcla de cepas no tiene por qué funcionar mejor que una única cepa. La función va a venir determinada por la diana a la que vaya dirigida el probiótico.

- Si una cepa es la responsable de un efecto determinado, la adición de otras cepas que no tengan dicho efecto puede diluir el efecto de la primera y encarecer el producto innecesariamente.

## Bibliografía

1. WHO/FAO. Probiotics in food health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 2006
2. Hill C, Guarner F, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, et al. Expert consensus document: the international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11: 506-14.
3. Klaenhammer TR, Kleerebezem M, Kopp MV, Rescigno M. The impact of probiotics and prebiotics on the immune system. *Nat Rev Immunol* 2012; 12: 728-34.
4. Timmerman HM, Koning CJ, Mulder L, Rombouts FM, Beynen AC. Monostrain, multistain and multispecies probiotics--A comparison of functionality and efficacy. *Int J Food Microbiol.* 2004; 96: 219-33.
5. El Hage R, Hernandez-Sanabria E, Van de Wiele T. Emerging trends in “smart probiotics”: Functional consideration for the development of novel health and industrial applications. *Front Microbiol.* 2017; 8: 1889.
6. Jackson SA, Schoeni JL, Vegge C, Pane M, Stahl B, Bradley M, et al. Improving end-user trust in the quality of commercial probiotic products. *Front Microbiol.* 2019; 10: 739.
7. Huys G, Vancanneyt M, D’Haene K, Vankerckhoven V, Goossens H, Swings J. Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res Microbiol.* 2019; 157: 803-10.
8. Aureli P, Fiore A, Scalfaro C, Casale M, Franciosa G. National survey outcomes on commercial probiotic food supplements in Italy. *Int J Food Microbiol.* 2010; 137: 265-73.
9. Toscano M, de Vecchi E, Rodighiero V, Drago L. Microbiological and genetic identification of some probiotics proposed for medical use in 2011. *J Chemother.* 2013; 25: 156-61.
10. Goldstein EJ, Citron DM, Claros MC, Tyrrell KL. Bacterial counts from five over-the-counter probiotics: Are you getting what you paid for? *Anaerobe.* 2014; 25: 1-4.
11. Morovic W, Hibberd AA, Zabel B, Barrangou R, Stahl B. Genotyping by PCR and high-throughput sequencing of commercial probiotic products reveals composition biases. *Front Microbiol.* 2016; 7: 1747.
12. Besselink MG, van Santvoort HC, Buskens E, Boermeester MA, van Goor H, Timmerman HM, et al; Dutch Acute Pancreatitis Study Group. Probiotic prophylaxis in predicted severe acute pancreatitis: a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet.* 2008; 371: 651-9.

## Comunicaciones Orales

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):76-83

### USOS CLÍNICOS

**Cambios en microbiota intestinal y mejora cognitiva tras ejercicio físico en modelo de esteatohepatitis-no-alcohólica.** S. Arbolea<sup>1</sup>, S.G. Higarza<sup>2</sup>, N. Arias<sup>2</sup>, M. Gueimonde<sup>1</sup>, J.L. Arias<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Bioquímica, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias. <sup>2</sup>Laboratorio de Neurociencias, Departamento de Psicología, Universidad de Oviedo, Oviedo, Asturias.

**Introducción/Objetivo.** La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) se caracteriza por una acumulación de grasa en el hígado, inflamación y lesión en las células hepáticas, en ausencia de un abuso crónico de alcohol; además, conlleva un elevado riesgo de desarrollar hepatocarcinoma. NASH también se asocia con apatía y depresión. El sedentarismo y las dietas altas en grasas y colesterol parecen ser claves en su desarrollo. Estos antecedentes apuntan a que la microbiota intestinal (MI) también podría estar involucrada, a través del eje intestino-hígado-cerebro. El objetivo de este estudio *in vivo* fue evaluar el impacto del enriquecimiento ambiental (EE), ejercicio físico, como posible tratamiento y su relación con la MI.

**Metodología.** 40 ratas Sprague-Dawley macho fueron divididas en cuatro grupos de trabajo: dos grupos NASH (dieta alta en grasa y colesterol) y dos grupos control (dieta normal). En un grupo de cada condición se evaluó el efecto del EE. En todos los grupos experimentales se analizó el estado cognitivo por diferentes tests *in vivo*, la actividad metabólica cerebral mediante la medida del citocromo-c-oxidasa, y la microbiota intestinal mediante secuenciación del gen ribosomal *16S*.

**Resultados.** En el grupo NASH, normopeso durante todo el estudio, se observaron alteraciones cognitivas, asociadas a cambios metabólicos cerebrales y a una disbiosis intestinal respecto al grupo control. La introducción del EE revirtió los cambios observados en el comportamiento y mejoró las altera-

ciones metabólicas cerebrales, modulando la composición de la microbiota intestinal, con disminución de las enterobacterias y aumento de *Akkermansia*.

**Conclusiones.** Este trabajo pone de manifiesto la interrelación del eje intestino-hígado-cerebro. El EE condujo una mejora en la cognición asociada a cambios en el metabolismo oxidativo cerebral y la microbiota intestinal. Dichos resultados abren las puertas para el desarrollo de estrategias de intervención destinadas a prevenir o mejorar los problemas asociados a la NASH.

**El tratamiento con probióticos en pacientes con dermatitis atópica modifica su microbioma digestivo.** E. Climent<sup>1</sup>, V. Navarro-López<sup>2</sup>, L. Llobregat<sup>1</sup>, D. Ramón-Vidal<sup>3</sup>, B. Ruzafa-Costas<sup>4</sup>, J. Martínez-Blanch<sup>1</sup>, S. Genovés-Martínez<sup>3</sup>, J.M. Carrión-Gutiérrez<sup>5</sup>, J.M. Pérez-Orquín<sup>6</sup>, A. Ramírez-Boscá<sup>7</sup>, J. Horga De La Parte<sup>8</sup>, D. Prieto-Merino<sup>9</sup>, F. Codoñer-Cortés<sup>1</sup>, M.E. Chenoll Cuadros<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Lifesequencing S.L. Paterna, Valencia, Spain. <sup>2</sup>Clinical Microbiology and Infectious Disease Unit, Hospital Universitario Vinalopó, Elche, Spain. <sup>3</sup>Biopolis S.L.-ADM. Paterna, Valencia, Spain. <sup>4</sup>Department of Clinical Medicine, Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM), Spain. <sup>5</sup>Especialidades Farmacéuticas Centrum. Alicante, Spain. <sup>6</sup>Korott S.L. Alcoi, Alicante, Spain. <sup>7</sup>Department of Dermatology, Hospital Universitario Vinalopó, Elche, Spain. <sup>8</sup>Department of Pharmacology, Pediatrics and Organic Chemistry, Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante, Spain. <sup>9</sup>Universidad Católica San Antonio de Murcia (UCAM), London School of Hygiene and Tropical Medicine, London, United Kingdom.

**Introducción.** La dermatitis atópica (DA) es una enfermedad cutánea inflamatoria crónica recurrente caracterizada por prurito intenso, inflamación y alteración de la barrera cutánea. El objetivo de este trabajo consistió en la caracterización de una potencial disbiosis en microbioma digestivo, y el impacto del consumo de probióticos en esta.

**Metodología.** Se realizó un estudio de 12 semanas, aleatorizado, doble ciego y controlado por placebo. Participaron cincuenta niños (4 a 17 años) con dermatitis atópica moderada. El tratamiento consistió en el consumo diario de una mezcla de probióticos (*Bifidobacterium lactis* CECT8145, *Bifidobacterium longum* CECT7347 y *Lactobacillus casei* CECT9104) o placebo durante 12 semanas. Se anotaron las variables asociadas a DA (índice SCORAD) y se recogieron heces, a partir de las cuales se llevó a cabo el estudio del microbioma bacteriano mediante secuenciación de V3-V4 del gen *rRNA 16S*, utilizando plataforma Illumina.

**Resultados.** En relación al microbioma digestivo en niños con DA, se observaron diferencias respecto a individuos sanos dependiendo del enterotipo analizado, siendo los grupos *Bacteroides*, *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium*, *Ruminococcus* y *Alistipes*. El consumo de probióticos mejoró significativamente el estado de los voluntarios determinado por la reducción del índice SCORAD. Tras el tratamiento, hubo cambios en enterotipos, siendo el mayoritario el paso de enterotipo 3 al a (55% de los voluntarios de E3). Además, el grupo que consumió probióticos mostró un incremento en *Bacteroides*, *Ruminococcus* y *Bifidobacterium*, y unos niveles menores *Faecalibacterium*, comparado con el placebo.

**Conclusiones.** El estudio nos ha permitido definir un microbioma disbiótico para el grupo de niños afectados con DA analizado, en el que resalta el potencial papel de *Faecalibacterium* en AD. El consumo de probióticos ha obtenido una mejora significativa en el índice SCORAD, y una modificación en su microbioma digestivo.

**Desarrollo de una solución integral para la nutrición de precisión.** A. Rodenes<sup>1</sup>, C. Moya<sup>1</sup>, E. Climent<sup>1</sup>, M.C. Solaz-Fuster<sup>1</sup>, V. Illescas<sup>1</sup>, S. Manresa<sup>1</sup>, A. Howard<sup>1</sup>, D. Carrillo<sup>1</sup>, L. Llobregat<sup>1</sup>, E. Chenoll<sup>2</sup>, J.F. Martínez-Blanch<sup>1</sup>. <sup>1</sup>*Lifesequencing SL-ADM Nutrition, Parc Científic Universitat de Valencia, Paterna, Valencia.* <sup>2</sup>*Biopolis S.L.-ADM Nutrition. Paterna, Valencia.*

**Introducción.** En los últimos años, se ha observado un incremento en la demanda de servicios para mejorar el estado nutricional y de salud de la población. Sin embargo, es ahora cuando es posible realizar una aproximación integral y de precisión. Para ello, es necesario un enfoque que englobe el estudio genético, metabólico y microbiológico, con el que poder categorizar a los individuos y determinar sus necesidades nutricionales específicas. Por ello, se pretende caracterizar a una cohorte que nos permita establecer la normalidad de la población con el objetivo de poder crear una base de datos que nos permita desarrollar un programa de nutrición de precisión.

**Metodología.** Estudio observacional en 211 participantes voluntarios sanos caracterizados en parámetros morfométricos, antecedentes de salud, estilo de vida y alimentación. En ellos,

se determinó: el microbioma bacteriano intestinal, 180 SNPs seleccionados por su relevancia en nutrigenética, y parámetros metabólicos a partir de sangre y heces, como ácidos grasos de cadena corta (SCFAs), hormonas, vitaminas, inflamación, ácidos grasos y glucemia. Además, se han recopilado datos bibliográficos nutricionales de dieta y efecto sobre grupos bacterianos concretos.

**Resultados.** Se han encontrado asociaciones significativas, principalmente entre los índices de diversidad del microbioma y los grupos estudiados. En el caso de SCFAs, se ha comprobado la relación óptima para ácido acético, propiónico y butírico, así como la correlación entre otros SCFAs obtenidos. Por otro lado, la interpretación de las diferentes variables genéticas nos permitirá analizar la predisposición a potenciales disfunciones metabólicas, y sopesar su presencia respecto de la población. Finalmente, los parámetros analizados en sangre nos permiten incluir el estado nutricional del individuo, y considerarlo dentro del análisis global.

**Conclusiones.** Los resultados obtenidos nos han permitido crear una base de datos relacional, mediante la que es posible clasificar en segmentos funcionales, a los nuevos individuos a analizar, en cuanto a estado nutricional, disbiosis del microbioma y carga genética. Este modelo continuará su desarrollo incluyendo cohortes específicas.

**Estudio de la composición de la microbiota intestinal como predictor del desarrollo de insuficiencia cardiaca asociado a hipertensión.** E. Gutiérrez Calabrés<sup>1</sup>, A. Ortega Hernández<sup>1</sup>, J. Modrego<sup>1</sup>, R. Gómez-Gordo<sup>2</sup>, A. Caro Vadillo<sup>1</sup>, C. Rodríguez-Bobada<sup>2</sup>, P. González<sup>1</sup>, D. Gómez Garre<sup>2</sup>. <sup>1</sup>*Laboratorio de Biología Vascular y Microbiota, Hospital Clínico San Carlos-IdISSC, Madrid.* <sup>2</sup>*CIBERCV, Madrid.*

**Introducción.** Los pacientes con insuficiencia cardiaca (IC) presentan cambios en la composición de la microbiota intestinal (MI), aunque se desconoce si esta disbiosis podría ser la causa del daño e incidir, por tanto, en su progresión. Nuestro objetivo ha sido comparar la composición de la MI entre un modelo experimental de ratas hipertensas (SHR), que rara vez desarrolla IC, y ratas hipertensas con desarrollo espontáneo de IC (SHHF).

**Métodos.** A todos los animales se les realizó un seguimiento mediante eco-doppler hasta los 19 meses de edad. El análisis de la MI se realizó a partir de muestras de heces recogidas a los 4, 9 y 19 meses de edad mediante secuenciación masiva de varias regiones hipervariables del gen *ARNr 16S*.

**Resultados.** A los 19 meses de edad, las ratas SHHF, pero no las SHR, presentan signos de IC, como dilatación del ventrículo izquierdo y disminución de la fracción de eyección. Al analizar la MI, las ratas SHHF y SHR se diferenciaron en la alfa y la beta diversidad, así como en la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* durante todo el estudio. Esta disbiosis se debió principalmente a

un aumento de Bacteroidetes, principales productoras de lactato. Además, en las ratas SHHF no se identificaron bacterias del filo Deferribacteres, principales reductoras del hierro III, aunque sí en las ratas SHR. Los cambios más importantes se observaron a los 9 meses de edad de los animales, antes de que se presentaran diferencias cardíacas entre ambos grupos. En las ratas SHHF, se observó una infrarrepresentación de géneros productores de ácidos grasos de cadena corta como Faecalibacterium.

**Conclusiones.** Nuestros resultados demuestran que la disbiosis de la MI es anterior a la manifestación de alteraciones cardíacas en la IC. Es posible que una intervención para corregir la MI pudiera ser una estrategia terapéutica innovadora para la IC.

**La microbiota salivar como propuesta de biomarcador diagnóstico en cáncer de cabeza y cuello.** L. Navarro Moratalla<sup>1</sup>, S. Chumillas<sup>1</sup>, D. Hellín<sup>2</sup>, J. Cabezas<sup>2</sup>, E. Núñez<sup>1</sup>, B. Ruzafa<sup>1</sup>, V. Navarro<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Bioithas. <sup>2</sup>Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia.

**Introducción.** El cáncer epidermoide de cabeza y cuello (CECC) se sitúa en el sexto lugar mundial en cuanto a frecuencia se refiere, situándose España como uno de los países con mayor incidencia en el continente europeo. En los últimos años, el uso de la saliva como herramienta diagnóstica o de seguimiento evolutivo de determinadas patologías, ha adquirido una gran relevancia en el campo de la biomedicina, ya que se trata de un método no invasivo, sencillo, barato, difícil de alterar y estable en condiciones no refrigeradas.

**Metodología.** El estudio se llevó a cabo entre los años 2008-2015, recogiendo un total de 179 y seleccionando aleatoriamente 20 de estas. Además, se tomaron muestras salivares de 20 voluntarios sanos con similitud en género, edad y comorbilidad. Se realizó un análisis de la región hipervariable del gen *rS16* en la muestra salivar.

**Resultados.** En relación al microbioma salivar, se observaron diferencias estadísticamente significativas en la media de secuencias de diferentes grupos bacterianos presentes en la saliva dentro de los *phylum Bacteroidete* y *Firmicute*. Para estudiar la validez de estos datos y su aplicación como prueba diagnóstica que discrimine pacientes con COCC y sujetos sanos, se calculó mediante curvas ROC los puntos de corte más apropiados y se determinó Sensibilidad y Especificidad de cada grupo por separado, seleccionando aquellos con mayor poder discriminativo.

**Conclusiones.** Se puede concluir que la microbiota salivar es diferente en pacientes con CECC y en sujetos sanos. Estos datos apoyan la posibilidad de desarrollar un prometedor biomarcador para el diagnóstico de la enfermedad de manera precoz y que podría servir para predecir la recidiva de la misma. De confirmarse los datos en un mayor número de casos, esta prueba se podría utilizar como cribado en sujetos de alto riesgo, pudiendo complementar a los factores pronóstico conocidos hasta el momento.

**Eficacia de Spagyn en mujeres con infecciones de orina de repetición.** M.M. López Jiménez<sup>1</sup>, I. Pajares Bernáez<sup>2</sup>, E. Gómez-Utrero Fuentes<sup>3</sup>, F. Navarro Expósito<sup>4</sup>, A. Roldán Cabrera<sup>5</sup>, J. Montes Sáez<sup>6</sup>, Y. Tordecilla Echenique<sup>7</sup>, F. Rebollo González<sup>8</sup>, M. Zudaire Landa<sup>9</sup>.

<sup>1</sup>Medicina Familiar y Comunitaria. Centro de Salud de Cantillana. <sup>2</sup>Medicina Integral. Centro Saludintegralip. <sup>3</sup>Unidad de Medicina de la Actividad Física. Hospital Vithas Internacional. <sup>4</sup>Unidad de Oncología. Hospital Príncipe de Asturias. <sup>5</sup>Director del Centro Sanitario Royma Salud de Boadilla del Monte. <sup>6</sup>Consulta de Nutrición Julia Montes. <sup>7</sup>Medicina Interna. Hospital Vithas Nisa Sevilla-Aljarafe. <sup>8</sup>Médico Especialista en Bioquímica Clínica. Laboratorio Lab-Sur. <sup>9</sup>Consulta de Nutrición Maite Zudaire.

**Introducción.** La infección del tracto urinario (ITU) de repetición es la que ocurre en dos o más ocasiones en seis meses o tres o más veces en un año. Mejora tras un tratamiento antibiótico específico, pero vuelve a aparecer infección a las pocas semanas con una infección por otra bacteria, o reinfección con la misma bacteria, volviendo todos los síntomas del síndrome miccional: disuria, polaquiuria, tenesmo. Componentes de Spagyn: *Lactobacillus rhamnosus* RF-1  $2 \times 10^9$  ufc/g y *Lactobacillus acidophilus* RF-2  $2 \times 10^9$  ufc/g. FOS, gelatina, estearato de magnesio (E470b), óxido de titanio (E171).

**Metodología.** Ámbito: pacientes que acudieron a consulta médica. Muestra: 10 casos de mujeres con edades entre 15 y 70 años, con infecciones de orina de repetición, que precisaron más de 3 antibióticos en el último año y en la última recaída, vista en la consulta de urgencias en el Centro de Salud, se les indicó Spagyn.

**Resultados.** Las 10 pacientes tratadas con Spagyn durante 1 mes con 1 comprimido al día, después con 1 comprimido al día en días alternos durante otro mes y posteriormente con 1 comprimido el día que tuviesen relaciones sexuales o notasen las primeras molestias al orinar, no volvieron a tener una infección de orina en los siguientes 6 meses de seguimiento.

**Conclusiones.** Spagyn es un complemento que mejora los síntomas del síndrome miccional en mujeres con infecciones de orina de repetición y disminuye las reinfecciones.

## INMUNONUTRICIÓN

**La relación de la fibra con la microbiota intestinal en adultos sanos difiere con el género.** N. González Zancada, N. Redondo Useros, L.E. Díaz Prieto, A. Gheorghie, B. Villavisencio, S. Gómez Martínez, E. Nova Rebato, A. Marcos Sánchez. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC).

**Introducción/Objetivo.** Las evidencias acerca de las propiedades de la fibra sobre la modulación de grupos bacterianos

beneficiosos son bien conocidas. Sin embargo, pocos estudios han analizado dichos efectos en adultos sanos, en ambos sexos, los cuales presentan diferencias en la microbiota intestinal debido a factores hormonales y genéticos, entre otros.

**Metodología.** 261 adultos sanos (51% hombres) fueron divididos en 3 grupos, según su consumo de fibra (cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos) en: 1) bajo consumo (n=50; BC: < 15 g/día); 2) medio consumo (n=118; MC: 15-25 g/día); 3) alto consumo (n=93; AC: > 25 g/día). Se analizaron la microbiota intestinal [secuenciación del gen 16S (Illumina)], en concreto los grupos bacterianos productores de butirato y Bifidobacterias, y los AGCC mediante cromatografía de gases. Las diferencias entre grupos de fibra se estudiaron con modelos lineales generales, con género, índice de masa corporal (IMC) y energía como factores de confusión, así como el test de Spearman para estudiar las asociaciones entre variables.

**Resultados.** No se observaron diferencias en hombres de los diferentes grupos de fibra en cuanto a las variables mencionadas. Sin embargo, las mujeres del grupo AC presentaban niveles más altos de la familia *Clostridiaceae* y del género *Clostridium* en comparación con los otros dos grupos (ambos  $P < 0,05$ ), y en concreto, parece deberse a la fibra de vegetales, tal y como muestra la correlación positiva entre ambas ( $P < 0,002$ ). Además, las mujeres del grupo AC presentaron niveles más altos de ácido butírico ( $P=0,014$ ), isobutírico e isovalérico (ambos  $P < 0,005$ ) en comparación con el grupo BC. No se observó relación con los niveles de *Bifidobacterias* ni con otros grupos bacterianos en hombres ni mujeres.

**Conclusión.** Un consumo alto de fibra solo en mujeres (> 25 g/día) podría relacionarse con beneficios a nivel intestinal, debido a la relación entre el ácido butírico y propiedades anti-inflamatorias.

