



FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

## **GRADO EN MEDICINA**

### **TRABAJO FIN DE GRADO**

**Microorganismos como medicamentos, ¿Podemos  
gestionar la microbiota?**

Microorganisms as drugs, can we manage the  
microbiota?

**Autor: D. Pablo Martínez Blanco**

**Directora: D<sup>a</sup>. Mónica Tramullas Fernández**

**Santander, junio 2020**

ÍNDICE:

Resumen/Abstract.....	2
Capítulos.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.1. ¿Qué es la microbiota humana?.....	3
1.2. Microbiota “normal”.....	3
2. PAPEL DE LA MICROBIOTA EN LA SALUD Y EN LA ENFERMEDAD.....	7
2.1. Microbiota intestinal. ....	7
2.1.1. Homeostasis metabólica. ....	7
2.1.2. Homeostasis inmunológica.....	8
2.1.3. Función protectora.....	12
2.1.4. Homeostasis intestinal y función cognitiva.....	12
2.2. Otras localizaciones de la microbiota.....	16
2.2.1. Microbiota de la cavidad oral.....	16
2.2.2. Microbiota de la piel.....	17
2.2.3. Microbiota del pulmón.....	17
2.2.4. Microbiota genitourinaria.....	18
3. ¿CÓMO PODEMOS MODIFICAR LA MICROBIOTA?.....	18
3.1. Probióticos.....	19
3.1.1. Adhesión mucosa intestinal.....	19
3.1.2. Efecto inmunomodulador.....	20
3.1.3. Efecto protector frente a patógenos bacterianos.....	21
3.2. Prebióticos.....	23
3.3. Trasplante fecal.....	26
3.3.1. El donante.....	26
3.3.2. El receptor.....	27
3.3.3. Ejecución del trasplante fecal.....	28
3.4. Simbióticos.....	29
3.5. Postbióticos.....	29
3.5.1. Bacterias inactivadas por calor.....	30
3.5.2. Componentes de la pared bacteriana.....	31
3.5.3. Exopolisacáridos.....	31
3.5.4. Sobrenadantes y factores solubles procedentes de las células microbianas..	32
4. ENFERMEDADES EN CUYA PATOGENIA SUBYACE UNA DISBIOSIS.....	33
4.1. Diarrea.....	33
4.2. Enfermedad inflamatoria intestinal.....	36
4.3. Cáncer colorrectal.....	43
4.4. Autismo.....	49
4.5. Depresión.....	50
4.6. Ansiedad.....	52
5. GARANTIAS DE LOS PROBIÓTICOS ¿SE NECESITA MÁS REGULACIÓN?.....	53
6. CONCLUSIONES.....	54
BIBLIOGRAFÍA.....	55
Agradecimientos.....	73

## Resumen

La microbiota coloniza gran parte del cuerpo humano, donde desempeña diferentes acciones que se traducen en la regulación homeostática metabólica e inmunológica y en la protección frente a la colonización por otros microorganismos con potencial patogénico. La presencia de una microbiota sana se basa en una adecuada proporción de diferentes poblaciones de microorganismos (bacterias, hongos, virus...) que realizan funciones microbiológicas beneficiosas para el individuo de forma mantenida en el tiempo. La disbiosis que se produce por alteraciones en este equilibrio microbiológico propicia la aparición o son la causa directa de diferentes procesos patológicos.

El objetivo de este trabajo es describir a través de una revisión bibliográfica centrada en los últimos diez años, a) la composición habitual de la microbiota y las funciones que esta realiza a nivel del organismo; b), la disbiosis subyacente en la patogenia de enfermedades como la enfermedad inflamatoria intestinal, el cáncer de colon, la diarrea asociada a fármacos, el autismo, la depresión y ansiedad; c) las diferentes técnicas de modificación de la microbiota a través de prebióticos, probióticos, postbióticos y del trasplante fecal con el fin último de revertir esta disbiosis, resolver el cuadro patológico y/o disminuir la clínica, y d) proponer la modulación de la microbiota como una alternativa terapéutica de patologías en las que subyace una disbiosis.

**Palabras clave:** Microbiota, disbiosis, prebióticos, probióticos, postbióticos, trasplante fecal.

## Abstract

The microbiota colonizes most of the human body, where they perform different actions that translate into metabolic and immunological homeostatic regulation and protection against colonization by other pathogenic microorganisms. The presence of a healthy microbiota is based on an adequate proportion of different populations of microorganisms (bacteria, fungi, viruses ...) that perform beneficial microbiological functions for the individual in a sustained manner over time. Dysbiosis caused by alterations in this microbiological balance favors the appearance or are the direct cause of different pathological processes.

This study aims to describe, through a bibliographic review of the last ten years, a) the habitual composition of the microbiota and its functions at the organism; b) the dysbiosis as the underlying mechanism in the pathogenesis of diseases such as inflammatory bowel disease, colon cancer, drug-associated diarrhea, autism, depression and anxiety; c) the different microbiota modification techniques such as the use of prebiotics, probiotics, postbiotics and fecal microbiota transplantation with the aim to reverse the dysbiosis, resolve the clinical presentation or decrease the symptoms and d) to suggest the microbiota modulation as therapeutic target in pathologies that present with dysbiosis.

**Key words:** Microbiota, dysbiosis, prebiotics, probiotics, prebiotics, fecal microbiota transplantation.

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. ¿Qué es la microbiota humana?

Microbiota significa conjunto de microorganismos que residen en un entorno. Por tanto, se podría definir la microbiota humana como el conjunto de microorganismos (bacterias, hongos, parásitos y virus), que residen en el cuerpo humano. Estos microorganismos colonizan las zonas expuestas (no estériles) de nuestro organismo, pudiendo hablar así de microbiota intestinal, microbiota bucal, microbiota de la piel, microbiota de la vía respiratoria y microbiota de tracto genitourinario según su localización. Característicamente esta microbiota será muy diversa según su entorno, encontrando en un mismo individuo poblaciones muy diferentes de microorganismos dibujándose así un mapa geográfico en cada individuo (1).

Si tomamos a un individuo humano como un conjunto de células destaca la relación que se establece entre el número de microorganismos existente por célula humana. Hablamos de una ratio que se estima aproximadamente de 1:10 según los últimos estudios. Por tanto, las características y posibles variaciones de estas poblaciones de microorganismos repercutirán de forma clara en el funcionamiento y desarrollo fisiológico y fisiopatológico humano (2).

La colonización del ser humano por estos microorganismos se inicia nada más producirse el nacimiento. En los recién nacidos la microbiota será muy homogénea independientemente de su localización y estará constituida por poblaciones abundantes en la flora vaginal materna como son *Lactobacillus* y *Prevotella spp* que se adquieren a través del canal de parto. Si el nacimiento se produce mediante cesárea, la colonización se llevará a cabo por la flora de la piel materna siendo predominantes los macroorganismos tipo *Staphylococcus spp*. Durante los tres primeros años se produce la diferenciación entre las distintas poblaciones que conforman la microbiota según su localización. A los 2-3 años los individuos ya presentan nichos diferenciados y de composición muy parecida a la que se encuentra en los adultos (3,4).

Destaca la gran variabilidad genómica que encontramos entre las poblaciones analizadas entre los mismos individuos. Mientras que la variabilidad genómica entre individuos humanos se encuentra alrededor del 0,1 %, sorprende que la variabilidad genómica de los microorganismos que conforman su microbiota sea superior al 90%. Esta variabilidad tan elevada se ve reflejada en los diferentes fenotipos encontrados entre individuos. Además, debemos tener en cuenta la gran cantidad de factores externos, que provocan cambios en la diferenciación temporal y espacial observada entre individuos, como son: el medio ambiente, el tipo de dieta, la ubicación geográfica, fármacos habituales, hábitos culturales e incluso el patrón del sueño. Destaca que otros factores intrínsecos como el sexo biológico, no tienen tanto efecto en la modificación de las poblaciones bacterianas (5).

### 1.2. Microbiota “normal”.

Se define microbiota normal o microbiota sana, al conjunto de microorganismos específicos que se encuentran en personas sanas. La gran variabilidad observada entre los diferentes taxones que conforman la microbiota en individuos sanos hace imposible determinar una microbiota específica del individuo sano, existiendo infinidad de posibilidades en la variabilidad de los filos y taxones bacterianos encontrados en individuos sanos. Es por eso que surge el concepto de “núcleo funcional saludable”, que

se refiere, al conjunto de microorganismos de un individuo sano que desempeñan las funciones microbiológicas beneficiosas que ejerce la microbiota, aunque sean ejecutadas por distribuciones proporcionalmente diferentes entre individuos y cuyas acciones beneficiosas se mantienen en el tiempo (6).

Las diferencias entre la microbiota que coloniza personas sanas y personas con enfermedades establece la posibilidad de que las variaciones en el tipo de poblaciones microbiológicas puedan influir en el desarrollo y perpetuación de la enfermedad (7). Por eso es interesante definir lo que sería un estado normal de la microbiota y compararlo frente a la disbiosis que sería el desequilibrio bacteriano en el que aumenta la proporción de especies habitualmente minoritarias y que puede asociarse con patologías (7).

La composición de una microbiota “normal” ha podido ser determinada gracias al avance en las técnicas de identificación molecular. Anteriormente se realizaba el cultivo de los microorganismos que se encontraban en la luz intestinal, que no resultó muy rentable ya que la mayoría de estos eran microorganismos anaerobios que son de difícil determinación mediante las herramientas de cultivo. Gracias a las técnicas de secuenciación del ADN y a la hibridación in situ con fluorescencia (FISH) que identifica ARN ribosómico, se han podido identificar las diferentes poblaciones que conforman la microbiota intestinal (8). La técnica de FISH consiste en el análisis del ARN bacteriano presente en los ribosomas de la bacteria. Algunas de las regiones del ARN ribosómico son específicas de la cepa, otras son universales para grupos, dominios o incluso reinos. Se producen así oligonucleótidos de forma sintética que son complementarios a las secuencias de interés y se marcan con fluoróforos. Estos oligonucleótidos sintéticos, llamados sondas, se ponen en contacto con las muestras y se hibridan con el ARN de los ribosomas bacterianos permitiendo identificar las diferentes poblaciones de microorganismos (7,8).

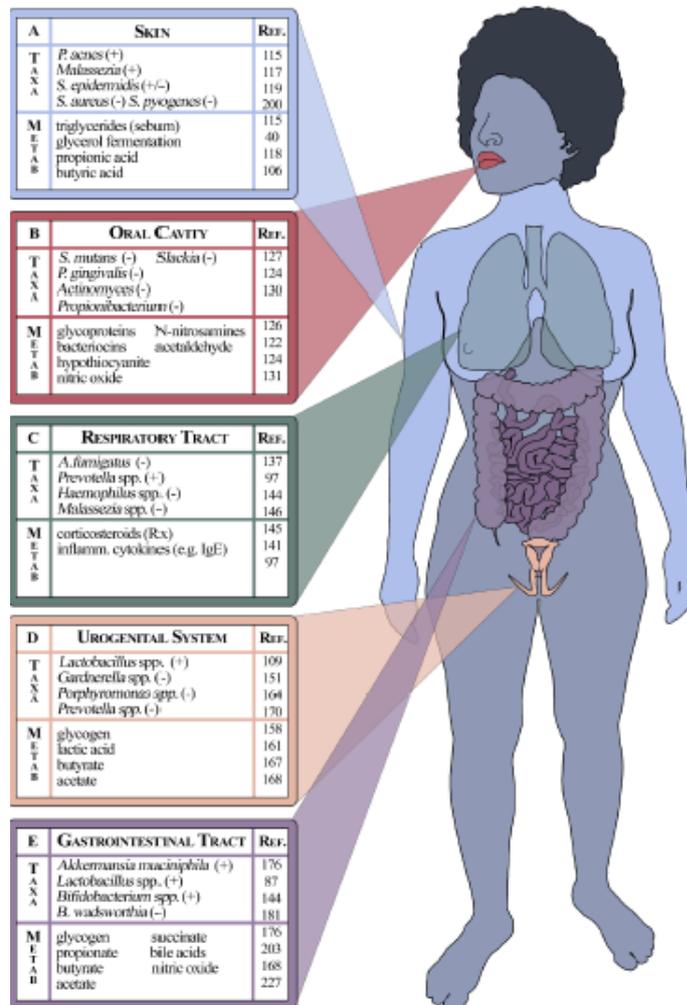
En 2012, se inicia el Proyecto del Microbioma Humano que realiza una identificación taxonómica de las bacterias que conforman la flora humana a través de la secuenciación genética de la subunidad 16S del ARN ribosómico. Los análisis nos llevan a la identificación principal de 5 filos en la microbiota intestinal de más de los 100 filos presentes en la naturaleza humana (9). Estos son los *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria*, *Proteobacteria* y *Verucorubia* de mayor a menor proporción respectivamente. La suma de *Firmicutes* y *Bacteroidetes* alcanza el 90% de las bacterias que conforman la microbiota intestinal humana. Dentro del filo de las *Bacteroidetes* destacan *Bacteroides phyla*, *Prevotella* y *Porphyromonas*, en el grupo de las *Firmicutes* destacan los géneros de *Faecalibacterium*, *Roseburia* y *Clostridium* y dentro del filo de las *Actinobacterias* tenemos como grupo principal a los *Bifidobacterium*.

Las variaciones entre la proporción de Firmicutes/Bacteroidetes ha determinado la clasificación de los individuos en 3 enterotipos según el grupo predominante. En el enterotipo 1 encontraremos un predominio de Bacteroides, en enterotipo 2 predominará el género Prevotella y en el enterotipo 3 predominará el género Rominococcus que pertenecen al género de los Clostridium dentro del filo Firmicutes (10).

El estudio de nuestro bioma se ha focalizado mayoritariamente en el grupo taxonómico de las bacterias ya que este es el mayoritario, pero también podemos encontrar otros grupos taxonómicos que son importantes en la regulación de procesos fisiológicos. Dentro de las *Arqueas* destacan las especies del género *Methanobrevibacter*

que se encargan de optimizar la digestión de los polisacáridos de la dieta por otros microbios y adaptan su expresión génica en presencia de bacterias intestinales como *Bacteroides thetaiotaomicron*. Los virus que conforman parte de la flora intestinal son de naturaleza hipervariable de forma que encontramos un viroma único en cada persona, el cual es muy difícil de determinar, aun así, los virus tipo bacteriófagos son los más predominantes e interferirán en la transferencia horizontal de genes entre bacterias. Dentro del reino taxonómico eucariota destacan los hongos y protozoos que habitualmente establecen una relación patogénica con el ser humano. Hongos como la *Candida*, *Malassezia* y *Saccharomyces*, son penetrantes en poblaciones sanas. Las interacciones entre reinos son responsables de al menos parte del equilibrio ecológico e inmune del microbioma sano. Un ejemplo es la competencia aparente entre bacterias y hongos en los ambientes bioquímicos de la piel o en el control de *Lactobacillus* de hongos en el intestino y la vagina (6).

El ecosistema del colon ha sido el hábitat más estudiado del cuerpo ya que es el más rico en cantidad y diversidad de microorganismos que conforman la microbiota a este nivel (6). Pero hay otros lugares donde la microbiota tiene especial relevancia (Figura 1):



**Figura 1.** Distribución de la microbiota y de sus metabolitos principales en las diferentes zonas del cuerpo. Tomada de: Barton, 2019

La piel: Al ser el órgano más amplio y expuesto del organismo, encontraremos que las poblaciones microbiológicas a este nivel serán más susceptibles a cambios en el ambiente, localizaciones geográficas (rural o urbana), rutinas de higiene, medicación tópica, la cohabitación de parejas sexualmente activas donde comparten microbioma, ciertos factores como los pliegues, las grietas, el pH, perfiles de secreción y las exposiciones ambientales. Además, hay factores intrínsecos al huésped que regulan las poblaciones microbiológicas encontrando diferencias en los patrones según el sexo biológico o factores hereditarios del huésped que influyen en el microbioma de la piel (a diferencia de lo que pasa a nivel de la microbiota intestinal donde el sexo parece tener menor relevancia) (11). A pesar de la vulnerabilidad de la microbiota cutánea a las perturbaciones externas, esta mantiene una estructura central consistente. Aunque estos microorganismos son capaces de generar patogenicidad oportunista bajo ciertas condiciones, cuando se encuentran en una situación estable realizan funciones homeostáticas y actúan como una barrera contra especies transitorias y potencialmente patógenas. Destacan cepas de *Propionibacterium acnes*, el género de hongos *Malassezia* y *Staphylococcus epidermidis*. Las *P. acnes* lipofílicas y las especies de *Malassezia* proliferan en sitios corporales ricos en glándulas sebáceas, como la cara y la espalda (12).

La cavidad oral: El microbioma presente en la cavidad oral viene determinado por las condiciones de oxigenación, pH y disponibilidad de nutrientes. Existe una gran variabilidad de los microorganismos a este nivel al igual que en el intestino, pero existe una predominancia de *Streptococcus ssp.* Gracias a la prematura colonización de la mucosa oral, el huésped puede distinguir entre los microorganismos que establecen una relación comensal y los patógenos transitorios. Los microorganismos comensales crean barreras biológicas mediante la formación de biopelículas, modificaciones del pH y del oxígeno y la producción de sustancias tipo bacteriocinas (lantibióticos y microcinas). Los microorganismos de la cavidad bucal se nutren mediante las mucinas presentes en la saliva y se adhieren a través de las glicoproteínas ricas en prolina que contribuyen a la formación de película en las superficies bucales, inmovilizando a los microbios a través de su adherencia a las estructuras (13,14).

Vía respiratoria: Ciertos hábitats corporales como es el caso del pulmón presentan una baja biomasa microbiana aun estando estos totalmente expuesto a la continua afluencia de microbios ambientales. La microbiota respiratoria muestra muchas características similares a las de la boca o el interior de la nariz. Sobre todo, la microbiota de la boca sirve como puente de colonización del tracto respiratorio superior y la orofaringe. El microorganismo predominante que se encuentra en el tracto respiratorio es la *Prevotella* (12,15).

Vía genitourinaria: El ecosistema vaginal sano se caracteriza por una baja diversidad microbiana, siendo el *Lactobacillus* el microorganismo dominante de forma específica en nuestra especie, seguido en menor proporción por *Gardnerella*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* y *Corynebacteria*. Parece ser que el alto contenido de mucinas, glucógeno y  $\alpha$ -amilasa en el líquido genital conforman el medio perfecto para el crecimiento de *Lactobacillus*. Los altos niveles de glucógeno encontrados en las secreciones vaginales parecen tener cierta relación con el tipo de alimentación rica en almidón que mostramos los humanos. La proliferación de *Lactobacillus* y la producción de ácido láctico que estos generan mediante la degradación anaerobia del glucógeno junto con la acidificación del pH vaginal mediada por estrógenos (<3,5) conforman un

líquido cervicovaginal con características antimicrobianas y antivirales. Variaciones en el pH y en el aumento de ácidos grasos de cadena corta (butirato y acetato) parecen tener un efecto no beneficioso a nivel genitourinario que provoca la colonización por otros microorganismos en detrimento del *Lactobacillus* generando otras patologías como la vaginosis bacteriana (*Gardnerella*) (12). En cuanto a la microbiota del tracto urogenital masculino, destacan los ecosistemas microbiológicos a nivel del tracto genitourinario inferior principalmente a nivel del surco coronal y la uretra. Destacando *Firmicutes*, *Actinobacteria*, *Fusobacteria*, *Proteobacteria* y *Bacteroidetes*. La circuncisión parece ser uno de los factores que influyen en la microbiota del tracto genital masculino, siendo menor la carga de microorganismos y también de infecciones en los pacientes circuncidados (16).

## **2. PAPEL DE LA MICROBIOTA EN LA SALUD Y EN LA ENFERMEDAD.**

### **2.1. Microbiota intestinal.**

#### **2.1.1. Homeostasis metabólica.**

El sistema gastrointestinal se encarga de la absorción y procesamiento metabólico de los nutrientes ingeridos, siendo indiscutible su acción en el mantenimiento de un correcto estado de salud (17). De esta forma la microbiota regula y modula varios estados patológicos como consecuencia de las interacciones biológicas y ambientales que ejerce con el intestino humano y que principalmente son de tipo metabólico.

#### **- Digestión de polisacáridos:**

La microbiota interviene en la digestión de los nutrientes obteniendo como resultado metabolitos de interés nutricional sirviendo como fuentes de energía, y metabólicamente generando precursores de vías de regulación homeostática energética. Los ácidos grasos de cadena corta (AGCC) como el ácido acético, propiónico y butírico son generados por la microbiota intestinal, principalmente por *Bacteroidetes*, a través del metabolismo de polisacáridos y proteínas, en menor medida. Estos AGCC realizan acciones directas a nivel intestinal, pero también regularán procesos de la función hepática, neurológica e inmunológica (18). Los polisacáridos utilizados por las bacterias de la microbiota son indigestibles por las enzimas digestivas humanas y están conformados principalmente por celulosa, pectinas y fructanos. Llegan al colon y son transformados en butirato, acetato y propionato en la proporción 1:3:1 (19).

El butirato contribuye a la producción de energía mediante su conversión a acetyl-CoA y además actúa inhibiendo la actividad de la histona deacetilasa (HDAC) generando así la hiperacetilación del ADN favoreciendo su degradación por las ADNasas. De esta manera su inhibición se traduce en proliferación, diferenciación y apoptosis celular de las células implicadas en el cáncer colorrectal ejerciendo así un papel protector (18,20).

El propionato se metaboliza a nivel hepático y el acetato se distribuye por el torrente sanguíneo atravesando incluso la barrera hematoencefálica donde influye en la saciedad a nivel hipotalámico. Además, el acetato y el propionato a nivel intestinal poseen cierto efecto antiinflamatorio sistémico que parece influir en la patogenia del

asma. El acetato, al reforzar la actividad reguladora de las células T mediante la inhibición que ejerce sobre la HDAC tipo 9, da como resultado la supresión de la hipersensibilidad a los alérgenos ambientales y el propionato interacciona con las células dendríticas pulmonares, lo cual genera una disminución de la inflamación mediada por las células T Helper tipo 2 (12).

Los carbohidratos de bajo peso molecular son metabolizados eficientemente por las bifidobacterias que poseen glucosidasas extracelulares y están asociadas a las células y sistemas de transporte específicos que permiten la rápida asimilación de azúcares de bajo peso molecular. En el caso de los azúcares de alto peso molecular los microorganismos pertenecientes al género de *Bacteriodes* son los que ejecutan su descomposición. *Rominococcus spp*, se encargarán de la degradación de almidón (21).

- Digestión de grasas:

Existe cierta relación entre la microbiota intestinal y los ácidos biliares (AB)(22,23). Los ácidos biliares primarios liberados por el hígado a la luz intestinal tras la comida son el ácido cólico y el ácido quenodesoxicólico que son sintetizados a partir del colesterol y los cuales se conjugan con taurina o glicina conformando los ácidos biliares conjugados. Su función es facilitar la absorción intestinal de lípidos y vitaminas liposolubles. La microbiota, mediante las sales biliares microbianas, facilitan la hidrólisis de los AB conjugados convirtiéndolos de nuevo en AB que se reabsorberán en el intestino delgado llegando por el sistema portal al hígado completando la circulación enterohepática (17). Al actuar como detergentes, las sales biliares también degradan la membrana celular de los microorganismos, es por ello que el microbioma intestinal ha adquirido estrategias de modificación lipídica y proteica a nivel de membrana para soportar la acción detergente de las sales biliares, y del mismo modo, se genera un ambiente inhóspito para otros microorganismos competidores. En el proceso de conversión de los AB conjugados mediado por las sales biliares microbianas se generan los AB secundarios, que son el ácido desoxicólico (DCA) y el ácido litocólico. Altos niveles de DCA secundarios a una rica dieta en grasas o a cirugías de derivación gástrica tipo Y de Roux, se han relacionado con un mayor riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular y adenoma colorrectal paso previo al desarrollo de cáncer colorrectal (12).

### **2.1.2 Homeostasis inmunológica.**

- Función inmunomoduladora:

La microbiota juega un papel crucial en el desarrollo del sistema inmune (24). Diversos estudios muestran la interacción del sistema inmune y la microbiota derivada del análisis del sistema inmunológico en “animales libres de gérmenes”, o también llamados ratones “germ-free”, es decir que no presentan colonización de microorganismos a nivel intestinal. En estos animales encontramos una atrofia generalizada del sistema inmunitario, con déficit inmunológico celular con la consiguiente disminución de las inmunoglobulinas (IgA e IgG) y citoquinas, además de la atrofia de los órganos linfáticos secundarios (bazo y ganglios linfáticos). También se observa una atrofia de las estructuras inmunológicas intestinales principales como el tejido linfoide asociado al intestino (GALT), a nivel de las placas de Peyer y el tejido linfoide del intestino delgado (SILT), disminución de los agregados linfoides en el

intestino grueso y de las células inmunes diseminadas de manera difusa en la lámina propia de todo el tracto gastrointestinal (25).

El hecho de que la microbiota intestinal juegue un papel inmunomodulador se explica por la relación que se establece entre el área de superficie más amplia del ser humano en contacto con los antígenos del ambiente externo, la mucosa intestinal, y la gran variabilidad microbiológica de la microbiota. De este modo, se genera la estimulación los receptores de reconocimiento de patrones (TLR y NLR) de células del sistema inmune y las células epiteliales intestinales a través de una gran cantidad de antígenos que además son muy diversos (26).

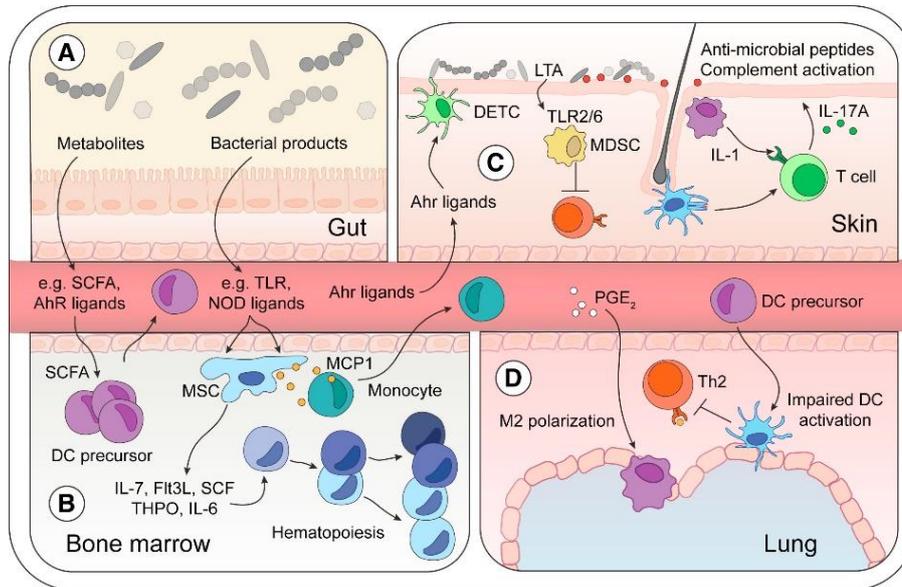
De esta forma el sistema inmunitario de la mucosa debe establecer un equilibrio entre sus dos funciones principales. Debe ser tolerante con la microbiota supra yacente para evitar la inducción de una respuesta inmune sistémica excesiva perjudicial, a la vez de ser capaz de controlar la microbiota intestinal para evitar su sobrecrecimiento y la translocación sistémica (27).