**Bifidobacterium breve CECT7263, pero no Lactobacillus fermentum CECT5716, previene la disfunción endotelial en hipertensión inducida por mineralocorticoide.** I. Robles Vera<sup>1</sup>, N. De la Visitación Pastor<sup>1</sup>, M. Romero Pérez<sup>1,2</sup>, M. Toral Jiménez<sup>1</sup>, M. Sánchez Santos<sup>1,2</sup>, M. Gómez Guzmán<sup>1,2</sup>, M. Olivares<sup>3</sup>, R. Jiménez Moleón<sup>1,2,4</sup>, F. Vargas<sup>2,5</sup>, J.M. Duarte Pérez<sup>1,2,4,5</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad de Granada. Granada. <sup>2</sup>Instituto de Investigación Biosanitaria de Granada, IBS GRANADA, Granada. <sup>3</sup>Laboratorio de Descubrimiento y Preclínica, Departamento de Investigación Biosearch S.A. Granada. <sup>4</sup>Ciber Enfermedades Cardiovasculares (CiberCV), Granada. <sup>5</sup>Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada, Granada, España.

**Introducción.** El objetivo de este estudio fue investigar si los cambios en la microbiota intestinal inducidos por el tratamiento con probióticos o la suplementación con ácidos grasos de cadena corta (SCFAs) previenen las alteraciones cardiovasculares en un

modelo de hipertensión independiente de renina inducida por acetato de deoxicorticosterona (DOCA) y sal.

**Métodos y resultados.** Los animales se dividieron aleatoriamente en seis grupos: control, DOCA-sal, sal DOCA-sal tratado-Bifidobacterium breve CECT7263 (BFM,  $10^9$  ufc/día), DOCA-sal-Lactobacillus fermentum CECT5716 (LC40,  $10^9$  ufc/día), DOCA-sal tratado con butirato (0,5 mg/kg/día), DOCA-sal tratado con acetato (100 mM en el agua de bebida). Las ratas fueron tratadas durante 5 semanas. La relación *Firmicutes/Bacteroidetes* no se modificó significativamente por ningún tratamiento en ratas DOCA-sal. El consumo de BFM y acetato aumentó las bacterias productoras de acetato en ratas DOCA-sal, pero no tuvo efecto sobre otras bacterias productoras de SCFAs. El porcentaje de linfocitos Th17 aumentó, mientras que los Treg se redujeron significativamente en nódulos mesentéricos (MLNs) del grupo de DOCA-sal en comparación con el control. BFM y acetato redujeron Th17 pero solo BFM aumentó significativamente Treg en los MLNs. Los tratamientos con BFM y con acetato previnieron el aumento de la presión arterial sistólica y la hipertrofia cardíaca y renal, mejoraron la vasodilatación inducida por acetilcolina, redujeron el aumento de la actividad aórtica de la NADPH oxidasa y restablecieron el equilibrio Th17/Treg en los anillos aórticos que estaba alterado en DOCA-sal. Ninguno de estos efectos se observó en los grupos DOCA-sal tratados con butirato o LC40.

**Conclusiones.** Los tratamientos con BFM y acetato, que aumentan las bacterias productoras de acetato en el intestino, previenen el desarrollo de hipertensión, disfunción endotelial y estrés oxidativo vascular inducido por la administración crónica de mineralocorticoide.

**Impacto del probiótico Lactobacillus fermentum CECT5716 sobre el proceso inflamatorio asociado a la obesidad experimental en ratones.** J.A. Molina-Tijeras<sup>1</sup>, T. Veza<sup>1</sup>, P. Díez-Echave<sup>1</sup>, L. Hidalgo-García<sup>1</sup>, A.J. Ruiz-Malagón<sup>1</sup>, M.J. Rodríguez-Sojo<sup>1</sup>, O. Bañuelos<sup>2</sup>, M. Olivares<sup>2</sup>, M.E. Rodríguez-Cabezas<sup>1</sup>, J. Gálvez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>CIBER-EHD, Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomédica (CIBM), Universidad de Granada. Granada, España. <sup>2</sup>Laboratorio de Descubrimiento y Preclínica, Departamento de Investigación BIOSEARCH S.A. Granada, España.

**Introducción/Objetivos.** La obesidad se deriva de un desequilibrio energético que promueve el crecimiento excesivo y la expansión del tejido conduciendo al desarrollo de hiperglucemia, disfunción endotelial, una inflamación subclínica y una alteración de la microbiota intestinal. La suplementación con probióticos parece modular la microbiota intestinal, disminuyendo la permeabilidad intestinal, la inflamación y los trastornos metabólicos. El objetivo es evaluar el efecto del probiótico *Lactobacillus fermentum* CECT5716 (LC40) en un modelo de obesidad inducida por dieta (DIO) en ratones, para investigar

su impacto en la pérdida de peso y los trastornos asociados con la obesidad.

**Material y métodos.** Ratones machos C57BL/6J (7-9 semanas de edad) fueron asignados en diferentes grupos (n=10): control, obesos (dieta rica en grasa –HFD–) y obesos tratados diariamente con LC40 ( $5 \times 10^8$  ufc/ratón/día) durante 9 semanas. El peso corporal y la ingesta de alimentos se controlaron regularmente. Una vez sacrificados, el estado inflamatorio se evaluó bioquímicamente determinando la expresión de mediadores involucrados en la respuesta inflamatoria y en la función de barrera intestinal.

**Resultados.** La administración de LC40 a ratones obesos redujo significativamente el aumento de peso corporal, sin diferencias significativas en la ingesta calórica entre los grupos. Este efecto se asoció con una disminución de la expresión de mediadores inflamatorios en hígado y grasa (IL-6 y TNF $\alpha$ ), al tiempo que aumentó la expresión de marcadores de la integridad epitelial intestinal (occludina, ZO-1, MUC-1 y MUC-2). Además, LC40 redujo significativamente la expresión de factores implicados en la adipogénesis (SREBF1, C/EBP $\alpha$  y PPAR $\gamma$ ). Asimismo, el tratamiento con LC40 resultó en una disminución de la endotoxemia metabólica dada por una reducción significativa en la expresión del receptor TLR-4.

**Discusión/Conclusión.** El probiótico LC40 ejerce efectos beneficiosos en la obesidad inducida por HFD en ratones, revelando una mejora del estado inflamatorio, junto con el restablecimiento de la función de barrera intestinal.

**Relación entre microbiota intestinal y consumo de alcohol.** J.A. López-Moreno<sup>1</sup>, I. Rincón-Pérez<sup>1</sup>, K.M. Bühler<sup>1</sup>, J. Calleja-Conde<sup>1</sup>, L. Segovia<sup>1</sup>, E. Giné<sup>1</sup>, J. Albert<sup>2</sup>, J.A. Hinojosa<sup>1</sup>, F. Rodríguez de Fonseca<sup>3</sup>, V. Echeverry-Alzate<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Universidad Complutense de Madrid. <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Madrid. <sup>3</sup>Instituto IBIMA.

La microbiota intestinal forma un ecosistema propio en nuestro organismo, que evoluciona con nosotros y que está influenciada por el ambiente en que nos movemos y por la dieta. Dado que el alcohol forma parte de la dieta habitual de millones de personas en todo el mundo, decidimos estudiar la relación entre el consumo de alcohol y la microbiota intestinal. En una muestra de más de quinientos estudiantes universitarios, hemos encontrado que el consumo de alcohol durante los fines de semana está asociado con un cambio en la composición de las heces y las bacterias intestinales. La hipótesis más plausible sería considerar que el alcohol cambia la microbiota intestinal, aunque no se puede descartar una segunda hipótesis: que las diferencias en la composición de la microbiota intestinal explicarían, al menos en parte, por qué unos individuos consumen más o menos alcohol. Para verificar esta segunda hipótesis, realizamos una serie de experimentos con modelos animales (ratas Wistar). Un grupo de ratas fue sometido a intoxicaciones alcohólicas y otro grupo fue tratado con el vehículo donde iba disuelto

el alcohol. Estos dos grupos de animales fueron donantes de microbiota intestinal (trasplante fecal). Otros grupos de ratas recibieron el trasplante de microbiota fecal. Los animales que recibieron el trasplante de microbiota fecal de animales tratados con alcohol bebieron más alcohol que los animales que recibieron el trasplante del grupo tratado con vehículo. Este hallazgo sugiere que la microbiota intestinal tiene un papel causal en el consumo voluntario de alcohol. También encontramos que la esterilización del intestino a través de un cóctel de antibióticos causó una reducción muy significativa del consumo de alcohol. Durante la presentación de este trabajo mostraremos los principales cambios que encontramos en la población de bacterias intestinales analizadas por secuenciación masiva (NGS) y las similitudes / diferencias encontradas entre humanos y animales.

**Cytokine in vitro profile in humans cells of *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT 7210 and *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* NH-001 shows their tolerogenic immune attributes.** M.C. De Almagro<sup>1</sup>, J. Vilar<sup>2</sup>, L.A. Gómez-Casajús<sup>2</sup>, J. Plaza<sup>2</sup>, J. Jiménez<sup>1</sup>, M. Rodríguez-Palmero<sup>1</sup>, J.A. Moreno-Muñoz<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratorios Ordesa SL. <sup>2</sup>Draconis Pharma SL.

The beneficial effects of different probiotics strains on modulating immune response are based partly on their ability to regulate differentially the production of anti- and pro-inflammatory cytokines and adaptive immune balance. In general, food allergy is one of the immune tolerance-related disorders, which is related to a disbalance between T helper, Th1 and Th2 responses or a reduction in the regulatory mechanisms of the immune response (e.g. regulatory T cells or Treg).

The cytokine tolerogenicity/immunogenicity profile of 5 probiotics *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT 7210, *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* (strains NH-001 and BPL-015), and *Lactobacillus paracasei* (strains ORD-0712 and ORD-0698) have been tested using three in vitro assays involving T cells and DCs: Concanavalin-A-activated mouse splenocytes, Concanavalin-A or anti-CD3/CD28-activated human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and differentiation and maturation of human Monocyte-derived Dendritic cells (MoDC).

Based on MoDC differentiation phenotype and cytokine responses, we identified two probiotics, *L. casei subsp. rhamnosus* NH-001 and *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT 7210, as potential inducers of tolerogenic immune profile as shown by the IL-10/IL-12 ratio. Furthermore, immature dendritic cells stimulated with LPS in the presence of NH001 or CECT 7210 enhanced production of anti-inflammatory IL-10 over pro-inflammatory IFN $\gamma$ . These probiotics also induced IL-10 production on murine splenocytes activated with ConA and on naïve or non-stimulated human PBMCs with no production of Th2 cytokine, IL-4.

Efecto inmunomodulador del *Lactobacillus paracasei* INIA p272 en colitis inducida por DSS en ratones. M.J. Rodríguez-Sojo<sup>1</sup>, P. Díez-Echave<sup>1</sup>, J. Garrido-Mesa<sup>1</sup>, T. Vezza<sup>1</sup>, A. Rodríguez-Nogales<sup>1</sup>, F. Algieri<sup>1</sup>, E. Rodríguez<sup>2</sup>, S. Langa<sup>2</sup>, J.L. Arques<sup>2</sup>, M.E. Rodríguez-Cabezas<sup>1</sup>, J. Gálvez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Farmacología, CIBER-EHD, *ibs*. GRANADA, Granada, CIBM, Universidad de Granada, España. <sup>2</sup>Departamento de Tecnología de los alimentos, INIA, Madrid, España.

**Introducción.** Los probióticos presentan actividad antiinflamatoria intestinal gracias a sus propiedades inmunomoduladoras. El presente estudio evalúa el efecto del probiótico *Lactobacillus paracasei* INIA P272 en el modelo de colitis inducida por DSS en ratón.

**Métodos.** Ratones machos C57BL/6 fueron tratados con *L. paracasei* INIA P272 ( $5 \times 10^8$  ufc/ratón/día) durante 23 días. Transcurridas dos semanas se induce la colitis mediante la administración de DSS (3% disuelto en agua durante 5 días); un grupo colítico no tratado y otro no colítico fueron utilizados como controles. El progreso de la inflamación intestinal fue evaluado diariamente mediante el índice de actividad de la enfermedad (DAI). En el día 24, los ratones fueron sacrificados y el estado inflamatorio intestinal fue evaluado. Los marcadores de inflamación del tejido fueron evaluados mediante RT-qPCR, y las poblaciones de leucocitos procedentes de la lámina propia se analizó mediante citometría de flujo.

**Resultados.** El tratamiento con *L. paracasei* INIA P272 se traduce en una actividad antiinflamatoria intestinal, como se evidencia en el curso del experimento por una reducción en los valores de DAI. Los efectos inmunomoduladores fueron también evidenciados con la mejora de la expresión de citoquinas y quimiocinas inflamatorias, como IL-1 $\beta$ , IL-6, MCP-1 y I-CAM, y las enzimas iNOS y MMP-9, involucradas en la respuesta inflamatoria y la remodelación del tejido inflamado. La evaluación de la infiltración de células inmunes en la lámina propia reveló que el grupo tratado con el probiótico mostró una reducción en el número de neutrófilos, mientras que la presencia de IL-10 FoxP3<sup>+</sup> Tregs se vio incrementada.

**Discusión/Conclusión.** *L. paracasei* INIA P272 presentó efectos antiinflamatorios intestinales, observándose una menor susceptibilidad a la colitis inducida por DSS. Estos efectos se pueden deber a la actividad inmunomoduladora atribuida al probiótico, lo que podría ser de gran interés en el desarrollo de futuros tratamientos de IBD con probióticos.

## MICROBIOLOGÍA Y VETERINARIA

Microorganismos resistentes a los antibióticos en las sondas nasogástricas y las heces de niños prematuros. J. Jara Pérez<sup>1</sup>, I. Castro Navarro<sup>1</sup>, C. Alba Rubio<sup>1</sup>, M. Sáenz de Pipaón<sup>2</sup>, B. Moreno Sanz-Gadea<sup>2</sup>, E. Escri-

bano Palomino<sup>2</sup>, L. Fernández Álvarez<sup>1</sup>, J.M. Rodríguez Gómez<sup>1</sup>, B. Orgaz Martín<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Universidad Complutense de Madrid, Madrid. <sup>2</sup>Hospital Universitario La Paz, Madrid.

**Introducción.** Los prematuros permanecen expuestos al entorno hospitalario (y, en consecuencia, a los microorganismos resistentes a antibióticos prevalentes en el mismo) durante un tiempo relativamente prolongado tras su nacimiento. Las sondas nasogástricas (SNGs) para la alimentación enteral podrían constituir una vía de entrada y un reservorio para tales microorganismos. El **objetivo** de este trabajo fue evaluar el impacto de la duración de la estancia en la Unidad de Cuidados Intensivos Neonatales (UCIN) sobre la presencia de microorganismos resistentes en las SNGs y heces de prematuros.

**Metodología.** Se tomaron muestras de meconio, heces, y SNGs de 30 prematuros de la UCIN del Hospital La Paz (Madrid) desde su nacimiento hasta la tercera semana de vida. El aislamiento de resistentes se realizó en placas de los medios MRSA (estafilococos resistentes a meticilina), CRE (enterobacterias resistentes a carbapenems) y VRE (enterococos resistentes a vancomicina). Las colonias aisladas se identificaron mediante secuenciación del gen *16S rRNA*.

**Resultados.** Entre los 245 aislados, un 77% se aislaron en MRSA, un 12% en VRE y un 11% en CRE, siendo *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis* y *Enterobacter* spp. las especies mayoritarias en los respetivos medios. En las primeras muestras solo se detectaron especies resistentes a meticilina, cuya presencia aumentó drásticamente en la segunda semana. Los resistentes a vancomicina y carbapenems solo se identificaron a partir de la segunda semana. Los estafilococos resistentes a la meticilina estaban distribuidos en todos los boxes. Sin embargo, el 56% de las enterobacterias resistentes a carbapenems estaban concentradas en un solo box. Algunas especies se pudieron aislar a partir de los tres medios, sugiriendo la presencia de clones multirresistentes.

**Conclusiones.** Tanto el entorno hospitalario como la duración de la estancia parecen determinantes para la presencia y acumulación de especies resistentes a antibióticos en la microbiota intestinal de niños prematuros.

Caracterización del microbioma respiratorio e intestinal de lactantes con bronquiolitis. C. Alba<sup>1</sup>, M. Aparicio<sup>2</sup>, J. Pérez<sup>3</sup>, J.M. Rodríguez<sup>2</sup>, R. Rodríguez<sup>3</sup>, L. Fernández<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Sección Departamental de Farmacia Galénica y Tecnología Alimentaria. <sup>2</sup>Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria, Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos. <sup>3</sup>Sección de Hospitalización de Pediatría, Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

**Introducción.** La bronquiolitis infantil está asociada frecuentemente al virus respiratorio sincitial. La mayoría de los niños portadores de este virus son asintomáticos o muestran síntomas

moderados, pero una pequeña proporción desarrolla síntomas severos y requiere hospitalización. Este hecho parece depender de diversos factores asociados al microbioma, al hospedador y al ambiente.

**Objetivo.** El objetivo de este trabajo fue analizar el perfil microbiológico de muestras nasales y fecales procedentes de niños con esta enfermedad y compararlo con el de controles sanos.

**Metodología.** En este estudio se reclutaron 75 niños (58 con bronquiolitis y 17 controles sanos) que proporcionaron muestras de lavado nasal y heces. El perfil microbiológico se estudió mediante un análisis metataxonómico (región V3-V4 del gen *rRNA 16S*) empleando la tecnología Illumina MiSeq *paired-end* y posterior análisis bioinformático con Qiime 2, RStudio y la base de datos SILVA.

**Resultados.** El análisis metataxonómico de las muestras nasales reveló la existencia de dos perfiles claramente diferenciados en función de la existencia o no de bronquiolitis. En relación con los controles, los niños con bronquiolitis tenían mayor abundancia relativa de secuencias del filo *Proteobacteria* y de los géneros *Haemophilus*, *Moraxella* y *Mannheimia* en las muestras nasales. En cambio, al contrario, los sanos tenían mayor abundancia relativa de los filos *Firmicutes* y *Actinobacteria* y de los géneros *Staphylococcus* y *Corynebacterium* que los niños con bronquiolitis. No se apreciaron diferencias entre el microbioma fecal de los niños sanos y el de los que padecían bronquiolitis a nivel de filo, excepto en algunos géneros minoritarios, como *Staphylococcus* y *Eggerthella*.

**Conclusiones.** El microbioma nasal de niños con bronquiolitis presenta un perfil claramente diferenciado del de los sanos. En cambio, el perfil del microbioma fecal tiene un poder discriminatorio menor, aunque se observan diferencias en la abundancia de algunos géneros minoritarios.

**Caracterización de la alteración genética y funcional que conduce al fenotipo sobreproductor de riboflavina de la cepa *Lactobacillus plantarum* B2.** J.A. Ruiz-Masó<sup>1</sup>, I. Ripa<sup>2</sup>, N. De Simone<sup>3</sup>, P. Russo<sup>3</sup>, G. Spano<sup>3</sup>, G. Del Solar<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, España. <sup>2</sup>Departamento de Biotecnología Microbiana y de Plantas, Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC), Madrid, España. <sup>3</sup>Departamento de Agricultura, Alimentación y Ciencias Medioambientales, Universidad de Foggia, Foggia, Italia.

**Introducción/Objetivos.** La riboflavina (RF) es el precursor de los cofactores enzimáticos FMN y FAD, esenciales para la vida. En BAL, la expresión del operón *rib* implicado en la biosíntesis de RF está regulada por un *riboswitch* (RS) FMN localizado en el extremo 5' del mRNA. Al unirse al FMN, el dominio sensor (aptámero) del RS promueve el cambio al estado "OFF" (terminación transcripcional prematura del operón *rib*) del dominio de expresión, inhibiendo la síntesis de RF. Aquí,

hemos analizado: 1) la producción de RF por diversas cepas de *Lactobacillus plantarum* seleccionadas mediante exposición a roseoflavina (análogo tóxico de RF), y 2) las concentraciones intra- y extra-celulares de RF y/o FMN y FAD, así como la alteración genética y funcional que afecta al aptámero del RS en la cepa con máxima sobreproducción.

**Metodología.** Los servidores Pasific, RNAfold y Mfold se emplearon para predecir las estructuras de los RS y aptámeros. La funcionalidad de los RS se analizó mediante clonación en el vector pPCR (que contiene el gen reportero *mrfp*) y transformación de las cepas isogénicas silvestre y mutante para monitorizar la emisión de fluorescencia. Mediante fluorimetría se determinó la acumulación a tiempo real de RF en el medio de cultivo. Asimismo, se desarrolló un método, basado en la conversión ácida de FAD en FMN, para la cuantificación fluorimétrica diferencial de flavinas intra- y extra-celulares.

**Resultados.** La cepa B2 con máxima sobreproducción de RF presenta una mutación que desestabiliza la hélice reguladora que conecta los dominios aptámero y de expresión del RS del operón *rib*, disminuyendo su capacidad de regulación por el efector. Esta presenta una concentración intracelular de RF (y/o FMN) unas 6 veces superior que la silvestre, y llega a acumular hasta 30 veces más de RF en el medio de cultivo.

**Conclusiones.** La mutación en B2 disminuye, pero no elimina, la función reguladora del RS, dando lugar a un fenotipo de muy alta producción de vitamina B<sub>2</sub>.

**Probióticos para acuicultura: de la caracterización a la acción.** A. Latorre-Pérez<sup>1</sup>, J. Pascual<sup>1</sup>, C. Vilanova<sup>1</sup>, M. Porcar<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Darwin Bioprospecting Excellence, S.L. Paterna, Valencia. <sup>2</sup>Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I2SysBio), Universidad de Valencia-CSIC, Paterna, Valencia.

**Introducción/Objetivos.** Las infecciones originadas por agentes microbianos son una de las principales causas de mortalidad en acuicultura, dando lugar a pérdidas económicas considerables. En el presente trabajo, se estudió un repunte de mortalidad en una piscifactoría de producción de esturiones (*Acipenser* spp.), con el objetivo de: 1) caracterizar el patógeno causante de la infección; 2) identificar los principales reservorios dentro de las instalaciones, y 3) desarrollar nuevos probióticos que presenten actividad inhibitoria frente al patógeno.

**Metodología.** El patógeno fue aislado de varios ejemplares infectados, y su genoma fue secuenciado para determinar su precisa identidad taxonómica. Por otro lado, se analizaron 58 muestras mediante secuenciación masiva de amplicones del gen *16S rRNA*. Estas incluían muestras de agua y biofilm de diferentes piscinas y tuberías, además de muestras intestinales procedentes de ejemplares sintomáticos y asintomáticos. Por último, se testó la habilidad de más de 300 cepas con potencial acción probiótica para inhibir *in vitro* el crecimiento del patógeno causante de la infección, así como otros agentes infecciosos comunes.

**Resultados.** Los análisis filogenómicos y de similitud de secuencia permitieron clasificar el microorganismo patógeno como miembro de la especie *Mycobacterium ulcerans*. Además, los resultados de la secuenciación masiva del gen *16S rRNA* confirmaron que el patógeno se distribuía en diversos hábitats dentro de las instalaciones, siendo el intestino de los ejemplares infectados uno de los principales reservorios. El análisis metataxonómico permitió detectar otros potenciales patógenos de interés presentes en la piscifactoría, como *Flavobacterium* spp. Finalmente, tres de las cepas cribadas mostraron una potente actividad inhibitoria *in vitro* frente a *Mycobacterium ulcerans*.

**Conclusiones.** El presente trabajo pone de manifiesto cómo la integración de métodos microbiológicos clásicos en combinación con análisis genómicos y metataxonómicos permiten desarrollar estrategias racionales para la selección de cepas con potencial acción probiótica en acuicultura.

**El nacimiento por cesárea altera la interacción microbiota-barrera intestinal impactando la fisiología del hospedador.** M. Barone<sup>1</sup>, J. Estelle<sup>2</sup>, S. Chadi<sup>3</sup>, K. Tambosco<sup>3</sup>, F. Maillard<sup>3</sup>, Y. Ramayo-Caldas<sup>2</sup>, M. Gallopín<sup>4</sup>, J. Planchais<sup>3</sup>, F. Chain<sup>3</sup>, C. Kropp<sup>3</sup>, P. Brigidi<sup>1</sup>, P. Langella<sup>3</sup>, R. Martín<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Universidad de Bolonia. Bolonia, Italia. <sup>2</sup>GABI. INRA Jouy en Josas. France. <sup>3</sup>MICALIS. INRA Jouy en Josas. France. <sup>4</sup>I2BC. CNRS. Orsay, France.

**Introducción.** Numerosos estudios muestran alteraciones en la primocolonización bacteriana tras una cesárea. Como la primocolonización es fundamental para el desarrollo del hospedador, se ha hipotetizado que estos desequilibrios serían responsables del aumento de la incidencia de ciertas enfermedades en personas nacidas por cesárea. Nuestros objetivos son: analizar los efectos de la cesárea en modelos murinos y determinar el papel de la microbiota intestinal.

**Metodología.** Ratones nacidos por cesárea (RNC) o por vía vaginal fueron analizados a 5 días, al destete y sometidos a modelos de colitis aguda y crónica a 4 y 6 semanas de vida. Se estudio su microbiota, la estructura y función de la barrera intestinal, la respuesta inmunológica y su transcriptoma.

**Resultados.** Los RNC muestran: 1) una mayor inflamación basal con alteraciones en el nivel de citoquinas, inmunoglobulinas y poblaciones de células T, macrófagos y células detriticas, y 2) un aumento en la permeabilidad intestinal *in vivo* y la resistencia trans-epitelial y el pasaje para-celular intestinales *ex vivo*. Además, poseen una barrera intestinal perturbada, con mayor proliferación celular (células productoras de mucus incluidas) y disminución del nivel de proteínas de unión estrecha. El análisis transcriptómico nos permitió identificar 8 redes funcionales moduladas en los RNC, relacionadas con la estructura epitelial y vías inflamatorias. La microbiota de RNC tiene una estructura particular, con un sistema bacteriano centrado en bacterias asociadas al mucus. Dicha microbiota es deficiente en la conver-

sión de acetato a butirato, conllevando un desequilibrio entre ambos que hemos confirmado *in vivo* e *in vitro* y que podría ser el responsable de las alteraciones observadas al estimular la producción de mucus y favorecer un ambiente pro-inflamatorio. Finalmente, los RNC son más sensibles a ambas colitis inducidas, correlacionándose su mayor sensibilidad con los parámetros citados anteriormente.

**Conclusión.** Nuestros resultados indican que los RNC poseen un diálogo microbiota-barrera intestinal específico que conlleva consecuencias en la fisiología del hospedador a corto y largo plazo.

**Persistencia de los efectos de la inoculación temprana de microbiota ruminal en caprino.** A. Belanche, J.M. Palma-Hidalgo, A.I. Martín-García, D.R. Yáñez-Ruiz. *Estación Experimental del Zaidín, CSIC. Granada, Spain.*

**Introducción.** Los rumiantes nacen con un rumen sub-desarrollado, por lo que la modulación del patrón de colonización microbiano a edades tempranas podría representar una oportunidad para programar una microbiota deseable. En ensayos previos hemos demostrado que la inoculación de microbiota ruminal a animales jóvenes permite acelerar la colonización microbiana ruminal, sin embargo, se desconocen la persistencia de dichos efectos.

**Objetivos.** Investigar los efectos a medio-largo plazo de la inoculación temprana de microbiota ruminal a modo de probiótico bajo dos situaciones nutricionales.

**Métodos.** Un total de 36 cabritos recién nacidos fueron aleatoriamente divididos en 4 tratamientos y diariamente inoculados con líquido ruminal procedente de cabras adultas alimentadas con forraje (LRF) o con concentrado (LRC), o líquido ruminal autoclavado como prebiótico (AUT), o ausencia de inoculación (CTL). Los animales recibieron lactación artificial durante 7 semanas y la inoculación cesó en la semana 11. A los 6 meses de edad se evaluó la persistencia de los efectos sobre la fermentación microbiana, microbiota, eficiencia alimentaria y desarrollo del tracto digestivo.

**Resultados.** La inoculación no afectó a la ingestión de alimento ni al desarrollo anatómico del tracto digestivo. Respecto al metabolismo energético, la inoculación con líquido ruminal fresco incrementó de la digestibilidad del forraje (+8%) y la concentración ruminal de ácidos grasos volátiles totales (+16%), proporción de butirato (del 36 al 60%) y la producción de metano. Con respecto al metabolismo protéico, la presencia de altos niveles de protozoos ruminales en los animales inoculados (LRC, LRF y AUT), dada actividad bacterívora y proteolítica, ocasionó un incremento en la concentración ruminal de amonio con ambas dietas (de 2,5 a 5,8 veces superior), así como una menor síntesis de proteína microbiana (-48%) bajo dietas forrajeras.

**Conclusión.** La inoculación temprana con microbiota ruminal originó unos efectos persistentes a medio-largo plazo que fueron beneficiosos para el metabolismo energético pero no para el protéico, por lo que su conveniencia dependerá del tipo de dieta.

## Posters

An Microbiota Probióticos Prebióticos. 2020;1(1):84-104

### USOS CLÍNICOS

POSTER NO PRESENTADO

**P2. Propuesta de un probiótico para una nutrición de precisión en la esclerosis múltiple.** F. Rojo Fernández<sup>1</sup>, R. De Cangas Morán<sup>1</sup>, G. Nicieza Forcelledo<sup>2</sup>, D. Zamarreño Ortiz<sup>3</sup>, J.R. Bahamonde Nava<sup>4</sup>, H. Hernández Monzón<sup>5</sup>, K. Torres Escandón<sup>6</sup>. <sup>1</sup>Dpto. Investigación en Nutrición de Precisión. Centro Salud Nutricional. Gijón (Asturias). <sup>2</sup>Dpto. de Cirugía General y del Aparato. Digestivo. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA)-Fundación Hospital del Jove. Gijón (Asturias). <sup>3</sup>Dpto. Urgencias. Hospital de Cabueñes. Gijón (Asturias). <sup>4</sup>Facultad Padre Ossó. Universidad de Oviedo. Oviedo (Asturias). <sup>5</sup>Instituto de Farmacia y Alimentos. Universidad de la Habana. La Habana. <sup>6</sup>Unidad de Cuidados Intensivos. Hospital de Cabueñes. Gijón (Asturias).

**Introducción.** La esclerosis múltiple (MS) es una enfermedad autoinmune desmielinizante del CNS crónica y multifactorial, que resulta de la interacción entre el genotipo, microbioma, epigenoma y medioambiente. El segundo es su factor etiológico más importante, habiéndose descrito una disbiosis intestinal,

caracterizada por una alteración en la microbiota que metaboliza el triptófano (Trp), aumentando la vía de la kinurenina (KP) en detrimento de la vía de los derivados indólicos (ligandos de Receptores de Hidrocarburos Aro -AhR-) y de la serotonina (5HT), hechos que aumentan la inflamación, permeabilidad intestinal y ansiedad y alteran la motilidad intestinal. El objetivo es resumir los hallazgos de un análisis del microbioma intestinal y sugerir una propuesta de probiótico.

**Material y métodos.** Mujer de 38 años que acude a consulta y solicita un análisis de microbiota intestinal. Refiere MS tratada con beta-1b interferón y actualmente con teriflunomida. La muestra de heces fue analizada mediante una secuenciación de los genes que codifican *16S RNAr* con la plataforma NGS (FeelGut®).

**Resultados.** La microbiota se encuadra dentro del enterotipo I (*Bacteroides*) propuesto por Arumugam M y cols. Aunque no se hallaron bacterias propiamente patógenas se detectó una disbiosis intestinal, sobresaliendo la proliferación de *Bacteroides vulgatus* (10,44%), patobionte relacionado con la inflamación asociada al desarrollo de encefalomielite autoinmune experimental (EAE), un modelo experimental de MS, en ratones transgénicos humanizados.

**Conclusiones.** Se propone un probiótico que vehiculice *Lactobacillus Reuteri* que convierte el Trp en indol-3-ácido láctico, agonista de los AhR y *Clostridium sporogenes*, única bacteria intestinal conocida con capacidad para descarboxilar el Trp a triptamina, en el contexto de una dieta rica en Trp que proporcione 10 mg/kg peso/día en lugar de los 5 propuestos por la RDA's americanas. Como el concepto de enterotipo es controvertido y no se conoce la dirección de la causalidad entre la MS y disbiosis intestinal, las conclusiones deben interpretarse con cautela.

**P3. Eficacia de un complemento de probióticos, enzimas digestivas y zinc en pacientes con intolerancias alimentarias.** M.M. López Jiménez<sup>1</sup>, R. Fernández Robles<sup>2</sup>, M. Murillo Montes<sup>1</sup>, I. Pajares Bernáez<sup>3</sup>, E. Gómez-Utrero Fuentes<sup>4</sup>, F. Navarro Expósito<sup>5</sup>, A. Roldán Cabrera<sup>6</sup>, J. Montes Sáez<sup>7</sup>, Y.M. Tordecilla Echenique<sup>8</sup>, F. Rebollo González<sup>9</sup>, M. Zudaire Landa<sup>10</sup>. <sup>1</sup>Medicina Familiar y Comunitaria. Centro de Salud de Cantillana. <sup>2</sup>Enfermero. Centro de Salud de Cantillana. <sup>3</sup>Medicina Integral. Centro Saludintegralip. <sup>4</sup>Medicina de la Actividad Física. Hospital Vithas Internacional. <sup>5</sup>Unidad de Oncología. Hospital Príncipe de Asturias. <sup>6</sup>Director del Centro Sanitario Royma Salud de Boadilla del Monte. <sup>7</sup>Consulta de Nutrición Julia Montes. <sup>8</sup>Medicina Interna. Hospital Vithas Nisa Sevilla-Aljarafe. <sup>9</sup>Médico Especialista en Bioquímica Clínica. Laboratorio Lab-Sur. <sup>10</sup>Consulta de Nutrición Maite Zudaire.

**Introducción.** Revisión de 60 casos de pacientes con intolerancias alimentarias, 30 de ellos tratados con el complemento

Prodiozym. Cada paciente presentaba de 3-7 alimentos positivos. Síntomas evaluados: dolor abdominal, distensión abdominal, estreñimiento/diarrea, reflujo gastroesofágico, gases, cefalea, dolores musculares/articulares, babeo nocturno, problemas de piel, alteraciones del sueño, dificultad para la concentración, acúfenos. Treinta de los casos revisados fueron tratados con dieta exenta de los alimentos que les provocaba la intolerancia alimentaria y otros 30 fueron además tratados con Prodiozym, mezcla de probióticos, enzimas digestivas y zinc (*Streptococcus thermophilus* ST-81; *Lactobacillus plantarum* LP-90; *Pediococcus pentosaceus*; Papaína; Amilasa; Citrato de zinc).

**Metodología.** *Ámbito:* pacientes que acudieron a consulta médica, con edades entre 15 y 70 años. *Muestra:* se hizo una revisión de pacientes con intolerancias alimentarias vistos entre 2018-2019, se fueron clasificando los pacientes en 2 grupos hasta conseguir 30 pacientes en cada grupo.

- Grupo 1: pacientes que solo se trataron con dieta.
- Grupo 2: pacientes que se trataron con dieta y Prodiozym.

*Exclusiones:*

- Pacientes que no habían realizado analítica de diagnóstico y de revisión (a los 6 meses): test de intolerancia alimentaria de 3ª generación.
- Pacientes que habían sido tratados con otros medicamentos o complementos.
- Pacientes que no realizaron correctamente la dieta.

**Resultados.** Los pacientes tratados con Prodiozym durante 3 meses (1 comprimido/día), tuvieron una mejoría más rápida y de mayor número de síntomas que los tratados exclusivamente con dieta. Además, no positivizaron nuevos alimentos en la analítica de revisión (6 meses después) y negativizaron antes los alimentos positivos, pudiendo realizar antes las reintroducciones de los alimentos excluidos.

**Conclusiones.** Prodiozym es un complemento que mejora los síntomas en los pacientes con intolerancia alimentaria y ayuda a la recuperación del paciente en menos tiempo, con la consiguiente reintroducción de alimentos.

**P4. Eficacia de dos *Lactobacillus* específicos y biotina en niños con intolerancias alimentarias y dermatitis atópica.** M.M. López Jiménez<sup>1</sup>, R. Fernández Robles<sup>2</sup>, M. Murillo Montes<sup>1</sup>, I. Pajares Bernáez<sup>3</sup>, E. Gómez-Utrero Fuentes<sup>4</sup>, F. Navarro Expósito<sup>5</sup>, A. Roldán Cabrera<sup>6</sup>, J. Montes Sáez<sup>7</sup>, Y.M. Tordecilla Echenique<sup>8</sup>, F. Rebollo González<sup>9</sup>, M. Zudaire Landa<sup>10</sup>. <sup>1</sup>Medicina Familiar y Comunitaria. Centro de Salud de Cantillana. <sup>2</sup>Enfermero. Centro de Salud de Cantillana. <sup>3</sup>Medicina Integral. Centro Saludintegralip. <sup>4</sup>Medicina de la Actividad Física. Hospital Vithas Internacional. <sup>5</sup>Unidad de Oncología. Hospital Príncipe de Asturias. <sup>6</sup>Director del Centro Sanitario Royma Salud de Boadilla del Monte. <sup>7</sup>Consulta de Nutrición Julia Montes. <sup>8</sup>Medicina Interna. Hospital Vithas Nisa Sevilla-Aljarafe. <sup>9</sup>Médico Especialista en Bioquímica Clínica. Laboratorio Lab-Sur. <sup>10</sup>Consulta de Nutrición Maite Zudaire.

**Introducción.** Revisión de 15 casos de niños con intolerancias alimentarias, tratados con dieta específica según sus intolerancias y con Dermaspag (*Lactobacillus paracasei* GMNL-133, 50 mg; *Lactobacillus fermentum* GM-090, 50 mg; Biotina, 50 µg). Todos los casos revisados fueron tratados con dieta específica exenta de los alimentos que les provocaba la intolerancia alimentaria y con Dermaspag. Se comparó con otros 8 casos de niños en los que se utilizó como tratamiento exclusivamente la dieta exenta de los alimentos que les provocaba la intolerancia alimentaria. Cada paciente presentaba de 2-5 alimentos positivos. Síntomas evaluados: heridas en la piel, hidratación de la piel, decoloración de piel, picor, dolor abdominal, distensión abdominal, estreñimiento/diarrea, gases, cefalea, dolores musculares/articulares, babeo nocturno, alteraciones del sueño, dificultad para la concentración.

**Metodología.** *Ámbito:* pacientes que acudieron a consulta médica, con edades entre 3 y 12 años. *Muestra:* pacientes diagnosticados de intolerancia alimentaria a 1 o más alimentos, estando diagnosticados previamente de dermatitis Atópica. Periodo entre 2018-2019.

*Exclusiones:*

- Pacientes que habían sido tratados con otros medicamentos o complementos.
- Pacientes que no realizaron correctamente la dieta.
- Pacientes que no acudieron a revisión.

**Resultados.** Los pacientes tratados con Dermaspag durante 2 meses (1 sobre/día), tuvieron una mejoría más rápida de los síntomas de la piel. Mejorando antes las heridas, la hidratación y las zonas decoloradas de la piel. Respecto al resto de síntomas típicos de la intolerancia alimentaria, no se observó que evolucionasen de forma diferentes a los pacientes tratados exclusivamente con la dieta exenta de los alimentos específicos según los resultados obtenidos en la analítica de test de liberación de histamina de 3ª generación.

**Conclusiones.** Dermaspag es un complemento que mejora el estado de la piel en los pacientes con intolerancia alimentaria, diagnosticados de dermatitis atópica.

#### P5. Administración de postbióticos como complemento al tratamiento del colon irritable: experiencia clínica. S. Gómez Senent. *Hospital Universitario La Paz. Madrid.*

**Introducción.** En los últimos años, ha surgido un nuevo enfoque terapéutico que se centra en las moléculas secretadas, moduladas o degradadas por el microbioma y que actúan directamente sobre el huésped: los postbióticos. Las terapias basadas en metabolitos, o “postbióticos”, se dirigen a las vías de señalización del microbioma y actúan mitigando los efectos negativos de un exceso, escasez o desregulación de los metabolitos involucrados en estas rutas. La era de la investigación de metabolitos en la ciencia de los microbiomas ya ha comenzado, y su potencial

como herramienta terapéutica para modular el microbioma justifica la investigación intensiva en los próximos años.

**Material y métodos.** Desde septiembre de 2019 se está evaluado la efectividad de la administración de péptidos de bajo peso molecular procedentes de un postbiótico como complemento del tratamiento en colon irritable.

**Resultados.** Los resultados se presentarán en la comunicación.

**Conclusiones.** Se presentarán en la comunicación.

**P6. Influencia de probióticos en citoquinas y lactobacilos fecales en niños con alergia a la leche.** S. Delgado<sup>1</sup>, L. Guadamuro<sup>1</sup>, M. Díaz<sup>1</sup>, S. Jiménez<sup>2</sup>, C. Molinos-Norniella<sup>3</sup>, D. Pérez-Solis<sup>4</sup>, J.M. Rodríguez<sup>5</sup>, C. Bousoño<sup>2</sup>, M. Gueimonde<sup>1</sup>, A. Margolles<sup>1</sup>, J.J. Díaz<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA)-Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Asturias. <sup>2</sup>Sección de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Infantil, Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA). Asturias. <sup>3</sup>Departamento de Pediatría, Hospital Universitario de Cabueñes. Asturias. <sup>4</sup>Servicio de Pediatría, Hospital Universitario San Agustín. Asturias. <sup>5</sup>Departamento de Nutrición y Ciencia de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid (UCM). Madrid.

**Introducción.** Actualmente, la terapia para los niños con alergia a las proteínas de leche de vaca (APLV) es una dieta de eliminación de lácteos. Para determinar el posible desarrollo de tolerancia se realizan pruebas de provocación oral (PPO). Existen evidencias del uso de probióticos para acelerar la adquisición de tolerancia. Se ha sugerido que *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) puede equilibrar la producción de citocinas posiblemente involucradas en APLV.

**Objetivo.** Analizar los cambios en la composición de la microbiota y las citocinas en muestras fecales de niños con APLV no mediada por IgE tras la realización de PPO y el efecto del consumo de LGG.

**Metodología.** Se analizaron muestras de 12 niños alérgicos que habían consumido fórmulas hipoalérgicas. De estos, cuatro habían sido suplementados con LGG. Se tomaron muestras de heces antes de las PPO, y a la semana y al mes de su realización. Los cambios en la microbiota se determinaron mediante ultrasecuenciación de amplicones del ARNr 16S y PCR cuantitativa, mientras que citoquinas relacionadas con inflamación se analizaron por inmunoensayo.