La relación entre la microbiota intestinal y el sistema inmune se basa en:

Acción inmunomoduladora. Maduración y desarrollo de la inmunidad de la mucosa y sistémica: A través de los metabolitos bacterianos producidos por la microbiota se genera la modulación de sistema inmune (26). Esta modulación se produce tanto a nivel local, como a nivel sistémico mediante el paso de estos metabolitos al torrente sanguíneo mediante difusión pasiva o transporte activo. Estos metabolitos podrían contribuir a la hematopoyesis en estado estacionario, al desarrollo de las células mieloides derivadas del saco vitelino y de las células madre. Las células madre mesenquimales también pueden detectar ligandos NOD1 (un tipo de NLR), expresando factores con efecto sobre la hematopoyesis, como la IL-7, Ligando tirosina quinasa 3 tipo FMS (FLT3L), factor de células madre (SCF), trombopoyetina e IL-6. Los AGCC ya mencionados, también poseen cierto efecto inmunomodulador mediante su unión a los receptores acoplados a proteínas G que se encuentran en células epiteliales y hematopoyéticas. Altos niveles de propionato se traducen en una mayor generación de precursores de macrófagos y células dendríticas (estas últimas sobre todo a nivel pulmonar). Existen factores de transcripción como los receptores de hidrocarburos de arilo (AhR), dependientes de ligando que detecta ligandos tanto xenobióticos como endógenos, en este caso, los metabolitos derivados de la microbiota. La activación de AhR a nivel intestinal promueve la producción de IL-22 por las células linfoides innatas (ILC) del grupo 3 y las células T helper 17 (T reguladoras), y el mantenimiento de linfocitos intraepiteliales. Los ligandos Ahr derivados de la dieta tienen cierto efecto sistémico ya que también promueven el mantenimiento de los linfocitos intraepiteliales de la dermis (**Figura 2**) (26).

Evitar la aparición de una respuesta inmune sistémica excesiva: Como consecuencia de la presencia de microorganismos a nivel de la luz intestinal existen varios mecanismos que evitan el desarrollo de una respuesta inmune frente a la microbiota como la separación física de las bacterias y las células huésped, modificaciones de los restos antigénicos de la microbiota para hacerlas menos

inmunogénicas o la modulación de la respuesta inmune del huésped localizada hacia la tolerancia (25,26).



**Figura 2.** Acción inmunomoduladora de la microbiota. Los metabolitos bacterianos contribuyen en los procesos de hematopoyesis, aumentan los precursores de macrófagos y células dendríticas a nivel pulmonar e intervienen en el mantenimiento de los linfocitos intraepiteliales en la dermis. Tomada de: Belkaid, 2017

Las células dendríticas intestinales condicionadas por las células epiteliales intestinales inducen la diferenciación de células T, concretamente las Th2 y las T reguladoras que favorecen a un estado más tolerogénico. Estas células epiteliales intestinales son moduladas por la microbiota intestinal (*Lactobacillus spp*) que induce la secreción de linfopoyetina estromal tímica (TSLP) que favorece a la maduración de los linfocitos T y la inhibición del factor de transcripción proinflamatorio NF-kB (media la respuesta celular frente a estímulos infecciosos). Además, la microbiota intestinal es capaz de prevenir la activación de NF-kB a través de la compartimentación de los receptores tipo toll (TLRs), activando solos los receptores que se encuentran a nivel apical y no los ubicados basolateralmente (que generarían una activación marcada del NF-kB), ejerciendo así un efecto inmunomodulador (27).

Otro mecanismo mediante el cual el individuo es más tolerogénico con la microbiota intestinal, es mediante la minimización de los efectos inmunogénicos de los componentes bacterianos, principalmente los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) que se encuentran en las membranas externas de las bacterias Gram negativas y que pueden desencadenar un shock séptico como resultado de la interacción bacteria-huésped (27,28). La vía mediante la cual se consigue minimizar el potencial de estas bacterias es la desfosforilación de las endotoxinas LPS ejercida por la fosfatasa alcalina intestinal. La actividad ejercida por la fosfatasa alcalina a nivel gastrointestinal es específica y reduce el reclutamiento neutrófilo mediado por Myd88 (proteína señalizadora y mediadora de la actividad inmune) y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) solo en presencia de la microbiota intestinal tipo Gram negativo y no en presencia de otros microorganismos. Además de la minimización de los efectos de los LPS por la fosfatasa alcalina intestinal, las células epiteliales intestinales adquieren tolerancia frente a estas endotoxinas a través de la regulación negativa de IRAK-1 (Quinasa 1 asociada a receptor de

interleucina-1/ Interleukin-1 receptor-associated kinase 1), que es una proteína necesaria para la señalización a través del ligando del receptor tipo-toll 4 (TLR4) y que, por tanto, disminuye la actividad inmunogénica. En estudios murinos se ha observado que esta tolerancia es adquirida al nacer por vía vaginal, lo que corrobora la importancia de la microbiota en el acondicionamiento tolerogénico de la respuesta inmune a nivel del tracto gastrointestinal (27).

Otra estrategia efectiva para evitar la activación inmune excesiva en la mucosa intestinal es la separación física por moco existente entre la microbiota y el sistema inmunitario presente en la mucosa del huésped. La capa de moco intestinal está dividida en dos niveles, uno superior permeado donde encontramos la microbiota intestinal y otro inferior en contacto con la mucosa intestinal y sin presencia de bacterias (26).

Inmunidad adaptativa: Las células plasmáticas que residen en la mucosa intestinal producen IgA secretora (IgAs) que recubren la microbiota intestinal y controlan el crecimiento bacteriano local y reducen las interacciones microbiota-sistema inmunitario de la mucosa (favoreciendo la tolerancia inmunológica del huésped frente a los microorganismos residentes en él). Las células dendríticas que residen en la mucosa intestinal toman muestras de las bacterias lumenales (la microbiota) y ejercen su papel de células presentadoras de antígeno, presentándoselas a las células plasmáticas. La migración de las células dendríticas está limitada a los ganglios linfáticos mesentéricos locales, permitiendo la inducción de una respuesta IgA compartimentada a la mucosa, evitando una respuesta sistémica a la microbiota intestinal (26,29). La presencia de la microbiota intestinal es indispensable para la activación de las células dendríticas y la consiguiente producción de IgA. Las bacterias Gram negativas de la microbiota (*Bacteroidetes*) son más eficientes en la inducción a la producción de IgAs que las Gram positivas (*Lactobacillus*) (27). También se observa que la ausencia de IgA intestinal se relaciona con un crecimiento excesivo de bacterias filamentosas segmentadas (Gram positivas), lo cual permite deducir que la inducción de IgAs puede ser una forma de competencia entre los diferentes miembros de la microbiota (27). Hay dos tipos IgAs, la tipo 1 producida sistémicamente y en las superficies mucosas y la tipo 2, producida únicamente en las superficies mucosas. Las IgAs tipo 2 son más resistentes a la degradación por proteasas bacterianas, siendo esta la subclase de IgA principal que encontramos en la lámina propia intestinal. Para que la producción de IgAs tipo 2 sea predominante es necesaria la producción por las células epiteliales intestinales de un ligando inductor de proliferación (que activara a las células plasmáticas) y que será secretado en respuesta a la detección de las bacterias (Gram + y Gram -) y productos bacterianos (LPS y flagelinas principalmente) por los TLRs.

La respuesta en la producción de IgA en la mucosa carece de características de memoria clásicas, siendo así capaces de responder al flujo en la composición de microbiota comensal, permitiendo que el sistema inmunitario de la mucosa responda a una microbiota cambiante.

A parte de las IgAs, existen los péptidos antimicrobianos (AMPs) producidos por el huésped para evitar la reacción sistémica de la microbiota intestinal. Estos impiden la traslocación bacteriana evitando que la microbiota se extralimite fuera del compartimento luminal. Los péptidos antimicrobianos presentan una distribución espacial diferente a lo largo de todo el tracto gastrointestinal siendo además más prevalente su acción a nivel de las criptas intestinales y en la capa de moco que se encuentra en contacto con la mucosa intestinal y menor a nivel luminal permitiendo la

replicación local de los microorganismos a la vez que se limita su contacto con la mucosa del huésped.

### 2.1.3 Función protectora.

La microbiota intestinal proporciona al huésped una barrera física contra los patógenos por diferentes mecanismos de competición como la ocupación de sitios de fijación, el consumo de nutrientes y la producción de sustancias antimicrobianas (30). Además, como ya se ha mencionado anteriormente, la presencia de los microorganismos que conforman la microbiota, estimula a la producción de sustancias antimicrobianas (AMPs) como defensinas, catelicidinas y lectinas tipo C por el tracto gastrointestinal del huésped, evitando su colonización o infección por microorganismos patógenos.

Las células de Paneth que se encuentran a nivel de las criptas localizadas en el intestino delgado, secretan una gran variedad de AMP, esta secreción es ejercida por la presencia de la microbiota intestinal normal, sus componentes estructurales y sus metabolitos microbianos. Se ha demostrado que los AGCC y el ácido litocólico (metabolitos de la microbiota) induce a la expresión de catelicidina LL-37 (30). En ocasiones, las defensinas son secretadas de una forma inactiva, prodefensinas que precisan de una escisión proteolítica para activarse, este proceso es catabolizado por la matrilisina una metaloproteasa producida por las células de Paneth. Se ha visto que la colonización por *Bacteroides thetaiotaomicron* induce a la expresión de matrilisina (27,30).

Otra vía mediante la cual la microbiota ejerce un efecto disuasorio sobre la colonización de patógenos es la propia presencia física de los microorganismos de la microbiota en la luz intestinal. En estudios in vitro se ha observado que en aislamientos fecales anaerobios donde predominan los Gram +, se ejerce un efecto inhibitorio sobre patógenos entéricos mayor que en los aislamientos fecales anaerobios donde predominan los Gram -. Esta actividad antagonista es variable y dependiente de las fluctuaciones temporales y las variaciones interindividuales de la microbiota intestinal (31).

Se ha observado que bacterias Gram + anaerobias facultativas y anaerobias obligatorias (*Lactobacillus* y *Bifidobacterium* respectivamente) previenen la infección por *Listeria* en células epiteliales cultivadas, a través de la elaboración y secreción de compuestos que modulan la respuesta inmune de las células epiteliales a la *Listeria* (32). También se ha demostrado que ciertos compuestos secretados por *Lactobacillus* disminuyen la colonización in vivo por *Escherichia coli* patógena (33). La presencia de bacterias filamentosas segmentadas en la mucosa a nivel del íleo excluye físicamente a la *Salmonella Enteritidis* evitando su colonización (27).

Como ya ha sido mencionado a nivel de la microbiota genitourinaria, las bacterias del género *Lactobacillus* producen ácido láctico que además de generar un ambiente inhibitorio al crecimiento de otras bacterias patógenas (al acidificar el pH de la mucosa), potencia la actividad antimicrobiana de las lisozimas del huésped (favoreciendo a la disrupción de la membrana externa bacteriana) (12).

### 2.1.4 Homeostasis intestinal y función cognitiva.

La microbiota intestinal ejerce un papel modulante de las funciones fisiológicas, conductuales y cognitivas del cerebro (34). La primera vez que se aceptó que la microbiota intestinal podía tener efecto sobre el sistema nervioso central (SNC) fue en un experimento con ratones libres de gérmenes que se encontraban en un entorno libre de patógenos, donde se observó que desarrollaban un comportamiento menos ansioso y aumentaban la producción de serotonina a nivel talámico en comparación con ratones convencionales en el mismo entorno(35,36).

Según los últimos estudios parece que la microbiota intestinal ejerce una influencia sobre el cerebro no solo a través de la red neuronal, sino que también se realiza una regulación mediante el sistema neuroendocrino, el sistema inmune y el sistema metabólico. Existe de esta forma un eje microbiota intestinal-cerebro, del cual forman parte la microbiota intestinal y sus productos metabólicos, el sistema nervioso entérico, sistema nervioso autónomo (simpático y parasimpático), sistema inmuno neural, sistema neuroendocrino y el SNC.

- Vías neuroanatómicas

El intestino interactúa con el cerebro a través de dos vías neuroanatómicas: La primera vía es la que intercambia información entre el intestino y el SNC a través del sistema nervioso autónomo. La segunda vía es bidireccional y establece una comunicación entre el sistema nervioso entérico (SNE) y el sistema nervioso autónomo (SNA). En estas vías anatómicas se establece una organización jerárquica de cuatro niveles que controla las funciones intestinales. El primer nivel es el SNE, incluyendo los ganglios mientéricos, ganglios submucosos y células gliales intestinales. El segundo nivel son los ganglios paravertebrales que regulan las respuestas viscerales periféricas. El tercer nivel es el SNA simpático, cuyas neuronas preganglionares se localizan en la medula espinal desde los segmentos T5 a L2 y el SNA parasimpático cuyas neuronas preganglionares provienen de la región sacra de los segmentos S2 a S4 y del par craneal X o nervio vago. El cuarto nivel son los núcleos cerebrales superiores.

La información de la corteza cerebral y los ganglios basales llega a los núcleos del tronco cerebral incluido el núcleo dorsal del nervio vago. Las vías aferentes llegan al núcleo del tracto solitario que proyecta al tálamo, sistema límbico y la corteza insular a través del núcleo parabraquial. Las fibras aferentes espinales a través del tracto espinotalámico llegan al tálamo y a través del tracto espinal llegan a los núcleos grácil y cuneatus de la médula oblongada que se proyectarán a través de la vía lemnisco medial al tálamo. Finalmente, desde el tálamo salen proyecciones a las áreas sensoriomotoras primarias y a la corteza insular (17).

La comunicación neural directa entre la microbiota y el cerebro se realiza a través del nervio vago. Las bacterias estimulan las neuronas aferentes del sistema nervioso entérico del intestino. Esta estimulación media la activación de la respuesta antiinflamatoria previniendo así episodios de septicemia causada por estos microorganismos y favoreciendo a un efecto antiinflamatorio mediante la activación vagal (35,37).

- Eje neuroendocrino-hipotalámico-hipofisario-adrenal

La microbiota intestinal es necesaria para la maduración neuroendocrina. La falta de microbiota intestinal y la falta de expresión de los receptores TLRs, provocan una

respuesta neuroendocrina a los patógenos intestinales. Se ha observado en ratones libres de gérmenes (ratones Germ-free) estabulados en un ambiente libre de patógeno, que los niveles de corticosterona y hormona adrenocotitrópica (ACTH) en respuesta a un estrés moderado son significativamente más elevados en comparación con ratones normales. Esta respuesta al estrés se revierte parcialmente en los ratones Germ-free cuando son sometidos al trasplante fecal, y tras la administración crónica de *Bifidobacterium infantis* los niveles de corticosterona y ACTH se normalizan (35,38). Además, se observó que la presencia de microbiota intestinal desde el periodo postnatal es imprescindible para el desarrollo del eje hipotalámico-hipofisiario-adrenal (HAA) y por lo consiguiente de una correcta respuesta al estrés (34).

A su vez, el estrés y alteraciones del eje HAA afectan la composición del microbioma intestinal. Situaciones de estrés en el periodo inicial de la vida, por ejemplo, la separación materna en ratas recién nacidas, provoca modificaciones en el eje HAA de estos animales (35,39). Se observa una disminución de *Bacteroides* en el ciego y un aumento de bacterias del género *Clostridium* a este nivel. También se observa un aumento de los niveles de interleucina-6 (IL-6) y de la proteína quimiotáctica de monocitos 1(MCP-1) en sangre. El aumento de niveles de MCP-1 se relaciona con los cambios a nivel de la microbiota intestinal encontrados en situaciones de estrés como son el aumento de *Enterococcus faecalis*, *Pseudobutyrvibrio* y cepas bacterianas del género *Dorea*. El estrés también genera cambios en la función de barrera que ejerce la mucosa intestinal, ya que frente a estas situaciones el LPS bacteriano y otras citocinas atraviesan la mucosa llegando a la circulación sanguínea activando los TLRs que a su vez generan más citocinas inflamatorias que ejercen acciones a nivel periférico, en este caso a nivel cerebral (35,40).

- Neurotransmisores y otros reguladores neurales sintetizados por las bacterias intestinales.

Las bacterias que conforman la microbiota sintetizan ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA), ácido butírico, serotonina, histamina, catecolaminas (dopamina, norepinefrina y epinefrina) y ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Estas sustancias son intercambiadas entre los microorganismos y las células intestinales. También se producen sustancias neurotóxicas como el ácido láctico y el amoniaco (35).

- Las catecolaminas, ejercen un papel modulador en el comportamiento motivador del huésped y en la toma de decisiones. A nivel intestinal, altos valores de norepinefrina principalmente y epinefrina inducen la patogénesis y el crecimiento bacteriano, ya que ejercen cierto efecto quimiotáctico sobre la mucosa intestinal del huésped, desarrollan el efecto “quorum sensing” (sustancias químicas ejercen un papel modulante en la expresión génica a nivel colectivo) que aumenta la expresión de genes de virulencia bacteriana y por último ejercen cierto papel sideróforo de forma que aumentan la disponibilidad de hierro para las bacterias favoreciendo su crecimiento (36,41). En los ratones libres de germen se ven niveles más altos de catecolaminas en la luz ileal, cecal y colónica (42). Por otro lado, las bacterias no solo se ven moduladas por los niveles de catecolaminas, sino que también generan estos neurotransmisores, que son de idéntica estructura química a las producidas por el huésped. Se sabe que las bacterias del género *Escherichia* y otros bacilos (comensales y no comensales) producen norepinefrina y dopamina

(36). Además, en el SNE, no está presente la feniletanolamina N-metiltransferasa encargada de catalizar la transformación de norepinefrina a epinefrina. Lo que sí que se observa es la presencia a nivel intestinal de ciertas bacterias de la microbiota que presentan la enzima  $\beta$ -glucuronidasa que cataliza la conversión de las formas inactivas de norepinefrina y dopamina del huésped a las formas activas. Aunque las células del tracto gastrointestinal del huésped responden a las catecolaminas se desconoce cómo estas influyen en la fisiología del huésped (36).

- GABA es el neurotransmisor inhibitorio del sistema nervioso. Tanto el individuo como las bacterias presentan la capacidad de convertir glutamato en GABA, además *Escherichia spp* y *Lactobacillus spp*, este último predominantemente, sintetizan GABA directamente o lo obtienen mediante la fermentación de los alimentos. *E. coli Nissle* una cepa probiótica produce un lipopéptido analgésico asociado a GABA (C12AsnGABA OH), el cual al asociarse con GABA facilita su difusión a través de la barrera epitelial permitiendo una mayor activación de los receptores gabaérgicos presentes en las neuronas sensoriales del SNE (37,43,44). Se ha demostrado que la administración oral de *Bifidobacterium dentium* una especie bacteriana productora de GABA y aislada en heces humanas, inhibe la hipersensibilidad visceral en ratas, lo que sugiere un cierto efecto fisiológico del GABA producido por las bacterias a nivel del huésped(45). Así mismo, las bacterias intestinales poseen receptores externos para GABA, por tanto, la producción de GABA por el individuo influye en la microbiota (36). Se ha visto que la administración de GABA en cultivos de *Pseudomonas aeruginosa* aumenta la virulencia del microorganismo. Aun así, no queda del todo clara la acción del GABA en la relación microbiota-huésped (36,37).
- La histamina, es una amina biogénica que se sintetiza a través de la histidina y cuya reacción es catabolizada por la histidina descarboxilasa que está presente tanto en el huésped como en algunos microorganismos de la microbiota intestinal. La histamina interviene en la modulación de la vigilia y desempeña funciones a nivel inmunitario. La desgranulación de histamina por parte de los mastocitos a nivel de la mucosa gastrointestinal se relaciona con el dolor visceral. La histamina secretada por los microorganismos interactúa con las aferencias vagales del sistema nervioso del huésped, pero no está claro su papel en la fisiología del individuo (36). Existe evidencia in vitro de que la histamina producida por *Lactobacillus reuteri* modela la función inmune mediante la supresión en la producción de TNF- $\alpha$  a través de los TLR y ejerce una acción inflamatoria intestinal mediante la activación de los receptores de histamina H2. Por otra parte, aún no se ha descrito como la histamina del huésped puede afectar a la microbiota (36,46).
- La serotonina (5-HT) se produce a través del triptófano por acción de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) presente en el ser humano y en las bacterias. Su acción principal es la de modular el comportamiento del huésped, la motilidad intestinal, interviene en la remodelación ósea y en el mantenimiento eritrocitario. Las células enterocromafines son las productoras del 95 % de la serotonina del cuerpo, pero aun así parece que la producida por la microbiota tiene cierto papel modulador a nivel del sistema serotoninérgico gastrointestinal del huésped (36,37,47). *Clostridium perfringens* modula la síntesis de 5-HT a nivel del colon del huésped mediante la TPH, al mismo tiempo que los productos microbianos como los AGCC modulan la expresión de la TPH1 del huésped (48). La serotonina modula la motilidad bacteriana e induce la expresión de genes de virulencia mediante el

mecanismo “quorum sensing”. En ratones libres de germen se observan niveles elevados de triptófano circulante que son normalizados tras la colonización con microbiota que proviene de animales convencionales (49). En estos animales libres de germen se vieron además valores de triptófano elevados a nivel hipocampal y que en esta ocasión no se normalizaron tras la colonización con microbiota. Por otra parte, se vio una reducción de los niveles de serotonina circulantes y también a nivel hipocampal. Hasta el 90 % de ese triptófano se transforma en quinurenina y no en serotonina (50). Los niveles de quinurenina y sus metabolitos como el ácido quinurénico y el ácido quinolínico se han visto implicados en problemas de salud mental. Las enzimas que catalizan esta transformación son la indoleamina-2,3-dioxigenasa (IDO-1) que encontramos en el intestino y en otros muchos tejidos y la triptófano-2,3-dioxigenasa (TDO) que se encuentra a nivel hepático. La TDO se ve fuertemente regulada por los glucocorticoides circulantes, cuyos niveles están modulados por la microbiota que además se ve modificada en situaciones de estrés. La IDO se ve regulada por el sistema inmune que a su vez como hemos descrito está influenciado por la acción microbiana. La microbiota por tanto influye, mediante una u otra vía en ambos procesos (36,50). Además de las vías metabólicas del triptófano que dan lugar a la 5-HT o a la quinurenina, también existen los derivados del triptófano como el indol. El indol y sus metabolitos modulan la inflamación intestinal, protegen contra la mortalidad en la colitis inducida por sustancias químicas, posiblemente aumentan la longevidad del huésped y recientemente se han implicado en el control microglial de los astrocitos en el SNC (50–52). El ácido indol-3-propionico que se genera a través del indol producido por la microbiota (destaca *Clostridium sporogenes*) y que llega a sangre a través del sistema portal, interviene en la inflamación intestinal y sus niveles se encuentran disminuidos en los pacientes con colitis activa e influyen en el metabolismo de la glucosa del huésped (52,53). La isatina, otro metabolito del indol, tiene efecto sobre la ansiedad en roedores(50,54). La isatina es detectable en el huésped a nivel del líquido cefalorraquídeo humano y en el hipocampo y se ha visto elevada en pacientes con diagnóstico de bulimia nerviosa (36,50). Aun así, parece no quedar clara la relación del aumento de isatina producida a través del indol micobacteriano en la salud mental, cerebral y conductual del huésped (36).

## 2.2 Otras localizaciones de la microbiota.

### 2.2.1 Microbiota de la cavidad oral:

Los compuestos bioactivos que se encuentran en la saliva incluyen factores que inhiben el crecimiento o modifican la actividad del complejo microbiano dentro de la boca. El crecimiento bacteriano se ve frenado por la lisis celular mediada por lisozima y por la interferencia que se produce en el metabolismo de la glucosa de estos microorganismos mediante lactoperoxidasa que cataliza la conversión de peróxido de hidrogeno y tiocianato en hipotiaocianito (55).

El óxido nítrico (NO) es una importante molécula de señalización celular, crucialmente involucrada en varias funciones fisiológicas: metabolismo, función nerviosa y función cardiovascular. Los componentes clave del microbioma oral han demostrado la capacidad de reducir los nitratos de la dieta a nitritos. El nitrito convertido se deposita en saliva, que se ingiere después de la circulación de la cavidad

oral, lo que conduce a la conversión de NO y la posterior transmisión a los tejidos en todo el cuerpo. Por otro lado, la suplementación con nitrito bacteriano puede estimular el desarrollo del cáncer mediante la formación de N-nitrosaminas cancerígenas. Con un riesgo similar de carcinogénesis, el acetaldehído es producido a partir del etanol por bacterias orales(14,56) .

La disfunción del microbioma oral contribuye directamente a las enfermedades dentales. La condición más ampliamente reconocida es la caries dental (14). La formación de caries comienza con la fermentación bacteriana de carbohidratos a ácidos orgánicos, lo que resulta en una reducción localizada del pH y la posterior desmineralización dental. Una vez que el sitio ha sido acidificado, el ambiente afectado se vuelve cada vez más selectivo para las bacterias que toleran condiciones de pH bajo, estimulando así la proliferación de comunidades destructivas y el empeoramiento de la condición. Aunque *Streptococcus mutans* está implicado en la caries dental, es evidente que ningún organismo es el agente causal y, en cambio, la actividad polimicrobiana impulsa la afección con diversos factores y de otros géneros bacterianos como *Actinomyces*, *Slackia*, *Propionibacterium* y *Lactobacillus* (12,57). La enfermedad periodontal también es causada por microorganismos (14). La formación prolongada de biopelículas en la interfaz del tejido gingival y la superficie del diente conduce a la acumulación de bacterias patógenas que exacerban la inflamación a través de compuestos citotóxicos como los lipopolisacáridos. El sangrado resultante de la inflamación proporciona una fuente de hierro del hemo, una molécula utilizada por microbios patógenos (por ejemplo, *Porphyromonas gingivalis*). Sin interrupción, los microbios asociados con la periodontitis prosperan y, con el continuo antagonismo inmunológico del tejido gingival, contribuyen a la inducción de una respuesta inflamatoria desregulada, dañando permanentemente el tejido conectivo y el hueso (12,14,57).

### 2.2.2 Microbiota de la piel:

Los triglicéridos presentes en el sebo son hidrolizados a ácidos grasos que favorecen la agregación bacteriana y contribuyen a mantener un pH ácido. Las condiciones ambientales de pH bajo seleccionan los comensales lipofílicos mientras inhiben la colonización por cepas potencialmente patógenas de *Staphylococcus aureus* y *Staphylococcus pyogenes*. *Propionibacterium acnes* también contribuye a la supresión de *S.aureus* resistente a la metilicina a través de la fermentación de glicerol a ácidos grasos de cadena corta (AGCC) y en particular al ácido propiónico, que también inhibe el crecimiento de *Escherichia coli* y *Candida albicans* (12).

### 2.2.3 Microbiota del pulmón:

Se ha demostrado una asociación clara entre la microbiota pulmonar y la salud pulmonar, sobre todo en relación con enfermedades inflamatorias como el asma. Como ya hemos visto, la exposición microbiana en la vida temprana tiene implicaciones en la salud respiratoria. Las fuertes asociaciones epidemiológicas afirman que existe un mayor riesgo de enfermedad respiratoria inflamatoria cuando el nacimiento se produce con cesárea en vez de por vía vaginal y un menor riesgo de diversas presentaciones de antígenos en ambientes demasiado estériles frente a altas exposiciones antigénicas en medios rurales y agrícolas (12,58). Se encontraron especies bacterianas como

*Lachnospira*, *Veillonella*, *Faecalibacterium* y *Rothia* con una abundancia relativa baja en los niños que tienen un mayor riesgo de desarrollar asma.

Los pacientes con asma tipo 2-alto, un fenotipo marcado por respuestas inmunológicas específicas de tipo 2, presentan una diversidad menor de especies fúngicas en las muestras de vías respiratorias obtenidas en comparación con otros pacientes con asma. El mismo estudio informó un enriquecimiento de especies del género de hongos *Trichoderma* en pacientes con tipo 2-alto (58).

Algunos análisis del componente fúngico del microbioma pulmonar implican la presencia de especies de *Malassezia* en pacientes con asma. Esta especie fúngica es un factor característico que encontramos en la dermatitis atópica y seborreica, relacionándose así un vínculo entre la translocación perjudicial de la microbiota de la piel y el asma (59).

En un estudio de los microorganismos presentes en la microbiota de pacientes con asma, se observó una disminución de los miembros típicos que conforman las poblaciones bacterianas tipo *Bacteroidetes* (sobre todo del subtipo *Prevotella*) y un aumento de los microorganismos del tipo *Proteobacteria*, como el *Haemophilus* y de Actinobacterias, independientemente de si el fenotipo del asma es de tipo cortico resistente o cortico sensible. Se ha objetivado que los monocitos procedentes de sangre periférica de pacientes que mostraban resistencia a corticoides, habían inhibido su respuesta a estos cuando se cultivan con *Haemophilus parainfluenzae*, que es un patógeno asociado al asma (12,15,58).

#### 2.2.4 Microbiota genitourinaria:

Al igual que en el resto de las localizaciones el principal papel de la microbiota genitourinaria es el de barrera de protección frente a la colonización por otros microorganismos. Parece ser que las características de la comunidad que conforman la microbiota genitourinaria son más importantes a la hora de explicar las infecciones urinarias que la propia existencia o ausencia de un microorganismo en particular (12,60). Las disbiosis bacterianas presentes a nivel de la microbiota genitourinaria pueden explicar procesos patológicos como la incontinencia urinaria de urgencia, las infecciones del tracto urinario e incluso los síndromes de vejiga dolorosa (60). A nivel urinario también se han documentado la existencia de péptidos antimicrobianos que juegan un papel clave en la modulación de la comunidad microbiana, previniendo las infecciones causadas por disbiosis, en la regulación de la respuesta a los tratamientos recibidos. A su vez, la determinación de la existencia de receptores de la interleucina 22 (IL-22) a nivel urotelial nos permite establecer que existen interacciones entre la comunidad microbiana, los receptores sensitivos colinérgicos uroteliales y las funciones uroteliales de tipo “no barrera” y los péptidos antimicrobianos, presentado una función inmunomoduladora protectora en la vejiga (60–62).

### 3. ¿CÓMO PODEMOS MODIFICAR LA MICROBIOTA?

El conocimiento de los diferentes microorganismos que componen la microbiota sana gracias a las nuevas técnicas de identificación basadas en el RNA ribosomal 16S, han permitido que frente a las disbiosis bacterianas que se presentan en diferentes procesos patológicos podamos intentar modificar estas poblaciones y restaurar un

microbioma normal en busca de potenciales beneficios que van desde la disminución de la sintomatología de estas enfermedades hasta su resolución completa (7,8).

Las técnicas que intentan realizar esta modulación de la microbiota, pueden ser directas o indirectas y estas incluyen la utilización de probióticos, prebióticos, postbióticos, simbióticos y el trasplante fecal. (63)

### **3.1. Probióticos.**

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), los probióticos son microorganismos vivos no patogénicos que administrados en una adecuada cantidad confieren beneficios de salud al huésped. En la actualidad los probióticos se están utilizando de una forma bastante amplia, en la cual ganan especial importancia las cepas de *Bifidobacterium* (*Bifidobacterium breve* y *Bifidobacterium longum*) y *Lactobacillus* (*Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei* y *Lactobacillus rhamnosus*), provenientes de la microbiota intestinal humana sana o como componentes que se encuentran presentes en los productos de consumo diario. También se han utilizado otros géneros bacterianos como el *Streptococcus*, *Bacillus*, *Enterococcus* y levaduras de *Saccharomyces* (63).

La utilización de probióticos a nivel intestinal se ha visto beneficiosa en el equilibrio y la restauración de la microbiota intestinal, la protección contra patógenos, en la acción inmunomoduladora y el mantenimiento de la integridad de la barrera intestinal. Los probióticos no deben ser patogénicos, ni tóxicos y ser capaces de sobrevivir y metabolizarse en el ambiente intestinal (resistiendo a la acción de los ácidos orgánicos, las sales biliares, el bajo pH del estómago y la acción de las enzimas intestinales). Además, deben mantener una composición constante mientras ejercen sus efectos y durante el almacenamiento de estos microorganismos hasta su utilización. Como hemos visto se pueden administrar de manera conjunta diferentes combinaciones de cepas microbianas y también se pueden administrar de forma combinada con los prebióticos, denominándose esta combinación como “simbióticos” (64).

Los probióticos evitan la colonización de otros patógenos mediante la acidificación del pH (mediante la producción de ácido láctico) y compitiendo con ellos por la adhesión y colonización, los nutrientes y los factores de crecimiento del intestino, además se unen directamente a algunas bacterias Gram negativas patógenas evitando su crecimiento bacteriano. También está descrito el papel inmunomodulador, la regulación de la inflamación y la mejora de la función de barrera epitelial de la mucosa y el consiguiente efecto de prevención de inflamación crónica, el aumento de absorción de electrolitos intestinales y el efecto beneficioso sobre la motilidad intestinal y el estreñimiento (63).

#### **3.1.1 Adhesión mucosa intestinal.**

La adhesión a la mucosa intestinal por parte de la microbiota y por tanto de los probióticos, es un requisito previo para establecer la colonización del intestino por estos organismos y se considera esta necesaria para el desarrollo de las funciones de modulación del sistema inmune y del antagonismo contra patógenos. De esta forma, que los probióticos consigan esta adhesión para desempeñar sus acciones beneficiosas es una característica importantísima en la selección de cepas bacterianas con posible potencial beneficioso. Las bacterias productoras de ácido láctico que conforman muchos

de los probióticos habituales, presentan determinantes en su superficie que interactúan con las células epiteliales intestinales y el moco que estas secretan, lo cual establece una asociación específica entre las proteínas de la superficie de las bacterias probióticas y la exclusión de patógenos del moco. Varias proteínas, como la proteína de unión al moco (MUB) presentes en *Lactobacillus*, promueven la ligación y además estas bacterias muestran adhesinas superficiales que median la unión a la mucosa. Estos procesos están mediados principalmente por proteínas, pero también se ven implicados restos sacáridos y ácidos lipoteicoicos, ya que suelen ser proteínas secretadas por las bacterias al exterior y que se anclan a la membrana a través de restos lipídicos o están incrustadas directamente sobre la pared celular. Estas proteínas desempeñan un papel facilitador de la colonización a través de la degradación de la matriz extracelular de las células epiteliales intestinales o facilitando un contacto cercano con el epitelio intestinal. Como ejemplo tenemos la adhesina MapA que media en la unión de *L. reuteri* y *L. fermentum* al moco. Probióticos basados en *L. plantarum* inducen las mucinas MUC2 y MUC3 e inhiben la adherencia de *E. coli* enteropatógena, lo que indica que las capas mucosas mejoradas y el glicocalix que recubre el epitelio intestinal así como la ocupación de sitios de unión microbiana por *Lactobacillus spp.* proporcionan protección contra la invasión de patógenos (65).

### 3.1.2 Efecto inmunomodulador.

Las bacterias que componen los probióticos presentan propiedades inmunomoduladoras y ejercen un papel protector frente a potenciales infecciones. De manera específica, cada cepa de bacterias y de forma dependiente de la dosis administrada, puede modular las respuestas inmunes celulares no específicas mediadas por macrófagos, linfocitos natural killer (NK), linfocitos T citotóxicos específicos de antígenos y la liberación de citocinas. De manera inespecífica a través de la respuesta inmune innata, los probióticos provocan una mayor producción de interleucina 12 (IL-12) por parte de las células presentadoras de antígeno y la posterior activación de las NK del huésped y la promoción de la respuesta de linfocitos T helper 1 (Linfocitos-Th1). Los probióticos también mejoran la inmunidad adquirida, inducen la secreción de IgA en el intestino con la activación de linfocitos B y T.

No quedan claros los mecanismos moleculares por los cuales cada cepa probiótica ejerce estas acciones sobre la vía inmune, además el uso concomitante de varias cepas en los productos probióticos hace que ciertas especies pueden inhibir el efecto estimulante de otras. Se han notificado diferencias en el grado de estimulación del sistema inmune entre unas cepas probióticas y otras, o entre las diferentes combinaciones de estas (63).

A continuación son descritas las acciones inmunomodulantes observadas con el uso de probióticos:

Respuesta antiinflamatoria: Los probióticos confieren respuestas antiinflamatorias mediante varias vías de señalización. Dentro de los efectos antiinflamatorios ejercidos por los probióticos se encuentra la mejora de la integridad de la barrera epitelial del intestino, la atenuación de la disfunción de barrera ejercida por las citoquinas proinflamatorias y la modulación de la respuesta reguladora T. Se ha observado que los probióticos conformados por *Lactobacillus* y bifidobacterias regulan negativamente la producción de mediadores inflamatorios (citocinas) como IL-6 y TNF- $\alpha$  tras la exposición

a compuestos proinflamatorios como el lipopolisacárido (LPS) de las células epiteliales intestinales y a otros niveles, ya que también es observada una disminución de biomarcadores proinflamatorios a nivel plasmático (63,66).

Mejora de la integridad de la barrera epitelial: La barrera epitelial intestinal es un mecanismo de defensa frente a las infecciones y colonizaciones patógenas. Esta conformada por la capa mucosa, los péptidos antimicrobianos, la IgA secretora y el complejo de adhesión entre células epiteliales (zona ocludens). La administración de probióticos tras el daño de la mucosa intestinal por determinados eventos patológicos como la infección por *E.coli*, inicia y fomenta la reparación de la barrera epitelial. En un estudio con cultivos de células epiteliales intestinales humanas (enteroideas y colonoides) se observó que la administración previa de *L.rhamnosus Gorbach-Goldin*, contrarresta el daño a nivel de la zona ocludens y la ocludia (uniones estrechas entre las células epiteliales) tras la administración de IFN- $\gamma$  (una citocina proinflamatoria humana que en determinadas cantidades provoca una disrupción en la barrera epitelial) (67).

Los probióticos no solo ayudan en la reparación de la integridad de la mucosa tras el deterioro de esta por procesos patológicos, sino que también, bloquean la entrada de patógenos en las células epiteliales intestinales a través del aumento de la barrera mucosa al estimular la liberación de gránulos de mucina de las células caliciformes ya que se regula la expresión de los genes de secreción mucosa, y mediante el mantenimiento de la permeabilidad intestinal al aumentar la integridad intercelular de las uniones epiteliales apicales (zonula ocludens) (21).

Receptores TLR-2: Los receptores tipo toll (TLRs), son proteínas transmembranas que se encuentran en varias células del sistema inmune y de otros sistemas. Su principal función es el reconocimiento de componentes microbianos y la consiguiente regulación de la actividad inmunológica innata y adaptativa. Hay 11 tipos de receptores Toll, lo que permite que la inmunidad innata reconozca diferentes grupos de patógenos al tiempo que inicia respuestas inmunológicas adecuadas. En humanos TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y TLR10, reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP) encontrados a nivel de la superficie bacteriana.

El receptor TLR2 es necesario para que cepas probióticas ejerzan sus efectos inmunomoduladores y antiinflamatorio, ya que su activación es importante en la regulación de las vías de señalización inflamatoria para las bacterias Gram positivas y aumentan la resistencia transepitelial impidiendo la acción de las bacterias invasoras. Contrariamente, mutaciones en el gen que codifica TLR2 se asocia a Enfermedad Intestinal Inflamatoria (EII) grave. Por tanto, la estimulación de TLR2 por bacterias probióticas puede desempeñar efectos favorables a nivel intestinal, generando un estado antiinflamatorio que mantiene la integridad de la barrera intestinal (63).

Inflammasoma NLRP3: También es conocido que los receptores tipo NOD (dominio de oligomerización de nucleótidos), llamados NLR, transmiten señales tras la interacción con la microbiota intestinal. En particular, el inflammasoma NLRP3 es importante para el mantenimiento de la integridad epitelial y la defensa contra la infección por patógenos en el intestino (63).

### **3.1.3 Efecto protector frente a patógenos bacterianos.**

Como ya he descrito la microbiota intestinal presenta un papel relevante en el fortalecimiento de la barrera epitelial intestinal, impidiendo así la acción de patógenos entéricos. Se ha demostrado que probióticos ricos en *Lactobacillus* (principalmente), *Streptococcus thermophilus* y *Bifidobacterias*, inhiben una amplia gama de enteropatógenos, como *E. coli*, *Salmonella*, *Helicobacter pylori*, *Listeria monocytogenes* y rotavirus. Estos efectos consisten en la inhibición del crecimiento de patógenos por la producción de compuestos antimicrobianos, la competencia por los recursos disponibles, la lucha contra los efectos de las toxinas, la inhibición de la virulencia, los efectos antiadhesivos y antiinvasores y la exclusión competitiva por la competencia por los lugares de unión. Además ha sido demostrado que probióticos cuya composición principal es el *Lactobacillus* reducen la formación de biopelículas de bacterias patógenas como *Listeria Monocytogenes*, a través de la competencia, la exclusión y el desplazamiento.

Exclusión competitiva de microorganismos patógenos: Las propiedades de adhesividad específicas debido a la interacción entre las proteínas superficiales y las mucinas pueden inhibir la colonización de bacterias patógenas y son el resultado de la actividad antagonista de algunas cepas de probióticos contra la adhesión de patógenos gastrointestinales. La exclusión competitiva por bacterias intestinales se basa en una interacción de bacteria a bacteria mediada por la competencia por los nutrientes disponibles y por los sitios de adhesión de la mucosa.

Los lugares de unión de *Lactobacillus*, *Bifidobacterias* y enteropatógenos como *E.Coli*, *Salmonella* y *H.pylori* entre otros, son comunes en las células epiteliales del huésped, estos comparten especificidades de unión a carbohidratos. Esto genera una competencia entre estas cepas y los patógenos específicos en la unión a receptores de las células intestinales del huésped. (65)

También se ha observado que *Bifidobacterium breve* y diferentes especies de *Lactobacillus* evitan la acción de los patógenos virales ya que inhiben la absorción del virus en las células intestinales, principalmente por el efecto estérico (impedimento estérico), fortificando la barrera epitelial de la mucosa y por la competencia por los receptores virales en los enterocitos. Los probióticos también tienen propiedades antifúngicas, por ejemplo, *Lactobacillus reuteri* contra el crecimiento de *Candida* (63).

Producción de sustancias antimicrobianas: Uno de los mecanismos por los cuales los probióticos parecen beneficiosos para la salud, es la producción de compuestos de bajo peso molecular como el ácido láctico y el ácido acético principalmente y otros compuestos como las bacteriocinas, que ejercen un papel antimicrobiano.

Los ácidos orgánicos ejercen un efecto inhibitorio en el crecimiento de bacterias Gram negativas. La forma no disociada del ácido orgánico penetra al citoplasma bacteriano y se disocia. La disminución del pH al liberar protones y la acumulación intracelular de la forma ionizada del ácido orgánico conduce a la muerte del patógeno (65).

Las bacteriocinas son producidas principalmente por bacterias Gram positivas (sobre todo bacterias ácido lácticas), por ejemplo lactacina B de *L. acidophilus*, plantaricina de *L. plantarum* y nisina de *Lactococcus lactis*. Estas presentan un espectro de actividad estrecho y actúan solo contra bacterias específicas, pero también se ha visto que algunas bacteriocinas también son activas contra patógenos transmitidos por alimentos. Los mecanismos de actuación de las bacteriocinas en la destrucción celular

consisten en la formación de poros en las membranas celulares o la inhibición de la síntesis de la pared bacteriana. La nisina por ejemplo, forma un complejo con el último precursor de la pared celular, el lípido II, inhibiendo así la biosíntesis de la pared celular de los bacilos formadores de esporas. Posteriormente el complejo agrega e incorpora péptidos para formar un poro en la membrana bacteriana (68).

Cepas de específicas Bifidobacterium, como la *B. bifidum* NCFB 1454 productoras de Bifidocina B, ejercen función antimicrobiana frente a bacterias Gram positivas. Otras cepas de Bifidobacterium parecen generar moléculas de bajo peso molecular como proteínas que parecen tener efecto sobre Gram negativos como la *Salmonella enterica* y *E.coli* (68).

Las bacterias probióticas también son capaces de producir los ácidos biliares desconjugados, derivados a partir de las sales biliares. Estos ácidos biliares desconjugados muestran una actividad antimicrobiana más fuerte en comparación de las sales biliares sintetizadas por el organismo huésped (65).

Las cepas probióticas inducen la liberación de defensinas por parte de las células epiteliales, pequeños péptidos que actúan como primera línea de defensa química frente a la invasión de patógenos. Estas proteínas antimicrobianas (PAM) son las defensinas  $\alpha$  y  $\beta$ , catelicidinas, lectinas de tipo C y ribonucleasas. Muchas de estas proteínas antimicrobianas son enzimas que destruyen las bacterias mediante el ataque a la pared o la membrana bacteriana y muchas de ellas son secretadas por la células de Paneth. La lisozima hidroliza el enlace glucosídico del peptidoglucano de la pared y de fosfolípidos de la membrana bacteriana como la fosfolipasa A2. Las defensinas realizan una interacción no específica y se unen principalmente a los grupos fosfolípidos aniónicos de la superficie de la membrana a través de interacciones electrostáticas. Esta interacción crea poros de defensina en la membrana bacteriana que interrumpen la integridad de la membrana y promueven la lisis de microorganismos. Las catelicidinas son péptidos  $\alpha$ -helicoidales catiónicos, que al igual que las defensinas se unen a las membranas bacterianas a través de interacciones electrostáticas e inducen la alteración de la membrana (65).

### 3.2. Prebióticos.

En 1995 se estipula la primera definición de prebióticos y se denominaron como “ingredientes alimenticios no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped al estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de bacterias residentes en el colon”. Esta definición fue modificándose con los años según los avances científicos de la época llegando hasta la definición vigente actualmente y que fue definida en 2017. Esta afirma que los prebióticos son sustratos utilizados selectivamente por los microorganismos del huésped que confieren un beneficio para la salud. Actualmente los prebióticos ya no son considerados únicamente como impulsores del crecimiento de bifidobacterias y lactobacilos del colon, sino que se les reconocen amplios efectos sobre la homeostasis metabólica y fisiológica del sistema e incluso propiedades de mejora del estado terapéutico (69).

Debemos tener en cuenta que los microorganismos vivos que conforman la microbiota y los probióticos viven en ecosistemas funcionales complejos, para entender cómo funcionan los prebióticos y como utilizarlos para modificar la microbiota en beneficio de la salud.

Los prebióticos más utilizados son los carbohidratos, aunque también destacan polifenoles, y ácidos grasos poliinsaturados. Polifenoles que encontramos en la parte insoluble del cacao, han demostrado aumentar el crecimiento de bifidobacterias, lactobacilos y butirato. Recordar que gran parte de la metabolización de carbohidratos como los polisacáridos que realizan las bacterias presentes en la microbiota acaban en la producción de AGCC como el acetato, butirato y propionato (19).

La respuesta del ecosistema frente a la presencia de carbohidratos depende del microorganismo dominante en la microbiota intestinal. Cuando el microorganismo predominante es del género *Prevotella*, la fermentación de carbohidratos es más veloz y el perfil de AGCC que se producen son diferentes a cuando el microorganismo predominante es del género de *Bacteroides* (que es el habitual). Se realizó un cultivo de inóculos fecales ricos en *Prevotella* o en *Bacteroides* junto con fructooligosacáridos prebióticos o con arabinosilanos diferentes, y se obtuvo un perfil de AGCC diferente que se correlacionaba con el microbioma. Los cultivos cuya especie predominante fue *Prevotella*, produjeron proporciones más altas de propionato, acetato y butirato que los cultivos con *Bacteroides* como microorganismo predominante (70).

A los prebióticos se le han atribuido las siguientes acciones (**Figura 3**):

Defensa contra patógenos: Mediante la utilización de sistemas modelo tipo in vitro, se ha observado un aumento en la producción de ácidos orgánicos y la propagación de bacterias beneficiosas como consecuencia de la reducción del pH luminal que inhibe el crecimiento de patógenos, tras la administración de prebióticos. Estudios realizados en personas mayores han mostrado que un consumo diario de galactooligosacáridos (GOS) induce una mayor actividad fagocítica y de las células tipo natural killers, favoreciendo así la acción del sistema inmune frente a microorganismos patógenos (21,71).

Modulación inmune: Aunque los mecanismos exactos no están claros, existe evidencia de que la intervención prebiótica puede reducir las respuestas de ayuda T tipo 2 y, por lo tanto, afectar la alergia. Los datos más favorables provienen de estudios en lactantes. La administración de GOS y fructooligosacáridos (FOS) de cadena larga en fórmulas infantiles en un ensayo clínico de doble ciego, aleatorizado y controlado con placebo en 259 lactantes se asoció con una reducción en la incidencia de hasta el 50% en la dermatitis atópica, sibilancias y urticaria en comparación con aquellos que fueron alimentados con una fórmula que no contenía estos prebióticos (72). En otro estudio prospectivo, doble ciego controlado con placebo en recién nacidos a término y sanos, se vio que la administración de una fórmula hipoalérgica suplementada con prebióticos durante 6 meses tras el nacimiento, redujo en más de 5 veces la prevalencia de alergias durante los 5 años posteriores tras la alimentación con los suplementos prebióticos, en los lactantes que recibieron la suplementación (21).

Aumento en la absorción intestinal de calcio: La absorción de minerales a nivel intestinal es dependiente de un proceso de transporte activo. La fermentación de prebióticos por parte de la microbiota intestinal, aumenta la producción de AGCC, generando una reducción del pH luminal. Esta reducción del pH aumenta la solubilidad del calcio favoreciéndose su absorción intestinal de forma pasiva. Existe un problema, y es que muchas de las sales de calcio existentes en los suplementos alimenticios y alimentos, tienen una solubilidad dependiente del pH y una disponibilidad limitada.

Dependiendo del pH inicial, la solubilidad del calcio se ve alterada e incluso puede aumentar con el aumento del pH (21). En varios estudios se ha demostrado que adolescentes que consumen una mezcla de FOS e inulina o GOS, muestran un aumento en la absorción y en la mineralización ósea de calcio. Esta intervención temprana podría reducir la incidencia de una futura osteoporosis. Esta hipótesis ha sido respaldada por datos generados en modelos animales, pero faltan estudios a largo plazo en humanos (73).

Mejora la función intestinal: Principalmente en el aumento del volumen fecal por el aumento de fibra. Además, la retención de agua por parte de los carbohidratos prebióticos genera un efecto humectante que ablanda las heces, viéndose una mejora en la consistencia y la frecuencia de defecación objetivada en varios ensayos clínicos aleatorios. Otro punto a tener en cuenta es que el aumento de la fermentación de los prebióticos añadidos por parte de la microbiota intestinal, incrementa los niveles de AGCC que ejercen función reguladora sobre las hormonas intestinales provocando respuestas motoras intestinales locales (21).

Efectos metabólicos: Los efectos metabólicos presentados por los prebióticos consisten en una mayor producción de AGCC que mejoran la función de barrera en el intestino impidiendo la traslocación de LPS bacterianos que se han visto relacionados con la aparición de enfermedades metabólicas como la diabetes y obesidad en modelos experimentales (74). También regulan positivamente la homeostasis de la glucosa, reducen la inflamación y el perfil lipídico en sangre en humanos. La administración de GOS junto con inulina mejora los marcadores inflamatorios en individuos con obesidad, en estudios ejecutados a corto plazo, ya que el efecto sobre la salud metabólica durante un largo periodo de consumo aún no ha sido establecido (75,76). En estudios in vitro se ha observado que la administración de GOS estimula directamente la expresión de proteínas de unión estrecha (zonula occludens) en las células epiteliales intestinales, disminuyendo así el flujo transepitelial, sin embargo GOS se fermenta en el intestino de forma que la medida en la que GOS actúa a nivel in vivo no está clara. La inulina presenta un efecto de mejoría en la respuesta glucémica y parece que es explicado por la inhibición directa del complejo enzimático intestinal isomaltasa-sacarasa, aunque esto ha sido descrito únicamente en ratones (21,76).

Efecto sobre la saciedad: Los AGCC que son producidos por la fermentación prebiótica en el intestino interactúan con receptores específicos de los ácidos grasos como FFAR2 y FFAR3 (Free fatty acid receptors) regulando la lipólisis y la liberación de incretinas “péptido 1 similar al glucagón” (GLP-1: glucagon-like peptide-1). Estos receptores se encuentran expresados en muchos tejidos del organismo, siendo así clave en la relación que se establece entre la fermentación prebiótica y el bienestar sistémico. Los AGCC interactúan con las células tipo L que se encuentran en el colon y que producen hormonas anorexigénicas como GLP-1 y péptido YY (PYY). Además, los AGCC resisten al metabolismo colónico llegando a través del sistema porta al hígado donde el propionato estimula la gluconeogénesis que actúa como señal de saciedad. A nivel sistémico, los AGCC interactúan con los receptores FFAR2 y FFAR3 que se encuentran en el tejido adiposo, estimulando la secreción de leptina que favorece una disminución del apetito a nivel hipotalámico. (21,77)

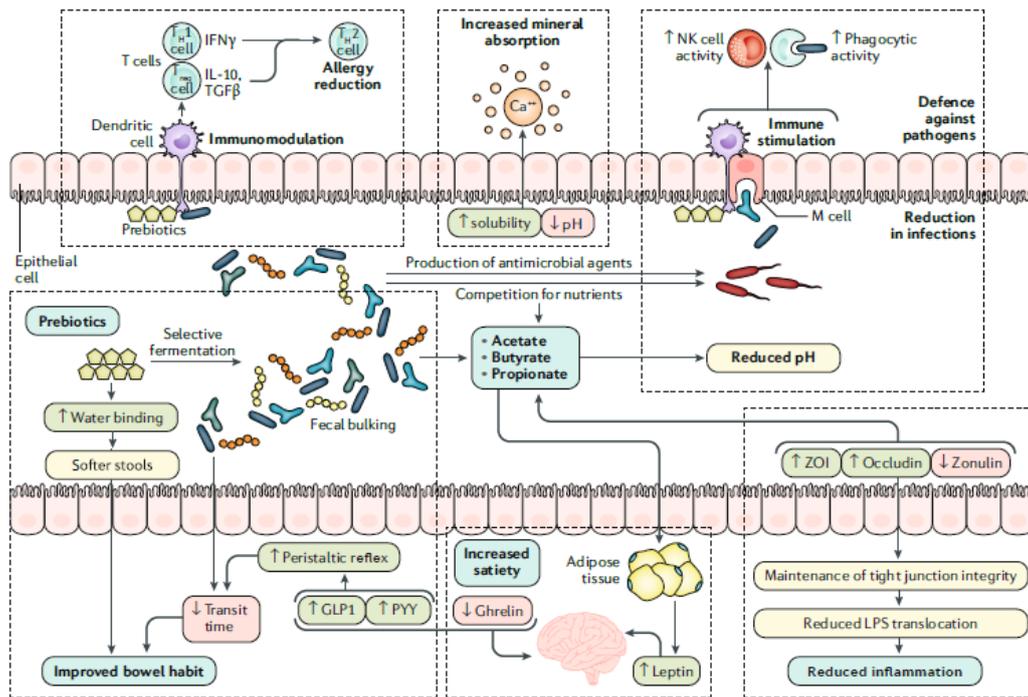


Figura 3. Acciones de los prebióticos. Tomada de: Sanders, 2019

### 3.3 Trasplante fecal.

El trasplante fecal o la transferencia de microbioma intestinal es ampliamente utilizado en las infecciones recurrentes por *C.difficile* y se utiliza para mejorar la disbiosis presente en el individuo, que facilita la infección por los diferentes microorganismos (*C.difficile* el más conocido) (78). El trasplante fecal restaura la composición y la funcionalidad de la microbiota intestinal. Como ya hemos comentado la microbiota desempeña funciones homeostáticas en el metabolismo y la disbiosis puede explicar diferentes trastornos metabólicos, por ello se plantea el trasplante fecal como intervención en la obesidad y enfermedades metabólicas (79).

El trasplante fecal requiere de la transferencia de la comunidad microbiana intestinal del donante al tracto gastrointestinal del receptor y así modificar la población microbiana y revertir el proceso patológico y promover un estado saludable de la microbiota.

#### 3.3.1 El donante.

Los ensayos clínicos con el trasplante fecal en la infección recurrente por *C.difficile*, han utilizado donantes anónimos, cónyuges o parientes de los afectados. Existe una falta de estandarización para la selección de donantes y no se ha caracterizado claramente a los donantes que favorecerán un trasplante fecal exitoso.

A partir de ensayos clínicos realizados sobre la eficacia del trasplante fecal, se observa que los indicadores de buen pronóstico principales son, una gran biodiversidad bacteriana en los donantes y una alta presencia de los taxones bacterianos específicos como *Bifidobacterium spp.* y *Akkermansia spp.* (80).

Los protocolos que pautan los trasplantes fecales presentan requisitos exigentes a la hora de determinar los donantes de microbiota fecal. Los donantes son

entrevistados para identificar comportamientos de alto riesgo, someterse a pruebas de sangre y heces exhaustivos que descarten agentes infecciosos que pudieran repercutir en el receptor del trasplante(78)(78)(78)(78)(78)(78)(78). Los donantes asintomáticos no pueden dar positivo para *H.pylori* para evitar la inducción de úlcera péptica y es importante descartar que los donantes puedan albergar microorganismos resistentes a múltiples fármacos (78).