**Resultados.** Todos los niños adquirieron tolerancia tras las PPO. Después de las mismas, y solo en el grupo de niños que no ingirieron LGG, los lactobacilos aumentaron significativamente respecto al período de restricción. Por el contrario, en los niños en los que se había suplementado la dieta con LGG se encontraron recuentos más altos de lactobacilos y una mayor diversidad microbiana en las muestras previas a las PPO. Se

observaron también diferencias significativas tras las PPO en los niveles de TNF- $\alpha$  en heces entre los niños que no habían consumido LGG y los que sí.

**Conclusiones.** El consumo del probiótico LGG durante una dieta restrictiva hipoalergénica afecta tanto a los niveles de lactobacilos como a citoquinas inflamatorias intestinales, generando un efecto beneficioso en el entorno intestinal que podría facilitar la respuesta digestiva a las PPO.

**P7. Efecto de la cepa *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BPL1 en niños con síndrome de Prader-Willi: ensayo aleatorio, doble ciego, controlado por placebo, cruzado.** M. Amat-Bou<sup>1,2</sup>, S. García-Ribera<sup>1</sup>, R. Corripio<sup>3,4</sup>, L. Ibáñez<sup>1,2</sup>, C. Moya<sup>5</sup>, J.F. Martínez-Blanch<sup>5</sup>, E. Climent<sup>5</sup>, M.E. Chenoll<sup>6</sup>, D. Ramón-Vidal<sup>6</sup>, M. Ramón-Krauel<sup>1,2</sup>, C. Lerin<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Hospital Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. <sup>2</sup>Institut de Recerca Sant Joan de Déu, Barcelona, Spain. <sup>3</sup>Parc Taulí Hospital Universitari, Sabadell, Spain. <sup>4</sup>Research and Innovation Institute Parc Taulí (I3PT), Sabadell, Spain. <sup>5</sup>Lifesequencing S.L.-ADM. Paterna, Valencia, Spain. <sup>6</sup>Biopolis S.L.-ADM. Paterna, Valencia, Spain.

**Introducción.** La cepa *Bifidobacterium animalis* sups. *lactis* BPL1 ha demostrado su eficacia en la mejora de la composición corporal y la salud metabólica. Dado que las manifestaciones clínicas del síndrome de Prader-Willi (SPW) incluyen hiperfagia, ansiedad, composición corporal alterada y desregulación metabólica, se probó si la suplementación diaria con BPL1 podría ser beneficiosa para los niños con SPW.

**Metodología.** En total 28 niños con diagnóstico genético de SPW (4,5-18 años) recibieron BPL1 ( $10^{10}$  ufc/día) y placebo durante 3 meses por fase, mediante un diseño cruzado doble ciego aleatorizado, con un período de lavado de 3 meses entre fases. La principal variable fue la composición corporal medida mediante un escáner DXA. La hiperfagia se evaluó mediante cuestionario específico para SPW (HQ-CT) y un análisis nutricional. Los problemas emocionales y de conducta se evaluaron con un cuestionario validado por los padres (CBCL, 8-18 años). Las fases de placebo y probiótico se compararon mediante la prueba de Wilcoxon (para muestras emparejadas). Se analizó el microbioma digestivo en cada inicio y fin de fase.

**Resultados.** El consumo diario de BPL1 disminuyó significativamente el porcentaje de adiposidad abdominal en comparación con el período de placebo ( $P < 0,05$ ) y mejoró los niveles de insulina en ayunas y el HOMA-IR ( $P < 0,05$  para ambos). IMC-SDS, la presión arterial, perfil lipídico, hiperfagia y la ingesta calórica. No se observaron cambios en los niveles de ansiedad, sí mejorías en abstinencia social después de la administración de BPL1 en comparación con el placebo ( $P < 0,05$ ). El consumo de BPL1 redujo la abundancia relativa de Firmicutes ( $P < 0,005$ ), y a nivel de género disminuyó *Blautia* e incrementó *Ihubacter* ( $P < 0,005$ ). El consumo de BPL1 rebajó en plasma glicerol y metabolitos relacionados con el metabolismo del triptófano.

**Conclusiones.** Nuestros resultados indican que la suplementación con BPL1 mejora la adiposidad abdominal, la resistencia a la insulina y podría mejorar algunos problemas de comportamiento en niños con SPW.

**P8. In vitro and in vivo evaluation of the antifungal activity of a probiotic combination against *Candida albicans*.** H. Authier<sup>1</sup>, S. Kuyllé<sup>2</sup>, B. Bénédicte<sup>1</sup>, S. Holowacz<sup>3</sup>, Á. Zarama<sup>4</sup>, A. Coste<sup>1</sup>. <sup>1</sup>UMR 152 Pharma Dev, Université de Toulouse, IRD, UPS, France. <sup>2</sup>GENIBIO, Lorp-Sentaraille, France. <sup>3</sup>PiLeJe Laboratoire, Paris, France. <sup>4</sup>PiLeJe SLU, Sant Just Desvern, Spain.

**Objective.** *Candida albicans* is an opportunistic pathogen that causes mucosal and systemic candidiasis. Drug resistance and high frequency of recurrent candidiasis indicate that new and improved treatments are needed. We evaluated the effects of a combination of *Lactobacillus gasseri* LA806 and *Lactobacillus helveticus* LA401 (Lactibiane® Cnd, PiLeJe Laboratoire, France) on gastrointestinal (GI) candidiasis in mice and investigated mechanisms of action *in vitro*.

**Method.** Colonization, microbiota composition and gut inflammation were evaluated in a mice model of GI candidiasis. Murine macrophage functionality was assessed *in vitro*.

**Results and conclusion.** The probiotic combination ( $10^9$  CFU/day po during 12 days) had protective effects in infected mice: decrease in fecal and GI tract *C. albicans* levels, modulation of colon mucosae-associated microbiota composition towards a protective profile, and reduction of inflammation status in colonic tissues. In probiotic pretreated macrophages, killing, binding, phagocytosis of *C. albicans* blastospores and expression of *C-type lectin receptors* were significantly increased. The cytokine profile of macrophages challenged with *C. albicans* or LPS was modified by probiotics. Our study promotes the probiotic combination as a good candidate for managing candidiasis and preserving GI integrity through modulation of microbiota and immunity.

## INMUNONUTRICIÓN

**P9. Actividad física, microbiota y salud. La actividad física regular puede influir en la salud, gracias a la microbiótica.** J. Segovia Olmo. *Universidad Internacional de Andalucía.*

**Introducción.** El sedentarismo y la disbiosis intestinal están relacionados con multitud de enfermedades crónicas actuales. Sin embargo, la práctica regular de actividad física, se usa como prevención y tratamiento de múltiples patologías.

**Objetivo.** Evisar los efectos positivos y/o negativos más novedosos de la práctica regular de actividad física en la microbiota intestinal y en la salud.

**Metodología.** Se realizó una búsqueda exhaustiva en bases de datos *Pubmed* y *Web of Science*. El proceso de búsqueda se completó con las palabras clave: *microbiota and physical activity*, *microbiota and exercise*, y *physical activity and health*. Se hizo una selección de estudios desde 2007, hasta 2019, siguiendo criterios de exclusión e inclusión, como la calidad con el objetivo, homogeneidad y tamaño de muestra, etc., tanto en animales como en humanos.

**Resultados.** La mayoría de estudios mostraban beneficios positivos en la salud, siendo la práctica de actividad física regular, no obligada y sin estrés. Por el contrario, si la práctica de actividad física era muy vigorosa hasta llegar al agotamiento o sobreentrenamiento causando estrés, se relacionaba con efectos negativos en la composición de la microbiota, en el sistema inmunitario y en la salud. En estudios animales existían menos factores de confusión que en humanos.

**Conclusiones.** 1) La posible asociación entre el ejercicio y la microbiota requiere investigaciones más sustanciales en los próximos años, considerando posibles factores de confusión: hábitos dietéticos, edad, IMC, porcentaje graso, factores ambientales, etc. (ya que todos ellos, también influyen en la composición de la microbiota). 2) Se sugiere que el mantenimiento del ejercicio en el tiempo, es necesario para inducir modificaciones duraderas del ecosistema microbiano intestinal. 3) El ejercicio no debe ser demasiado vigoroso ni forzado, ni causar estrés físico ni psicológico. Todas las personas nos podríamos beneficiar de los efectos de un ejercicio individualizado, duradero en el tiempo y en combinación con otros estilos de vida saludables.

**P10. *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT7210 es capaz de modificar la microbiota intestinal en lechones al destete.** P. López-Colom<sup>1,2</sup>, E. Barba-Vidal<sup>1</sup>, L. Castillejos<sup>1</sup>, M. Rodríguez-Palmero<sup>3</sup>, J.A. Moreno-Muñoz<sup>3</sup>, S.M. Martín-Orúe<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Universitat Autònoma de Barcelona <sup>2</sup>Universidad Agraria del Ecuador. <sup>3</sup>Laboratorios Ordesa S.L.

El objetivo del estudio fue evaluar la capacidad de la cepa probiótica *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT 7210 (Laboratorios Ordesa S.L.) para modular la microbiota intestinal del lechón al destete y mejorar su resistencia frente a patógenos oportunistas como *Salmonella*.

Se utilizaron 72 animales de 21 días, distribuidos en 24 corrales y 4 grupos experimentales en un diseño 2x2: con o sin probiótico, e inoculados o no oralmente con el patógeno. El probiótico se administró diariamente vía oral (10<sup>9</sup> ufc/d) y tras una semana de adaptación, los animales se inocularon con *Salmonella typhimurium* en dos días consecutivos (2x10<sup>9</sup> y 6x10<sup>9</sup> ufc/d). Tras la inoculación, se controló la evolución clínica y a día 4 post-inoculación se sacrificó un animal por corral para

muestrear digesta colónica. Se extrajo el ADN de las muestras (*QIAamp DNA Stool Mini Kit*) y se secuenció el gen *16S rRNA* (región V3-V4) (Illumina MiSeq). El análisis de datos se realizó con QIIME y R v3.6.1. (paquetes phyloseq y vegan).

La inoculación con el patógeno indujo cambios significativos en la estructura de la microbiota, agrupándose los animales de forma separada (Permanova P < 0,001) pero sin modificar la riqueza de especies ni la alfa-diversidad del ecosistema. El uso del probiótico se asoció con cambios en la microbiota colónica que tendió a presentar una mayor heterogeneidad en la respuesta al desafío con *Salmonella* (ANOSIM P=0,11), una menor riqueza de especies (P=0,03) y una menor alfa diversidad (índice Shannon P=0,07) en comparación al grupo control.

Los resultados obtenidos muestran como la administración oral de *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CECT 7210 es capaz de modificar la estructura del ecosistema intestinal en lechones al destete promoviendo una respuesta diferencial frente al desafío con *Salmonella*.

**P11. Cambios en la relación ingesta de fibra-microbiota intestinal asociados al proceso de envejecimiento.** S. González Solares<sup>1</sup>, N. Salazar Garzo<sup>2</sup>, M. Gómez Martín<sup>1</sup>, S. Arboleya Montes<sup>3</sup>, C. González De Los Reyes Gavilán<sup>3</sup>, M. Gueimonde Fernández<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Universidad de Oviedo. <sup>2</sup>FINBA-IPLA CSIC. <sup>3</sup>IPLA-CSIC.

**Introducción/objetivo.** El efecto del consumo de diferentes tipos de fibra sobre la composición y actividad de la microbiota intestinal ha sido objeto de numerosos estudios con el fin de mejorar la salud del hospedador. Sin embargo, existe un cierto desconocimiento acerca de cómo afecta el envejecimiento a este binomio.

**Sujetos y métodos.** Se reclutaron 184 sujetos sin patologías declaradas (52 hombres, 132 mujeres) clasificados en intervalos de edad (< 50, 50-65, 65-80, > 80 años). Se recogió información dietética mediante un cuestionario de frecuencia validado y se codificó según las tablas de Marlett y cols. Se cuantificaron por qPCR los principales grupos microbianos y se determinaron los niveles de ácidos grasos de cadena corta fecales mediante cromatografía de gases.

**Resultados.** Los sujetos > 80 años presentaban mayores niveles de *Akkermansia* y *Lactobacillus* y menores de *Faecalibacterium prausnitzii* que los grupos de menor edad. En adultos jóvenes la ingesta de fibra total se asoció positivamente con los niveles de *Akkermansia* ( $\beta=0,314$ ;  $p=0,016$ ) mientras que en el grupo 50-65 años el consumo de fibra soluble se relacionó positivamente con *Lactobacillus* ( $\beta=0,313$ ;  $p=0,010$ ). En sujetos entre 60-80 años únicamente se asoció la hemicelulosa insoluble con los niveles de *F. prausnitzii* y la celulosa con la producción de acético. La ingesta de fibra insoluble (especialmente celulosa y hemicelulosa) fue significativamente inferior en los sujetos > 80 años, identificándose también la hemicelulosa insoluble como predictor de los recuentos de *F. prausnitzii*.

**Conclusiones.** La relación entre el consumo de las diferentes fibras dietéticas y la microbiota intestinal parece estar afectada por la edad. Esta relación edad-dependiente debería ser tenida en cuenta en el diseño de estrategias dietéticas específicas dirigidas a la modulación de la microbiota intestinal en personas de edad avanzada.

**P12. *Lactobacillus fermentum* CECT5716 y *Bifidobacterium breve* CECT7263 previenen la hipertensión inducida por activación TLR7.** N. De la Visitación<sup>1</sup>, I. Robles-Vera<sup>1</sup>, M. Toral<sup>2</sup>, M. Romero<sup>1</sup>, J. Moleón<sup>1</sup>, M. Sánchez<sup>1</sup>, R. Jiménez<sup>1</sup>, M. Gómez-Guzmán<sup>1</sup>, M. Olivares<sup>3</sup>, J. Duarte<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, y Centro de Investigaciones Biomédicas (CIBM), Universidad de Granada, Granada, España. <sup>2</sup>Grupo de regulación genética del remodelado e inflamación cardiovascular, Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid, España. <sup>3</sup>Laboratorio de Descubrimiento y Preclínica, Departamento de Investigación BIOSEARCH S.A., Granada, España.

**Introducción.** El consumo de probióticos cambia la composición de la microbiota intestinal, evitando la progresión del lupus eritematoso sistémico (LES). El objetivo de este estudio es investigar si *Lactobacillus fermentum* CECT5716 (LC40) y/o *Bifidobacterium breve* CECT7263 (BFM) previenen la hipertensión, la disfunción endotelial y la disbiosis intestinal en un modelo inducible de LES.

**Métodos.** Se trataron ratones BALB/cByJRj con 1,25 mg del agonista de TLR7 Imiquimod (IMQ) durante 8 semanas. Al mismo tiempo, LC40 y BFM se administraron diariamente a la dosis 10<sup>9</sup> ufc/ratón.

**Resultados.** IMQ indujo una disbiosis intestinal caracterizada por una reducción tanto en la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* (F/B) como en la riqueza de Chao y el número de especies. LC40 y BFM no restauraron estos parámetros. El análisis tridimensional de componentes de los principales taxones bacterianos en muestras fecales mostró una separación entre los grupos. El porcentaje de bacterias productoras de acetato fue elevado por IMQ, pero ninguno de los probióticos lo restableció. Se encontraron BFM y LC40 asentados en la microbiota intestinal de animales tratados respectivamente con ellos. Los tratamientos con LC40 y BFM redujeron el nivel plasmático anti-dsDNA, así como las poblaciones de linfocitos B en bazo, que se encontraron elevadas en IMQ. LC40 y BFM redujeron el porcentaje de linfocitos Th17 en nódulos linfáticos mesentéricos, y solo en LC40 los Treg estaban elevados. Las aortas de ratones IMQ mostraron reducidas respuestas vasodilatadoras dependientes de endotelio a acetilcolina, que fueron normalizadas por ambos probióticos. Además, el contenido de ROS vascular aumentó en ratones IMQ, y se redujo tanto por LC40 como por BFM.

**Conclusión.** BFM y LC40 impidieron el desarrollo de hipertensión en este modelo y normalizaron la función endotelial.

**P13. Impacto de la fibra sobre las poblaciones de *Bifidobacterium* y *Bacteroides* en microbiota intestinal infantil.** M. Gómez-Martín<sup>1</sup>, S. Saturio López<sup>2</sup>, S. Arboleya Montes<sup>2</sup>, D. Herrero Morín<sup>3</sup>, M. Gueimonde Fernández<sup>2</sup>, S. González Solares<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Universidad de Oviedo. <sup>2</sup>IPLA-CSIC. <sup>3</sup>SESPA.

**Introducción.** Numerosos trabajos han determinado el impacto del tipo de lactancia sobre el desarrollo de la microbiota intestinal (MI), en edades tempranas. Sin embargo, apenas existen estudios que analicen el impacto de la introducción de carbohidratos complejos, como los presentes en la fibra, en la evolución de la MI en edades tempranas.

**Objetivo.** Evaluar el impacto de la introducción e ingesta de fibra sobre el desarrollo de las poblaciones de *Bifidobacterium* y *Bacteroides* durante el primer año de vida, así como sobre la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

**Sujetos y métodos.** Estudio longitudinal en una cohorte de niños a término (34 niños y 31 niñas) pertenecientes al proyecto EarlyMicroHealth-JPI. Se tomaron muestras fecales a los 3, 6 y 12 meses de edad para los análisis de microbiota y se recogió información dietética en cada uno de los tiempos de muestreo mediante cuestionarios de frecuencia de consumo semanal. La ingesta de fibra y sus subtipos (soluble, insoluble y sus subclases) se determinó utilizando las tablas de Marlett y cols. Los niveles de *Bacteroides* y *Bifidobacterium* se determinaron mediante qPCR y los de AGCC mediante cromatografía de gases.

**Resultados.** La ingesta media de fibra total aumentó significativamente en los periodos de tiempo evaluados (3, 11 y 19 g/día a los 3, 6 y 12 meses de edad, respectivamente), así como la de sus principales clases y subclases. Con independencia del tipo de lactancia recibida, el consumo de fibra se relacionó con los niveles de AGCC lo que podría estar relacionado con los cambios observados en las poblaciones de bifidobacterias y bacteroides estudiadas.

**Conclusiones.** La cuantificación de la ingesta de fibra en las primeras etapas de vida puede representar un eslabón fundamental a la hora de profundizar en nuestra comprensión del proceso de desarrollo de la microbiota intestinal del recién nacido.

**P14. Yogur: ¿posible alimento funcional para adultos sanos?** N. Redondo Useros, A. Gheorghe, L.E. Díaz Prieto, B. Villavisencio, A. Marcos Sánchez, E. Nova Rebato. Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC).

**Introducción/objetivos.** Las propiedades moduladoras del consumo de yogur sobre la microbiota intestinal han sido poco

investigadas en adultos sanos, aunque representan una potente diana de acción debido al inadecuado estilo de vida actual.

**Metodología.** Estudio observacional de hábitos de consumo de yogur (mediante cuestionario específico) en 260 adultos sanos (48,4% mujeres), divididos en 4 grupos: 1) no consumidores (NC-Y: 0 yogures/semana; n=40); 2) consumo bajo (CB: > 0-2 yogures/semana; n=41); 3) consumo medio (CM: 3-4 yogures/semana, n=44); 4) consumo alto (CA: =5 yogures/semana; n=50). Se analizaron la microbiota intestinal [secuenciación del gen *16S rRNA* (Illumina)], síntomas intestinales (cuestionario específico), y la dieta (cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos). Se utilizaron los test de Kruskal Wallis con *posthoc* de Bonferroni para los parámetros intestinales, mientras que las diferencias en el perfil nutricional se estudiaron mediante modelos lineales generales, corregidos por IMC y género.

**Resultados.** El consumo de yogur no se relacionó con grupos bacterianos determinados, aunque se observaron niveles más elevados de la bacteria del yogur *Streptococcus thermophilus* en el grupo CA en comparación con los grupos NC-Y y CB ( $P < 0,001$ ). Solo en hombres del grupo CA se observó una menor sintomatología intestinal, indicada por una puntuación más baja de síntomas intestinales globales ( $P=0,028$  y  $P=0,003$ , respectivamente), y en concreto de flatulencia ( $P=0,018$  y  $P=0,036$ ), y un mejor perfil nutricional, como refleja la mayor ingesta de fibra en comparación con NC-Y ( $P=0,032$ ) y la menor ingesta de grasa saturada en comparación con el grupo CB ( $P=0,025$ ).

**Conclusión.** Estos resultados sugieren la necesidad de plantear estudios de intervención con yogur de forma separada en hombres y mujeres que confirmen su posible papel como alimento funcional en población adulta sana.

**P15. Efectos de la fibra dietética sobre consumo de alcohol y microbiota intestinal en rata.** J. Calleja-Conde<sup>1</sup>, L. Segovia-Rodríguez<sup>1</sup>, V. Echeverry-Alzate<sup>2</sup>, K. Buhler<sup>1</sup>, E. Giné<sup>3</sup>, J.A. López-Moreno<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Psicobiología y Metodología en Ciencias del Comportamiento. Universidad Complutense de Madrid. <sup>2</sup>Andalusian Public Foundation for Health and Biomedicine Research in Malaga. <sup>3</sup>Departamento de Biología Celular. Universidad Complutense de Madrid.