También es importante excluir aquellos potenciales donantes que presenten antecedentes de trastornos gastrointestinales, autoinmunes, neurológicos, tumores malignos, obesidad, síndrome metabólico o desnutrición para evitar teóricas transmisiones de trastornos de los donantes a los receptores y es que en los trasplantes realizados por infecciones por *C.difficile* se vio que algunos de los receptores aumentaron de peso o desarrollaron enfermedades autoinmunes (78,81–83). Así mismo la transmisión de trastornos malignos, metabólicos y neuropsiquiátricos se han demostrado en modelos animales (81).

Otros factores que desempeñan un papel importante en el trasplante fecal son el sexo, la edad y si los donantes y receptores comparten grupo sanguíneo. Estas diferencias se explican porque las hormonas sexuales interfieren en las vías inmunológicas y por la expresión diferencial de genes en el cromosoma X que presentan un papel en las respuestas inmunes frente a patógenos (84). En relación con esto se plantea la utilización de parientes como donantes en el trasplante fecal. Los familiares cercanos pueden presentar una composición bacteriana más similar y por tanto el microbioma intestinal del donante puede ser mejor tolerado por el sistema inmune del receptor. Por otro lado, un donante no relacionado con el receptor puede ser beneficioso si la causa de la disbiosis bacteriana que presenta el receptor presenta una etiología de características familiares o ambientales. La composición filogenética de la microbiota intestinal es dinámica y muestra variaciones interindividuales de unas edades a otras y en relación al sexo, por lo que parece importante identificar la edad y sexo del donante para conseguir un trasplante fecal exitoso (5,78,85).

### **3.3.2 El receptor.**

La compatibilidad donante-receptor es importante en el éxito del trasplante fecal. En diversos estudios se observó que receptores que recibían un trasplante fecal del mismo donante presentaron distintas respuestas en el éxito de la colonización intestinal, obteniendo un menor éxito en aquellos receptores con síndrome metabólico. Los receptores que tienen cepas microbianas comunes con el donante, aunque los niveles de estas en el receptor fueran más bajos, presentaron una mayor tasa de eficacia en el trasplante fecal que los que no (78,80).

Las interacciones entre la genética del receptor y el microbioma del donante son fundamentales en la viabilidad y el éxito del trasplante fecal. La genética del receptor contribuye en el tipo de entorno fisiológico intestinal que el receptor posee que, junto con la dieta, el ejercicio y los fármacos tomados anteriormente (antibióticos, sobre todo) definen la composición del microbioma intestinal (5,86). Además, existe la relación previa al trasplante entre del sistema inmune y la microbiota intestinal del receptor, que puede generar diversas respuestas a la terapia. Por lo tanto, la detección de compatibilidades inmunológicas entre el donante y el receptor y el control cuidadoso de

la ingesta alimentaria, la actividad física y los medicamentos del receptor después del trasplante fecal pueden mejorar la efectividad del tratamiento (80,87).

El viroma intestinal del receptor previo al trasplante fecal puede ser un factor determinante en el éxito de este. Hay dos tipos de virus predominantes en el viroma intestinal, los bacteriófagos que son virus que infectan bacterias y los virus eucariotas que infectan al huésped y otras células eucariotas. Los virus bacteriófagos son los que pueden modular la composición y función del microbioma intestinal y por consiguiente los que pueden condicionar el éxito del trasplante fecal (78,88). En pacientes con colitis ulcerosa, con una menor diversidad viral eucariota se asociaron mejores resultados en el trasplante fecal que en los que presentaban una biodiversidad alta. Por el contrario, la implantación de un viroma con una mayor diversidad de bacteriófagos en los receptores que sufrieron una infección previa por *C.difficile* presentaron un mejor resultado en el trasplante fecal (89,90).

### 3.3.3 Ejecución del trasplante fecal.

El procesamiento de las heces utilizadas en el trasplante fecal es uno de los pasos clave. Se utilizan condiciones aeróbicas o anaeróbicas de procesamiento, heces frescas o heces congeladas y es importante la cantidad adecuada de microbiota presente en las heces. Lo más importante es que el proceso de procesamiento sea lo más breve posible y que la cantidad de material fecal sea el suficiente para el trasplante fecal (91).

Existen dos rutas de administración, la ruta de administración gastrointestinal superior por sonda nasogástrica, endoscopia y cápsulas y la ruta de administración gastrointestinal inferior (colonoscopia, sigmoidoscopia y enemas). Las cápsulas son un método novedoso que se puede utilizar en pacientes en los que los procesos mecánicos no son una opción debido a una situación médica más delicada. Estas presentan material fecal fresco o heces liofilizadas (deshidratadas) y se encuentran doble o triplemente encapsuladas para evitar la digestión ácida del estómago (85).

En la preparación para recibir un trasplante fecal tenemos dos posibilidades, los antibióticos y el lavado intestinal con polietilenglicol. En las infecciones por *C.difficile* se recomienda el tratamiento previo con antibióticos vía oral como la vancomicina, fidaxomicina o metronidazol durante 3 días y el lavado intestinal para reducir el número de bacterias *C.difficile* y potenciar de esa forma el éxito del trasplante fecal (91). En la obesidad y las enfermedades metabólicas no hay pruebas suficientes para apoyar el pretratamiento con antibióticos o el lavado intestinal para aumentar la eficacia, aunque en la mayoría de los ensayos clínicos se realiza previamente, el lavado intestinal a los pacientes (78).

Es importante la frecuencia de administración de material fecal en el trasplante. En la infección por *C.difficile* son necesarias infusiones fecales repetidas para conseguir la remisión clínica. En un ensayo clínico donde se realizó un régimen intensivo de instilaciones de materia fecal para tratar la colitis ulcerosa, se repitió el procedimiento 5 días por semana durante 8 semanas para conseguir la remisión en el 27% de los pacientes, en comparación con la remisión del 8% observada en el grupo placebo (92). Por el contrario, en otro ensayo clínico se administró el material fecal al inicio y una única repetición más 3 semanas después, que no mostró ninguna diferencia significativa en los pacientes con colitis ulcerosa que recibieron un trasplante fecal de donantes sanos versus trasplante fecal autólogo (93).

Es importante determinar el momento óptimo para repetir el trasplante fecal. En el trasplante fecal realizado en pacientes con enfermedad de Crohn se demostró que el tiempo medio para repetir el trasplante y mantener la remisión clínica era aproximadamente de 4 meses y también se observó que el tiempo medio para mantener la remisión clínica después de la segunda instilación del trasplante fecal era aproximadamente de 6 meses, por lo tanto, los trasplantes fecales en serie inducen la remisión y además prolongan la eficacia de los trasplantes fecales anteriores. (78,94)

### **3.4 Simbióticos.**

Los simbióticos son mezclas sinérgicas de prebióticos y probióticos que presentan efectos beneficiosos sobre el huésped al mejorar la supervivencia y colonización de microorganismos vivos beneficiosos en el tracto gastrointestinal del huésped (95). Estos al igual que los probióticos y los prebióticos, modulan la composición de la microbiota y la producción de metabolitos microbianos (95). Fórmulas de alimentación para lactantes con simbióticos han demostrado favorecer el correcto crecimiento en lactantes que mostraban alergia a la leche de vaca, y modular la microbiota intestinal previniendo los síntomas similares al asma en lactantes con dermatitis atópica (96). También se ha observado que la suplementación con simbióticos formados por scGOS (galactooligosacáridos de cadena corta), lCFOS (fructooligosacáridos de cadena larga) y *Bifidubacterium breve* en los recién nacidos por cesaria, compensa la colonización tardía por cepas de *Bifidubacterium* que presentan estos niños, y que son importantes en la producción de acetato y en la acidificación del intestino. Estos procesos fisiológicos son indicadores de salud intestinal en los bebés nacidos por vía vaginal (96,97).

La utilización de los simbióticos en adultos parece tener un papel positivo en la regulación del estreñimiento, la disminución de la glucemia en ayunas y la disminución del riesgo a una sepsis postoperatoria después de una cirugía gastrointestinal (97,98).

### **3.5 Postbióticos.**

La utilización de probióticos es generalizada en los suplementos dietéticos y alimenticios, fórmulas infantiles de alimentación e incluso en productos sanitarios, convirtiéndose en opciones terapéuticas de diversas enfermedades. Sin embargo, existen potenciales inconvenientes con relación a su uso, como problemas de seguridad al utilizar microorganismos vivos en poblaciones vulnerables (recién nacidos e inmunodeprimidos), donde existe riesgo de traslocación bacteriana desde el intestino a la circulación sistémica. (63)

En busca de alternativas para solucionar estos posibles efectos secundarios, existe evidencia en la utilización de preparaciones de compuestos bioactivos producidos por microorganismos durante procesos de fermentación. Estos compuestos contienen células microbianas, constituyentes celulares y metabolitos bacterianos y pueden ejercer respuestas biológicas relevantes en la restauración de la homeostasis intestinal normal de forma similar a las bacterias vivas (63,97).

La eficacia postbiótica se basa en los metabolitos microbianos, proteínas, lípidos, carbohidratos, vitaminas, ácidos grasos orgánicos, componentes de la pared celular u otras moléculas generadas en los procesos de fermentación. También mediante procedimientos como ciclos de calor, la sonicación, la irradiación con rayos gamma o

ultravioleta y el sometimiento de las bacterias a altas presiones se obtienen componentes bacterianos con papel postbiótico (97,99).

Estos componentes presentan actividad antiinflamatoria e inmunomoduladora, mediante la estimulación del sistema inmunitario innato, las respuestas adaptativas y a través de su efecto sobre la integridad de la membrana mucosa intestinal (100). Estos activan los receptores tipo toll, otros receptores de transducción del epitelio intestinal, receptores de células dendríticas y otras células intestinales del sistema inmune (101). Además los postbióticos poseen acción antimicrobiana y ejercen efectos de antagonismo bacteriano a través de la competición con los patógenos en la adhesión y colonización intestinal (101). Han demostrado tener cierto beneficio en diferentes indicaciones sobre neonatos como evitar el riesgo de translocación desde la luz intestinal a la sangre, evitar la adquisición y retransferencia de genes de resistencia a antibióticos y evitar la interferencia con la colonización normal de la microbiota intestinal (63).

Existen dos tipos de postbióticos; los paraprobióticos que son células microbianas muertas inactivadas o restos de los componentes microbiológicos, que cuando son administrados en cantidades suficientes confieren beneficios al huésped y las FIFs (fórmulas infantiles fermentadas), que consisten en fórmulas fermentadas por bacterias productoras de ácido láctico y que no presentan bacterias viables en su formulación (97,99).

Los postbióticos aumentan el potencial beneficioso de los microorganismos que conforman la microbiota y eluden el desafío técnico que supone la correcta colonización y mantenimiento estable de los microorganismos que si presentan los probióticos y del trasplante fecal. Esto facilita la entrega de los componentes activos en la ubicación intestinal deseada, mejora la vida útil y favorece el transporte y almacenamiento farmacéutico de estos compuestos (97).

### **3.5.1 Bacterias inactivadas por calor.**

La inactivación bacteriana por calor genera una lisis bacteriana y la consiguiente pérdida de viabilidad. Aún después de esto, estas bacterias presentan efectos inmunomoduladores (63,102). Las bacterias fermentadoras del ácido láctico inducen la secreción de IL-12, mejorando la actividad innata. Parece que *Lactobacillus paracasei* presenta una mayor capacidad para inducir la secreción de IL-12(102).

También se realizó una combinación de varias especies de bacterias del ácido láctico (*L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* y *Enterococcus faecium*) donde se observó una mejoría en la acción macrófaga en la actividad inmunomoduladora en un modelo murino, en comparación con la administración de estas mismas bacterias, pero en este caso vivas (102).

Las cepas probióticas alteradas por calor mantiene su capacidad para inducir la producción de IgA, como se observa en muestras fecales de bebés prematuros, que fueron tratados con una formulación de *S.thermophilus* inactivados por calor (103).

Las cepas bacterianas muertas por calor también tienen efecto en el mantenimiento de la integridad de la barrera mucosa. La cepa OLL2838 de *L. rhamnosus* atenuada por calor protege frente al aumento de la permeabilidad de la mucosa intestinal en ratones con colitis inducida (102). Cepas de *Lactobacillus acidophilus* destruidas por calor, contrarrestan el aumento de permeabilidad paracelular observado en cultivos celulares infectados por *E. Coli* C1845 (63). En un estudio en ratas en el que

se valoraba la lesión intestinal aguda ejercida por alcohol, la administración de un probiótico formado por *B. breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*, tras la realización del tratamiento térmico, se observó que protegieron significativamente la citoarquitectura de la barrera intestinal, evitando el paso de endotoxina y otros productos bacterianos desde la luz intestinal hacia la circulación portal y regulando negativamente la expresión de TNF- $\alpha$  (63).

Diferentes cepas de *Lactobacillus* destruidos por calor compiten por los lugares de adhesión a nivel gastrointestinal con microorganismos patógenos intestinales que causan cuadros diarreicos (*E. coli*, *Campylobacter* y *H. pylori*) (63). El *L. plantarum* destruido por calor protege contra la infección por *Salmonella* en ratones y redujo la translocación de este a diferentes órganos (hígado y bazo) al inhibir la adhesión e invasión del patógeno (97,104). La administración de *Lactobacillus johnsonii* inactivado por calor inhibe el crecimiento de *H. pylori* in vitro y además el número de *H. pylori* en el estómago de ratones infectados disminuyó significativamente tras la administración oral repetida de cepas de *Lactobacillus* expuestas a ciclos de calor (105). La administración de bifidobacterias inactivadas por ciclos térmicos ha demostrado una mayor resistencia a la infección por *Salmonella* en ratones, además, en un estudio in vitro se observa que la administración de *Bifidobacterium* BB12 inactivada por calor interfiere con la formación de biopelículas de *Streptococcus mutans* en la cavidad bucal (97,106).

### 3.5.2 Componentes de la pared bacteriana.

La utilización de los componentes de la pared bacteriana celular como postbióticos ejerce una acción inmunomoduladora. (63).

Ácidos lipoteicoicos: En estudios realizados con ratones, se observó que los ácidos lipoteicoicos activan las funciones inmunes innatas al convertirse en inductores de IL-12 en células del bazo cultivadas (incluidas células dendríticas esplénicas). Además, los ácidos lipoteicoicos suprimen la producción de IL-8 inducida por poli I:C (que es un inmunoestimulante que ejerce una función agonista sobre los receptores TLR-3, de forma que simula una infección viral), en modelos epiteliales intestinales, lo que sugiere la capacidad de estas moléculas para inhibir las respuestas inflamatorias inducidas por patógenos virales (63,107). En modelos de ratones que simulan una infección por *Salmonella*, la combinación de múltiples especies bacterianas destruidas por ciclos de calor, incluyendo *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* y *Enterococcus faecium*, fueron capaces de suprimir la inflamación inducida y la invasión por *Salmonella*, siendo este efecto atribuido a la acción de los ácidos lipoteicoicos y EPS (63,97).

Peptidoglucanos: En ratones desnutridos e inmunodeprimidos infectados por *Streptococcus pneumoniae*, la administración de peptidoglucano de *L. rhamnosus*, mejora la respuesta inmune innata. Además, la administración nasal de esta molécula mejoró la respuesta inmune innata y la respuesta adaptativa respiratoria y sistémica humana. También se ha visto que peptidoglucanos de *Lactobacillus*, inhiben la liberación de citocinas inflamatorias en respuesta a LPS en células similares a macrófagos (108).

### 3.5.3. Exopolisacáridos (EPS).

Los exopolisacáridos son polímeros de carbohidratos (principalmente) que son secretados en el entorno bacteriano circundante o pueden quedarse unidos a la

superficie celular. Están presente en la mayoría de las bacterias y actúan como una capa superficial protectora e intervienen en la formación de biopelículas bacterianas (28).

Los EPS ejercen una acción inmunomoduladora mediante su interacción con las células intestinales. Los EPS presentes en cepas *Bifidobacterium breve* han demostrado un papel inmunomodulador al comprarse con cepas de *Bifidobacterium* que no expresaban EPS (109). Se describen efectos cardioprotectores, antiulcerosos, antioxidantes y efectos reductores en las cifras de colesterol atribuidos a los EPS (97). Además, EPS de *L. plantarum* 70810 funcionan como agentes antitumorales in vitro al inhibir la proliferación celular tumoral HepG-2 (línea celular del carcinoma hepatocelular), BGC-823 (línea celular del carcinoma gástrico) y HT-29 (línea celular relacionada con el adenocarcinoma de colon) (110).

Los EPS de bifidobacterias favorecen a la formación de biopelículas protectoras y el crecimiento de lactobacilos y otras bacterias anaerobias de forma que preservan las células del huésped contra lesiones ejercidas por otros patógenos y sus toxinas (109). La administración aislada de EPS de *B. bifidum*, inhibió el crecimiento de enterobacterias, enterococos y *Bacteroides fragilis*. El EPS de *B. longum* también inhibe el crecimiento de bacterias patógenas, como *E. coli*, *Salmonella*, *S. aureus*, *B. subtilis* y *B. cereus* (63,97).

La cepa de *S. thermophilus* CRL1190 presenta EPS que tienen la capacidad de reducir la adhesión de *H. pylori* y atenuar la inflamación en las células de la línea epitelial gástrica (111). El EPS purificado de *L. plantarum* WLPL04, conformado por xilosa, glucosa y galactosa inhibe la adhesión de *E. coli* O157: H7 a las células HT-29, además inhibe la formación de biopelículas por bacterias patógenas como *Pseudomonas aeruginosa*, *E. coli* O157: H7, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus* (101).

### 3.5.4 Sobrenadantes y factores solubles procedentes de las células microbianas.

Los sobrenadantes libres de células son el propio medio de cultivo de las células, sus metabolitos y otros productos secretados por los microorganismos bacterianos, que pueden atravesar la capa de moco intestinal y alcanzar la capa epitelial e interactuar con las células inmunes presentes en la mucosa intestinal. Los metabolitos probióticos tienen actividad antiinflamatoria y antioxidante, actuando primero sobre las células epiteliales intestinales y luego sobre las células inmunes, con diferencias dependiendo de la cepa probiótica utilizada. La reducción de mediadores proinflamatorios se ha demostrado en modelos in vitro de células inmunes tras la exposición a productos secretados por cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* (63,100).

En un estudio con diferentes cepas probióticas (*L. delbrueckii*, *L. paracasei*, *L. salivarius*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *L. lactis*, *L. casei*, *S. thermophilus*, *B. breve* y *B. longum*) y con células mononucleares de sangre periférica se observaron respuestas inmunitarias antiinflamatorias mediadas por metabolitos y componentes de la superficie celular de estas bacterias (63,97). En modelos de células epiteliales de colon, los péptidos purificados solubles secretados por *L. rhamnosus* GG evitan la apoptosis celular inducida por citoquinas, promoviendo la homeostasis epitelial intestinal y los sobrenadantes libres de células de *L. acidophilus*, *L. casei* y *L. reuteri*, regulan negativamente la expresión de prostaglandina tipo 2 (PGE-2) e IL-8 (100).

Los sobrenadantes libres de las bacterias probióticas, los ácidos orgánicos (ácido láctico), el peróxido de hidrógeno, el diacetilo y las bacteiocinas, contienen propiedades antimicrobianas (63,112). Los sobrenadantes obtenidos de bacterias del ácido láctico y

de bifidobacterias ejercen una actividad antimicrobiana fundamentalmente sobre microorganismos Gram negativos, pero también se observa que los sobrenadantes de *S. thermophilus* generan un efecto bactericida dependiente de la concentración de ácido láctico sobre microorganismos Gram positivos como *C. difficile* (63,112).

Las bacteriocinas son péptidos antibacterianos pequeños y termoestables que inhiben el crecimiento de otras bacterias (incluidos los patógenos entéricos) y también presentan un efecto antiviral y antifúngico (28). Las bacteriocinas y otros compuestos antimicrobianos presentan características fisicoquímicas que les permiten estar presentes en los postbióticos obtenidos tras diferentes ciclos de calor ya que resisten temperaturas de hasta 100°C y también presentan un amplio rango de estabilidad frente a variaciones del pH de 3 a 10, la acción de solventes orgánicos débiles, procesos de refrigeración y congelación y a la acción de sales y enzimas (113,114).

#### **4. ENFERMEDADES EN CUYA PATOGENIA SUBYACE UNA DISBIOSIS.**

##### **4.1 Diarrea.**

Las infecciones virales del tracto gastrointestinal son la causa más común de diarrea pediátrica en todo el mundo, siendo el rotavirus el principal microorganismo (115). Las infecciones por rotavirus presentan capacidad de modificar negativamente la microbiota intestinal de huésped, observándose alteraciones en la composición de *Bacteroides*. Es probable que la disbiosis observada en la composición bacteriana sea consecuencia de las alteraciones que el virus produce sobre la homeostasis del tracto gastrointestinal, más que la propia acción directa del virus sobre las bacterias, ya que se observó una disbiosis similar en diarreas cuya causa no es el rotavirus. Se ha observado que la utilización de probióticos es útil en la diarrea por rotavirus, demostrando que una comunidad bacteriana intestinal sana proporciona al huésped protección frente a las infecciones por rotavirus (27). Sería interesante determinar si los patógenos víricos entéricos ejercen su acción mediante la destrucción de la microbiota o simplemente esta se ve alterada como daño colateral en un intento de estos por maximizar su dispersión. (27)

La diarrea asociada a antibióticos (DAA) es un efecto adverso característico del tratamiento con antibióticos, consecuencia de la interrupción de la microbiota intestinal. Cualquier antibiótico podría causar una DAA, pero son los de amplio espectro dirigidos frente a anaerobios y que presentan una mala absorción intestinal (la clindamicina, las cefalosporinas como cefixima y ceftriaxona y los betalactámicos como la amoxicilina-clavulánico) con los que se observa una mayor incidencia (116).

La acción de los antibióticos a nivel de la microbiota intestinal se traduce en una reducción de la riqueza, la diversidad y la uniformidad taxonómica del tracto GI, lo que provoca el agotamiento de los residentes bacterianos intestinales normales y la consiguiente colonización por patógenos como *C. difficile* (el más prevalente hasta en un 20% de los casos) u otros patógenos oportunistas como *Clostridium perfringens*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* y *Candida* (116).

Se ha visto que la utilización de probióticos previene y reduce la incidencia de diarrea asociada a *C. difficile* en adultos y niños (117). También se ha observado que el uso de prebióticos puede reducir el riesgo de DAA en un 51% sin un aumento aparente de efectos secundarios (117). Se demostró que el uso de *Lactobacillus rhamnosus* y *Saccharomyces boulardii* fueron los más protectores contra la DAA (117,118). En la revisión realizada por Cochrane sobre la utilización de probióticos en la prevención de

DAA pediátrica que revisó 6352 participantes informó que la utilización de probióticos confiere un efecto beneficioso moderado para la prevención de la DAA. El estudio concluyó que el número necesario a tratar para reducir un evento era de 9 pacientes. La reducción en el riesgo de desarrollar un DAA se redujo significativamente cuando la administración de probióticos era > 5 millones de unidades formadoras de colonias por día (118). Se demostró que *L. rhamnosus* o *S. boulardii* eran las especies más apropiadas para prevenir la DAA en niños que reciben antibióticos (118).

En un ensayo se observó que en pacientes con infección por *C. difficile* la administración de cápsulas con *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* junto con antibióticos se asoció con reducciones significativas en la duración de la diarrea en comparación con las cápsulas que tenían placebo. Además, el examen del contenido fecal demostró que aquellos que consumieron probióticos presentaban proporciones más bajas de *Verrucomicrobiaceae* en sus heces en comparación con los que recibieron cápsulas de placebo asociándose niveles altos de *Verrucomicrobiaceae* a una mayor incidencia en la infección por *C. difficile* (119). En otro estudio tras la administración de múltiples cepas de *Bacillus subtilis* y *Enterococcus faecium* durante el tratamiento antibiótico para erradicar *H. pylori*, se observaron menos cambios inducidos por los antibióticos en la composición bacteriana y fúngica fecal en comparación con los sujetos que fueron tratados con placebo (120).

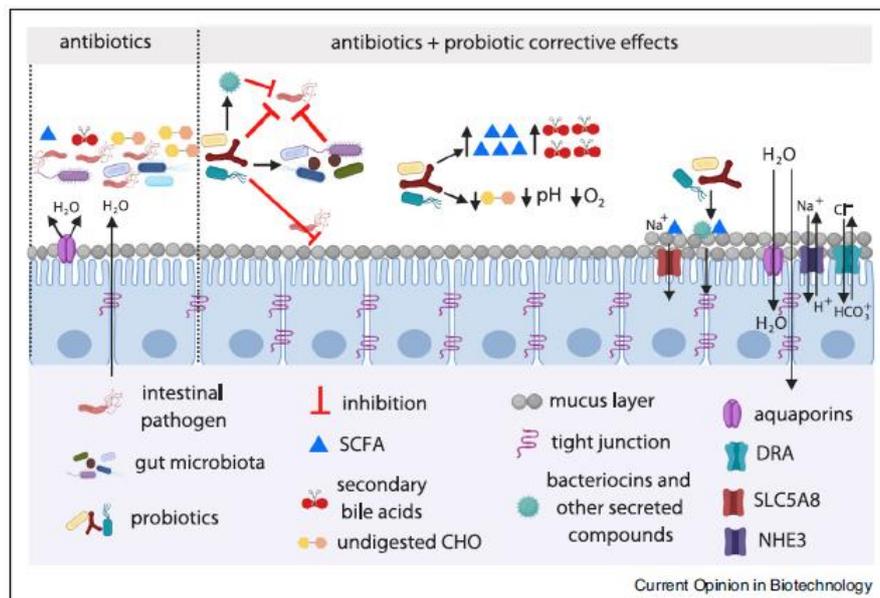
La remodelación del microbioma intestinal por la acción ejercida por los antibióticos se traduce en alteraciones en el metaboloma intestinal, ya que se observa una disminución en la producción de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). La reducción en la síntesis de butirato, propionato y acetato favorece el desarrollo de DAA, ya que estos AGCC promueven la absorción de NaCl y agua de la luz intestinal. Los AGCC, son rápidamente absorbidos en el colon y estimulan la absorción de líquidos dependientes de Na a través de un proceso cíclico independiente de AMP por intercambiadores de Na-H, AGCC-HCO<sub>3</sub> y Cl-AGCC (121).

La administración conjunta de probióticos como el *Lactobacillus plantarum* 299V junto con el tratamiento antibiótico con metronidazol, evita la disminución de AGCC. En ratones se observó que la administración directa de tributirina (un derivado del butirato), fue suficiente para prevenir la lesión intestinal inducida por los antibióticos, además de evitar la reducción del número de receptores y transportadores de ACGG en la luz intestinal y del transportador SLC5A8 (Transportador monocarboxilato de sodio acoplado 1, es decir transporta AGCC acoplado a sodio a favor de gradiente) (116,121). La administración de *Lactobacillus rhamnosus* GG en ratones ejerció el mismo efecto que la administración de tributirina, esto es interesante ya que, las cepas de *Lactobacillus* carecen de las vías metabólicas necesarias para la producción de butirato, por lo que se cree que la interacción de estos probióticos con la microbiota intestinal aumentó los niveles de butirato luminal (116). El aumento en la producción de ácidos orgánicos como lactato y acetato por los probióticos parece contribuir al mantenimiento de los niveles intestinales de AGCC. Estos ácidos generan un ambiente microbiológico más apto para las bacterias productoras de AGCC y reduce el riesgo de la colonización por microorganismos patógenos, como se observó tras la administración de *Bifidobacterium*, donde se produce una disminución en la infección por *E. coli* enteropatógena (116,122). Los ácidos orgánicos provocan una reducción del pH luminal y los niveles de oxígeno, proporcionan sustratos utilizados por la microbiota en la generación de butirato y propionato. Además, el crecimiento de bacterias probióticas

en la luz intestinal disminuye la concentración de carbohidratos no digeridos en la luz intestinal, de forma que se reduce el riesgo de diarrea de causa osmótica (116,121).

La falta de absorción de solutos o la secreción activa de solutos por el epitelio intestinal produce diarrea acuosa. Los niveles de solutos están controlados por diferentes canales y transportadores basolaterales y apicales (116). La microbiota influye en la expresión y mantenimiento de estos canales (**Figura 4**). En ratones, la administración de *Bifidubacterium subtilis* CU1, induce un aumento en la expresión de la proteína NHE3, un intercambiador epitelial de Na/H<sup>+</sup> que promueve la absorción de líquidos y una disminución en la expresión del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), proteína que secreta Cl<sup>-</sup> (123). En otro estudio en ratones, *L. acidophilus* previno la diarrea inducida por *Citrobacter rodentium* en ratones al contrarrestar la inhibición de NHE3 y al favorecer la activación de la proteína de membrana DRA que intercambia Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. La presencia de *Bacteroides fragilis* y *L.rhamnosus GG* se traduce en un aumento de la expresión de genes que codifican proteínas de membrana tipo acuaporinas (116,123,124).

En individuos sanos, el 95% de los ácidos biliares se absorben a nivel del íleon distal y las cantidades restantes son modificadas por las bacterias intestinales y después son absorbidas pasivamente o excretadas. Los antibióticos rompen este circuito, y provocan un aumento de los ácidos biliares primarios que llegan al colon y que inhiben las proteínas de transporte de iones epiteliales favoreciendo así la diarrea acuosa y además, la reducción de ácidos biliares secundarios a la acción de la microbiota intestinal, aumenta la susceptibilidad a la infección por *C. difficile*. En las muestras fecales de individuos que fueron tratados con amoxicilina-clavulánico se observó un aumento de ácido cólico (un ácido biliar primario) y niveles más bajos de ácidos biliares secundarios. Estos cambios se revertieron tras la administración de *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 (116,125).



**Figura 4.** Mecanismos moleculares de los probióticos en la prevención de la diarrea aguda asociada a antibióticos. Tomada de: Mekonnen, 2020

## 4.2 Enfermedad inflamatoria intestinal.

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) está constituida por la colitis ulcerosa (CU) y la enfermedad de Crohn (EC). En ambas existe una inflamación del tracto gastrointestinal, en la CU de la capa mucosa del colon y en la EC podemos encontrar una afectación transmural de todo el tracto gastrointestinal. La patogénesis de estas enfermedades no está determinada, pero parece que la microbiota intestinal juega un papel claro en desarrollo de la EII, ya que se observaron alteraciones específicas de la microbiota humana como marcadores de predisposición, actividad y respuesta terapéutica en la EII (126). Parecen existir tres componentes que median la patogenia de la enfermedad, el entorno, la genética del huésped y la microbiota. Los genes descritos en los hospedadores que parecen tener cierto efecto sobre la comunidad microbiana son el locus de IgA, los genes codificantes de HLA, genes de las defensinas, el gen NOD2 el gen beta de la molécula similar a la resistina, el gen de la apolipoproteína I y el gen MEFV principalmente. En los cambios que se producen en la microbiota están implicadas dos vías principalmente: Las infecciones por helmintos y la expresión de lipocalina-2 (1).

La infección por helmintos: Parece ser que el aumento en la prevalencia de la EII en los países desarrollados en comparación con los países subdesarrollados se explica porque en estos la tasa de infección por parásitos es mucho menor, siendo estos un factor protector frente al desarrollo de EII. Se observó que, en ratones deficientes del gen de susceptibilidad para la EC (NOD2<sup>-/-</sup>), se producen anomalías en el intestino delgado consecuencia de una colonización sostenida por *Bacteroides vulgatus*, una bacteria inflamatoria que se encuentra en la comunidad microbiana del intestino. Por el contrario, en ratones NOD2<sup>-/-</sup> que presentaban una infección crónica por parásitos de género *Trichuris muris* se inhibe la colonización por bacterias inflamatorias tipo *Bacteroides vulgatus* y se promueve un entorno microbiano protector enriquecido en bacterias tipo *Clostridium* (127). En las poblaciones endémicas donde existe colonización intestinal por helmintos, los individuos presentan una microbiota protectora similar a la de estos ratones, además cuando se realizaron tratamientos de desparasitación en estas poblaciones se observó un detrimento de *Clostridium* en favor de un aumento de *Bacteroidetes* y consiguientemente una mayor incidencia de EII.

Expresión de lipocalina-2: La lipocalina-2 (Lcn2) es un péptido antimicrobiano que se encuentra en altas concentraciones en el moco y en las heces de los pacientes con EII. Es producido principalmente por las células epiteliales y actúa como una defensina presentando un papel antimicrobiano al evitar la adquisición de hierro por las cepas siderófilas bacterianas, inhibiendo su crecimiento (1,128). Lcn2 parece tener un papel relevante en la respuesta aguda de la inflamación, en la eritropoyesis y en el metabolismo del hierro, aunque no queda clara su función en la EII. En ratones con doble inhibición en la expresión de Lcn2 y la interleucina 10, se observa una mayor prevalencia de colitis de inicio temprano en relación con el silenciamiento de Lcn2 y de tumores del colon derecho con relación al silenciamiento del gen que expresa la interleucina 10. Estos ratones muestran alteraciones en su comunidad bacteriana intestinal, como por ejemplo el aumento de bacteroidetes tipo *Alistipes* (128).

Las terapias actuales en la EII como corticoides, metotrexato, ácido 5-aminosalicílico, inhibidores de JAK, inhibidores del factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , anticuerpo antiinterleucina (IL)-12p40, anticuerpos anti-integrina y la resección quirúrgica, inducen la remisión en muchos pacientes con EII, pero también presentan efectos adversos graves que se traducen en una calidad de vida deteriorada (129). Terapias moduladoras de la microbiota como el trasplante fecal, los probióticos y los prebióticos son seguras y pueden corregir la disbiosis que impulsa la respuesta inmune desregulada en la EII. La buena respuesta del trasplante fecal a la infección recurrente refractaria por *C.difficile* ha despertado un interés por la terapia basada en microbios, lo que ha llevado a la administración de fármacos y alimentos de Estados Unidos (FDA) a crear una nueva categoría de productos bioterapéuticos vivos (PBVs) para organismos vivos como las bacterias en la prevención, tratamiento y cura de enfermedades (126,130).

La microbiota intestinal incluye microbios benignos con la capacidad, en condiciones de un ecosistema alterado, de provocar determinadas patologías o inflamación (patobiontes) y microorganismos beneficiosos que inducen respuestas inmunes protectoras (comensales) (26,126). Los pacientes con EII exhiben perfiles de microbiota intestinal desequilibrados (disbiosis), donde observa un aumento de Proteobacterias (enterobacterias como *E.coli* y *Klebsiella*), *Fusobacterias*, *Ruminococcus gnavus* y *Candida tropicalis*, por un lado y una disminución de *Firmicutes* como *Faecalibacterium prausnitzii*, *Ruminococci* y *Clostridium*(27,126).

Varios estudios señalan que aunque no se ha demostrado que ningún miembro de la microbiota intestinal sea el responsable directo de la patogénesis de la EII en huéspedes no predispuestos, se observa una alta incidencia de *E.coli* adherente e invasiva patogénica (ECAI) en las biopsias ileales de pacientes con EC. ECAI se une a Carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (CEACAM6), una proteína de adhesión que se encuentra sobre expresada en la superficie apical de las células ileales en la EC. La ECAI que se relaciona con la EC es de tipo uropatógena en lugar de enteropatógena, esto indica que no estamos hablando de un patógeno infeccioso si no de un microorganismo de la microbiota habitual alterado fenotípicamente probablemente a través del mecanismo de transferencia horizontal de genes (27).

Por otro lado, algunas especies de *Clostridium* y *F.prausnitzii* son microbios antiinflamatorios putativos. La producción de AGCC por parte de los *Clostridium* residentes en la microbiota, induce a las células T reguladoras del colon, los linfocitos B y los macrófagos a la producción de interleucina 10 que reduce la colitis y reduce la abundancia de *Enterobacteriaceae*. A su vez, *F. prausnitzii* también induce a la producción de IL-10 en este caso por las células dendríticas (131).

La mayoría de las poblaciones bacterianas encontradas en los pacientes con EII son aerotolerantes (aerobios o anaerobios facultativos) como *E. coli*, *F. varium*, *Haemophilus*, *Enterococcus faecalis* y *Neisseriaceae*. Por el contrario, las poblaciones bacterianas que se encuentran disminuidas son anaerobios obligados, como los grupos de *Clostridium* IV, XIVa, XVIII y *F. prausnitzii*. Esta tendencia da lugar a la "hipótesis del oxígeno" en la que la interrupción en la anaerobiosis indica un papel para el oxígeno en la disbiosis intestinal. Las cepas *Clostridium* inhiben la expansión de enterobacterias disbióticas al reducir el oxígeno luminal a través de la activación del gen PPAR- $\gamma$  epitelial, cuya disminución se relaciona en la patogénesis de la EII (132). Además de su papel causal en la conducción de la inflamación, la microbiota influye en la eficacia de las

terapias inmunomoduladoras, como en los fármacos anti-TNF- $\alpha$ , esteroides y los tratamientos basados en PD-1 (126,133,134).

Son varias las estrategias para modificar la microbiota y conseguir un beneficio terapéutico en la EII (**Figura 5**):

**Antibióticos:** El uso de antibióticos en la EII está indicado principalmente en el tratamiento de las complicaciones de la enfermedad (bacteriemia, abscesos, infecciones oportunistas, infecciones de la herida quirúrgica). Algunas especies parecen estar involucradas en la patogénesis de la EII como *Mycobacterium avium paratuberculosis* el aumento de bacterias de tipo *Enterobacteriaceae*, que se ha aislado en varios pacientes con EC y CU. Sin embargo, se considera que la EII está causada por alteración en la microbiota intestinal, genes del huésped y un sistema inmune modulado por diversos factores ambientales y no como consecuencia de un único microorganismo que genere una colitis infecciosa específica (126).

Aun así, los antibióticos orales tienen su papel en el tratamiento de la enfermedad, contrarrestando la expansión de patobiontes por el intestino disbiótico. El uso de metronidazol a largo plazo elimina *Bacteroides*, cuya concentración está relacionada con la actividad de la enfermedad. El ciprofloxacino es efectivo contra las enterobacterias negativas y la rifamicina que de forma habitual altera la composición de la microbiota intestinal, en pacientes con EII reduce la fijación bacteriana. El mayor inconveniente en el uso de los antibióticos en la EII es la disminución en la diversidad bacteriana al no inhibir solo el crecimiento de patobiontes, sino que también inhiben el crecimiento de bacterias beneficiosas. A pesar de esto algunos antibióticos seleccionan las bacterias beneficiosas, aumentando el número de bacterias beneficiosas, la rifamicina aumenta las concentraciones de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *F. prausnitzii*. Los cambios en la composición microbiana alteran la producción de los metabolitos, el uso de antibióticos en la EII puede modificar la producción de metabolitos bacterianos, consiguiendo en algunos casos aumento de los AGCC y otros productos beneficiosos. Las rifamicinas, la ciprofloxacina, el metronidazol y los macrólidos tienen efectos inmunomoduladores de la mucosa, específicamente, la rifaximina es un agonista específico del intestino del receptor X de pregnane humano (PXR) que ayuda a mantener la homeostasis de la mucosa (126,135).

Dados los posibles efectos negativos del uso a largo plazo de antibióticos, como la toxicidad del huésped y las resistencias bacterianas, se debe considerar el uso a corto plazo seguido de terapias de mantenimiento alternativas, como probióticos, prebióticos, dieta e inmunoterapias estándar (126,135).

**Probióticos y postbióticos:** El uso de probióticos y postbióticos en la EII presentan diferentes efectos beneficiosos:

Inhibición de los patobiontes: El uso de cepas probióticas como *E. coli* Nissle 1917 y *L. johnsonii* La1 compiten por el nicho ecológico, la unión al epitelio intestinal y los nutrientes con los patobiontes que ejercen su acción patógena en la EII (*Enterobacteriaceae*, *Fusobacterium* y *Bacteroidaceae*). Además, la disminución del pH luminal por los AGCC producidos por los probióticos y las bacterias residentes protectoras, los péptidos antimicrobianos y la modulación de los ácidos biliares por los productos bioterapéuticos vivos también inhiben a los patobiontes. Asimismo, los probióticos y las bacterias residentes inhiben los patobiontes de forma indirecta a través

de las células del huésped. Probióticos como *Clostridium* y VSL#3 (un cóctel de diferentes cepas bacterianas formado por *Lactobacillus casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbrueckii subespecie bulgaricus*, *Bifidobacterium longum*, *B. breve*, *B. infantis* y *Streptococcus alivarius thermophilus*,) han demostrado activar la expresión del gen PPAR- $\gamma$  a nivel de las células epiteliales de la mucosa intestinal, lo que se traduce en una disminución del oxígeno luminal e inhibición de las enterobacterias aerobias. *E. coli Nissle 1917* induce la producción de defensina por las células epiteliales, mediante la unión de la flagelina de las bacterias con el receptor TLR de las células (126,132,136,137).

Aumento de las bacterias residentes beneficiosas: Aumenta la biodiversidad bacteriana de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* y *S. Thermophilus* al mismo tiempo que reduce la diversidad fúngica. Lo que favorece la inhibición de los patobiontes (136).

Mejora de la función de barrera de la mucosa: Las cepas de *Bifidobacterium* fortalecen la función de la barrera epitelial, además el aumento de AGCC es beneficioso ya que es utilizada por los colonocitos como fuente de energía, mejoran la función de barrera de la mucosa y activan los linfocitos T reguladores del colon. Metabolitos como el indol, se unen a los receptores de hidrocarburos de arilos (AhR), PXR y a los esfingolípidos (26). Algunos probióticos activan las vías de reconocimiento TLR y NOD2 que median algunas de las funciones protectoras bacterianas (26,63,126,138).

Inmunomodulación sistémica y de la mucosa: Los probióticos y las bacterias residentes inducen la producción de citocinas antiinflamatorias (IL-10, TGF- $\beta$ , etc.), favorecen la acción de células reguladoras inmunes (Treg, IgA + y células B reguladoras) y atenúan las citocinas inflamatorias (IFN- $\gamma$ , IL-12p40, TNF- $\alpha$ , etc.) (26,133,138)

Parece que los probióticos presentan una eficacia mayor en la colitis ulcerosa y en la puchitis. Algunos ejemplos son la demostración en varios ensayos controlados aleatorizados que el tratamiento con probióticos tipo *Bifidobacterium*, ejerce efectos beneficiosos en la actividad metabólica e inmunomoduladora de pacientes con CU activa. También el ya mencionado coctel VSL#3 tiene efectos aún más beneficiosos, reafirmando la idea de que un conjunto de microorganismos es más eficiente que una única cepa sola. También, en otro ensayo clínico aleatorizado se ha demostrado que un cóctel de esporas de *Firmicutes* purificadas recogidas de donantes de heces sanos seleccionados (SER-387) junto con la administración (o no) de vancomicina exhibieron cambios transcripcionales generalizados desde el inicio, con una disminución de la expresión de genes inflamatorios y una mayor expresión de mediadores homeostáticos (126,139,140).

Por otro lado, los resultados obtenidos en la Enfermedad de Crohn son menos esperanzadores y el beneficio observado (tasa de remisión post cirugía) es muy débil o no significativo. Aun así, la adicción del cóctel VSL#3 mejoró las características endoscópicas y disminuyó los niveles de citocinas inflamatorias de la mucosa. En cambio *E. coli Nissle 1917* y otras cepas de *Lactobacillus* carecen de beneficios en la remisión clínica y en las características endoscópicas, pero aumentaron significativamente números de linfocitos T reguladores en sangre periférica (126,136,139).

**Prebióticos:** El uso de sustratos fermentados por la microbiota para la producción de AGCC, CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> y metano (principalmente) en la EII presenta ciertos beneficios terapéuticos para la enfermedad como el aumento de las bacterias beneficiosas que conforman la microbiota como bifidobacterias, lactobacilos, *F. prausnitzii* y *Clostridium* (grupos IV y XIVa). También inhiben los patobiontes

disminuyendo las poblaciones de *Bacteroides*, *R. gnavus* y *Candida*. Mediante el aumento en la producción de AGCC e inulina mejoran la barrera mucosa y mediante la regulación en la producción de IgA (y también de AGCC) aumentan el número de linfocitos T reguladores ejerciendo un papel en la inmunomodulación de la mucosa y también a nivel sistémico. La utilización de fibra dietética para los enfermos en la EII es debatida, pero se ha visto que la utilización de ciertas fibras dietéticas y oligosacáridos se traduce en efectos metabólicos potencialmente beneficiosos, como por ejemplo la absorción de sustancias tóxicas, colesterol y ácidos biliares (favoreciendo su eliminación) (26,75,138,141).

Los prebióticos que están en la dieta también afectan al metabolismo y composición de la microbiota, de forma que la dieta puede influir en la disbiosis presente en la EII. La nutrición enteral exclusiva es utilizada como terapia para inducir la remisión en la enfermedad de Crohn y conseguir una curación y recuperación histológica de la mucosa digestiva en los pacientes pediátricos. A pesar de que la alimentación enteral exclusiva produce una disminución en la diversidad microbiana esta provoca una serie de cambios microbianos beneficiosos (138,142,143). Muchas dietas se han postulado como posibles candidatas en la mejora de la sintomatología de la EII como la dieta mediterránea, la dieta asiática y la semi vegetariana. Dietas que simulan el ayuno, dietas bajas en fermentables oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y poliol o dietas que controlan de forma muy específica los carbohidratos parecen tener cierto papel prometedor en la disminución de la sintomatología de la EII y más concretamente en la colitis ulcerosa (10,138,144).

**Simbióticos:** La utilización conjunta de probióticos y prebióticos potencia los beneficios de estas dos estrategias terapéuticas. La eficacia de los prebióticos depende de la abundancia inicial de especies protectoras residentes, además, se ha visto que en muchos casos la administración en formas simbióticas mejora los resultados del tratamiento con probióticos o PBVs. Se ha observado que la administración de simbióticos formados por cepas tipo *Bifidobacterium* junto con prebióticos como galacto-oligosacáridos mejoraron la imagen endoscópica y disminuyeron los marcadores inflamatorios en pacientes con CU (95,138,145).

El uso de terapias combinadas cada vez está más presente. La alimentación enteral (parcial) junto con la administración de una dieta de exclusión rica en fibra, frutas y verduras frescas fue mejor tolerada e indujo un remisión más sostenida en pacientes pediátricos en EC que la administración de una nutrición enteral exclusiva estándar (143).

**Trasplante fecal de microbiota (TFM):** Aún no están claros los componentes terapéuticos relevantes en el TFM. El aumento de la biodiversidad bacteriana que sucede en el trasplante está claramente relacionado con la respuesta clínica exitosa del TFM en la EII. Después del TFM la microbiota receptora se asemeja a la microbiota del donante, ya que el trasplante de heces favorece el crecimiento de las bacterias residentes que se asemejan las especies del donante. El TFM es un material complejo que contiene no solo bacterias, si no también virus bacteriófagos y metabolitos bacterianos que deben ser incluidos en las investigaciones sobre el TFM (78).

En la colitis ulcerosa, varios ensayos clínicos aleatorizados en los que se han realizado TFM han demostrado una mejora de la clínica, la imagen endoscópica y las

muestras histológicas en estos pacientes, aunque es verdad que la tasa de respuesta clínica significativamente mejorada (24-32%) no es tan alta como en el TFM para la infección recurrente por *C. difficile* (93%) (79,138). El análisis de los taxones bacterianos después del TFM, concluye que este mejora la biodiversidad bacteriana y con ello la respuesta clínica, asimismo, la presencia de bacterias tipo *Clostridium* (grupos IV y XVIII) post TFM se correlaciona con la remisión clínica postrasplante y en cambio la presencia de Proteobacterias como la *Sutterella* y diferentes especies de *Fusobacterium* se asocian con una falta de remisión. También es importante la pauta de antibióticos utilizada pretratamiento al trasplante, la combinación AFM (amoxicilina, fosfomicina y metronidazol) revela mejores resultados en la respuesta clínica posterior. Esto se debe a que la reducción en la abundancia de *Bacteroidetes* por el pretratamiento con antibióticos AFM, se restablece rápidamente en los pacientes que respondieron al TFM, restablecimiento que no se produjo en los que no respondieron. El taxón tipo *Bacteroidetes* inhibe a *C.perfringens* e induce la respuesta de los linfocitos T reguladores. En los ensayos clínicos realizados parece que los efectos del TFM parecen disminuir tras los 3 meses de su instauración (79,138,146).

En la enfermedad de Crohn, la realización del TFM ha demostrado que en los pacientes respondedores también existe la presencia de una microbiota intestinal de diversidad microbiana similar al donante después del trasplante y un aumento de los linfocitos T reguladores en la lámina propia. Al igual que en la CU los respondedores de TFM en la EC mostraron una mejoría clínica varias semanas después de TFM, pero este efecto disminuyó meses después con el retorno a los patrones de composición bacteriana cercanos a los niveles previos al trasplante. Para mantener los beneficios clínicos se sugiere la realización de sucesivos trasplantes de microbiota en menos de 4 meses y actualmente existen varios ensayos clínicos aleatorizados que trabajan en esta posibilidad (78,79,87,138,146).

Se trabaja en la optimización de los protocolos de injerto, selección de donantes y receptores, y el emparejamiento de estos, basándose en la secuenciación microbiana para poder postular el TFM como tratamiento de primera línea en EI, pero la realización de más ensayos clínicos aleatorizados es precisa para valorar la posible transmisión de agentes infecciosos "indefinidos" en las heces humanas, en contraste con la seguridad que ofrecen los cocteles formados por prebióticos, probióticos, postbióticos, simbióticos...(87,138)

### **Algunas de las potenciales terapias a estudio son:**

La utilización de PBVs derivados de las bacterias que conforman la microbiota en sujetos sanos: Un cóctel de 17 cepas diferentes de *Clostridium* aisladas en sujetos sanos ha generado un aumento de la producción de AGCC y un aumento en los linfocitos T reguladores productores de IL-10, que provocan la corrección de la disbiosis bacteriana y la alteración de los metabolitos (no solo de AGCC) (147).

La utilización de sustratos de microbiota (postbióticos) para reducir la inflamación de la mucosa: La utilización de sustratos purificados de microbios específicos (postbióticos) provocan una disminución de la inflamación intestinal. Proteínas de *L. rhamonosus* (p75 y p40) que se unen al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), polifosfatos inorgánicos de lactobacilos, enzimas que presentan capacidad para degradar quimiocinas como la lactocepina procedentes del

combinado de bacterias VSL#3, polisacárido-A de *B.fragilis*, proteínas con características inflamatorias de *F.prausnitzzi* y líquido de kangfuxina extraído de gusanos secos tipo Periplaneta americana. Por otro lado, se investiga en los metabolitos procedentes de cepas patógenas como *E. coli* patogénica tipo QBECO. La obtención de macromoléculas purificadas de este tipo de *E. coli*, presentan la capacidad de restaurar la respuesta productiva del sistema inmune hacia otras bacterias enteropatógenas invasoras del tracto gastrointestinal y reconstruir la función de barrera normal, mejorando la imagen endoscópica e histológica en pacientes con EC y CU y cuyo ensayo clínico aleatorizado en EC se encuentra en desarrollo (126,148).

Editar la microbiota: Mediante la utilización de inhibidores enzimáticos y de moléculas de superficie imprescindibles en el metabolismo y funcionamiento de bacterianas patogénicas. En ratones se ha utilizado el tungstato, que inhibe el molibdeno, que es un cofactor necesario en los procesos metabólicos respiratorios en bacterias tipo Enterobacteriaceae, inhibiendo así su expansión y la inflamación que estas provocan a nivel intestinal. Editar la microbiota para conseguir una reducción en el número y en las funciones de los patobiontes, por ejemplo, a través del bloqueo de la unión epitelial enteroinvasiva tipo adherente que realiza *E. coli* AIEC mediante la utilización de bloqueadores de las adhesinas tipo FimH y la utilización de bacteriófagos específicos contra patobiontes (149).

Bacteriófagos, levaduras y bacterias modificados por ingeniería genética: La utilización de virus bacteriófagos mejoran la homeostasis intestinal y protege contra las lesiones intestinales y la infección por patógenos. Esto se debe a la acción específica de los bacteriófagos contra bacterias patógenas sin afectar a las bacterias residentes con un papel beneficioso. Hay estudios clínicos aleatorizados que están investigando la utilización de bacteriófagos contra *E.coli* AEIC en pacientes con enfermedad de Crohn (150). La utilización de levaduras probióticas como la *Candida Glabrta*, produce quitina que reduce el crecimiento excesivo de bacterias y otros hongos y, además, atenúa la colitis inducida por sulfato sódico de dextrano (un polisacárido que induce una colitis ulcerosa-like tras su administración) mediante la activación de PPAR- $\gamma$  y la inducción de IL-10 (151). Por otro lado, a través de la ingeniería genética se han conseguido varias cepas de bacterias que expresan sustratos antiinflamatorios como IL-10, IL-35, elafina (un inhibidor de elastasa producida en enfermedades inflamatorias y tumorales en respuesta a citoquinas inflamatorias como IL 1 y TNF- $\alpha$ ) y factores trefoil (pequeños péptidos que participan en la reparación mucosa mediante la restitución y regeneración epitelial) (126).

Tratamiento personalizado: La eficacia de los antibióticos, probióticos, el trasplante fecal la terapia anti-TNF- $\alpha$  depende de la microbiota previa del paciente. Se está realizando un ensayo clínico aleatorizado que investiga los efectos de la terapia personalizada en la pouchitis. Por lo tanto, se postula como la mejor estrategia para el manejo personalizado de la EII, identificar los perfiles microbianos intestinales antes de comenzar la terapia (126).

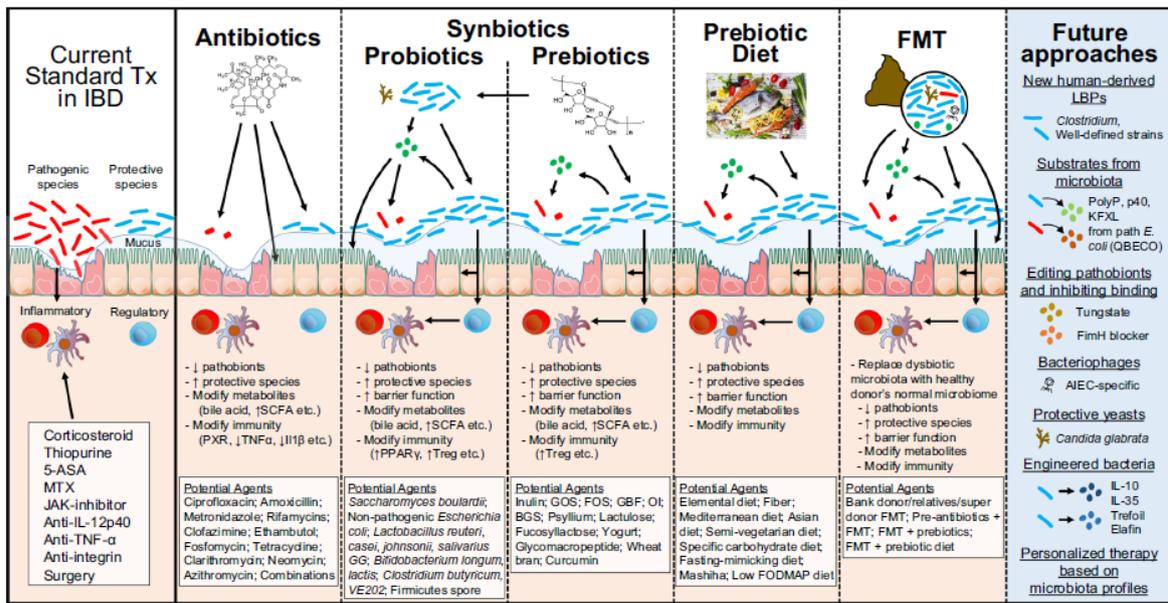


Figura 5. Resumen de las diferentes estrategias terapéuticas para modificar la microbiota en la EII. Tomada de Oka, 2020.