El alcohol es la sustancia adictiva más consumida a nivel mundial, siendo su consumo asociado a aproximadamente 3,3 millones de muertes al año, según la Organización Mundial de Salud (OMS). En los últimos años, el consumo de bebidas alcohólicas se ha relacionado con la composición de la microbiota intestinal (MBI), componente de un eje bidireccional de comunicación con el sistema nervioso central, conocido como eje intestino-cerebro. Esta MBI es susceptible al tipo de dieta, dando lugar a variaciones en la producción de ácidos grasos de cadena corta (SCFAs). Debido a ello, en el presente estudio se analizó la influencia de distintas fibras dietéticas que dan lugar

a una variación en la producción de SCFAs (pectina, goma guar, almidón resistente y celulosa, así como del prebiótico inulina) sobre el consumo de alcohol, la composición de la MBI y varios test conductuales (pruebas cognitivas, y de tipo ansiedad y depresión) en ratas Wistar. Los resultados obtenidos indican que el porcentaje de fibras seleccionado (20%), añadido a la dieta estándar, no afecta al peso corporal de los animales. Además, la ingesta crónica de las fibras dietéticas pectina, goma guar e inulina, previene el consumo de alcohol respecto al grupo alimentado con dieta estándar, en dos modelos diferentes de consumo voluntario de alcohol. Con los resultados obtenidos hasta el momento, podríamos hipotetizar que estas dietas regularían el consumo de alcohol a través de la distinta producción de SCFAs, de esta forma, la incorporación de goma guar, pectina o inulina en la dieta podría ser una nueva vía de prevención y/o tratamiento del consumo elevado de alcohol. Los datos provenientes de la secuenciación masiva de la MBI y la evaluación conductual serán presentados en el XI Workshop de la Sociedad Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos.

**P16. Modulación de componentes inmunitarios de la madre, del neonato, y de leche materna: aproximación preclínica con *Lactobacillus fermentum* CECT5716.** I. Azagra-Boronat, A. Tres, M. Massot-Cladera, A. Franch, M. Castell, F. Guardiola, M.J. Rodríguez-Lagunas, F. Pérez-Cano. *Universitat de Barcelona-INSA*.

**Introducción/objetivos.** La cepa probiótica aislada de leche materna *Lactobacillus fermentum* CECT5716 ha mostrado acciones inmunomoduladoras y antiinfecciosas en edades tempranas. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar los efectos de la suplementación con esta cepa a ratas durante la gestación y lactancia sobre la composición de algunos componentes inmunitarios a nivel materno, de la descendencia y del posible vehículo de transmisión, la leche materna.

**Metodología.** Para ello se suplementaron ratas Wistar con  $10^{10}$  ufc/día de la cepa probiótica durante 5 semanas, que comprende las tres semanas de gestación y las dos primeras semanas de lactancia. Al final de la intervención, se valoró la presencia de la cepa en leche materna, glándulas mamarias y contenidos cecales mediante PCR. También se obtuvo plasma materno, de las crías, así como leche materna para el análisis de microbiota mediante secuenciación del DNA 16S, perfil lipídico por cromatografía de gases-masas e inmunoglobulinas por Luminex®.

**Resultados.** La cepa probiótica se detectó en todas las madres a nivel intestinal y en algún caso se transfirió a nivel mamario y crías. Aunque la composición de la microbiota intestinal no mostró grandes cambios a nivel general, se consiguió modificar de forma positiva el perfil lipídico y la composición de inmunoglobulinas en plasma materno. Algunos de estos cambios fueron también observados a nivel de leche materna y del plasma de las crías.

**Conclusiones.** La suplementación con *Lactobacillus fermentum* CECT5716 durante el embarazo y los períodos de lactancia indujo cambios inmunitarios maternos que fueron transmitidos a las crías a través de la leche materna. Estos resultados permiten sugerir que una intervención nutricional de la dieta materna podría mejorar el desarrollo inmunitario neonatal y, posiblemente reducir procesos infecciosos, a través de la mejora de la composición inmunitaria de la leche materna.

**P17. La microbiota de ratones obesos incrementa el proceso tumoral e inflamatorio en cáncer colorrectal.** A.J. Ruiz-Malagón<sup>1</sup>, T. Veza<sup>1</sup>, L. Hidalgo-García<sup>1</sup>, P. Díez-Echave<sup>1</sup>, J.A. Molina-Tijeras<sup>1</sup>, M.J. Rodríguez-Sojo<sup>1</sup>, M.E. Rodríguez-Cabezas<sup>1</sup>, J.A. Marchal<sup>2</sup>, J. Gálvez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Farmacología, CIBER-EHD, *ibs*. GRANADA, CIBM, Universidad de Granada, Granada, España. <sup>2</sup>Departamento de Anatomía Humana y Embriología. IBIMER, *ibs*. GRANADA, CIBM, Universidad de Granada, Granada, España.

**Introducción/objetivos.** El cáncer colorrectal constituye una de las principales causas de morbimortalidad en el mundo siendo la obesidad un factor de riesgo para este. Ambas patologías se asocian a disbiosis intestinal. El objetivo de este estudio fue evaluar el impacto de un trasplante de microbiota fecal (FMT) de ratones delgados y ratones obesos sobre el desarrollo tumoral en un modelo de cáncer colorrectal asociado a colitis (CAC).

**Metodología.** Ratones machos C57BL/6 fueron distribuidos en dos grupos, uno se alimentó con una dieta estándar y el otro con dieta rica en grasa (HFD). Pasadas 7 semanas se recolectaron las heces y se usaron para realizar la FMT sobre dos grupos de ratones que previamente fueron sometidos a tratamiento antibiótico. Simultáneamente, se indujo un proceso de CAC mediante la administración de AOM/DSS. La FMT se prolongó 3 semanas más al proceso de inducción tumoral. La progresión de la inflamación intestinal se evaluó diariamente mediante el índice de actividad de la enfermedad (DAI). Tras el sacrificio se analizó el estado inflamatorio y tumoral mediante RT-qPCR.

**Resultados.** La FMT de ratones delgados produjo una reducción del número de tumores en comparación con aquellos que recibieron la FMT de ratones alimentados con HFD. Además, redujo la ingesta diaria de comida y produjo un menor acúmulo de grasa a nivel abdominal. El grupo que recibió la microbiota de ratones delgados experimentó una mejora en la expresión de marcadores inflamatorios como la IL-6, la IL-1 $\beta$ , así como, la IL-23 y la IL-17, ambos implicados en el proceso tumoral.

**Conclusiones.** La FMT de ratones delgados produce una mejora del proceso tumoral en comparación con la FMT de ratones obesos, así como, un alivio del proceso inflamatorio. Queda así demostrada la existencia de una asociación perjudicial entre la microbiota de la población obesa y el cáncer colorrectal.

**P18. Efecto antiinflamatorio de un extracto de hoja de olivo en un modelo de trasplante de microbiota fecal (FMT) en ratones obesos.** T. Veza<sup>1</sup>, J.A. Molina-Tijeras<sup>1</sup>, A.J. Ruiz-Malagón<sup>1</sup>, L. Hidalgo-García<sup>1</sup>, P. Díez-Echave<sup>1</sup>, M.J. Rodríguez-Sojo<sup>1</sup>, A. Rodríguez-Nogales<sup>2</sup>, M. Romero<sup>3</sup>, I. Robles-Vera<sup>3</sup>, B. Martín-García<sup>4</sup>, A.M. Gómez-Caravaca<sup>4</sup>, D. Arráez-Román<sup>4</sup>, A. Segura-Carretero<sup>4</sup>, J. Duarte<sup>3</sup>, M.E. Rodríguez-Cabezas<sup>1</sup>, J. Gálvez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>CIBER-EHD, Departamento de Farmacología, *ibs*. GRANADA, Centro de Investigación Biomedica (CIBM), Universidad de Granada, Granada. <sup>2</sup>Instituto de Investigación Biomédica de Málaga-IBIMA, Málaga. <sup>3</sup>CIBER-Enfermedades Cardiovasculares, Departamento de Farmacología, Centro de Investigación Biomedica (CIBM), Universidad de Granada, Granada. <sup>4</sup>Centro Tecnológico de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional (CIDAF), PTS Granada. Granada.

**Introducción/Objetivo.** En los últimos años el trasplante de microbiota fecal (FMT) está ganando atención como tratamiento de la obesidad. Sin embargo, los mecanismos moleculares detrás de este efecto aún no se han entendido completamente. El objetivo de este estudio fue evaluar los efectos de un extracto de hoja de olivo (OLE) en un modelo de trasplante fecal a ratones obesos, describiendo los mecanismos subyacentes involucrados en los efectos beneficiosos, con especial atención al estado inflamatorio subclínico asociado a la obesidad.

**Metodología.** Ratones C57BL/6J que consumieron una dieta estándar o una dieta rica en grasa se dividieron en 3 grupos experimentales: grupo control delgado, grupo obeso y grupo obeso tratado con OLE (25 mg/kg) durante 5 semanas. La semana previa al sacrificio se recolectaron los contenidos fecales de los tres distintos grupos para el posterior modelo de FMT. Los ratones receptores (delgado, obeso y obeso-OLE) fueron administrados por vía oral con el contenido fecal de los donantes durante 5 semanas. Durante el periodo experimental se midió el peso corporal y el consumo de comida semanalmente. Al final del tratamiento, muestras de tejido adiposo y de hígado se utilizaron para la extracción de ARN para evaluar la expresión de diferentes biomarcadores inflamatorios y proteínas implicadas en los procesos metabólicos.

**Resultados.** La FMT-OLE se tradujo en un menor incremento del peso corporal en comparación que el grupo control obeso, y la mejora en el metabolismo glucídico y lipídico. Estos efectos beneficiosos se asociaron con una mejora en la expresión de marcadores asociados a la obesidad como citocinas de carácter inflamatorio (TNF- $\alpha$  y IL-1 $\beta$ ), la proteína transportadora de membrana de glucosa (GLUT-4) y la proteína quinasa de AMP (AMPK) involucrada en los procesos metabólicos.

**Conclusiones.** FMT-OLE tuvo un efecto terapéutico favorable en un modelo de obesidad en ratones contribuyendo a la mejora del estado inflamatorio crónico subclínico asociado a la obesidad.

**P19. Relación entre el consumo de cerveza y la microbiota intestinal. Estudio observacional en adultos sanos.** N. González Zancada, N. Redondo Useros, L.E. Díaz Prieto, A. Gheorghie, A. Marcos Sánchez, E. Nova Rebato. *Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC).*

**Introducción/Objetivo.** La metabolización de los compuestos bioactivos de la cerveza (polifenoles,  $\beta$ -glucanos y arabinosilanos) por parte de la microbiota intestinal podría influir en su composición. Este trabajo exploró las asociaciones entre el consumo moderado de cerveza, la composición de la microbiota y el perfil de ácidos grasos de cadena corta (AGCC).

**Metodología.** Se estudiaron 78 adultos sanos con dos patrones distintos de consumo de alcohol: consumo nulo/ocasional (Abstemios) (n=44; < 1,5 g alcohol/día) y consumo procedente de cerveza =70% (Cerveza) (n=34; cerveza 10-30 g/día; vino < 2 g/día; licores < 6 g/día). La composición de la microbiota se analizó mediante secuenciación del gen *16S rRNA* (Illumina); en concreto la diversidad alfa y los taxones con mayor capacidad fermentativa de fibra, y la producción de AGCC mediante cromatografía de gases. Se empleó un modelo lineal general o un test de Mann-Whitney teniendo en cuenta el sexo y la composición corporal (IMC y % masa grasa) como factores de confusión.

**Resultados.** No hubo diferencias entre grupos en diversidad alfa (riqueza, Shannon). A nivel de familia, tan solo *Clostridiaceae* fue inferior en Cerveza versus Abstemios (P=0,009). *Alkaliphilus* y *Alkaliphilus peptidifermentans* mostraron abundancias inferiores en hombres del grupo Cerveza comparado con Abstemios (P=0,025; P=0,028). Por otra parte, el género *Blautia* y *Pseudobutyrvibrio* fueron significativamente más abundantes en Cerveza que en Abstemios (P=0,044; P=0,037), y se observó una tendencia similar para *Johnsonella* y *Butyrvibrio* (P=0,051; P=0,056). A nivel de especie *Blautia coccoides* y *B. producta* mostraron diferencias entre grupos (P=0,027; P=0,039). Finalmente, en Cerveza se encontró una concentración mayor de ácido butírico que en Abstemios (P=0,032).

**Conclusión.** el consumo moderado de cerveza se asoció con mayor abundancia del género *Blautia* y una mayor concentración de butírico; sin embargo, no hay *a priori* relación directa entre ambos hallazgos, pues el butírico no es un producto final mayoritario del metabolismo de dicho género.

## VETERINARIA

**P20. Inoculación de microbiota ruminal en animales recién nacidos para acelerar la colonización microbiana del rumen.** J.M. Palma Hidalgo, A. Belanche Gracia, I. Nejjam, R. Serrano Gómez, E. Jiménez Jiménez, A.I. Martín García, D. Yáñez Ruiz. *Estación Experimental del Zaidín, CSIC.*

**Introducción.** Tras el nacimiento, los rumiantes se alimentan a base de leche y se comportan como animales esencialmente monogástricos. La colonización microbiana y el desarrollo del rumen permiten al animal experimentar la transición hacia un rumiante propiamente dicho, capaz de digerir alimento sólido. En los sistemas intensivos basados en lactancia artificial esta colonización se ve comprometida por la ausencia de contacto con animales adultos, responsables principales de la transmisión de esta microbiota.

**Objetivos.** Este trabajo evalúa la inoculación de microbiota ruminal de animales adultos en animales recién nacidos para acelerar la colonización microbiana del rumen.

**Metodología.** 32 cabritos fueron separados al nacer en 4 grupos experimentales (n=8). Los animales fueron inoculados con líquido ruminal fresco proveniente de cabras adultas con dieta concentrada (LRC) o dieta forrajera (LRF), líquido ruminal autoclavado (PRE) o no inoculados (CTL). La inoculación se realizó diariamente a razón de 0,5 ml/kg peso vivo. Se tomaron muestras de líquido ruminal a las 5, 7 y 9 semanas de vida (antes, durante y después del destete, respectivamente) para la secuenciación de los genes *del RNAr 16S* de bacterias y arqueas y *RNAr 18S* de hongos y protozoos.

**Resultados.** Los grupos de cabritos inoculados con líquido ruminal fresco presentaron una riqueza y biodiversidad bacteriana y protozoaria notablemente mayores con respecto a los otros 2 grupos experimentales (P < 0,001 para ambos parámetros y grupos microbianos) independientemente del tiempo de muestreo. En el caso de las arqueas, se observaron diferencias significativas (P=0,04) en términos de riqueza, pero no en biodiversidad, siendo PRE el grupo con menos riqueza y CTL el que más (+52%). No se apreciaron diferencias en la riqueza ni biodiversidad de hongos anaerobios.

**Conclusiones.** La inoculación de líquido ruminal fresco en cabritos recién nacidos promovió una colonización ruminal temprana de bacterias y protozoos, lo que podría acelerar el desarrollo del rumen permitiendo un adelantamiento del destete.

**P21. Del nacimiento al destete: una visión del proceso de colonización microbiana intestinal en el lechón.** M. Saladrigas-García<sup>1</sup>, M. Durán<sup>2</sup>, J. Coma<sup>2</sup>, J.F. Pérez<sup>1</sup>, S.M. Martín-Orúe<sup>1</sup>. <sup>1</sup>*Universitat Autònoma de Barcelona.* <sup>2</sup>*Grupo Vall Companys.*

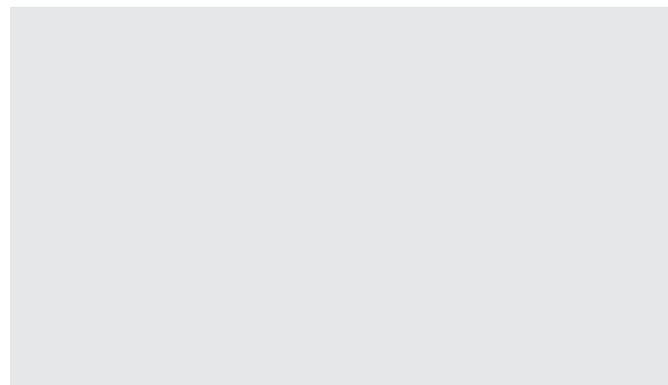
El **objetivo** del estudio fue el de explorar la evolución de la microbiota intestinal del lechón desde el nacimiento hasta el destete y valorar el posible impacto de un manejo diferencial en granja.

Se seleccionaron dos granjas con una pauta diferente en el uso de antimicrobianos. En cada granja se seleccionaron 10 camadas y se muestrearon heces de un cerdo por camada los días 2, 7, 14 y 21 de lactancia y 14 tras el destete. Se extrajo el ADN de las muestras (DNA PSP® Spin Stool) y se secuenció

el gen *16S rRNA* (región V3-V4) (Illumina MiSeq). El análisis de datos se realizó con QIIME y R v3.5.3. (paquete phyloseq).

La diversidad alfa incrementó con la edad ( $P < 0,001$ ) con una creciente riqueza de especies. La diversidad beta disminuyó tras del destete ( $P < 0,001$ ) sugiriendo una evolución convergente entre individuos. El análisis de la estructura del ecosistema (Envfit, ANOSIM), mostro también diferencias con la edad ( $P < 0,001$ ). Se observó una disminución progresiva en *Clostridiaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Fusobacteriaceae*, *Pasteurellaceae* y *Streptococcaceae* ( $P < 0,001$ ). En contraste, *Lachnospiraceae* ( $P=0,003$ ), *Lactobacillaceae* ( $P=0,003$ ) y *Veillonellaceae* ( $P=0,025$ ) aumentaron del día 7 al 14, y luego disminuyeron. *Campylobacteraceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Ruminococcaceae* ( $P < 0,001$ ) y *Prevotellaceae* ( $P=0,005$ ) aumentaron gradualmente con la edad, reflejando el cambio de una microbiota más láctica hacia una más butirógena. Con respecto al impacto de la granja, se encontraron algunas diferencias en la riqueza de especies y ligeros cambios en la estructura del ecosistema (ANOSIM:  $P=0,025$ ) asociados a diferencias en algunos grupos taxonómicos.

En **conclusión**, durante la transición desde el nacimiento hasta el destete, la microbiota del lechón muestra cambios importantes con la sucesión de grupos que convergen hacia un ecosistema más estable y mejor adaptado a la alimentación seca. En esta secuencia de colonización el manejo de la granja parece tener un impacto limitado.



**P23. Efecto del consumo de probióticos funcionales en el microbioma de perros y gatos sanos.** A. Rojas<sup>1</sup>, J. Hoke<sup>2</sup>, E. Climent<sup>3</sup>, V. Illescas<sup>3</sup>, M.C. Solaz<sup>3</sup>, D. Carrillo<sup>3</sup>, J. Martínez-Blanch<sup>3</sup>, D. Ramón-Vidal<sup>1</sup>, M. Tortajada<sup>1</sup>, M.E. Chenoll<sup>1</sup>. <sup>1</sup>*Biopolis S.L.-ADM. Paterna, Valencia, Spain.* <sup>2</sup>*ADM Nutrition, Companion animals. Decatur, IL (EE.UU.).* <sup>3</sup>*Lifesequencing S.L.-ADM. Paterna, Valencia, Spain.*

**Objetivos.** En estudios anteriores, ADM ha desarrollado un probiótico con el efecto de reducir los niveles de grasa corporal (BPL1). Este efecto ha sido demostrado en ensayos clínicos en humanos. Este enfoque se puede aplicar en el área de mascotas. Para ello, se deben realizar las primeras pruebas de seguridad, demostrando en animales sanos que después de la ingestión de probióticos no se observan cambios perjudiciales en los animales. Los objetivos que se fijaron fueron:

1. Garantizar la seguridad del consumo de BPL1.
2. Analizar el efecto potencial del consumo de probióticos en el microbioma intestinal.

**Metodología.** Los estudios incluyeron la siguiente dosificación en perros y gatos:

1. Perros sanos (10 individuos/brazo) que consumen BPL1 ( $1 \times 10^{10}$  ufc/día) o placebo.
2. Gatos sanos (10 individuos/brazo) que consumen BPL1 ( $1 \times 10^{10}$  ufc/día) o placebo.

Para la evaluación de las poblaciones bacterianas en las muestras de heces se siguió una estrategia basada en la captura de regiones hiper-variables V3-V4 del gen ribosomal *16S*. La secuenciación se realizó en la plataforma MiSeq de Illumina. Posteriormente se realizaron varias pruebas bioestadísticas a los distintos subconjuntos de muestras.

**Resultados.** Además de validar la seguridad del probiótico, se han encontrado resultados interesantes relativos a la evolución del microbioma. En concreto, el estudio ha permitido identificar poblaciones que podrían ser consideradas como posible biomarcador relacionado con el control de peso en perros.

**Conclusiones.** Se ha llevado a cabo el primer paso para obtener un probiótico seguro que potencialmente sea capaz de ayudar activamente en el control de peso en mascotas (perros y gatos).

POSTER NO PRESENTADO

**P24. Análisis comparativo de cepas tunecinas productoras de dextrano pertenecientes a los géneros *Leuconostoc* y *Weisella*.** A.M. Hernández-Alcántara<sup>1</sup>, N. Besrou-Aouam<sup>1,2</sup>, I. Fhoula<sup>2</sup>, M.L. Mohedano<sup>1</sup>, A. Najjari<sup>2</sup>, A. Prieto<sup>1</sup>, P. Ruas-Madiedo<sup>3</sup>, P. López<sup>1</sup>, H.I. Ouzari<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, CIB-CSIC, Madrid, España. <sup>2</sup>Laboratorio de Microorganismos y Biomoléculas Activas (LR03ES03), Facultad de Ciencias de Túnez, Universidad Túnez El Manar, Túnez. <sup>3</sup>Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), CSIC. Villaviciosa, Asturias, España.