### 4.3 Cáncer colorrectal.

El cáncer colorrectal (CCR) es aquel que comprende los tumores desarrollados a nivel del colon (cáncer de colon) y el recto (cáncer de recto). Es una de las neoplasias más frecuente en la población ocupando el segundo lugar en mujeres tras el cáncer de mama y el tercero en hombres tras el cáncer de pulmón y próstata (152). El cáncer colorrectal presenta 4 subtipos según localización y origen. En colon descendente y recto la principal causa es el alto nivel de inestabilidad cromosómica y en colon ascendente al contrario objetivamos como causa principal la inestabilidad de microsátélites, de forma que la distribución anatómica parece favorecer los subtipos tumorales (153). Los tumores del lado derecho y del lado izquierdo del colon se caracterizan por tumores condicionados por una actividad microbiana distinta. La fermentación sacrolítica domina en colon ascendente donde además la presencia de alto volumen líquido diluye bastante el contenido luminal, en cambio los metabolitos producidos en el ciego incluidos los AGCC pueden reabsorberse con el agua y electrolitos a nivel del colon transverso, de modo que los potenciales metabolitos tóxicos que llegan al colon descendente están mucho más concentrados a este nivel. Existe así un gradiente de exposición a metabolitos bacterianos tóxicos desde el colon distal hasta el colon proximal (153–155).

En los pacientes que presentan pólipos preneoplásicos o cáncer de colon se observa un aumento de los genes involucrados en el metabolismo de aminoácidos y producción de azufre y una disminución en la abundancia de genes involucrados en el metabolismo de metano (155). El aumento de una dieta rica en proteínas y baja en fibra favorece a la producción elevada de compuestos fenólicos, aminos, amoniaco y sulfuro de hidrogeno por parte de la microbiota. Consecuentemente estos metabolitos pueden ser aprovechados como fuentes de nitrógeno para la alimentación cruzada bacteriana, o ser captados por colonocitos y transportados al torrente sanguíneo (155). Sin embargo, su acumulación en la luz del colon ejerce una acción potencialmente genotóxica, ya que bacterias reductoras de sulfato utilizan la metionina y cisteína como

sustratos para producir H<sub>2</sub>S que inhibe la oxidación del ácido butírico y aumenta la inflamación y proliferación celular. Se ha observado un aumento de estas bacterias en los pacientes con CCR en estadios II y III en relación con los pacientes sanos utilizados como controles (154,155).

La génesis del tumor se caracteriza por un ambiente de disrupción de la barrera colónica, en la que encontramos una barrea mucosa adelgazada, secreción de mucina alterada, inflamación y cambios en la liberación de IgA secretora que genera una biopelícula aberrante. Las especies bacterianas que predominan en este ambiente tumorigénico y que han sido encontradas en mayor proporción en los pacientes con CCR en comparación con controles sanos son *Bacteroides fragilis*, cepas de *Escherichia Coli* PKS +, *Fusobacterium nucleatum*, *Enterococcus faecalis* y *Streptococcus gallolyticus* (154).

La endocarditis por *Streptococcus gallolyticus* se relaciona con una mayor incidencia de neoplasia de colon. Se ha observado que la seropositividad para el antígeno Sg del *S.gallolyticus* se relaciona con una mayor expresión de ARNm de Nf-KB e IL-8 en tejidos tumorales, ya que induce a un estado proinflamatorio y de recambio celular que promueve el desarrollo del tumor. También se ha postulado que este aumento de proliferación celular se relaciona con un aumento en la catenina nuclear independientemente de la inflamación (156).

El *E.faecalis* induce el desarrollo tumoral mediante la producción de peróxido que favorece alteraciones en el ciclo celular que como resultado obtiene la precipitación a procesos de poliploidía celular (157).

Cepas específicas de *E.coli* se han encontrado en mayor proporción en pacientes con CCR que en controles sanos, concretamente del subgrupo filogenético B2 que es de tipo enteropatógeno y que se encuentra también en los pacientes con EII. Estas bacterias presentan genes que codifican cilomodulinas como el CIF (Factor inhibidor del ciclo/Cycling inhibiting factor) que bloquea la mitosis e induce la apoptosis de las células epiteliales y genotoxinas como la colibactina que provocan la ruptura de la cadena de ADN y la consiguiente formación de tumores. Por tanto, la infección por *E. coli* PKS positiva induce aberraciones cromosómicas y aumenta la tasa de frecuencia de mutación, además de influir en el comportamiento del ciclo celular (158).

*Bacteroides Fragilis* se encuentra en el 40% de la población sana. Esta bacteria puede producir una enterotoxina tipo metaloproteinasa (BFT) y la colonización de esta se ha asociado con cambios preneoplásicos tempranos (adenomas y pólipos serrados o hiperplásicos) pero no en pacientes con carcinoma, por lo que sugiere tener un papel en la carcinogénesis temprana. Se ha visto que en ratones con el gen APC silenciado (que desarrollan polipomatosis adenomatosa), la enterotoxina BFT es capaz de producir colitis mediada por los linfocitos th-17, además de producirse una respuesta inflamatoria procancerígena mediada por IL-17. También se ha observado que la toxina BTF induce la escisión de E-Cadherina lo que se traduce en una mayor permeabilidad paracelular y un aumento posterior en la proliferación celular. La BTF del *B.fragilis* facilita la disbiosis microbiana localizada ya que favorece la carcinogénesis a través de la colonización de otras bacterias pro-cancerígenas, tanto por sus efectos sobre el sistema inmunitario del huésped como por su efecto sobre la barrera intestinal ya que se ha visto que influye en la degradación de la mucina. Se ha observado relación en la colonización de *B.fragilis* productora de BFT y *E.coli* PKS positivo y *Fusobacterium nucelatum*. (154,159)

La terapia convencional para el cáncer de colon incluye la cirugía, quimioterapia y terapias con anticuerpos. Estos métodos terapéuticos tienen variables efectos adversos como la toxicidad inespecífica sobre todas las células (quimioterapia), no son completamente efectivas frente a las lesiones ya formadas y a la diseminación de la enfermedad avanzada (quimioterapia y anticuerpos) y la cirugía no es siempre una opción plausible en enfermos cuya intervención quirúrgica no esté recomendada por los riesgos intra y postoperatorios. El uso de bacterias como agente terapéutico contra el cáncer se postula como una opción terapéutica, ya que presenta una toxicidad selectiva hacia las células tumorales mediante la actividad citolítica contra las células cancerosas y, además, la capacidad de supervivencia de estos microorganismos en un ambiente hipóxico como es el que existe en el tumor y la capacidad de control postadministración. Según se avance en los estudios, las bacterias y sus productos (metabólicos, bacteriocinas, enzimas...) podrían utilizarse como terapia única o en combinación con las que ahora son consideradas terapias de primera línea (152,160).

Las **bacteriocinas** son péptidos producidos en los ribosomas bacterianos que matan o inhiben el crecimiento bacteriano de cepas de forma selectiva. Se utilizan como “antibióticos de estrecho espectro”, conservantes alimentarios y presentan actividad anticancerígena. Hay diversos tipos de bacteriocinas (I, II, III, IV) y son clasificadas según su peso molecular (161).

Pediocina K2a2-3: Es una bacteriocina de clase IIa (termoestable y de tamaño <10 kDa) producida por *Pediococcus acidilactici* K2a2-3 y posee acción antibacteriana y también, anticancerígena es capaz de inhibir el crecimiento de la línea celular HT-29 del adenocarcinoma de colon (152,161).

Nisina A: Es una bacteriocina de clase I (llamadas lantibióticos y cuyo tamaño es < 5 kDa) producida por *Lactococcus lactis*. Presenta un efecto inhibitorio sobre bacterias Gramnegativas y previene el crecimiento de células cancerosas, interfiriendo en el reordenamiento de fosfolípidos y permitiendo la penetración de iones al insertarse en la membrana celular. Inhibe la invasión tumoral local, las metástasis y la recurrencia de las líneas celulares de cáncer de colon como LS-180, SW-48, HT-29 y Caco2 (161,162).

Colicinas: Son una familia de bacteriocinas cuya masa molecular que oscila entre 40 y 80 kDa producidas por *E. coli*. La colicina tipo E1 es la que parece tener un efecto antitumoral en la línea celular del cáncer de colon inducido por HT-29. E1 y otros tipos de colicinas son capaces de alterar la distribución de las cargas eléctricas en la membrana plasmática y las consiguientes alteraciones en la despolarización de la membrana plasmática (152,161).

Existen **péptidos no ribosomales (PNR)**, que son sintetizados mediante modificaciones postraduccionales por sintetetas peptídicas no ribosómicas (enzimas biosintéticas). Estos péptidos se insertan en el esqueleto de otros péptidos, elementos heterocíclicos ácidos grasos y otras moléculas. Presentan actividad biológica, propiedades farmacológicas antibióticas o como biosurfactantes (152).

Arenamidas: Ciclohexadepsipéptidos producidos por una bacteria marina, *Salinispora arenicola*. Existen tres tipos (A, B y C). A y B pueden bloquear o inhibir la activación de TNF, actúan como inhibidores citotóxicos de NF-κB e inhiben la producción de NO y prostaglandinas E2. Además, A y B también muestran actividad citotóxica moderada contra la línea celular HCT-116 relacionada con el carcinoma de colon

humano. Otros péptidos no ribosomales como mixirinas, lucentamidas, urukthapelstaint A, procedentes de diferentes bacterias de origen marino también demuestran actividad anticancerígena contra la línea celular HCT-116 del carcinoma de colon (152).

Azurina: Es una metaloproteína globular pequeña de bajo peso molecular (14 kDa) que procede de *Pseudomona aeruginosa*. Tiene la capacidad de penetrar en las células tumorales y aumentar los niveles intracelulares de p53 al inhibir la ubiquitinación mediada por COP1 y la degradación proteasómica. Un dominio dentro de la azurina denominado "P28" penetra en las células endoteliales humanas e inhibe la actividad quinasa del receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR-2) y al factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF), de forma que se inhiben la capacidad de migración de las células tumorales, la formación de tubos capilares y la neoangiogénesis mediada por estos factores. Además, la azurina presenta actividad anticancerígena contra la línea celular HCT-116 del carcinoma de colon (152,163).

Entap: Es un péptido antiproliferativo que se aísla en cepas de *Enterococcus*. Presenta actividad frente a las células de la línea celular HT-29 del cáncer de colon, al inhibir el ciclo celular en la fase de G1 e inducir la apoptosis autófaga (152).

Ohmyungsamicinas A y B: Son péptidos cíclicos derivados de *Streptomyces spp.* Tienen actividad microbiana y antitumoral que es ejercida mediante la inhibición del crecimiento y desarrollo de las células metastásicas de forma específica respetando las células circundantes normales. La evidencia muestra que las ohmyungsamicinas A y B tienen actividad antitumoral contra la línea celular HCT-116 de cáncer de colon (152).

Las **toxinas** son otros productos bacterianos que alteran procesos celulares como la reproducción, la apoptosis y la diferenciación de las células. Estas toxinas también pueden presentar una acción anticancerígena en el cáncer de colon (152).

Toxina de la difteria: La toxina de la difteria liberada por *Corynebacterium diphtheria* contiene dos subunidades A y B. La subunidad B se une a los receptores de la superficie celular y favorece la entrada de la subunidad A al citoplasma celular y produciendo la muerte celular (28). Existe una forma mutante no tóxica de la toxina "the cross-reacting material 197" (CRM 197) que es capaz de unirse a la forma transmembrana de HB-EGF (factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina) que participa en procesos fisiológicos y en procesos patológicos que incluyen progresión tumoral y las metástasis a nivel de varios órganos de todo el cuerpo. Los efectos anticancerígenos de esta CRM 197 son frente a las líneas celulares SW480, SW620, HCT-116, CaCo-2 y HT-29 del cáncer de colon (152).

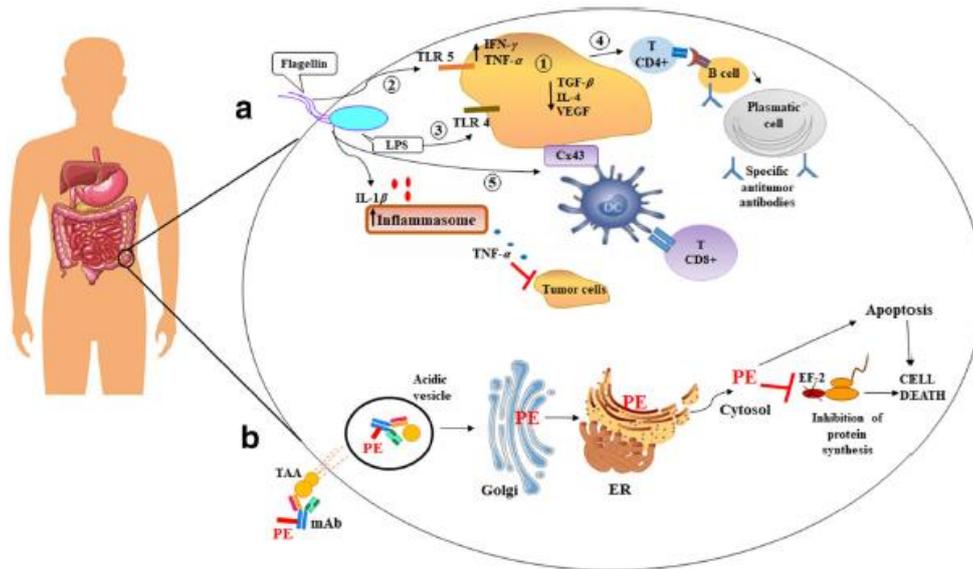
Verotoxina 1: La verotoxina 1 (VT1) o shiga toxin 1, es una citotoxina secretada por diferentes cepas de *E.coli* (enterohemorrágica, verotoxigénicas y productoras de toxina shiga) (28). VT1 presenta un efecto citotóxico sobre las células que expresan el receptor específico de VT1 llamado globotriaosilceramida (Gb3), además de sobre las células endoteliales de los glomérulos y las células epiteliales del túbulo del riñón. Las células del cáncer de colon que han desarrollado resistencia a múltiples fármacos expresan el receptor de membrana Gb3 y es que este se encuentra sobre expresado en muchas líneas celulares de tumores humanos con resistencia a la acción de los fármacos quimioterápicos. La actividad antiangiogénica y antineoplásica que presentan VT1 se ha visto muy eficiente en la línea celular HCT116 del cáncer de colon. VT1 puede detener las células en la fase S en 24 h y aumenta la incubación de la fragmentación del ADN desencadenada (152,164).

Exotoxina de Pseudomona: El tratamiento del cáncer de colon con anticuerpos monoclonales resulta prometedor, pero ya existen casos de tumores resistentes a los anticuerpos monoclonales cuando son utilizados en monoterapia. Esto podría cambiar cuando son combinados con agentes citotóxicos como por ejemplo la exotoxina de Pseudomona (EP) (152). Tanto la EP como la toxina A de la difteria son ligandos adecuados que se pueden unir al anticuerpo monoclonal que reconocerá de forma selectiva a las células tumorales a través de un antígeno asociado al tumor. Tras la unión, el anticuerpo se internaliza y se produce la separación de la inmunotoxina, EP en este caso, que desencadena la muerte celular mediante la inactivación catalítica del factor de alargamiento eucariota 2 (EF-2), lo cual induce a la apoptosis celular (Figura 6 b). La utilización del anticuerpo monoclonal humano recombinante anti-CD24 (SWA11) junto con una exotoxina de pseudomona mutada induce a la apoptosis de las líneas celulares HT-29, HCT116 y COLO320 de cáncer de colon de forma selectiva sin toxicidad para los tejidos normales (152,165).

Enterotoxina de Clostridium perfringens (ECP): La toxina ECP ejerce un papel citotóxico selectivo en las células epiteliales, al unirse a las proteínas de unión estrecha de las zonas de oclusión tipo claudinas 3 y 4. Estas se encuentran sobreexpresadas en el carcinoma de colon. ECP forma poros en las membranas celulares de estas células induciendo a la muerte celular. Varios estudios demuestran que ECP recombinante tiene acción en las líneas celulares de cáncer de colon que sobreexpresan estas claudinas, incluyendo SW480, SW620, HCT116, CaCo-2 y HT-29. Los resultados de este estudio indican que ECP presenta efectos citotóxicos, como la alteración de la membrana, la necrosis e inhibe el crecimiento de carcinoma de colon en los ratones (166).

Ciertas **cepas bacterianas** se han relacionado con un papel protector en el cáncer de colón, pudiendo así, ser utilizadas formas atenuadas como terapia en este tipo de neoplasia:

Salmonella typhimurium: Formas de *Salmonella* modificadas por biotecnología pueden usarse como vector para atacar tumores humanos e inducir expresión de genes efectores que codifican proteínas terapéuticas. Se elimina el gen msbB para reducir la toxicidad de estas al disminuir la estimulación de citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ ) y óxido nítrico, además estas cepas son genéticamente estables sin ningún marcador de resistencia al tratamiento con antibióticos (167). Estas cepas provocan una activación de la respuesta inmune innata y adaptativa en el microambiente tumoral (**Figura 6**). Provocan un aumento en las citocinas inflamatorias (IFN- $\gamma$  y TNF- $\alpha$ ) y la disminución de factores antiinflamatorios y angiogénicos (VEGF- factor de crecimiento endotelial vascular) asociados con el crecimiento tumoral. Los LPS y la flagelina bacteriana estimula el reclutamiento de neutrófilos, macrófagos, linfocitos y células dendríticas al microambiente tumoral mediante la estimulación de los TLR4 y TLR5. La colonización por *Salmonella* induce la expresión de la conexina 43, que es imprescindible en la presentación cruzada de antígenos tumorales por las células dendríticas a los linfocitos TCD8+ y por otro lado, la activación de linfocitos T CD4+ en el microambiente tumoral induce a la activación y diferenciación de linfocitos B en células plasmáticas que producen anticuerpos antitumorales específicos (152).



**Figura 6.** Activación de la respuesta inmune innata y adaptativa por *Salmonella* en el microambiente tumoral (a) e internalización y mecanismo de acción de la inmunotoxina de *Pseudomona* (b). Tomada de Yaghoubi, 2020

Otras bacterias que también son atenuadas o modificadas genéticamente como *Listeria monocytogenes*, que presenta efecto anticancerígeno con relación al carcinoma de colon (línea celular Colo 205). Esta presenta algunos vectores recombinantes como la proteína E7 (proteína producida por el virus del papiloma humano-16) y que se encuentra unida a la listeriolisina O, que es una proteína propia de *L.monocytogenes* que permite el paso de esta al citoplasma de la célula presentadora de antígeno. A través de este proceso *L.monocytogenes* induce al desarrollo de respuestas inmunes contra las células tumorales mediante la activación de los linfocitos T auxiliares CD4+ y los linfocitos T citotóxicos CD8+ (152). Varias especies de *Lactobacillus* presentan actividad frente al cáncer de colon. *L. acidophilus* aumenta los niveles séricos de IFN-γ, IL-10 y el número de células CD4 y CD8, y disminuye significativamente los niveles séricos de marcadores tumorales CEA y CA19-9 en el cáncer de colon inducido por azoximetano (168). El polifosfato (polyP) derivado de *L. brevis*, induce la apoptosis en la línea celular SW620 del cáncer de colon mediante la activación de la vía de las MAP quinases (169). *L. casei* BL23, disminuye el desarrollo de adenoma en modelos animales a los que se les induce cáncer de colon mediante azoximetano y sulfato de dextrano, al inhibir la desarrollo y proliferación del tumor además del efecto inmunomodulador que presenta mediante la regulación negativa de la IL-22, y un efecto antiproliferativo, a través de la regulación positiva de caspasa-7, caspasa-9 y Bik (170). Dentro de las cepas de *Bifidobacterium* que presentan una acción anticancerígena mediante la modulación de la respuesta inmune, la unión a carcinógenos y los cambios en la microbiota, la producción de agentes antitumorales o antimutagénicos en el colon y el cambio de las actividades metabólicas, destacan el extracto de butanol de *B. adolescentis* SPM0212 que inhibe el crecimiento de líneas celulares de cáncer de colon como Caco-2, HT-29 y SW480 y *B. longum* que reprime a enzimas como la α-glucuronidasa, la α-glucosidasa, la triptófasea y la ureasa que son un factor de riesgo en el desarrollo de cáncer de colon e inhibe la proliferación de líneas celulares de cáncer de colon humano, incluidos HT-29, SW 480 y Caco-2 (152).

#### 4.4 Autismo.

El trastorno del espectro autista (TEA) es un grupo heterogéneo de trastornos del desarrollo neurológico caracterizado por profundos déficits en la sociabilidad, un comportamiento estereotipado o repetitivo, ansiedad y trastornos cognitivos (171,172). A nivel fisiopatológico encontramos un proceso neuroinflamatorio en el que se producen alteraciones a nivel de la neurogénesis, una producción anormal de neurotransmisores y hormonas como la oxitocina y vasopresina (36). En relación con este proceso de origen neurológico parece cobrar cierta relevancia el tracto GI y la microbiota presente en él. Aproximadamente un 70 % de los pacientes con TEA presentan comorbilidades intestinales como estreñimiento, distensión abdominal y diarrea. En un estudio abierto donde se trató a varios niños con TEA con vancomicina, un antibiótico de amplio espectro, se observó una mejoría significativa de los síntomas conductuales. Por tanto, cabe esperar que tanto la composición como la producción de metabolitos de la microbiota contribuye a las alteraciones del comportamiento en el neurodesarrollo (36,173,174). En la microbiota de las personas con TEA se encuentra una disminución del género *Bifidobacterium* (con efecto protector principalmente) y un aumento de los géneros bacterianos *Desulfovibrio* y *Clostridium* (con potencial efecto patogénico). Asimismo se ha observado que la expresión del gen CPB2 que codifica la toxina clostridial B se encuentra aumentada en *C.perfringes* aislados en la microbiota fecal de niños con TEA en comparación con controles sanos (175). Aun así, existe evidencia limitada para demostrar que si modificamos la microbiota intestinal de los individuos con TEA vamos a conseguir una mejora de los síntomas neurológicos en estos pacientes (34,36). El uso de probióticos y dietas libres de caseína y gluten que modifican la composición microbiológica de la microbiota intestinal a base del aumento de bacterias tipo *Bifidobacterium longum* y el trasplante fecal de microbiota parecen tener ciertos resultados positivos en los síntomas gastrointestinales y conductuales de los pacientes con TEA, pero es necesaria la realización de estudios más rigurosos y ensayos clínicos con mayor muestra de individuos (173).

En ratones modificados genéticamente, en los que se silencia el conjunto de genes SHANK, un modelo experimental TAE, se observa modificaciones de la microbiota con reducciones de las poblaciones de *Lactobacillus*, *Prevotella* y *Veillonella*. El tratamiento en estos ratones con *Lactobacillus reuteri*, produjo una mejoría en los déficits sociales en los machos, no en las hembras. Esto se debe a que en los ratones machos el tratamiento con *L.reuteri* se produce una mayor expresión del ARNm de oxitocina dentro del hipotálamo y en cambio en las hembras se produce una reducción en la expresión del neuropéptido. Esto sugiere que además de la modulación de la expresión de la oxitocina, existen factores de tipo sexual que influyen en el mecanismo de acción de *L.reuteri* (176).

En ratones BTBR que expresan un fenotipo inherente al autista, también son observados cambios fisiopatológicos en su tracto GI, como el enlentecimiento del tránsito y la falta de permeabilidad del intestino delgado y grueso. Estos fenómenos favorecen a la traslocación bacteriana y de sus metabolitos o componentes al torrente sanguíneo sistémico (36). Además, se observa una disminución de los géneros de tipo *Bifidobacterium* y *Blautia*, ambos relacionados con déficit en la señalización de ácidos biliares, lo cual se traduce en un enlentecimiento del tránsito intestinal y en la falta de permeabilidad intestinal (177).

Además de los modelos genéticos de ratones SHANK y BTBR donde se ve que alteraciones genéticas que explican el TEA y como se ve alterada la microbiota en ellos, es importante remarcar que también la exposición prenatal a factores ambientales puede alterar la composición de la microbiota y favorecer el desarrollo de TEA. Se ha visto que la exposición intrauterina a componentes virales o a el Poly I:C (inmunoestimulante que ejerce una función agonista sobre los receptores TLR 3, de forma que simula una infección viral), favorece el desarrollo de un comportamiento autista en ratones, un aumento de la permeabilidad intestinal y alteraciones en la composición de la microbiota intestinal (178). La interacción con el ácido valproico provoca además de los efectos teratogénicos, la inflamación intestinal, la disbiosis en la microbiota intestinal que se objetiva en cambios en la relación *Firmicutes/Bacteroidetes* y un aumento en las bacterias del género *Desulfovibrio* e interacciona con el recambio serotoninérgico en la amígdala (50). Por tanto, como ya he descrito, la influencia de la microbiota sobre los procesos del SNC con relación a la neurotransmisión serotoninérgica, hace que alteraciones en las poblaciones de microorganismos que la conforman, tras la exposición a ácido valproico y Poly I:C contribuyen a déficits en el comportamiento de estos animales (36).

También han sido descritas que dosis neurotóxicas de ácido propiónico (AGCC) inducen a un comportamiento similar al autismo en roedores. Se ha observado que los ratones de madres alimentadas durante el embarazo en una dieta rica en grasas y que muestran déficits cognitivos y en el comportamiento, existe una microbiota pobre en *Lactobacillus*. La administración de *L. reuteri* llevó a la restauración de sus déficit sociales y a un aumento de la expresión hormonal de oxitocina a nivel hipotalámico. El hecho de que *L. reuteri* aumente la producción de oxitocina a nivel del hipotálamo depende de la integridad del nervio vago además de la señalización de IL-10 y por tanto del buen funcionamiento del eje microbiota intestinal -SNC (179).

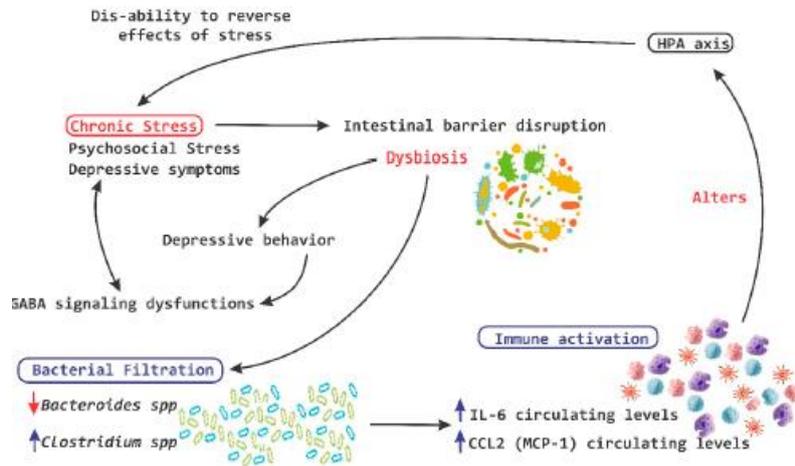
Parece que el papel de otros microorganismos como el *B. fragilis* y su administración temprana en la vida de los ratones con TEA genera una mejora en el comportamiento estereotipado y ansiedad que estos presentan, pero no ejerce ningún papel sobre la sociabilidad de estos. Esto refleja que cada bacteria posee sus propias propiedades bioquímicas y por consiguiente los efectos prebióticos de estas serán distintos según el microorganismo que se utilice y por tanto la modulación que ejerce sobre el eje microbiota-intestino- cerebro será distinta en cada caso (36).

#### **4.5 Depresión.**

La depresión es un trastorno del estado de ánimo multifactorial que se manifiesta clínicamente por un descenso del estado de ánimo, anhedonia, baja autoestima y un aumento de la autocrítica y los niveles de perfeccionismo (172). Actualmente es conocido que el trastorno depresión mayor (TDM) se relaciona con un aumento de citocinas proinflamatorias, que genera un ambiente de neuroinflamación que sobreactiva el eje hipotálamo- hipófisis- adrenal/suprarrenal (40,180). Han sido descritas que determinadas alteraciones en la composición de la microbiota intestinal aumentan la permeabilidad intestinal a los productos metabólicos bacterianos, alcanzando el torrente sanguíneo de formas más fácil y desencadenando una respuesta inmune con la consiguiente liberación de citoquinas que favorecen a la neuroinflamación. El propio ambiente inflamatorio secundario a la disbiosis, a través

del eje microbiota-intestino-cerebro, podría causar alteraciones cognitivas relacionadas con la depresión y la ansiedad (36,40,181).

Así mismo, procesos que provocan un estrés crónico son capaces de generar una disbiosis bacteriana que altera la función protectora de la barrera intestinal, lo que genera la fuga de bacterias y la activación del sistema inmunitario local aumentando niveles de IL-6 y la proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), que ejercen una alteración del eje HHA y de la capacidad de este para revertir los efectos nocivos del estrés (**Figura 7**) (180).



**Figura 7.** Relación entre el estrés crónico y el eje Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal. Tomada de Bermúdez-Humarán, 2019

Diversos estudios con ratones libres de microbiota muestran que estos tienen una reducción del comportamiento depresivo frente a situaciones de estrés como la prueba de natación forzada (182). También se ha observado que modificaciones pre y probióticas de su flora intestinal genera cambios en su comportamiento depresivo, además de mejorar su respuesta inflamatoria (34,43).

En humanos han sido encontradas diferencias en la microbiota fecal de pacientes con TDM e individuos sanos, pero estos estudios no son del todo concordantes (43). En un estudio se observa que en individuos deprimidos existe un aumento en *Bacteroidetes*, *Proteobacteria* y *Actinobacteria* y una disminución en *Firmicutes*, *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* que se correlaciona negativamente con la gravedad de los síntomas depresivos (183). Por otro lado, en otro estudio se concluyó que los pacientes con depresión presentan sobrerrepresentación de los filos *Actinobacteria* (*Bifidobacterium*) y *Firmicutes* (*Blautia*) (184) y en un pequeño estudio metaproteómico (estudios de los niveles de proteínas) con controles pareados por sexos, edad e IMC, se encontraron secuencias proteicas diferentes en individuos con TDM y en los controles sanos, llegando a la conclusión de que en individuos con depresión existen niveles de *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Lachnospiraceae* más abundantes y niveles de *Bacteroidetes* y *Proteobacterias* menos abundantes en comparación con los controles sanos (185).

Se observó que en los pacientes con TDM presentan alta producción de cortisol y menor riqueza microbiana fecal. Se observó que el trasplante fecal de microbiota humana procedente de pacientes con TDM a ratones resultó en una transferencia de fenotipos/comportamientos depresivos y ansioso en los animales, que no se vio en los controles de trasplante fecal de microbiota de pacientes controles sanos (186).

Varios estudios que examinan la microbiota humana y sus diferentes componentes como el Proyecto Flamenco “Gut Flora” en Bélgica y el proyecto “American Gut” en Estados Unidos han llegado a conclusiones importantes en el intento de vislumbrar la relación existente entre la modificación de las poblaciones microbianas y la salud mental (187). En los pacientes con depresión existe una disminución en las poblaciones de *Faecalibacterium* y *Coprococcus* que se encargan de parte de la producción de AGCC que regulan muchas de las funciones beneficiosas de la microbiota ya explicadas. En estos estudios también se identificaron metabolitos bacterianos con potencial neuroactivo y la identificación de conjuntos de genes que se corresponden con diferentes procesos de producción y degradación de compuestos neuroactivos, por ejemplo, en la síntesis de metabolitos de la dopamina como el ácido 3,4-dihidroxifenilacético y otros compuestos relacionados con el glutamato y GABA (36,187).

El uso de *L. casei* como probiótico mejoró las calificaciones del estado de ánimo en una cohorte de ancianos sanos que tenían un estado de ánimo más bajo al inicio del estudio. También la utilización de un triple probiótico constituido por *L. acidophilus*, *L. casei* y *B. bifidum* dio como resultado mejores puntuaciones de depresión además de efectos metabólicos beneficiosos en una cohorte de pacientes con TDM (36,188). La suplementación con *L. rhamnosus* HN001 durante el embarazo resultó en una disminución significativa de la ansiedad y la depresión postnatal (189). La administración de un prebiótico basado en Galactooligosacaridos (GOS) junto con un probiótico conformado por *L. helveticus* y *B. longum* en pacientes con TDM leve-moderado generó una disminución en los scores clínicos del paciente y mejoras en la señalización del triptófano (190). La utilización de *C. butyricum* como probiótico combinada con fármacos antidepresivos en pacientes con depresión resistente al tratamiento, presentó efectos prometedores siendo otro ejemplo en el cual la variación en la composición microbiana ejerce un efecto modulador sobre las enfermedades del trastorno del estado de ánimo y su modulación mediante diferentes probióticos puede ser una diana terapéutica a desarrollar (191).

#### **4.6 Ansiedad.**

La ansiedad junto con la depresión se encuentra dentro del grupo de trastornos psiquiátricos más frecuentes. Al igual que la depresión se ve influenciada por el eje microbiota-intestino-cerebro y por lo tanto la desregulación de las poblaciones microbianas que conforman la microbiota puede modular a la enfermedad (36,192). En los ratones libres de germen se ha observado un comportamiento similar al de la ansiedad, con respuestas exageradas de corticosterona al estrés que demuestran las alteraciones de estos animales a nivel del eje HHA (193).

Probióticos multicepas compuestos por *S. thermophilus*, *L. bulgaricus*, *L. lactis subsp. lactis*, *L. acidophilus*, *L. plantarum*, *B. lactis* y *L. reuteri* han demostrado cierto efecto ansiolítico en un estudio realizado sobre pacientes sanos (194). La utilización de *Lactobacillus plantarum* DR7 como probiótico ha asociado una disminución de los síntomas de ansiedad y estrés en un estudio doble ciego aleatorizado comparado con placebo (195). También se ha observado que la utilización de prebióticos basados en mezclas de galactooligosacáridos en pacientes con EII ha disminuido sus niveles de ansiedad (36).

## 5. GARANTÍAS DE LOS PROBIÓTICOS ¿SE PRECISA MÁS REGULACIÓN?

El consumo y la venta libre de probióticos ha aumentado en los últimos años debido a sus potenciales beneficios en la salud humana. Desde grandes empresas hasta start ups han comenzado a comercializar probióticos, prebióticos, etc... Esto ha desembocado en que algunos de los probióticos comercializados no cumplan con la información que aparece en su etiquetado. Para regular la comercialización de los productos bacterianos, se propone un control de la calidad de los productos por terceros, empresas que sometan los prebióticos a evaluaciones imparciales que determinen la identidad de los microorganismos que conforman el producto (mediante técnicas rápidas de secuenciación como la PCR o la secuenciación genómica completa), pureza (asegurando que no hay ningún microorganismo contaminante en el producto) y cuantificación de los productos a través de las citometrías de flujo (196,197).

Para que los productos bioterapéuticos vivos (PBVs) pasen del laboratorio a la práctica clínica deben presentar los siguientes mínimos (21):

- Ensayos clínicos aleatorizados y controlados de alta calidad que evidencien que la administración de probióticos o prebióticos a una determinada dosis, presentan resultados clínicos relevantes.
- Seguimiento a corto y largo plazo de los efectos tras la administración en los ECA.
- Productos de alta calidad debidamente etiquetados (nombres de géneros y especies, cantidad de producto en unidades formadoras de colonias, fecha, condiciones de almacenamiento...)
- Solicitud por parte de los médicos de los datos de eficacia disponible sobre estos productos de manera basada en la evidencia (datos positivos y negativos).
- Evaluar las características del huésped (dieta, microbiota basal, medicamentos y enfermedades) que modulen la respuesta a las terapias microbiológicas.

La administración de PBVs se considera segura, ya que se han administrado juntos con los alimentos durante años sin presentar efectos adversos, además de los ensayos clínicos realizados con estos productos. El uso de probióticos en adultos sanos no ha notificado ningún efecto adverso, pero su uso se ha visto asociado a un mayor riesgo de infección y/o morbilidad en neonatos con bajo peso al nacer, adultos y lactantes en unidades de cuidados intensivos y pacientes postoperatorios e inmunodeprimidos, causando problemas de bacteriemia y fungemia (197).

La FDA y la Agencia para la Investigación y Calidad de la Atención Médica, revisaron la seguridad de los próbioticos. Concluyeron que, aunque los ensayos clínicos existentes no revelan evidencia de un mayor riesgo, estos no han evaluado ni informado correctamente sobre la seguridad de estos productos, especificando que para determinar si los probióticos son seguros como medicamentos deben incluirse datos de seguridad y toxicología similares a los controles de otros medicamentos (198).

Según la OMS y la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), los probióticos serían responsables de efectos secundarios como infecciones sistémicas, actividades metabólicas nocivas, estimulación inmunológica excesiva en individuos susceptibles, transferencia génica y molestias gastrointestinales menores. Tanto la OMS como la FAO recomiendan evaluar la seguridad de las nuevas cepas probióticas probando su potencial resistencia a antibióticos, la producción de toxinas y el potencial hemolítico, evaluando actividades metabólicas como la producción

de D-lactato y la desconjugación de sales biliares, realizando estudios en humanos y comprobar los efectos secundarios de su administración a largo plazo, con vigilancia en el mercado e idealmente estudiar el uso de animales inmunocomprometidos para determinar la infectividad de los PBVs en este tipo de huéspedes (198).

## 6. CONCLUSIONES.

La microbiota tiene un papel importante en la homeostasis fisiológica humana a nivel de todos los sistemas del organismo, con especial relevancia en el digestivo, aunque también realiza funciones importantes a nivel del tracto genitourinario, la piel, tracto respiratorio... Nuestro bioma está conformado principalmente por diferentes tipos de bacterias (predominantemente), hongos, protozoos, virus y arqueas. La proporción en la que se encuentran los microorganismos y el equilibrio que se establece entre ellos es importante en el buen funcionamiento de la microbiota. Las alteraciones en este equilibrio, denominada disbiosis, influyen en el desarrollo y perpetuación de enfermedades. Aun así, la configuración de una microbiota “normal” o sana debe ser entendida como un “núcleo funcional saludable” que puede ser diferente entre individuos en cuanto a la composición pero que desempeña funciones microbiológicas beneficiosas que se mantienen en el tiempo.

Las funciones que ejecuta la microbiota son la regulación de la homeostasis metabólica, inmunológica y la protección frente a infecciones por microorganismos patógenos. Alteraciones en estas funciones, basadas en la disbiosis subyacente se explica la patogenia de diferentes enfermedades intestinales como la enfermedad inflamatoria intestinal, el cáncer colorrectal, la diarrea inducida por antibióticos y otras enfermedades extraintestinales como la ansiedad, la depresión y el autismo, secundarias a alteraciones en el eje microbiota-intestino-sistema nervioso central. Mediante la utilización de técnicas que modulan la microbiota intestinal como el uso de antibióticos, prebióticos, probióticos, postbióticos y el trasplante fecal, podremos reconstituir la microbiota hacia un núcleo funcionante saludable y revertir el microambiente patogénico que se traduce en las manifestaciones clínicas de estas enfermedades e incluso poder curar estos procesos patológicos, convirtiendo así la modulación de la microbiota en una potencial diana terapéutica en este tipo de enfermedades.

Existen otras enfermedades en las que es apreciada un disbiosis en la microbiota, que no queda clara si es consecuencia del proceso patológico o causa etiológica directa o indirecta de la enfermedad. En enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson y el Alzheimer, en las que alteraciones de la composición de la microbiota podría explicar parte del proceso de inflamación sistémica y del plegamiento anómalo de proteínas. También en enfermedades del tracto genitourinario como la incontinencia urinaria de urgencia, la vaginosis y la infección del tracto urinario son apreciadas alteraciones de la microbiota que generan una disrupción en la barrera de la mucosa genitourinaria, de la inmunidad local y alteraciones de la neuromodulación (eje microbiota del tracto urinario inferior- cerebro) y como consecuencia se observan infecciones recurrentes por microorganismos patógenos, alteraciones inmunológicas y alteraciones en la modulación de la señalización sensorial de la vejiga.

Son precisos más estudios in vivo en estos pacientes para poder determinar si la modulación de la microbiota en estos procesos patológicos es de utilidad y así barajar el trasplante de microbiota o la utilización de probióticos, postbióticos y prebiótico como otra opción terapéutica.

La modulación de la microbiota presenta grandes dificultades como son la necesidad de un tratamiento específico en función del análisis del microbioma individual y la seguridad a la hora de implantar microorganismos vivos en los pacientes. El desarrollo de las técnicas de identificación bacteriana basadas en el RNA ribosomal 16S y la utilización de nuevas técnicas que modulan la microbiota basadas en componentes de los microorganismos y no en la utilización de estos de forma directa, como los postbióticos o el desarrollo y la aplicación del trasplante fecal en más patologías, parecen aclarar los potenciales problemas existentes en la modulación de la microbiota.

Por tanto, la utilización de los microorganismos y sus productos metabólicos como medicamentos es una potencial diana terapéutica que ya es utilizada en algunas enfermedades pero, en la que se debe potenciar la investigación y ampliar sus indicaciones para otras enfermedades inmunológicas, neoplasias o enfermedades de patogenia incierta donde las alteraciones en el equilibrio homeostático de la microbiota como un núcleo funcionando, son clave en la sintomatología y patogenia de estas patologías.

#### **BIBLIOGRAFÍA:**

1. Blum HE. The human microbiome. Vol. 62, *Advances in Medical Sciences*. Medical University of Bialystok; 2017. p. 414–20.
2. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are We Really Vastly Outnumbered? Revisiting the Ratio of Bacterial to Host Cells in Humans. *Cell*. 2016.
3. Dominguez-Bello MG, Costello EK, Contreras M, Magris M, Hidalgo G, Fierer N, et al. Delivery mode shapes the acquisition and structure of the initial microbiota across multiple body habitats in newborns. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 29;107(26):11971–5.
4. Koenig JE, Spor A, Scalfone N, Fricker AD, Stombaugh J, Knight R, et al. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 Mar 15;108(SUPPL. 1):4578–85.
5. Chavira A, Belda-Ferre P, Kosciólek T, Ali F, Dorrestein PC, Knight R. The microbiome and its potential for pharmacology. In: *Handbook of Experimental Pharmacology*. Springer; 2019. p. 301–26.
6. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med*. 2016;8(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13073-016-0307-y>
7. Swidsinski A, Loening-Baucke V. Spatial organization of intestinal microbiota in health and disease. 2020;

8. Greuter D, Loy A, Horn M, Rattei T. probeBase--an online resource for rRNA-targeted oligonucleotide probes and primers: new features 2016. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4; 44(D1):D586-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26586809>
9. Proctor LM, Creasy HH, Fettweis JM, Lloyd-Price J, Mahurkar A, Zhou W, et al. The Integrative Human Microbiome Project. *Nature.* 2019 May 30;569(7758):641–8.
10. Bibbò S, Ianiro G, Giorgio V, Scaldaferrì F, Masucci L, Gasbarrini A, et al. The role of diet on gut microbiota composition. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(22):4742–9.
11. Ying S, Zeng D-N, Chi L, Tan Y, Galzote C, Cardona C, et al. The Influence of Age and Gender on Skin-Associated Microbial Communities in Urban and Rural Human Populations. Badger JH, editor. *PLoS One.* 2015 Oct 28;10(10):e0141842. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0141842>
12. Barton W, O'sullivan O, Cotter PD. Metabolic phenotyping of the human microbiome. Vol. 8, F1000Research. F1000 Research Ltd; 2019.
13. Edlund A, Garg N, Mohimani H, Gurevich A, He X, Shi W, et al. Metabolic Fingerprints from the Human Oral Microbiome Reveal a Vast Knowledge Gap of Secreted Small Peptidic Molecules. *mSystems.* 2017 Aug 29;2(4).
14. Krishnan K, Chen T, Paster B. A practical guide to the oral microbiome and its relation to health and disease. *Oral Dis.* 2017 Apr 1; 23(3):276–86. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/odi.12509>
15. Larsen JM. The immune response to *Prevotella* bacteria in chronic inflammatory disease. *Immunology.* 2017;151(4):363–74.
16. Mändar R. Microbiota of male genital tract: Impact on the health of man and his partner. *Pharmacol Res.* 2013;69(1):32–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2012.10.019>
17. Hall J e. Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica | Elsevier España. 2016. 1168 p. Available from: <https://tienda.elsevier.es/guyton-y-hall-tratado-de-fisiologia-medica-9788491130246.html>
18. Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From dietary fiber to host physiology: Short-chain fatty acids as key bacterial metabolites. Vol. 165, *Cell.* Cell Press; 2016. p. 1332–45.
19. Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol.* 2017 Jan 8 [cited 2020 Apr 14];19(1):29–41. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/1462-2920.13589>
20. Donohoe DR, Collins LB, Wali A, Bigler R, Sun W, Bultman SJ. The Warburg Effect

- Dictates the Mechanism of Butyrate-Mediated Histone Acetylation and Cell Proliferation. *Mol Cell*. 2012 Nov 30;48(4):612–26.
21. Sanders ME, Merenstein DJ, Reid G, Gibson GR, Rastall RA. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16(10):605–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
  22. Ridlon JM, Kang DJ, Hylemon PB, Bajaj JS. Bile acids and the gut microbiome. Vol. 30, *Current Opinion in Gastroenterology*. Lippincott Williams and Wilkins; 2014. p. 332–8.
  23. Wu H, Esteve E, Tremaroli V, Khan MT, Caesar R, Mannerås-Holm L, et al. Metformin alters the gut microbiome of individuals with treatment-naive type 2 diabetes, contributing to the therapeutic effects of the drug. *Nat Med*. 2017 Jul 1;23(7):850–8.
  24. Gury-BenAri M, Thaiss CA, Serafini N, Winter DR, Giladi A, Lara-Astiaso D, et al. The Spectrum and Regulatory Landscape of Intestinal Innate Lymphoid Cells Are Shaped by the Microbiome. *Cell*. 2016 Aug 25;166(5):1231-1246.e13.
  25. Arrieta MC, Stiemsma LT, Amenyogbe N, Brown E, Finlay B. The intestinal microbiome in early life: Health and disease. Vol. 5, *Frontiers in Immunology*. Frontiers Media SA; 2014.
  26. Belkaid Y, Harrison OJ. Homeostatic Immunity and the Microbiota. Vol. 46, *Immunity*. 2017. p. 562–76.
  27. Sekirov I, Russell SL, Caetano M Antunes L, Finlay BB. Gut microbiota in health and disease. *Physiol Rev*. 2010;90(3):859–904.
  28. Patrick Murray, Ken Rosenthal, Michael Pfaller. *Microbiología médica - 8th Edition*. 8th edition. Elsevier; 2017. Available from: <https://www.elsevier.com/books/microbiologia-medica/murray/978-84-9113-076-5>
  29. Sutherland DB, Suzuki K, Fagarasan S. Fostering of advanced mutualism with gut microbiota by Immunoglobulin A. Vol. 270, *Immunological Reviews*. Blackwell Publishing Ltd; 2016 [cited 2020 Apr 14]. p. 20–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26864102>
  30. Salzman NH, Underwood MA, Bevins CL. Paneth cells, defensins, and the commensal microbiota: A hypothesis on intimate interplay at the intestinal mucosa. Vol. 19, *Seminars in Immunology*. 2007. p. 70–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17485224>
  31. Gomes DA, Souza AML, Lopes R V, Nunes AC, Nicoli JR. Comparison of antagonistic ability against enteropathogens by G+ and G- anaerobic dominant components of human fecal microbiota. *Folia Microbiol (Praha)*. 2006 ;51(2):141–5. Available

from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16821725>

32. Corr SC, Gahan CGM, Hill C. Impact of selected *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species on *Listeria monocytogenes* infection and the mucosal immune response. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2007 Aug; 50(3):380–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17537177>
33. Medellín-Peña MJ, Griffiths MW. Effect of molecules secreted by *Lactobacillus acidophilus* strain La-5 on *Escherichia coli* O157:H7 colonization. *Appl Environ Microbiol*. 2009 Feb;75(4):1165–72.
34. Ganci M, Suleyman E, Butt H, Ball M. The role of the brain–gut–microbiota axis in psychology: The importance of considering gut microbiota in the development, perpetuation, and treatment of psychological disorders. *Brain Behav*. 2019;9(11):1–19.
35. Wang HX, Wang YP. Gut microbiota-brain axis. *Chin Med J (Engl)*. 2016;129(19):2373–80.
36. Cryan JF, O’riordan KJ, Cowan CSM, Sandhu K V., Bastiaanssen TFS, Boehme M, et al. The microbiota-gut-brain axis. *Physiol Rev*. 2019;99(4):1877–2013.
37. Smith LK, Wissel EF. Microbes and the Mind: How Bacteria Shape Affect, Neurological Processes, Cognition, Social Relationships, Development, and Pathology. *Perspect Psychol Sci*. 2019;14(3):397–418.
38. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu XN, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic-pituitary-adrenal system for stress response in mice. *J Physiol*. 2004 Jul 1;558(1):263–75.
39. Barouei J, Moussavi M, Hodgson DM. Effect of Maternal Probiotic Intervention on HPA Axis, Immunity and Gut Microbiota in a Rat Model of Irritable Bowel Syndrome. Heimesaat MM, editor. *PLoS One*. 2012 Oct 11;7(10):e46051. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0046051>
40. Carlessi AS, Borba LA, Zugno AI, Quevedo J, Réus GZ. Gut microbiota–brain axis in depression: The role of neuroinflammation. *Eur J Neurosci*. 2019;(March 2020).
41. Moreira CG, Russell R, Mishra AA, Narayanan S, Ritchie JM, Waldor MK, et al. Bacterial adrenergic sensors regulate virulence of enteric pathogens in the gut. *MBio*. 2016 Jul 6;7(3).
42. Asano Y, Hiramoto T, Nishino R, Aiba Y, Kimura T, Yoshihara K, et al. Critical role of gut microbiota in the production of biologically active, free catecholamines in the gut lumen of mice. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 2012 Dec 1;303(11).
43. Järbrink-Sehgal E, Andreasson A. The gut microbiota and mental health in adults. *Curr Opin Neurobiol*. 2020;62:102–14.

44. Pérez-Berezo T, Pujo J, Martin P, Le Faouder P, Galano JM, Guy A, et al. Identification of an analgesic lipopeptide produced by the probiotic *Escherichia coli* strain Nissle. *Nat Commun*. 2017 Dec 1;8(1):1–12.
45. Pokusaeva K, Johnson C, Luk B, Uribe G, Fu Y, Oezguen N, et al. GABA-producing *Bifidobacterium dentium* modulates visceral sensitivity in the intestine. *Neurogastroenterol Motil*. 2017 Jan 1;29(1):e12904. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/nmo.12904>
46. Thomas CM, Hong T, van Pijkeren JP, Hemarajata P, Trinh D V., Hu W, et al. Histamine Derived from Probiotic *Lactobacillus reuteri* Suppresses TNF via Modulation of PKA and ERK Signaling. Heimesaat MM, editor. *PLoS One*. 2012 Feb 22;7(2):e31951. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0031951>
47. De Vadder F, Grasset E, Holm LM, Karsenty G, Macpherson AJ, Olofsson LE, et al. Gut microbiota regulates maturation of the adult enteric nervous system via enteric serotonin networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jun 19;115(25):6458–63.
48. Yano JM, Yu K, Donaldson GP, Shastri GG, Ann P, Ma L, et al. Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis. *Cell*. 2015 Apr 9;161(2):264–76.
49. Knecht LD, O'Connor G, Mittal R, Liu XZ, Daftarian P, Deo SK, et al. Serotonin Activates Bacterial Quorum Sensing and Enhances the Virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in the Host. *EBioMedicine*. 2016 Jul 1;9:161–9.
50. O'Mahony SM, Clarke G, Borre YE, Dinan TG, Cryan JF. Serotonin, tryptophan metabolism and the brain-gut-microbiome axis. Vol. 277, *Behavioural Brain Research*. Elsevier; 2015. p. 32–48.
51. Sonowal R, Swimm A, Sahoo A, Luo L, Matsunaga Y, Wu Z, et al. Indoles from commensal bacteria extend healthspan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2017 Sep 5;114(36):E7506–15.
52. Dodd D, Spitzer MH, Van Treuren W, Merrill BD, Hryckowian AJ, Higginbottom SK, et al. A gut bacterial pathway metabolizes aromatic amino acids into nine circulating metabolites. *Nature*. 2017 Nov 30;551(7682):648–52.
53. Lee JH, Wood TK, Lee J. Roles of indole as an interspecies and interkingdom signaling molecule. Vol. 23, *Trends in Microbiology*. Elsevier Ltd; 2015. p. 707–18.
54. Jaglin M, Rhimi M, Philippe C, Pons N, Bruneau A, Goustard B, et al. Indole, a Signaling Molecule Produced by the Gut Microbiota, Negatively Impacts Emotional Behaviors in Rats. *Front Neurosci*. 2018 Apr 9 ;12(APR):216. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnins.2018.00216/full>
55. Floch MH, Yehuda Ringel, W. Allan Walker. *The Microbiota in Gastrointestinal*

- Pathophysiology | Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis . Martin H. Floch, Yehuda Ringel, W. Allan Walker, editors. 2017. Available from: <https://www.sciencedirect.com/book/9780128040249/the-microbiota-in-gastrointestinal-pathophysiology#book-info>
56. Hezel M, Weitzberg E. The oral microbiome and nitric oxide homeostasis. *Oral Dis.* 2015 Jan 1 ;21(1):7–16. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/odi.12157>
  57. Gomez A, Nelson KE. The Oral Microbiome of Children: Development, Disease, and Implications Beyond Oral Health. Vol. 73, *Microbial Ecology*. Springer New York LLC; 2017. p. 492–503.
  58. Durack J, Lynch S V., Nariya S, Bhakta NR, Beigelman A, Castro M, et al. Features of the bronchial bacterial microbiome associated with atopy, asthma, and responsiveness to inhaled corticosteroid treatment. *J Allergy Clin Immunol.* 2017 Jul 1;140(1):63–75.
  59. Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, Meyer JA, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature.* 2013 May 22;498(7454):367–70.
  60. Mueller ER, Wolfe AJ, Brubaker L. Female urinary microbiota. *Curr Opin Urol.* 2017;27(3):282–6.
  61. Becknell B, Schwaderer A, Hains DS, Spencer JD. Amplifying renal immunity: The role of antimicrobial peptides in pyelonephritis. Vol. 11, *Nature Reviews Nephrology*. Nature Publishing Group; 2015. p. 642–55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26149835>
  62. Le PT, Pearce MM, Zhang S, Campbell EM, Fok CS, Mueller ER, et al. IL22 Regulates Human Urothelial Cell Sensory and Innate Functions through Modulation of the Acetylcholine Response, Immunoregulatory Cytokines and Antimicrobial Peptides: Assessment of an In Vitro Model. Kumar A, editor. *PLoS One.* 2014 Oct 29; 9(10):e111375. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0111375>
  63. Piqué N, Berlanga M, Miñana-Galbis D. Health benefits of heat-killed (Tyndallized) probiotics: An overview. *Int J Mol Sci.* 2019;20(10):1–30.
  64. Yadav M, Dixit, Shukla P. Probiotics of Diverse Origin and Their Therapeutic Applications: A Review. *J Am Coll Nutr.* 2019;5724.
  65. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, Gómez-Llorente C, Gil A. Probiotic mechanisms of action. *Ann Nutr Metab.* 2012;61(2):160–74.
  66. Wang J, Ji H, Wang S, Liu H, Zhang W, Zhang D, et al. Probiotic *Lactobacillus plantarum* Promotes Intestinal Barrier Function by Strengthening the Epithelium and Modulating Gut Microbiota. *Front Microbiol.* 2018 Aug 24;9(AUG):1953.