**Introducción/Objetivos.** Los exopolisacáridos (EPS) producidos por las bacterias ácido lácticas (BAL) poseen una amplia aplicación industrial. Así, los dextranos se emplean en la industria alimentaria para mejorar las propiedades reológicas de alimentos fermentados y poseen capacidad inmunomoduladora y antiviral. El objetivo de este trabajo fue identificar weisellas productoras de dextrano y caracterizar su naturaleza y el efecto de sus polímeros comparándolo con los de *Leuconostoc lactis* AV1n.

**Metodología.** Los EPS se caracterizaron por análisis de la composición de azúcares y de metilación. Su tamaño se determinó por SEC-MALS. La producción de dextrano y el flujo metabólico se cuantificaron por el método del fenol sulfúrico y por cromatografía de gases. Se analizó la interacción bacteria-células Caco-2, y la formación de biopelícula por tinción con cristal violeta.

**Resultados.** Se demostró que los EPS eran dextranos con elevadas masas moleculares (5,84x10<sup>7</sup>-2,61x10<sup>8</sup> Da). Su producción se detectó durante la fase exponencial de crecimiento, con un consumo de sacarosa de > 95% por AV1n y de 57% por las weisellas. El EPS producido por *W. confusa* 11.3b disminuyó en la fase estacionaria. Este resultado indicativo de una actividad dextranasa, fue confirmado por la detección de halos de degradación de azul dextrano. *W. confusa* V30 mostró menor adherencia a los enterocitos en presencia de glucosa (38,1%) versus sacarosa (14,3%). El tipo de azúcar no afectó la adhesión de *W. cibaria* AV2ou (10,5±1,4%) y 11.3b (11,2±3,0%). AV1n mostró mayor adherencia en presencia de sacarosa (48,8%) versus glucosa (27,8%) y se categorizó como fuerte formador de biopelícula sobre poliestireno en presencia de sacarosa (3,38±0,38) versus glucosa (0,78±0,21). Dichos azúcares no influyeron diferencialmente en la formación de biopelícula por las weisellas.

**Conclusiones.** Por primera vez, *L. lactis* AV1n ha evidenciado al dextrano como efector positivo de la adhesión y agregación de BAL, y se ha detectado una actividad dextranasa en una weisella.

**P25. Impacto de la suplementación con probióticos en el metabolismo intestinal de los polifenoles de la uva.** I. Gil-Sánchez, C. Cueva, A. Tamargo, D. González de Llano, M.V. Moreno-Arribas, B. Bartolomé. CIAL-CSIC-UAM.

**Objetivos.** Es sabido que, mayoritariamente, la microbiota intestinal metaboliza los polifenoles de la dieta generando metabolitos fenólicos fisiológicamente activos. La administración de bacterias probióticas metabolizadoras de polifenoles se ha propuesto como una estrategia nutricional para favorecer el metabolismo microbiano intestinal de estos fitoquímicos, y, por tanto, para mejorar su efectividad en el organismo humano. El objetivo de este trabajo es estudiar el impacto en la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal de la ingesta *in vitro* de un extracto de polifenoles de uva tinta, suplementada o no con un probiótico.

**Método.** Empleando el Simulador Gastrointestinal dinámico simgi<sup>®</sup> se simuló la digestión gastrointestinal de un extracto de polifenoles de uva tinta (800 mg, equivalentes a 522 mg de polifenoles totales) antes y después de alimentar el simulador con la cepa probiótica *L. plantarum* CLC 17 (2x10<sup>10</sup> ufc/día, 7 días). Los cambios en la composición de la microbiota se evaluaron por recuento bacteriano, qPCR y secuenciación del gen *16S rRNA*, y los cambios en la actividad metabólica, por análisis de metabolitos fenólicos e iones de amonio.

**Resultados.** Se ha conseguido implantar con éxito la cepa probiótica *L. plantarum* CLC 17 en los compartimentos del colon del simgi<sup>®</sup>, previamente estabilizados con microbiota fecal procedente de voluntarios sanos. La suplementación con *L. plantarum* CLC 17 aumentaba la formación de metabolitos fenólicos, así como el contenido de amonio. Respecto a la composición microbiana, no se observaron cambios en la diversidad bacteriana, aunque sí un descenso en la abundancia relativa de la familia *Enterobacteriaceae* después de la implantación del probiótico.

**Conclusiones.** Los datos obtenidos confirman los efectos protectores de la suplementación con probióticos/lactobacilos sobre el ecosistema intestinal, disminuyendo el contenido de bacterias nocivas y actuando también como “bio-potenciadores” del metabolismo de los polifenoles de la dieta.

**P26. Análisis piloto de microbiota humana en muestras argentinas-chilenas de origen fecal y de piel.** R.D. Peralta<sup>1,2</sup>, I.J. Cassol<sup>2</sup>, E. Elguero<sup>3</sup>, A. Millán<sup>3</sup>, F. Zapata<sup>4</sup>, H.G. Alvarado<sup>5</sup>, D. Fuentes<sup>4</sup>, G.E. Cerrone<sup>3</sup>, G.D. Fretchel<sup>3,6</sup>, I. Pedroso<sup>7</sup>, C.G. Boggio Marzet<sup>8</sup>, J.P. Bustamante<sup>2,9</sup>. <sup>1</sup>Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos, Argentina. <sup>2</sup>Facultad de Ingeniería, Universidad Austral, LIDTUA (CIC), Argentina. <sup>3</sup>Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires, Argentina. <sup>4</sup>Fraunhofer Chile Research, Center for Systems Biotechnology, Santiago de Chile,

Chile. <sup>5</sup>Universidad de Chile. <sup>6</sup>Hospital de Clínicas, Buenos Aires, Argentina. <sup>7</sup>Universidad Autónoma de Chile, Santiago de Chile, Chile. <sup>8</sup>Gastroenterología y Nutrición Pediátrica. Hospital “Dr. I. Pirovano”, Buenos Aires, Argentina. <sup>9</sup>Instituto de Investigación y Desarrollo en Bioingeniería y Bioinformática (IBB), CONICET-UNER, Oro Verde, Argentina.

**Introducción.** En la última década se han incrementado exponencialmente la cantidad de publicaciones que abordan el estudio de la microbiota humana. Esto trae consigo el empleo de numerosos métodos para la obtención, análisis, visualización e interpretación de los datos de microbiota. Frente a la amplia diversidad de metodologías, no hay aún un consenso sobre el proceso de análisis. En este trabajo se comenzó a diseñar e implementar un protocolo, desde la extracción de las muestras hasta la interpretación de resultados, para el análisis de la microbiota humana a partir de muestras de dos sitios, fecales y de piel.

**Metodología.** Se secuenciaron 8 muestras (*paired-end reads*) partiendo de amplificaciones de regiones del marcador 16S para 4 muestras fecales y 4 muestras de piel. En el caso de las de piel, también se amplificó una región del marcador 18S. Las secuencias obtenidas se editaron con *cutadapt*, eliminando adaptadores y cebadores. La calidad de estas se evaluó con *FastQC*. El proceso de eliminación de ruido, desreplicación y eliminación de quimeras se realizó con *Deblur* y *Dada2*. La asignación taxonómica se hizo con *Vsearch*, empleando como base de datos de referencia *SILVA* v1.3.2. Las métricas de alfa y beta diversidad se calcularon con *QIIME 2*.

**Resultados.** Se analizaron las abundancias relativas de las muestras, junto con los análisis de diversidad característicos. En términos generales, los filos más abundantes observados en muestras fecales correspondieron a *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, mientras que en piel correspondieron a *Firmicutes* y *Actinobacterias*.

**Conclusiones.** En este trabajo se presenta un protocolo de implementación del proceso completo de análisis de microbiota en un esfuerzo bilateral Argentina-Chile, desde la extracción de las muestras hasta el análisis de resultados de microbiota humana. Esto permitirá contar con resultados reproducibles, trazables y precisos hacia futuras aplicaciones en la clínica médica, desde su uso como complemento al diagnóstico hasta llegar a ser una herramienta de seguimiento para tratamientos.

POSTER NO PRESENTADO

**P28. Estudio fenotípico y molecular de cepas probióticas de *Lactobacillus pentosus* pre-adaptadas en presencia de aceites vegetales.** J.J. De la Fuente Ordóñez, E. Alonso García, L. Lavilla Lerma, B. Pérez Montoro, S. Castillo-Gutiérrez, M.D. Estudillo-Martínez, N. Benomar, H. Abriouel. *Universidad de Jaén*.

**Introducción/Objetivos.** Las cepas de *Lactobacillus pentosus* aisladas a lo largo del proceso de fermentación natural de la aceituna Aloreña mostraron un gran potencial probiótico tales como la tolerancia a bajos pHs y a altas concentraciones de sales biliares, y también un amplio espectro de actividad antimicrobiana frente a diferentes patógenos. La robustez de estas cepas de *L. pentosus* ha sido incrementada frente a diferentes tipos de

estrés mediante la pre-adaptación de dichas cepas en presencia de aceites vegetales comestibles.

**Metodología.** En este estudio, hemos analizado las diferentes propiedades probióticas de siete cepas de *L. pentosus* pre-adaptadas o no con diferentes aceites vegetales (oliva, girasol, lino, argán, almendras y maíz). A continuación, hemos seleccionado una cepa de *L. pentosus* que exhibía el mejor potencial probiótico tras su adaptación en presencia de aceites para así analizar su transcriptoma y detectar las diferencias en la expresión de genes en comparación con la cepa no adaptada.

**Resultados.** Las siete cepas de *L. pentosus* pre-adaptadas en presencia de diferentes aceites vegetales mostraron un comportamiento diferente dependiendo de la cepa analizada y del aceite utilizado en la adaptación. En general, independientemente del aceite vegetal utilizado las cepas pre-adaptadas de *L. pentosus* mostraron una gran capacidad de auto-agregación, co-agregación con patógenos tales como *Listeria monocytogenes* y *Salmonella*, una gran capacidad de adhesión a la mucina y mayor actividad antimicrobiana frente a diferentes patógenos. Teniendo en cuenta estos resultados, hemos seleccionado la cepa *L. pentosus* AP2-16 (con el mejor perfil probiótico tras su adaptación) y hemos secuenciado el transcriptoma tanto de la cepa sin adaptar (control) como de la cepa adaptada. Los resultados del análisis transcriptómico revelaron la expresión de varios genes en la cepa adaptada y que están relacionados con varios procesos biológicos, incluyendo la utilización del carbono, aminoácidos y procesos del metabolismo de péptidos, proteínas de transporte y de membrana.

**Conclusiones.** Los resultados mostraron que la pre-adaptación con aceites vegetales representa una de las nuevas herramientas para incrementar el potencial probiótico de las cepas de *L. pentosus* mediante la expresión de genes implicados en diferentes procesos biológicos.

**P29. Estudio descriptivo de la microbiota intestinal en pacientes con infección por *Clostridium difficile* y en pacientes colonizados por *Clostridium difficile*.** P. Sánchez Pellicer, V. Navarro López. *Hospital Universitario del Vinalopó, Elche, Alicante.*

**Introducción/Objetivos.** *Clostridium difficile* es un bacilo Gram positivo, anaerobio estricto y formador de esporas. Constituye la principal causa de diarrea nosocomial en pacientes hospitalizados. La colonización intestinal de *C. difficile* puede dar lugar a un abanico de situaciones como la ausencia de síntomas (individuos colonizados) hasta diarrea grave o colitis pseudomembranosa fulminante (individuos infectados). La disrupción de la microbiota intestinal endógena (disbacteriosis) proporciona el ambiente ideal para que pueda producirse la infección. La comparación de la microbiota intestinal de sujetos infectados y colonizados por *C. difficile* podría aportar información relevante sobre grupos susceptibles de desarrollo de CDI o protectores,

puesto que la presencia de ciertos géneros podría relacionarse con la inhibición de la transición desde un estado de colonización a infección.

**Metodología.** Mediante secuenciación masiva del gen bacteriano ADN<sub>r</sub> 16S se realizaron estudios de alfa y beta diversidad, de agrupamiento y de composición en 15 pacientes con infección por *C. difficile* (Grupo CDI), 15 individuos colonizados por *C. difficile* (Grupo P) y 15 controles sanos (Grupo CTRL).

**Resultados.** Se evidencia una pérdida de alfa diversidad y riqueza y una estructura diferente en los grupos CDI y P con respecto al grupo CTRL, pero sin diferencias significativas entre los dos primeros. El estudio de la composición muestra que en los grupos CDI y P se produce una fuerte disminución del *phylum Firmicutes* y una expansión de potenciales patógenos. Asimismo, hay una pérdida de géneros inhibitorios de la germinación de *C. difficile* en los pacientes infectados que se conservan en mayor medida en los individuos colonizados.

**Conclusión.** Los sujetos infectados y colonizados por *C. difficile* presentan una microbiota intestinal con una diversidad, riqueza, estructura y composición completamente diferente a la de los controles sanos, aunque similar entre si. Es en la composición donde encontramos que los sujetos colonizados, en especial en géneros minoritarios, presentan diferencias con respecto a los infectados.

**P30. Análisis de las propiedades probióticas de cepas sobreproductoras de riboflavina derivadas de bacterias aisladas de chicha Argentina.** M.L. Mohedano<sup>1</sup>, A. Hernández-Alcántara<sup>1</sup>, S. Pardo<sup>1</sup>, T. Requena<sup>2</sup>, A. De Moreno de LeBlanc<sup>3</sup>, J.G. LeBlanc<sup>3</sup>, R. Aznar<sup>4</sup>, P. López<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). <sup>2</sup>Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación (CIAL-CSIC). <sup>3</sup>Centro de Referencia para Lactobacilos (CERELA-CO-NICET). <sup>4</sup>Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC).

**Introducción/Objetivos.** Algunas bacterias ácido lácticas (BAL) producen riboflavina, vitamina B2 esencial para los seres humanos. Por ello pueden ser utilizadas para la elaboración de alimentos funcionales. En este trabajo se pretendió caracterizar *in vitro* e *in vivo* tres cepas de *Lactobacillus plantarum* sobreproductoras de riboflavina, derivadas de BAL aisladas de chicha argentina.

**Metodología.** Las BAL fueron marcadas por transferencia del plásmido pRCR12, que codifica la proteína fluorescente mCherry. Los niveles de riboflavina y de mCherry se determinaron fluorimetricamente. Se analizó la adhesión de las BAL a células epiteliales Caco-2. La formación de biopelículas se evaluó por tinción con cristal violeta y por la fluorescencia de mCherry, que también se utilizó para analizar la autoagregación de las BAL. Se determinó la supervivencia de las BAL bajo estrés

gastrointestinal en presencia de una matriz alimentaria comercial (Incaparina). La supervivencia *in vivo* de las BAL libres o en conjunción con Incaparina se evaluó en un modelo murino con ratones convencionales BALB/c.

**Resultados.** El marcaje de las BAL con pRCR12 no afectó de forma significativa su crecimiento o su producción de riboflavina. Las tres cepas mostraron niveles semejantes de adhesión a los enterocitos (4-6%) y similares a los del probiótico *Lactobacillus rhamnosus* LGG (4%). Las tres cepas formaron biopelículas consistentes. M9MG6B2 y M5MA1B2 mostraron una agregación superior (30-40%) a la de M9MM1B2 (18%). Se detectó *in vitro* un efecto protector de la Incaparina y una resistencia satisfactoria de las tres cepas al estrés gastrointestinal. Únicamente M9MM1B2 mostró cierta susceptibilidad a pH 2,0 (supervivencia del 63%). La administración de las BAL solas o junto con Incaparina a roedores, no tuvo efecto adverso sobre la salud, el crecimiento y/o el bienestar de los roedores.

**Conclusiones.** Los resultados obtenidos indican que las tres BAL estudiadas poseen características probióticas de interés para el desarrollo de alimentos funcionales.

**P31. Aceite de oliva virgen frente a mantequilla en la microbiota intestinal murina.** N. Andújar Tenorio<sup>1</sup>, A. Cobo Molinos<sup>2</sup>, A.M. Martínez Rodríguez<sup>1</sup>, M. Hidalgo Pestaña<sup>1</sup>, I. Prieto Gómez<sup>1</sup>, A. Gálvez del Postigo<sup>1</sup>, M. Martínez Cañamero<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Universidad de Jaén. <sup>2</sup>Universidad de Granada.

**Introducción/Objetivos.** Las dietas altas en grasas condicionan las poblaciones microbianas existentes en el intestino y nuestro grupo de investigación ha contribuido a conocer más sobre ello estudiando el efecto en ratones de dietas enriquecidas con aceite de oliva virgen y con mantequilla en comparación con una dieta de pienso estándar. Los resultados, que hemos descrito previamente, mostraron diferencias significativas en los cambios en la microbiota entre los grupos de oliva virgen y mantequilla tras aplicar las dietas durante doce semanas. En esta ocasión presentaremos los resultados obtenidos en el balance intermedio del experimento, comparándolo con los resultados finales con el propósito de determinar si las diferencias descritas pueden ser detectadas previamente o si existen tendencias que ya apunten a los resultados finales.

**Metodología.** Veintiséis ratones Swiss-Webster se alimentaron con pienso estándar (8) o enriquecido en aceite de oliva virgen (9) o mantequilla (9). Al cabo de seis semanas se midió la población simbiote existente en las heces mediante secuenciación masiva del gen *16S rRNA*.

**Resultados.** Al secuenciar la diversidad microbiana en las muestras fecales, la cantidad de lecturas fue estable. Las secuencias se recortaron y filtraron, dejando un total de 382499, con una longitud media entre 549 y 568 nt. Después de asociar un

organismo a cada secuencia obtenida, las lecturas se filtraron, analizaron y agruparon en función de diferentes niveles taxonómicos. En total, las secuencias se clasificaron en nueve filos. El más frecuente fue *Bacteroidetes*, excepto en tres ratones donde *Firmicutes* estaba en una mayor proporción. Las proteobacterias fueron predominantes de manera estadísticamente significativa en el grupo alimentado con mantequilla, mientras que *Tenericutes* fue significativamente menos frecuente en el alimentado con oliva virgen.

**Conclusiones.** Estos resultados confirman el comportamiento diferente del aceite de oliva virgen frente a la mantequilla descrito por nosotros, adelantando su detección a mitad del experimento.

**P32. Levaduras probióticas: estudio de sus propiedades biotecnológicas.** P. Fernández-Pacheco<sup>1</sup>, M. Arévalo-Villena<sup>2</sup>, B. García-Béjar<sup>2</sup>, A. Briones<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Facultad de Bioquímica. <sup>2</sup>Facultad de Ciencias y Tecnologías Químicas. Universidad de Castilla-La Mancha, Ciudad Real.

**Introducción/Objetivos.** Un microorganismo debe presentar ciertas características de resistencia, supervivencia y adhesión celular para ser un probiótico. Sin embargo, existen propiedades biotecnológicas relacionadas con la salud y el bienestar del consumidor que son interesantes, por lo que el objetivo de este trabajo fue caracterizar levaduras de origen alimentario (10 *Saccharomyces* y 10 no-*Saccharomyces*), previamente seleccionadas por su potencial probiótico.

**Metodología.** Se evaluaron el metabolismo prebiótico (uso de melibiosa, trehalosa, celobiosa, rafinosa, xilano, pectina, beta-glucano, celulosa, e inulina como fuente de carbono); la asimilación de colesterol; las actividades enzimáticas esterasa, lipasa, proteasa y fosfohidrolasa; la actividad antioxidante (test DPPH y prueba de la catalasa); y sensibilidad a diferentes antimicóticos (Mycostatin®, Cyclochem®, Canesten® y Fluconazol®).

**Resultados.** Aquellas levaduras capaces de fermentar el mayor número de fuentes de carbono fueron *Hansiniopsis osmophila*, *Lachancea thermotolerans* y *Candida vini* en menos de 48 horas. Todas las cepas mostraron porcentajes de asimilación de colesterol elevados (78,5-88,9%). Las *Saccharomyces* presentaron prácticamente el mismo perfil enzimático, a diferencia de las no-*Saccharomyces* que presentaron resultados mejores con diferentes perfiles. Todas las cepas fueron catalasa positivo y eliminaron radicales libres, destacando a *S. cerevisiae* y *Pichia kudriavzevii*. En mayor o menor medida fueron sensibles a los antifúngicos comerciales.

**Conclusiones.** Todas las propiedades estudiadas son cepa dependiente. Las levaduras que destacaron en la mayoría de ellas eran de las especies *S. cerevisiae*, *H. osmophila* y *L. thermotolerans*. Teniendo en cuenta estos resultados, las levaduras podrían considerarse potenciales probióticos cuyo uso se puede diversificar en función de la aplicación buscada.

**P33. Propiedades probióticas *in vivo* de cepas de *Lactobacillus pentosus* aisladas de aceitunas de mesa.** A. Benítez Cabello<sup>1</sup>, E. Torres Maravilla<sup>2</sup>, L. Bemúdez Humarán<sup>2</sup>, P. Langella<sup>2</sup>, R. Martín<sup>2</sup>, R. Jiménez<sup>1</sup>, N. Arroyo López<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Instituto de la Grasa (CSIC). <sup>2</sup>Instituto Micalis (Francia).

**Introducción.** Las tendencias actuales se dirigen hacia la búsqueda de alimentos funcionales, que actúen de dos modos: proporcionando propiedades probióticas debido a sus características inherentes, o actuando como un transportador de microorganismos beneficiosos hacia el consumidor final. En este sentido, la aceituna de mesa supone una buena alternativa a estos alimentos reconocidos como saludables, presentando cepas de *Lactobacillus* formadores de biofilms con numerosas propiedades potencialmente probióticas. La regulación de la respuesta inmune supone un efecto beneficioso de los microorganismos probióticos, actuando en situaciones que requieren una respuesta antiinflamatoria para la prevención y/o tratamiento de enfermedades relacionadas con funciones inmunes anormales como alergias o desórdenes inflamatorios intestinales. El objetivo del trabajo fue confirmar el potencial probiótico de cepas de *Lactobacillus* previamente aisladas de la superficie de aceitunas de mesa, mediante la medida de sus propiedades inmunomoduladoras *in vitro*, y validar su efecto protector *in vivo* en un modelo murino con colitis crónica inducida.

**Metodología. Microorganismos:** Se utilizaron 13 cepas de la especie *L. pentosus* y 3 de *L. plantarum* previamente aisladas de biofilms de aceitunas de mesa procedente de diferentes tipos de procesados industriales. **Propiedades inmunomoduladoras:** Las propiedades antiinflamatorias se determinaron midiendo la capacidad de las mismas para suprimir la secreción de la citosina IL-8 por la línea celular humana HT-29, previamente estimulada con TNF- $\alpha$ . Por otro lado, se utilizó la línea celular murina RAW 264.7 para evaluar la capacidad de las cepas para regular la producción de la citosina proinflamatoria, IL-6 y la antiinflamatoria, IL-10. **Modelo murino:** Para el estudio *in vivo*, se utilizó el modelo murino C57BL, al cual se le indujo una colitis moderada mediante el uso de DNBS.

**Resultados y conclusión.** *L. pentosus* LPG1 presentó excelentes propiedades probióticas mostrando una perfecta regulación en la modulación de la producción de las citosinas pro y antiinflamatorias, buena capacidad para reducir la secreción de IL-8 por HT-29 y un destacable efecto protector en el modelo con colitis.

**P34. Efecto de los edulcorantes artificiales sobre la microbiota intestinal de diabéticos tipo 1 y 2.** J.A. Rufián Henares<sup>1</sup>, B. Navajas Porras<sup>1</sup>, A. Lerma<sup>2</sup>, D. Hinojosa Nogueira<sup>1</sup>, S. Pérez Burillo<sup>1</sup>, P. Francino Puget<sup>2</sup>, S. Pastoriza de la Cueva<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro de Investigación Biomédica (UGR). <sup>2</sup>Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (Fisabio).

**Introducción.** La alimentación es una pieza fundamental para mantener los niveles glucémicos en pacientes con diabetes tipo 1 y 2. En la actualidad hay muchos alimentos que contienen edulcorantes artificiales para mejorar el sabor de los mismos sin aportar calorías ni modificar el estatus glucémico de los humanos. Sin embargo, estudios recientes muestran que algunos edulcorantes pueden modificar la glucemia por modificación de la composición de la microbiota intestinal. De esta forma, el objetivo de esta comunicación es presentar el efecto que tienen distintos edulcorantes artificiales comerciales sobre la microbiota intestinal de pacientes con diabetes tipo 1 y 2.

**Métodos.** Se ha realizado una digestión *in vitro* de distintos edulcorantes artificiales y se han fermentado con las heces de pacientes con diabetes tipo 1 y 2. Posteriormente se han evaluado los cambios en la composición de la microbiota intestinal (mediante análisis metagenómico) y de su funcionalidad, mediante el análisis de la producción de ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico).

**Resultados.** Se ha observado que los edulcorantes artificiales modifican la composición de la microbiota intestinal en función de su composición química. Así mismo se ha observado que dicha modificación es distinta en función del tipo de diabetes que presente el paciente. Igualmente, la presencia de edulcorantes artificiales modifica el patrón de producción de ácidos grasos de cadena corta, lo que puede tener repercusiones sobre la respuesta inmune del paciente y por ello su salud.

**Conclusiones.** la técnica de digestión-fermentación *in vitro* permite estudiar de manera personalizada cómo cada tipo de edulcorante afecta a la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal de diabéticos tipo 1 y 2, lo que permitirá desarrollar programas de nutrición personalizada inteligente en el futuro cercano.

**P35. Efecto de la extracción (manual/bomba) y desnatado en el análisis dependiente de cultivo y metataxonómico de la leche humana.** C. Alba<sup>1</sup>, M. Rodríguez-Cruz<sup>2</sup>, M. Aparicio<sup>1</sup>, M.A. Checa<sup>3</sup>, L. Fernández<sup>4</sup>, J.M. Rodríguez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Dpto. Nutrición y Ciencia de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid. <sup>2</sup>Laboratorio de Nutrición Molecular, Departamento de Nutrición, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, México. <sup>3</sup>Centro de Salud Arrabal, Zaragoza, España. <sup>4</sup>Sección Departamental Tecnología de los Alimentos, Universidad Complutense de Madrid.

**Introducción.** La leche materna es un nicho ecológico para bacterias que posteriormente participarán cuantitativa y cualitativamente en la modulación de la microbiota intestinal de los niños lactantes. La aplicación de técnicas, tanto dependientes de cultivo como moleculares para determinar su microbiota parece sencilla en primera instancia, pero el procesamiento de la muestra, desde su recolección como el almacenamiento o incluso el método de análisis presenta dificultades debido a la falta de

protocolos estandarizados. El objetivo del presente estudio es caracterizar los efectos en la toma de muestra de leche materna por medio del uso de una bomba o extracción manual y el efecto de desnatar la leche para los estudios metataxonómicos.

**Metodología.** 27 mujeres fueron reclutadas (10 para el estudio del efecto de la extracción por bomba y manual y 17 para el efecto del desnatado). Se realizó el cultivo de las muestras en los medios CNA, MCK y SDC (37°C por 48 horas en aerobiosis) y MRS-Cys (37°C por 48 horas en anaerobiosis). Se realizó el conteo del crecimiento y, al menos un representante de cada morfología fue seleccionado. Se purificó su ADN y se realizó su identificación por secuenciación del gen *ADNr 16S* o por espectrometría de masas (MALDI-TOF). El ADN para los estudios taxonómicos fue extraído siguiendo el protocolo *QIAamp DNA Stool Mini Kit* (QIAGEN, Hilden, Alemania). Para los estudios metataxonómicos se secuenció la región V3-V4 usando el protocolo *Illumina MiSeq pair-end* (Illumina Inc., San Diego, CA, USA). Los análisis bioinformáticos se realizaron con Qiime2, RStudio y la base de datos SILVA.

**Resultados.** No se encontraron diferencias significativas dependiendo de la fracción de la leche ni en método de extracción de la muestra en la metataxonomía de las muestras.

**Conclusiones.** De manera global, nuestro estudio remarca las diferencias en la composición de los microorganismos entre mujeres demostrando una gran variedad interindividual. Siendo este el mayor factor de variación entre las muestras.

**P36. Explorando la presencia de la isla genómica PKS mediante anticuerpos específicos dirigidos a la maquinaria productora de colibactina.** R. Marcos Fernández<sup>1</sup>, A. Blanco Míguez<sup>1</sup>, L. Guadamuro García<sup>1</sup>, F. Fernández Riverola<sup>2</sup>, A. Lourenço<sup>2</sup>, A. Margolles Barros<sup>1</sup>, B. Sánchez García<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Bioquímica del Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Asturias. <sup>2</sup>Escuela Superior de Ingeniería Informática (ESEI), Universidad de Vigo, Ourense.

**Introducción/Objetivos.** *Escherichia coli* es una de los primeros colonizadores del intestino humano, normalmente las cepas pertenecientes a esta especie son comensales incluso algunas de ellas han sido seleccionadas como probióticos. Sin embargo, algunas cepas llevan consigo las llamadas islas de patogenicidad o diferentes elementos móviles que están asociados con enfermedades intra- y extra- intestinales. La isla genómica *pks* codifica la maquinaria necesaria para la síntesis de una genotoxina híbrida péptido-poliqúetido llamada colibactina. La colibactina induce roturas de doble cadena en el ADN, aberraciones cromosómicas y detección del ciclo celular. La cepa probiótica Nissle 1917, contiene la isla *pks* y produce una genotoxina funcional. Recientes estudios han encontrado la isla de patogenicidad en otros miembros de la familia *Enterobacteriaceae*, tales

como *Citrobacter*, *Klebsiella* y *Enterobacter*. El objetivo principal de este estudio fue realizar un análisis a gran escala para detectar cepas *pks+* de *E. coli* utilizando la citometría de flujo.

**Metodología.** Se evaluó el marcaje de cepas *pks+* (Nissle) y *pks-* (LMG2092) mediante citometría de flujo y microscopía de láser confocal. Además, microbiotas intestinales de donantes sanos fueron procesadas para detectar, enriquecer y eliminar cepas *pks+*. Las microbiotas fueron marcadas y separadas magnéticamente para obtener fracciones positivas y negativas.

**Resultados.** Los resultados muestran la capacidad del método para eliminar de una microbiota cepas *pks+* en un solo paso. La fracción positiva (enriquecida en *E. coli pks+*) fue sembrada y los aislados obtenidos fueron identificados mediante secuenciación del gen *ADNr 16S* y posteriormente la presencia de la isla *pks* se validó mediante análisis de PCR.

**Conclusiones.** Nuestro estudio muestra el potencial de la citometría de flujo para detectar cepas con características fenotípicas específicas en una microbiota compleja.

El estudio ha sido realizado gracias a la financiación del proyecto "Identificación de péptidos bioactivos contra el cáncer colorectal a partir de microbiomas intestinales". Referencia: AECC160016.

## MICROBIOLOGÍA 2

**P37. Aplicación de inteligencia artificial en el estudio de la microbiota intestinal asociada con obesidad mórbida.** N. Salazar Garzo<sup>1</sup>, I. Díaz<sup>2</sup>, T. Fernández Navarro<sup>3</sup>, C. Martínez Faedo<sup>4</sup>, M. Gueimonde Fernández<sup>1</sup>, C.G. De los Reyes-Gavilán<sup>1</sup>, S. González Solares<sup>5</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, IPLA-CSIC, Villaviciosa. Grupo Dieta, Microbiota y Salud (DIMISA-ISP), Oviedo. <sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Computación, Universidad de Oviedo, Oviedo. <sup>3</sup>Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, Oviedo. Grupo Dieta, Microbiota y Salud (DIMISA-ISP), Oviedo. <sup>4</sup>Servicio de Endocrinología, HUCA, SESPA, Oviedo. <sup>5</sup>Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo, Oviedo. Grupo Dieta, Microbiota y Salud (DIMISA-ISP), Oviedo.

**Introducción/Objetivo.** La obesidad representa una patología compleja y multifactorial con una elevada prevalencia a nivel mundial. Numerosos estudios han tratado de caracterizar la composición de la microbiota intestinal asociada a la obesidad. Sin embargo, los resultados no son concluyentes ni muestran información discriminatoria para los diferentes grados de obesidad.

**Sujetos y métodos.** Se estudió una muestra de 184 sujetos, clasificada en 5 categorías de IMC según la Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad. La composición de la microbiota intestinal se determinó por qPCR y la información dietética a

partir de un cuestionario de frecuencias de consumo validado. La influencia de las variables microbiológicas sobre la obesidad se calculó mediante técnicas de aprendizaje matemático. Tras el entrenamiento de diferentes métodos se seleccionó el árbol de decisión C4.5 tanto por su capacidad discriminadora como por la interpretabilidad de los datos obtenidos en el contexto de la obesidad.

**Resultados.** A través de árboles de decisión (con un porcentaje de acierto 95%, precisión 92% y cobertura 1), ha sido posible identificar al grupo *Bacteroides* como el grupo microbiano con mayor valor predictivo para obesidad mórbida en la muestra analizada. Niveles del grupo *Bacteroides* por encima de  $10,17 \log \text{ n}^\circ\text{cel/g}$  clasifican a los sujetos con un  $\text{IMC} > 40 \text{ kg/m}^2$ . Dichos sujetos presentaron también una mayor ingesta dietética de carnes y derivados (170,7 vs. 123,7 g/d) así como de huevos (24,4 vs. 17,6 g/d). Por el contrario, el consumo de ácidos grasos poliinsaturados fue menor que los sujetos pertenecientes al resto de categorías de IMC y no se observaron diferencias significativas en la ingesta energética.

**Conclusiones.** Hemos desarrollado la inteligencia artificial para la identificación de un nivel de referencia de microorganismos fecales, *Bacteroides*  $> 10,17 \log \text{ n}^\circ\text{cel/g}$  característico de los individuos con obesidad mórbida frente a individuos con menor valor de IMC.

**P38. Búsqueda de probióticos con potencial metabolizador de xenobióticos obesógenos.** A. López Moreno<sup>1</sup>, M. Aguilera<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Microbiología. <sup>2</sup>Facultad de Farmacia. Universidad de Granada, Granada.

**Introducción/Objetivos.** En la actualidad la exposición a contaminantes o xenobióticos ingeridos con la dieta en pequeñas cantidades (bisfenoles (BPA), ftalatos, benzofenonas, metales pesados), puede resultar en disbiosis microbianas asociadas con diabetes de tipo II, obesidad y otros desórdenes endocrinos. Estas disbiosis pueden ser prevenidas o intervenidas con la administración de probióticos, contribuyendo a regular el eje fisiológico hormonal. El **objetivo** es analizar el potencial modulador de diversas cepas probióticas en disbiosis de la microbiota por exposición a xenobióticos, determinando experimentalmente sus capacidades metabolizadoras.

**Metodología.** Los experimentos piloto se realizaron con varias concentraciones de exposición al xenobiótico obesógeno: BPA, para determinar la CMI, tolerancia y/o capacidad degradadora o adsorbente de cada cepa probiótica. Las medidas de BPA se han realizado con LC-MS (CIC-UGR).

**Resultados.** Se observan tasas de eliminación de BPA diferenciales en *Lactobacillus gasseri* (87,7%) y *Lactobacillus fermentum* (83,6%), ambas mayores al resto de cepas probióticas y no probióticas ensayadas. Cada bacteria presenta una tasa y velocidad de eliminación de BPA específica. Finalmente, todas las cepas utilizadas en el experimento eran capaces de eliminar

mayor porcentaje de BPA conforme disminuíamos la concentración del contaminante, mostrando diferentes adaptaciones bacterianas al mismo. Se observó además la capacidad diferencial de eliminación de BPA que presenta la microbiota de muestras fecales a altas concentraciones, pudiendo relacionarse con una mayor diversidad composicional microbiana. Además, determinadas muestras fecales eran capaces de eliminar más concentración de BPA (89,3%) que las bacterias probióticas individualmente, es decir, un consorcio de bacterias puede ser más efectivo en la eliminación de contaminantes de la dieta como el BPA.

**Conclusiones.** Se han encontrado probióticos con capacidades degradadoras diferenciales de BPA. Se necesita investigar exhaustivamente las bases moleculares, enzimas y rutas metabólicas involucradas en dichas capacidades.

**Palabras clave:** Probióticos, Xenobióticos, Obesógeno, Bisfenol A (BPA), Microbiota, Disbiosis

**P39. Yogur magnético, un nuevo suplemento contra la anemia.** V. Garcés<sup>1</sup>, A. González<sup>1</sup>, L. Sabio<sup>1</sup>, C.M. Sánchez Arévalo<sup>1</sup>, M. Olivares<sup>2</sup>, N. Gálvez<sup>1</sup>, J.M. Domínguez Vera<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento Química Inorgánica, Facultad de Ciencias, Universidad de Granada, Granada. <sup>2</sup>Departamento de Investigación de Biosearch S.A., Granada.

**Introducción y objetivo.** Algunas bacterias probióticas pueden servir como plataformas para la deposición de nanopartículas de maghemita (MNP,  $\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_3$ ). Dichas nanopartículas de óxido de hierro (III) son magnéticas, y su deposición se produce en los exopolisacáridos (EPS) del probiótico, adquiriendo por tanto propiedades magnéticas de una forma artificial. Estos probióticos cargados de MNP son capaces de superar el ambiente químico del estómago y alcanzar los intestinos. Por tanto, estos probióticos pueden servir como transportadores de nanopartículas de óxido de hierro que permitan la absorción de hierro en duodeno y paliar así la anemia por deficiencia de hierro (IDA). Por otro lado, el yogur es uno de los alimentos fermentados más valorado alrededor del mundo. El yogur es el resultado de la fermentación de la leche producida por bacterias probióticas como, *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus*. Hemos incorporado MNP a los probióticos genuinos del yogur. Además, la incorporación de MNP no afecta a la viabilidad de los probióticos, por lo que pueden fermentar leche y producir yogur: un yogur magnético. Nuestro objetivo es desarrollar un yogur magnético para el tratamiento de IDA.

**Metodología.** Tras la incorporación de MNP a un fermento constituido por *Streptococcus thermophilus* y *Lactobacillus acidophilus* (probióticos-MNP), hemos evaluado la capacidad fermentativa de probióticos-MNP para producir yogur.

**Resultados.** Hemos demostrado la deposición de MNP en los EPS de los dos probióticos del fermento, *Streptococcus ther-*

*mophilus* y *Lactobacillus acidophilus*. Asimismo, hemos demostrado que probióticos-MNP siguen manteniendo su capacidad fermentativa para producir yogur.

**Conclusiones.** Hemos desarrollado un yogur magnético que podría servir como suplemento de hierro para el tratamiento de IDA.

**P40. Lactobacilos y bifidobacterias probióticas capaces de metabolizar fitoestrógenos relacionados con el envejecimiento saludable.** J.L. Arqués Orobon, Á. Peirotén Herrero, P. Gaya Sicilia, S. Langa Marcano, J.M. Landete Irazo. *Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid.*

**Introducción.** Los fitoestrógenos (FT) (isoflavonas, lignanos y elagitaninos) son polifenoles presentes en soja, semillas de lino y granada entre otros alimentos de origen vegetal. Los FT tienen efecto estrogénico/antiestrogénico por su estructura similar a los estrógenos humanos. Los FT encontrados en los alimentos tienen baja biodisponibilidad y deben ser metabolizados por la microbiota intestinal en otros tales como equol, genisteína, enterolignanos y urolitinas, los cuales tienen efectos beneficiosos en la salud humana como: mejora de los síntomas de la menopausia, prevención de enfermedades cardiovasculares y disminución del riesgo de cáncer de mama.

**Metodología.** Estudiamos el metabolismo de FT de más de 200 cepas de bacterias lácticas y bifidobacterias con potencial probiótico y/o tecnológico. Los FT producidos en diferentes medios de cultivo y alimentos fueron detectados y cuantificados por HPLC-ESI/MS.

**Resultados.** Se identificaron cepas de lactobacilos y bifidobacterias productoras de isoflavonas bioactivas en leche de soja tales como daidzeína, genisteína, dihidrodaidzeína, O-desmetilangolesina y tetrahidrodaidzeína. Por otro lado, *Lactobacillus mucosae* INIA P508, *Lactobacillus salivarius* INIA P448, *Lb. salivarius* INIA P183, *Bifidobacterium bifidum* INIA P466, *Bifidobacterium catenulatum* INIA P732 y *Bifidobacterium pseudolongum* INIA P2 fueron capaces de producir enterolignanos a partir de semillas de lino. Además, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* INIA P815 produjo urolitinas A y B a partir de ácido elágico.

**Discusión.** Las isoflavonas bioactivas, enterolignanos y urolitinas pueden mejorar los síntomas relacionados con la menopausia, así como prevenir enfermedades relacionadas con el envejecimiento (cáncer y enfermedades cardiovasculares). La producción de FT bioactivos por la microbiota intestinal es altamente variable entre individuos. Así, el aseguramiento de la producción de estos metabolitos bioactivos por bacterias probióticas en el intestino en combinación con una alimentación rica en FT, podría aumentar los niveles de estos compuestos en sangre y producir efectos beneficiosos durante el envejecimiento.

**P41. Factores ambientales/antropométricos asociados a la producción microbiana intestinal de ácidos grasos de cadena corta ramificados.** D. Ríos-Covián<sup>1</sup>, S. González-Solares<sup>2</sup>, A. Nogacka<sup>1</sup>, S. Arboleya<sup>1</sup>, N. Salazar<sup>1</sup>, M. Gueimonde<sup>1</sup>, C.G. de los Reyes-Gavilán<sup>1</sup>. <sup>1</sup>IPLA-CSIC. <sup>2</sup>Universidad de Oviedo.

**Introducción/Objetivos.** Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) son el principal producto del catabolismo bacteriano de carbohidratos y proteínas en el colon, y juegan un papel esencial en las interacciones microbiota-hospedador. Los ácidos acético, propiónico y butírico son los mayoritarios y están siendo objeto de numerosos estudios. Sin embargo, los niveles de ácidos grasos de cadena corta ramificados (AGCC-R), principalmente los ácidos isovalérico e isobutírico, son considerablemente menores, siendo muy escaso hasta ahora el conocimiento sobre las variaciones en diferentes grupos humanos, microorganismos intestinales capaces de sintetizarlos y su influencia en la salud. Los AGCC-R se han propuesto como marcadores de fermentación proteica en el colon, tradicionalmente asociados a la producción de otros productos perjudiciales y por lo tanto considerados como dañinos para el epitelio colónico. En este contexto, el objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la producción de AGCC-R por la microbiota intestinal en función del índice de masa corporal (IMC), la edad y la dieta.

**Metodología.** Se analizaron los niveles de AGCC y AGCC-R fecales mediante cromatografía de gases en 232 individuos sanos, con edades comprendidas entre los 3 meses y los 95 años, y con IMC en los adultos entre 19 y 54 kg/m<sup>2</sup>. Los datos nutricionales en adultos se obtuvieron a través de un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos.

**Resultados.** Los niveles de AGCC-R en heces mostraron una fuerte asociación positiva con la edad mientras que no se evidenció una relación clara con el IMC. El consumo de fibra dietética insoluble se correlacionó negativamente con los niveles fecales de AGCC-R.

**Conclusión.** Es posible modular los niveles intestinales de AGCC-R a través de la dieta. Se precisan más estudios para aumentar nuestro conocimiento de la relación entre la producción de AGCC y AGCC-R con la composición de la microbiota intestinal y la salud humana.

**P42. Supervivencia de *Akkermansia muciniphila* en monocitos humanos.** A. Peña-Cearra<sup>1</sup>, M.Á. Pascual-Itoiz<sup>2</sup>, T. Gutiérrez<sup>2</sup>, A. Pellón<sup>2</sup>, E. Atondo<sup>2</sup>, A. Palacios<sup>2</sup>, D. Barriales<sup>2</sup>, J. Castelo<sup>2</sup>, H. Rodríguez<sup>2</sup>, J. Anguita<sup>3</sup>, L. Abecia<sup>4</sup>. <sup>1</sup>Inflammation and Macrophage plasticity Laboratory, CIC bioGUNE, Derio. Universidad del País Vasco UPV-EHU, Leioa. <sup>2</sup>Inflammation and Macrophage plasticity Laboratory, CIC bioGUNE, Derio. <sup>3</sup>Inflammation and Macrophage plasticity Laboratory, CIC bioGUNE, Derio. IKERBAS-

QUE, Basque Foundation for Science, Bilbao. <sup>4</sup>Inflammation and Macrophage plasticity Laboratory, CIC bioGUNE, Derio. Departamento de Inmunología, Microbiología y Parasitología, Universidad del País Vasco UPV/EHU, Leioa.

La presencia de *Akkermansia muciniphila* (*A.m*) en el tracto digestivo se ha detectado tras el nacimiento, permaneciendo a lo largo de la vida asociado a distintas facetas de la salud gastrointestinal. Esta bacteria gram negativa reside en la capa mucosa del colon donde se encarga del mantenimiento de la integridad intestinal. Sin embargo, también se ha detectado en otras localizaciones como la leche, cavidad oral, páncreas, o sistema biliar, donde puede ejercer otras funciones desconocidas. El objetivo de este trabajo es estudiar si *A.m* es capaz de sobrevivir dentro de células del sistema inmune. Para ello, se aislaron células mononucleares de sangre periférica procedentes de donantes sanos y se seleccionaron los monocitos CD14<sup>+</sup> mediante MACS. Las células seleccionadas se incubaron con *A.m* durante 1 hora para su fagocitosis. Tras ello, se eliminaron las bacterias extracelulares añadiendo a la placa antibiótico durante otra hora. A partir de este punto, se tomaron muestras a distintos tiempos hasta 24 horas para determinar la eficacia del antibiótico y cuantificar las bacterias intracelulares. A las 24 h también se tomaron muestras del sobrenadante para medir la producción de TNF. *A.m* sobrevivió dentro de los monocitos al menos 24 horas. Además, un estímulo previo con la bacteria, aumentó su capacidad de supervivencia en macrófagos derivados de médula ósea de ratón y disminuyó la producción de TNF. En conclusión, *A.m* es capaz de sobrevivir en monocitos humanos, aumentando esta capacidad tras un contacto previo. Por tanto, existe la posibilidad de que estas células sean capaces de ejercer como vehículo de *A.m* para su traslocación. Estos resultados indican además que la co-evolución de la microbiota y el sistema inmune innato ha generado mecanismos de inmunidad entrenada o tolerancia en macrófagos permitiendo el incremento de la supervivencia de especies beneficiosas como *A.m* así como la disminución de la señalización pro-inflamatoria.

**P43. Regulación de miRNAs en células dendríticas por vesículas extracelulares de microbiota.** N. Díaz, M. Riera, R. Giménez, J. Badía, L. Baldomá. *Departament de Bioquímica i Fisiologia, Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Universitat de Barcelona.*

**Introducción/Objetivo.** Las vesículas de membrana (MVs) liberadas por microbiota son agentes relevantes en la comunicación con el hospedador. Las células dendríticas (DCs) en la lámina propia reconocen los microorganismos presentes en el lumen intestinal y dirigen las respuestas inmunes adecuadas. Son por tanto actores clave en la inmunidad y preservación de la homeostasis intestinal. Los miRNAs son reguladores pos-

transcripcionales de diversos procesos celulares. El objetivo de este estudio fue analizar la regulación de miRNAs en DCs por estimulación con MVs de *E. coli* probióticas y comensales.

**Metodología.** Se aislaron las MVs del probiótico *E. coli* Nissle 1917 (EcN) y de la cepa comensal ECOR12. Se utilizó un modelo inmune de monocitos CD14<sup>+</sup> aislados de residuos leucocitarios de donantes sanos que fueron diferenciados a DCs inmaduras por 7 días y luego incubados con MVs por 24 h. Una vez aislado el RNA se comprobó su concentración y calidad. La expresión de miRNAs fue analizada por RNA-seq y la validación de miRNAs seleccionados confirmada por RT-qPCR.

**Resultados.** Se identificaron miRNAs regulados (*up-* o *down*) por las MVs de estas cepas (log2fold-change > 0,7, padj < 0,001): 74 miRNAs regulados por MVs de EcN y 72 por MVs de ECOR12. Entre ellos, 49 miRNAs estaban activados por MVs de ECOR12 y 23 por MVs de EcN. Se seleccionaron para su validación por RT-qPCR dos miRNAs activados por EcN (mir-29a-5p y mir-33a-3p), tres activados por ECOR12 (mir-146b-5p, mir-24-3p y mir-125b-5p) y tres miRNAs comunes para las MVs de ambas cepas (mir-155-5p, mir-146a-5p y mir-let7i-3p). Además, se validó la expresión de mRNAs diana inmunológicamente relevantes como: TRAF-4 e IL-12 (mir-29a-5p), TRAF-6 y TLR-4 (mir-146b-5p), CD180 e INF- $\gamma$  (mir-24-3p), y SHIP-1 y SOCS-1 (mir-155-5p).

**Conclusión.** La expresión de miRNAs en DCs es regulada por vesículas secretadas por microbiota de manera específica según la cepa.

**P44. Efecto de aditivos conservantes sobre la microbiota intestinal.** J.A. Rufián Henares<sup>1</sup>, B. Navajas Porras<sup>1</sup>, A. Lerma<sup>2</sup>, D. Hinojosa Nogueira<sup>1</sup>, S. Pérez Burillo<sup>1</sup>, P. Francino Puget<sup>2</sup>, S. Pastoriza de la Cueva<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro de Investigación Biomédica (UGR). <sup>2</sup>Fundación para el Fomento de la Investigación Sanitaria y Biomédica de la Comunitat Valenciana (Fisabio).

**Introducción.** Desde la revolución industrial cada vez disponemos de más tipos de alimentos a lo largo de todo el año. Esto es debido a la aplicación de técnicas de conservación por calor, así como a la utilización de aditivos conservadores. Aunque estos aditivos se utilizan para incrementar la vida útil de los alimentos y evitar el desarrollo de microorganismos patógenos, se desconoce el efecto que pueden tener los mismos sobre la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal. Por ello, el objetivo de esta comunicación es presentar el efecto que tienen distintos aditivos conservadores sobre la microbiota intestinal de adultos.

**Métodos.** Se ha realizado una digestión *in vitro* de distintos conservadores y se han fermentado con las heces de adultos sanos y diabéticos tipo 1 y 2. Posteriormente se han evaluado los cambios en la composición de la microbiota intestinal (mediante análisis metagenómico) y de su funcionalidad, mediante el aná-

lisis de la producción de ácidos grasos de cadena corta (acético, propiónico y butírico).

**Resultados.** Se ha observado que algunos conservadores modifican la composición de la microbiota intestinal, dependiendo de su estructura química. Asimismo, se ha observado que dicha modificación es distinta en adultos sanos que en pacientes diabéticos. Finalmente, la presencia de aditivos conservantes modifica el patrón de producción de ácidos grasos de cadena corta, lo que puede tener un impacto a largo plazo en la respuesta inmune de los humanos.

**Conclusiones.** La técnica de digestión-fermentación *in vitro* permite estudiar de manera personalizada cómo cada tipo de aditivo conservador afecta a la composición y funcionalidad de la microbiota intestinal. De esta forma se podrán diseñar en el futuro alimentos diseñados específicamente atendiendo a la composición de la microbiota.

**P45. Proyecto ProInfant-CYTED: selección de una cepa con potencial probiótico dirigida a niños con malnutrición.** P. Ruas-Madiedo<sup>1</sup>, R. Aznar<sup>2</sup>, D. Luaces<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Grupo Funcionalidad y Ecología de Microorganismos Beneficiosos (Micro-Health), Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias - Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC) Villaviciosa, Asturias. <sup>2</sup>Departamento de Microbiología y Ecología, Colección Española de Cultivos tipo (CECT), Universitat de València, Valencia.

**Introducción/Objetivos.** El proyecto ProInfant-CYTED, formado por un consorcio de siete países iberoamericanos, tiene como objetivo el desarrollo de alimentos funcionales utilizando vegetales nativos, obtenidos de manera sostenible, que contengan probióticos seleccionados entre los presentes en la microbiota de productos fermentados tradicionales. En esta comunicación mostramos los criterios de selección racional del candidato probiótico para ser evaluado en un estudio de intervención con niños malnutridos en Guatemala en 2020.

**Metodología.** Se han incluido en el estudio 8 cepas (7 *Lactobacillus plantarum* y 1 *Lactobacillus rhamnosus*), aisladas de alimentos andinos fermentados, y 2 probióticos de referencia (*L. plantarum* 299V y *L. rhamnosus* GG). Todas ellas se sometieron a una digestión gastrointestinal secuencial simulada (protocolo Infogest), y se evaluó su adhesión al epitelio intestinal (línea HT29) y su capacidad para inhibir la adhesión de *Escherichia coli* O157:H7 (CECT 4267).

**Resultados.** Tras el desafío oral y gástrico la supervivencia de las cepas en un alimento (bebida de maíz, soja y leche) fue superior al 10%; después del reto duodenal e intestinal la viabilidad disminuyó entorno al 1% (más de 7 log ufc/ml viables) siendo las cepas de *L. rhamnosus* las más sensibles (< 0,5%). Tres cepas de *L. plantarum* presentaron una adherencia a HT29 significativamente mayor que la cepa probiótica *L. plantarum* 299V (DSM 9843) y, además, inhibieron la adhesión de *E. coli*

O157:H7 en mayor o igual medida que la cepa de referencia 299V. Finalmente, se valoró su aptitud tecnológica en la empresa ADM-Biopolis S.L. resultando seleccionada la cepa *L. plantarum* CECT 9435.

**Conclusiones/Agradecimientos.** La combinación de criterios microbiológicos y de aptitud tecnológica ha permitido seleccionar la cepa para el estudio de intervención con niños malnutridos. El proyecto ProInfant está financiado por el programa CYTED (917PTE0537) y en España por MINECO (PCIN2017-003 y PCIN2017-075). Se agradece a la empresa ADM-Biopolis S.L. la producción de la cepa para el estudio de intervención.

**P46. Celulosa bacteriana. Influencia de la presencia de bacterias en la textura.** L. Sabio, A. González, V. Garcés, C. Hurtado, G.B. Ramírez-Rodríguez, N. Gálvez, J.M. Delgado-López, J. M. Domínguez-Vera. Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Ciencias. Instituto de Biotecnología. Universidad de Granada. Granada.

**Introducción/Objetivos.** La celulosa es un polímero producido principalmente por las plantas, pero también por ciertas bacterias, como *Acetobacter xylinum*. Ambas celulosas, bacteriana (BC) y vegetal, son inertes químicamente e insolubles, pero la BC tiene la ventaja de ser ultrapura, cristalina y libre de componentes de menor interés, como hemicelulosa y pectinas. Esto hace a la BC totalmente biocompatible y perfecta para su aplicación en el campo de la biomedicina. Actualmente, la explotación comercial de la BC se centra en vendajes o apósitos debido a su gran capacidad de absorción del exudado y a que permite una adecuada regeneración del tejido. En la celulosa, las unidades de D-glucopiranososa se unen para formar cadenas lineales, que se empaquetan mediante puentes de hidrógeno inter- e intramoleculares. Esto resulta en regiones desordenadas (amorfas) y regiones muy ordenadas (cristalinas). Los cambios en la cristalinidad se relacionan con las condiciones de cultivo, tratamientos para eliminar la bacteria y los métodos de secado (como la liofilización). Sin embargo, la cristalinidad se ha estudiado tras diferentes tratamientos (inmersión en etanol, agua hirviendo, lavados de NaOH a 90°C, y neutralización), lo que puede modificar la estructura inicial donde se encuentra la bacteria. El objetivo de este trabajo es estudiar cómo afecta la presencia de *Acetobacter* en la textura de la BC.

**Metodología.** Se cultiva *Acetobacter* en condiciones estáticas/dinámicas (30°C, aerobia) hasta obtener la celulosa con el grosor deseado. Posteriormente se elimina la bacteria productora y se analiza por difracción de rayos X y microscopía electrónica de barrido, tanto en presencia como en ausencia de bacteria.

**Resultados.** Hemos demostrado que la BC adquiere textura. Los patrones de rayos X confirman una orientación en muestras donde la bacteria ha sido eliminada.

**Conclusiones.** Hemos demostrado que la bacteria tiene influencia en la textura de la BC.

**Bibliografía.** 1) Portela R, Leal CR, Almeida PL, Sobral RG. Bacterial cellulose: a versatile biopolymer for wound dressing applications. *Microb Biotechnol.* 2019; 12: 586-610.

**P47. Diferentes factores perinatales afectan a la carga del gen de resistencia, *BlaSHV*, en niños prematuros.** S. Saturio<sup>1</sup>, M. Suárez<sup>2</sup>, N. Fernández<sup>2</sup>, D. Konstantinou<sup>3</sup>, M. Skouroliakou<sup>3</sup>, G. Solís<sup>2</sup>, S. Arboleya<sup>1</sup>, M. Gueimonde<sup>1</sup>. <sup>1</sup>*Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA-CSIC), Villaviciosa, Asturias.* <sup>2</sup>*Hospital Universitario de Asturias (HUCA-SESPA), Oviedo, Asturias.* <sup>3</sup>*IASO Maternity Hospital, Atenas, Grecia.*

**Introducción.** El establecimiento de la microbiota intestinal (MI) se ve comprometido en niños prematuros y muestra elevados niveles de enterobacterias y patógenos potenciales. Hoy en día, existe una gran problemática con las resistencias a antibióticos y aún se desconoce cómo el resistoma intestinal se establece desde edades tempranas. Por ello, el objetivo de este estudio fue cuantificar la presencia del gen de resistencia (GR) a betalactámicos, *BlaSHV*, en niños prematuros y el efecto de diferentes factores perinatales: edad gestacional, profilaxis antimicrobiana intraparto (PAI) y nutrición parenteral.

**Métodos.** Se estudiaron dos cohortes de prematuros en Asturias y Grecia. En una se incluyeron 42 neonatos (33-36 semanas de gestación) y 27 prematuros extremos.

**Resultados.** Se observaron concentraciones crecientes del gen *BlaSHV* a lo largo del tiempo. En la cohorte de Asturias, no se encontraron diferencias significativas debidas a la edad gestacional. La exposición a PAI condujo a niveles significativamente mayores de *BlaSHV* en prematuros extremos. Respecto a los niños con nutrición parenteral, se observó que la fórmula enriquecida en antioxidantes indujo una mayor concentración del gen en estudio.

**Conclusión.** Estos resultados revelaron que diferentes factores perinatales, exposición a antibióticos o nutrición parenteral, pueden afectar a la carga de GR a antibióticos en la MI de prematuros. Serían necesarios más estudios para ahondar en el impacto de dichas prácticas y elaborar estrategias de modulación de la MI, destinadas a la reducción de los GR a antibióticos en la MI neonatal.

**P48. Estudio de la capacidad de adhesión *in vitro* de levaduras con potencial probiótico.** P. Fernández-Pacheco<sup>1</sup>, M. Arévalo-Villena<sup>1</sup>, C. Pintado Losa<sup>2</sup>, B. García-Béjar<sup>1</sup>, A. Briones<sup>1</sup>. <sup>1</sup>*Universidad de Castilla-La Mancha, Laboratorio de Biotecnología de Levaduras. Ciudad Real, España.* <sup>2</sup>*Universidad de Castilla-La Mancha, Área de Bioquímica y Biología molecular. Toledo, España.*

**Introducción/Objetivos.** Actualmente existe una única cepa de levadura comercializada y reconocida como probiótico para humanos. Una de las propiedades dentro de los procesos de selección es la capacidad de adhesión a las membranas epiteliales. El presente trabajo parte de 20 levaduras, *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* previamente seleccionadas por otras aptitudes probióticas, y su objetivo es conocer la capacidad de formación de biopelículas y de adhesión a células Caco 2 antes y después del paso por el tracto gastrointestinal.

**Metodología.** La formación de biopelículas se estudió mediante recuento de células viables adheridas a una lámina de vidrio en caldo YPD y liberadas tras un proceso de sonicación antes y después de su paso por el tracto gastrointestinal (boca, estómago, intestino). La monocapa levaduriforme originada sobre células Caco 2 se evaluó mediante tinción y observación al microscopio y recuento de viables tras la incubación en condiciones fisiológicas.

**Resultados.** En general la capacidad de adhesión fue mayor tras el paso por el tracto gastrointestinal. La formación de biopelículas fue similar entre *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* (valores medios de 4,3 log ufc/cm<sup>2</sup>). No ocurrió lo mismo en la adhesión a las células epiteliales, donde el porcentaje fue muy variado (entre 26,8 y 78,4%). Los mejores resultados los presentaron una cepa de *S. cerevisiae*, *Lachancea thermotolerans* y *Candida vini*. La levadura probiótica comercial, utilizada como control, mostró el porcentaje de adhesión más bajo.

**Conclusiones.** Se encontró una alta correlación entre la formación de biopelículas y la capacidad de fijación a células Caco 2, lo que podría extrapolarse a una buena adhesión a la mucosa intestinal. Estos resultados, junto con los obtenidos en trabajos anteriores, permiten la selección de levaduras con prometedor potencial probiótico.

# MÁSTER EN MICROBIOTA, PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS

Adquirirás los conocimientos más actuales sobre el mundo de la microbiota y su utilización en probióticos y prebióticos, desde un punto de vista multidisciplinar

QUESTION EVERYTHING

 **Universidad  
Europea**



Online  
SEMIPRESENCIAL

- Máster sobre el mundo del microbioma humano y sus aplicaciones en Medicina.
- Con el aval de la Sociedad Española de Microbiota, Probióticos y Prebióticos (SEMIPyP), organización científica dedicada al fomento y difusión del conocimiento científico y la investigación sobre la microbiota de las regiones corporales y su impacto en la salud.
- Formato online con orientación multidisciplinar.
- Posibilidad de prácticas en centro adscritos especializados tanto investigadores como clínicos.
- Posibilidad de participar en proyectos de investigación.

<b>Dirigido a:</b>	Licenciados/Graduados en Medicina, Farmacia, Nutrición, Veterinaria, Enfermería, Biología u otra carrera de la rama biosanitaria.
<b>Duración:</b>	12 meses
<b>Modalidad:</b>	Online/ Semipresencial
<b>Idioma:</b>	Español
<b>Nº de ECTS:</b>	60. Estructurados en 2 semestres
<b>Campus:</b>	Online Universidad Europea de Madrid

••• Descuento a los socios de SEMIPyP y SIAMPyP •••

ESCUELA DE POSGRADO. UNIVERSIDAD EUROPEA DE MADRID  
SOCIEDAD ESPAÑOLA DE MICROBIOTA, PROBIÓTICOS Y PREBIÓTICOS (SEMIPyP)



(+34) 918 340 192



[universidadeuropea.es](http://universidadeuropea.es)



[ueonline@universidadeuropea.es](mailto:ueonline@universidadeuropea.es)



**Vivomixx**<sup>®</sup>  
Food Supplement

# ¿Nuestro secreto?

Tenemos la  
combinación perfecta



**Vivomixx**<sup>®</sup>, una fórmula probiótica que combina **aval científico, seguridad, calidad y eficacia.**<sup>1-3</sup>



**60 ESTUDIOS CLÍNICOS**



**8 CEPAS BACTERIANAS**



**ALTA CONCENTRACIÓN**

Más información en: [www.vivomixx.es](http://www.vivomixx.es)

Vivomixx<sup>®</sup> es un complemento alimenticio, no debe utilizarse como sustituto de una dieta variada y equilibrada y un estilo de vida saludable. Información dirigida exclusivamente a profesionales sanitarios.

**Referencias:** **1.** Gionchetti P, et al. Gastroenterology. 2000; 119(2):305-9. **2.** Guandalini S, et al. JPGN. 2010; 51(1):24-30. **3.** Mardini HE, et al. Inflamm Bowel Dis. 2014; 20(9):1562-7.



**GRIFOLS**