- Available from:  
<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01953/full>
67. Donato KA, Gareau MG, Wang YJJ, Sherman PM. Lactobacillus rhamnosus GG attenuates interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor- $\alpha$ -induced barrier dysfunction and pro-inflammatory signalling. *Microbiology*. 2010 Nov 1;156(11):3288–97.
  68. Juturu V, Wu JC. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. Vol. 36, *Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2018. p. 2187–200.
  69. Gibson GR, Hutkins R, Sanders ME, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017;14(8):491–502.
  70. Chen T, Long W, Zhang C, Liu S, Zhao L, Hamaker BR. Fiber-utilizing capacity varies in Prevotella- versus Bacteroides-dominated gut microbiota. *Sci Rep*. 2017 Dec 1;7(1).
  71. Vulevic J, Juric A, Walton GE, Claus SP, Tzortzis G, Toward RE, et al. Influence of galacto-oligosaccharide mixture (B-GOS) on gut microbiota, immune parameters and metabonomics in elderly persons. *Br J Nutr*. 2015 Aug 28;114(4):586–95.
  72. Cuello-Garcia CA, Fiocchi A, Pawankar R, Yepes-Nuñez JJ, Morgano GP, Zhang Y, et al. World Allergy Organization-McMaster University Guidelines for Allergic Disease Prevention (GLAD-P): Prebiotics. *World Allergy Organ J*. 2016 Mar 1 ;9(1):10. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S193945511930167X>
  73. Whisner CM, Martin BR, Schoterman MHC, Nakatsu CH, McCabe LD, McCabe GP, et al. Galacto-oligosaccharides increase calcium absorption and gut bifidobacteria in young girls: A double-blind cross-over trial. *Br J Nutr*. 2013 Oct 14;110(7):1292–303.
  74. Kellow NJ, Coughlan MT, Reid CM. Metabolic benefits of dietary prebiotics in human subjects: A systematic review of randomised controlled trials. Vol. 111, *British Journal of Nutrition*. Cambridge University Press; 2014. p. 1147–61.
  75. Schroeder BO, Birchenough GMH, Ståhlman M, Arike L, Johansson MEV, Hansson GC, et al. Bifidobacteria or Fiber Protects against Diet-Induced Microbiota-Mediated Colonic Mucus Deterioration. *Cell Host Microbe*. 2018 Jan 10;23(1):27-40.e7.
  76. Akbari P, Fink-Gremmels J, Willems RHAM, Difilippo E, Schols HA, Schoterman MHC, et al. Characterizing microbiota-independent effects of oligosaccharides on intestinal epithelial cells: insight into the role of structure and size. *Eur J Nutr*. 2017 Aug 13; 56(5):1919–30. Available from:

<http://link.springer.com/10.1007/s00394-016-1234-9>

77. Chambers ES, Morrison DJ, Frost G. Control of appetite and energy intake by SCFA: What are the potential underlying mechanisms? In: Proceedings of the Nutrition Society. Cambridge University Press; 2015. p. 328–36.
78. Leong KSW, O’Sullivan JM, Derraik JGB, Cutfield WS. Gut microbiome transfer – finding the perfect fit. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2020;
79. Wortelboer K, Nieuwdorp M, Herrema H. Fecal microbiota transplantation beyond *Clostridioides difficile* infections. *EBioMedicine*. 2019;44:716–29. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.05.066>
80. Li SS, Zhu A, Benes V, Costea PI, Hercog R, Hildebrand F, et al. Durable coexistence of donor and recipient strains after fecal microbiota transplantation. *Science* (80-). 2016 Apr 29;352(6285):586–9.
81. Cenit MC, Sanz Y, Codoñer-Franch P. Influence of gut microbiota on neuropsychiatric disorders. Vol. 23, *World Journal of Gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Co., Limited; 2017. p. 5486–98.
82. Brandt LJ, Aroniadis OC, Mellow M, Kanatzar A, Kelly C, Park T, et al. Long-term follow-up of colonoscopic fecal microbiota transplant for recurrent *clostridium difficile* infection. *Am J Gastroenterol*. 2012 Jul;107(7):1079–87.
83. Alang N, Kelly CR. Weight Gain After Fecal Microbiota Transplantation. 2015 [cited 2020 May 8]; Available from: <https://academic.oup.com/ofid/article-abstract/2/1/ofv004/1461242>
84. Van Lunzen J, Altfeld M. Sex Differences in Infectious Diseases-Common but Neglected. *J Infect Dis*. 2014; 209(S3):79–80. Available from: [https://academic.oup.com/jid/article-abstract/209/suppl\\_3/S79/2192876](https://academic.oup.com/jid/article-abstract/209/suppl_3/S79/2192876)
85. Kelly CR, Kahn S, Kashyap P, Laine L, Rubin D, Atreja A, et al. Update on Fecal Microbiota Transplantation 2015: Indications, Methodologies, Mechanisms, and Outlook. *Gastroenterology*. 2015 Jul 1; 149(1):223–37. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016508515006800>
86. Hall AB, Tolonen AC, Xavier RJ. Human genetic variation and the gut microbiome in disease. Vol. 18, *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group; 2017. p. 690–9.
87. Gupta A, Saha S, Khanna S. Therapies to modulate gut microbiota: Past, present and future. *World J Gastroenterol*. 2020;26(8):777–88.
88. Ogilvie LA, Jones B V. The human gut virome: A multifaceted majority. Vol. 6, *Frontiers in Microbiology*. Frontiers Media S.A.; 2015.
89. Zuo T, Wong SH, Lam K, Lui R, Cheung K, Tang W, et al. Bacteriophage transfer during faecal microbiota transplantation in *Clostridium difficile* infection is

- associated with treatment outcome. *Gut*. 2018 Apr 1;67(4):634–43.
90. Conceição-Neto N, Deboutte W, Dierckx T, Machiels K, Wang J, Yinda KC, et al. Low eukaryotic viral richness is associated with faecal microbiota transplantation success in patients with UC. Vol. 67, *Gut*. BMJ Publishing Group; 2018. p. 1558–9.
  91. Cammarota G, Ianaro G, Tilg H, Rajilić-Stojanović M, Kump P, Satokari R, et al. European consensus conference on faecal microbiota transplantation in clinical practice. In: *Gut*. BMJ Publishing Group; 2017. p. 569–80.
  92. Paramsothy S, Kamm MA, Kaakoush NO, Walsh AJ, van den Bogaerde J, Samuel D, et al. Multidonor intensive faecal microbiota transplantation for active ulcerative colitis: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2017 Mar 25;389(10075):1218–28.
  93. Rossen NG, Fuentes S, Van Der Spek MJ, Tijssen JG, Hartman JHA, Duflou A, et al. Findings From a Randomized Controlled Trial of Fecal Transplantation for Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2015 Jul 1;149(1):110-118.e4.
  94. Li P, Zhang T, Xiao Y, Tian L, Cui B, Ji G, et al. Timing for the second fecal microbiota transplantation to maintain the long-term benefit from the first treatment for Crohn's disease. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2019 Jan 1;103(1):349–60.
  95. Gurry T. Synbiotic approaches to human health and well-being. *Microb Biotechnol*. 2017 Sep 1;10(5):1070–3. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/1751-7915.12789>
  96. Chua MC, Ben-Amor K, Lay C, Goh AEN, Chiang WC, Rao R, et al. Effect of Synbiotic on the Gut Microbiota of Cesarean Delivered Infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017 Jul 1; 65(1):102–6. Available from: <http://journals.lww.com/00005176-201707000-00023>
  97. Wegh CAM, Geerlings SY, Knol J, Roeselers G, Belzer C. Postbiotics and their potential applications in early life nutrition and beyond. *Int J Mol Sci*. 2019;20(19).
  98. Miller LE, Ouwehand AC, Ibarra A. Effects of probiotic-containing products on stool frequency and intestinal transit in constipated adults: Systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Vol. 30, *Annals of Gastroenterology*. Hellenic Society of Gastroenterology; 2017 p. 629–39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29118557>
  99. Aguilar-Toalá JE, Garcia-Varela R, Garcia HS, Mata-Haro V, González-Córdova AF, Vallejo-Cordoba B, et al. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. Vol. 75, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd; 2018. p. 105–14.
  100. De Marco S, Sichetti M, Muradyan D, Piccioni M, Traina G, Pagiotti R, et al. Probiotic Cell-Free Supernatants Exhibited Anti-Inflammatory and Antioxidant Activity on Human Gut Epithelial Cells and Macrophages Stimulated with LPS.

2018; Available from: <https://doi.org/10.1155/2018/1756308>

101. Liu Z, Zhang Z, Qiu L, Zhang F, Xu X, Wei H, et al. Characterization and bioactivities of the exopolysaccharide from a probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* WLPL04. *J Dairy Sci.* 2017 Sep 1;100(9):6895–905.
102. Chen CY, Tsen HY, Lin CL, Lin CK, Chuang LT, Chen CS, et al. Enhancement of the immune response against *Salmonella* infection of mice by heat-killed multispecies combinations of lactic acid bacteria. *J Med Microbiol.* 2013 Nov 1;62(PART 11):1657–64.
103. Arai S, Iwabuchi N, Takahashi S, Xiao J, Abe F, Hachimura S. Orally administered heat-killed *Lactobacillus paracasei* MCC1849 enhances antigen-specific IgA secretion and induces follicular helper T cells in mice. Ashour HM, editor. *PLoS One.* 2018 Jun 13; 13(6):e0199018. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0199018>
104. Kareem KY, Ling FH, Chwen LT, Foong OM, Anjas Asmara S. Inhibitory activity of postbiotic produced by strains of *Lactobacillus plantarum* using reconstituted media supplemented with inulin. *Gut Pathog.* 2014 Jun 14; 6(1):23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24991236>
105. Aiba Y, Ishikawa H, Tokunaga M, Komatsu Y. Anti-*Helicobacter pylori* activity of non-living, heat-killed form of lactobacilli including *Lactobacillus johnsonii* No.1088. *FEMS Microbiol Lett.* 2017 Jun 15;364(11).
106. Schwendicke F, Horb K, Kneist S, Dörfer C, Paris S. Effects of heat-inactivated *Bifidobacterium* BB12 on cariogenicity of *Streptococcus mutans* in vitro. *Arch Oral Biol.* 2014 Dec 1;59(12):1384–90.
107. Vinogradov E, Sadovskaya I, Grard T, Chapot-Chartier MP. Structural studies of the rhamnose-rich cell wall polysaccharide of *Lactobacillus casei* BL23. *Carbohydr Res.* 2016 Nov 29;435:156–61.
108. Kolling Y, Salva S, Villena J, Alvarez S. Are the immunomodulatory properties of *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 peptidoglycan common for all *Lactobacilli* during respiratory infection in malnourished mice? *PLoS One.* 2018 Mar 1;13(3).
109. Castro-Bravo N, Wells JM, Margolles A, Ruas-Madiedo P. Interactions of surface exopolysaccharides from *bifidobacterium* and *lactobacillus* within the intestinal environment. Vol. 9, *Frontiers in Microbiology.* Frontiers Media S.A.; 2018. p. 2426.
110. Wang K, Li W, Rui X, Chen X, Jiang M, Dong M. Characterization of a novel exopolysaccharide with antitumor activity from *Lactobacillus plantarum* 70810. *Int J Biol Macromol.* 2014 Feb 1;63:133–9.
111. Marcial G, Villena J, Faller G, Hensel A, de Valdéz GF. Exopolysaccharide-producing *streptococcus thermophilus* CRL1190 reduces the inflammatory

- response caused by helicobacter pylori. *Benef Microbes*. 2017 May 15;8(3):451–61.
112. Lukic J, Chen V, Strahinic I, Begovic J, Lev-Tov H, Davis SC, et al. Probiotics or pro-healers: the role of beneficial bacteria in tissue repair. *Wound Repair Regen*. 2017 Nov 1; 25(6):912–22. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/wrr.12607>
  113. Sarkar A, Mandal S. Bifidobacteria—Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. Vol. 192, *Microbiological Research*. Elsevier GmbH; 2016. p. 159–71.
  114. Bali V, Panesar PS, Bera MB. Trends in utilization of agro-industrial byproducts for production of bacteriocins and their biopreservative applications. Vol. 36, *Critical Reviews in Biotechnology*. Taylor and Francis Ltd; 2016. p. 204–14.
  115. Crawford SE, Ramani S, Tate JE, Parashar UD, Svensson L, Hagbom M, et al. Rotavirus infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2017 Nov 9;3.
  116. Mekonnen SA, Merenstein D, Fraser CM, Marco ML. Molecular mechanisms of probiotic prevention of antibiotic-associated diarrhea. *Curr Opin Biotechnol*. 2020;61:226–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2020.01.005>
  117. Kim SK, Guevarra RB, Kim YT, Kwon J, Kim H, Cho JH, et al. Role of Probiotics in Human Gut Microbiome-Associated Diseases. *J Microbiol Biotechnol*. 2019;29(9):1335–40.
  118. Guo Q, Goldenberg JZ, Humphrey C, El Dib R, Johnston BC. Probiotics for the prevention of pediatric antibiotic-associated diarrhea. *Cochrane Database Syst Rev*. 2019;2019(4).
  119. De Wolfe TJ, Eggers S, Barker AK, Kates AE, Dill-McFarland KA, Suen G, et al. Oral probiotic combination of Lactobacillus and Bifidobacterium alters the gastrointestinal microbiota during antibiotic treatment for Clostridium difficile infection. Deshpande A, editor. *PLoS One*. 2018 Sep 28;13(9):e0204253. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0204253>
  120. Wu L, Wang Z, Sun G, Peng L, Lu Z, Yan B, et al. Effects of anti-H. pylori triple therapy and a probiotic complex on intestinal microbiota in duodenal ulcer. *Sci Rep*. 2019 Dec 1;9(1):1–11.
  121. van der Beek CM, Dejong CH, Troost FJ, Masclee AA, Lenaerts K. Role of short-chain fatty acids in colonic inflammation, carcinogenesis, and mucosal protection and healing. *Nutr Rev*. 2017; Available from: <https://academic.oup.com/nutritionreviews/article-abstract/75/4/286/3573470>
  122. Kumar A, Alrefai WA, Borthakur A, Dudeja PK. Lactobacillus acidophilus counteracts enteropathogenic E. coli-induced inhibition of butyrate uptake in intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2015; 309:602–7. Available from: <http://www.ajpgi.org>

123. Urdaci MC, Lefevre M, Lafforgue G, Cartier C, Rodriguez B, Fioramonti J. Antidiarrheal Action of *Bacillus subtilis* CU1 CNCM I-2745 and *Lactobacillus plantarum* CNCM I-4547 in Mice. *Front Microbiol.* 2018 Jul 10 ;9(JUL):1537. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2018.01537/full>
124. Kumar A, Anbazhagan AN, Coffing H, Chatterjee I, Priyamvada S, Gujral T, et al. *Lactobacillus acidophilus* counteracts inhibition of NHE3 and DRA expression and alleviates diarrheal phenotype in mice infected with *Citrobacter rodentium*. Available from: <http://www.ajpgi.org>
125. Kelly CP, Chong Nguyen C, Palmieri LJ, Pallav K, Dowd SE, Humbert L, et al. *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 Modulates the Fecal Bile Acids Metabolism During Antimicrobial Therapy in Healthy Volunteers. *Front Microbiol.* 2019 Mar 4;10(MAR):336. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2019.00336/full>
126. Oka A, Sartor RB. Microbial-Based and Microbial-Targeted Therapies for Inflammatory Bowel Diseases. Vol. 65, *Digestive Diseases and Sciences*. Springer US; 2020. 757–788 p. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06090-z>
127. Cleynen I, Boucher G, Jostins L, Schumm LP, Zeissig S, Ahmad T, et al. Inherited determinants of Crohn’s disease and ulcerative colitis phenotypes: A genetic association study. *Lancet.* 2016 Jan 9;387(10014):156–67.
128. Moschen AR, Gerner RR, Wang J, Klepsch V, Adolph TE, Reider SJ, et al. Lipocalin 2 Protects from Inflammation and Tumorigenesis Associated with Gut Microbiota Alterations. *Cell Host Microbe.* 2016 Apr 13;19(4):455–69.
129. Matsuoka K, Kobayashi T, Ueno F, Matsui T, Hirai F, Inoue N, et al. Evidence-based clinical practice guidelines for inflammatory bowel disease. Vol. 53, *Journal of Gastroenterology*. Springer Tokyo; 2018. p. 305–53.
130. Fda, Cber. Early Clinical Trials with Live Biotherapeutic Products: Chemistry, Manufacturing, and Control Information; Guidance for Industry. Available from: <http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance>
131. Oka A, Mishima Y, Bongers G, Liu B, Herzog J, Baltus A, et al. Tu1844 - IL-10-Independent Protective Activities of Human-Derived *Clostridium* Strains in Experimental Colitis. *Gastroenterology.* 2018 May 1;154(6):S-1036.
132. Byndloss MX, Olsan EE, Rivera-Chávez F, Tiffany CR, Cevallos SA, Lokken KL, et al. Microbiota-activated PPAR- $\gamma$  signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science (80- ).* 2017 Aug 11;357(6351):570–5.
133. Aden K, Rehman A, Waschina S, Pan WH, Walker A, Lucio M, et al. Metabolic Functions of Gut Microbes Associate With Efficacy of Tumor Necrosis Factor

- Antagonists in Patients With Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*. 2019 Nov 1;157(5):1279-1292.e11.
134. Routy B, Le Chatelier E, Derosa L, Duong CPM, Alou MT, Daillère R, et al. Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* (80- ). 2018 Jan 5;359(6371):91–7.
  135. Sartor RB. Review article: the potential mechanisms of action of rifaximin in the management of inflammatory bowel diseases. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016 Jan 1; 43:27–36. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/apt.13436>
  136. Fedorak RN, Feagan BG, Hotte N, Leddin D, Dieleman LA, Petrunia DM, et al. The probiotic vsl#3 has anti-inflammatory effects and could reduce endoscopic recurrence after surgery for crohn’s disease. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2015 May 1; 13(5):928-935.e2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25460016>
  137. Pujol A, Crost EH, Simon G, Barbe V, Vallenet D, Gomez A, et al. Characterization and distribution of the gene cluster encoding RumC, an anti-Clostridium perfringens bacteriocin produced in the gut; Available from: <https://academic.oup.com/femsec/article-abstract/78/2/405/606723>
  138. Mishima Y, Oka A, Liu B, Herzog JW, Eun CS, Fan TJ, et al. Microbiota maintain colonic homeostasis by activating TLR2/MyD88/PI3K signaling in IL-10-producing regulatory B cells. *J Clin Invest*. 2019 Sep 3;129(9):3702–16.
  139. Jia K, Tong X, Wang R, Song X. The clinical effects of probiotics for inflammatory bowel disease: A meta-analysis. Vol. 97, *Medicine (United States)*. Lippincott Williams and Wilkins; 2018.
  140. Bharat M, Curran J, Herfarth HH, Jagarlamudi K, Oneto C, Bhandari BR, et al. 85 - SER-287, an Investigational Microbiome Therapeutic, Induces Remission and Endoscopic Improvement in a Placebo-Controlled, Double-Blind Randomized Trial in Patients with Active Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis. *Gastroenterology*. 2018 May 1;154(6):S-25.
  141. Moens F, de Vuyst L. Inulin-type fructan degradation capacity of clostridium cluster IV and XIVa butyrate- producing colon bacteria and their associated metabolic outcomes. *Benef Microbes*. 2017 May 30;8(3):473–90. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28548573>
  142. Lewis JD, Chen EZ, Baldassano RN, Otley AR, Griffiths AM, Lee D, et al. Inflammation, Antibiotics, and Diet as Environmental Stressors of the Gut Microbiome in Pediatric Crohn’s Disease. *Cell Host Microbe*. 2015 Oct 14;18(4):489–500.
  143. Levine A, Wine E, Assa A, Sigall Boneh R, Shaoul R, Kori M, et al. Crohn’s Disease Exclusion Diet Plus Partial Enteral Nutrition Induces Sustained Remission in a Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology*. 2019 Aug 1;157(2):440-450.e8.

144. Obih C, Wahbeh G, Lee D, Braly K, Giefer M, Shaffer ML, et al. Specific carbohydrate diet for pediatric inflammatory bowel disease in clinical practice within an academic IBD center. *Nutrition*. 2016 Apr 1;32(4):418–25.
145. Ishikawa H, Matsumoto S, Ohashi Y, Imaoka A, Setoyama H, Umesaki Y, et al. Beneficial effects of probiotic *Bifidobacterium* and galacto-oligosaccharide in patients with ulcerative colitis: A randomized controlled study. *Digestion*. 2011 Aug;84(2):128–33.
146. Paramsothy S, Paramsothy R, Rubin DT, Kamm MA, Kaakoush NO, Mitchell HM, et al. Faecal microbiota transplantation for inflammatory bowel disease: A systematic review and meta-analysis. *J Crohn's Colitis*. 2017 Oct 1;11(10):1180–99.
147. Atarashi K, Tanoue T, Oshima K, Suda W, Nagano Y, Nishikawa H, et al. Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature*. 2013;500(7461):232–6.
148. Sutcliffe S, Kalyan S, Pankovich J, Chen JMH, Gluck R, Thompson D, et al. Novel Microbial-Based Immunotherapy Approach for Crohn's Disease. *Front Med*. 2019 Jul 19;6.
149. Zhu W, Winter MG, Byndloss MX, Spiga L, Duerkop BA, Hughes ER, et al. Precision editing of the gut microbiota ameliorates colitis. *Nature*. 2018 Jan 11;553(7687):208–11.
150. Gogokhia L, Buhrke K, Bell R, Hoffman B, Brown DG, Hanke-Gogokhia C, et al. Expansion of Bacteriophages Is Linked to Aggravated Intestinal Inflammation and Colitis. *Cell Host Microbe*. 2019 Feb 13;25(2):285-299.e8.
151. Charlet R, Pruvost Y, Tumba G, Istel F, Poulain D, Kuchler K, et al. Remodeling of the *Candida glabrata* cell wall in the gastrointestinal tract affects the gut microbiota and the immune response. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1):1–12.
152. Yaghoubi A, Khazaei M, Avan A, Hasanian SM, Soleimanpour S. The bacterial instrument as a promising therapy for colon cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2020;35(4):595–606.
153. Fakhri B, Lim KH. Molecular landscape and sub-classification of gastrointestinal cancers: A review of literature. Vol. 8, *Journal of Gastrointestinal Oncology*. AME Publishing Company; 2017. p. 379–86.
154. Alhinai EA, Walton GE, Commane DM. The role of the gut microbiota in colorectal cancer causation. *Int J Mol Sci*. 2019;20(21).
155. Yachida S, Mizutani S, Shiroma H, Shiba S, Nakajima T, Sakamoto T, et al. Metagenomic and metabolomic analyses reveal distinct stage-specific phenotypes of the gut microbiota in colorectal cancer. Vol. 25, *Nature Medicine*. Nature Publishing Group; 2019. p. 968–76. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31171880>

156. Kumar R, Herold JL, Taylor J, Xu J, Xu Y. Variations among *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* strains in connection with colorectal cancer. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1):1–10.
157. Fan TJ, Goeser L, Naziripour A, Redinbo MR, Hansen JJ. *Enterococcus faecalis* gluconate phosphotransferase system accelerates experimental colitis and bacterial killing by macrophages. *Infect Immun*. 2019;87(7).
158. Zhang Z, Aung KM, Uhlin BE, Wai SN. Reversible senescence of human colon cancer cells after blockage of mitosis/cytokinesis caused by the CNF1 cyclomodulin from *Escherichia coli*. *Sci Rep*. 2018 Dec 1;8(1):1–11.
159. Chung L, Thiele Orberg E, Geis AL, Chan JL, Fu K, DeStefano Shields CE, et al. *Bacteroides fragilis* Toxin Coordinates a Pro-carcinogenic Inflammatory Cascade via Targeting of Colonic Epithelial Cells. *Cell Host Microbe*. 2018 Feb 14;23(2):203-214.e5.
160. Groza D, Gehrig S, Kudela P, Holcmann M, Pirker C, Dinhof C, et al. Bacterial ghosts as adjuvant to oxaliplatin chemotherapy in colorectal carcinomatosis. *Oncoimmunology*. 2018 May 4;7(5).
161. Kaur S, Kaur S. Bacteriocins as potential anticancer agents. *Front Pharmacol*. 2015;6(NOV).
162. Norouzi Z, Salimi A, Halabian R, Fahimi H. Nisin, a potent bacteriocin and anti-bacterial peptide, attenuates expression of metastatic genes in colorectal cancer cell lines. *Microb Pathog*. 2018 Oct 1;123:183–9.
163. Jia L, Gorman GS, Coward LU, Noker PE, McCormick D, Horn TL, et al. Preclinical pharmacokinetics, metabolism, and toxicity of azurin-p28 (NSC745104) a peptide inhibitor of p53 ubiquitination. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2011 Aug 18;68(2):513–24.
164. Bhattacharjee RN, Park KS, Uematsu S, Okada K, Hoshino K, Takeda K, et al. *Escherichia coli* verotoxin 1 mediates apoptosis in human HCT116 colon cancer cells by inducing overexpression of the GADD family of genes and S phase arrest. *FEBS Lett*. 2005 Dec 5;579(29):6604–10.
165. Shapira S, Shapira A, Starr A, Kazanov D, Kraus S, Benhar I, et al. An immunoconjugate of Anti-CD24 and *Pseudomonas* exotoxin selectively kills human colorectal tumors in mice. *Gastroenterology*. 2011 Mar 1;140(3):935–46.
166. Tabariès S, Siegel PM. The role of claudins in cancer metastasis. *Oncogene*. 2017 Mar 2;36(9):1176–90.
167. Zheng JH, Min J-J. Targeted Cancer Therapy Using Engineered *Salmonella typhimurium*. *Chonnam Med J*. 2016;52(3):173.

168. Agah S, Alizadeh AM, Mosavi M, Ranji P, Khavari-Daneshvar H, Ghasemian F, et al. More Protection of *Lactobacillus acidophilus* Than *Bifidobacterium bifidum* Probiotics on Azoxymethane-Induced Mouse Colon Cancer. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2019 Sep 15;11(3):857–64.
169. Sakatani A, Fujiya M, Ueno N, Kashima S, Sasajima J, Moriichi K, et al. Polyphosphate derived from *Lactobacillus brevis* inhibits colon cancer progression through induction of cell apoptosis. *Anticancer Res*. 2016 Feb 1;36(2):591–8.
170. Jacouton E, Chain F, Sokol H, Langella P, Bermúdez-Humarán LG. Probiotic strain *Lactobacillus casei* BL23 prevents colitis-associated colorectal cancer. *Front Immunol*. 2017 Nov 17;8(NOV).
171. Masi A, DeMayo MM, Glozier N, Guastella AJ. An Overview of Autism Spectrum Disorder, Heterogeneity and Treatment Options. Vol. 33, *Neuroscience Bulletin*. Science Press; 2017. p. 183–93.
172. American Psychiatric Association. Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales. DSM-5. Vol. 53, *Psychology Applied to Work: An Introduction to Industrial and Organizational Psychology*, Tenth Edition Paul. 2012. 1689–1699 p.
173. Kang DW, 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 Dec 23; 5(1):10. Available from: <http://microbiomejournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40168-016-0225-7>
174. Kang DW, Ilhan ZE, Isern NG, Hoyt DW, Howsmon DP, Shaffer M, et al. Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders. *Anaerobe*. 2018 Feb 1;49:121–31.
175. Góra B, Gofron Z, Grosiak M, Aptekorz M, Kazek B, Kocelak P, et al. Toxin profile of fecal *Clostridium perfringens* strains isolated from children with autism spectrum disorders. *Anaerobe*. 2018 Jun 1;51:73–7.
176. Tabouy L, Getselter D, Ziv O, Karpuj M, Tabouy T, Lukic I, et al. Dysbiosis of microbiome and probiotic treatment in a genetic model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*. 2018 Oct 1;73:310–9.
177. Golubeva A V., Joyce SA, Moloney G, Burokas A, Sherwin E, Arboleya S, et al. Microbiota-related Changes in Bile Acid & Tryptophan Metabolism are Associated with Gastrointestinal Dysfunction in a Mouse Model of Autism. *EBioMedicine*. 2017 Oct 1;24:166–78.
178. de Theije CGM, Wopereis H, Ramadan M, van Eijndthoven T, Lambert J, Knol J, et al. Altered gut microbiota and activity in a murine model of autism spectrum disorders. *Brain Behav Immun*. 2014 Mar 1;37:197–206.

179. Buffington SA, Di Prisco GV, Auchtung TA, Ajami NJ, Petrosino JF, Costa-Mattioli M. Microbial Reconstitution Reverses Maternal Diet-Induced Social and Synaptic Deficits in Offspring. *Cell*. 2016 Jun 16;165(7):1762–75.
180. 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(4).
181. Roy Sarkar S, Banerjee S. Gut microbiota in neurodegenerative disorders. Vol. 328, *Journal of Neuroimmunology*. Elsevier B.V.; 2019. p. 98–104.
182. Zheng P, Zeng B, Zhou C, Liu M, Fang Z, Xu X, et al. Gut microbiome remodeling induces depressive-like behaviors through a pathway mediated by the host's metabolism. *Mol Psychiatry*. 2016 Jun 1;21(6):786–96.
183. Jiang H, Ling Z, Zhang Y, Mao H, Ma Z, Yin Y, et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun*. 2015 Aug 1;48:186–94.
184. Chung YCE, Chen HC, Chou HCL, Chen IM, Lee MS, Chuang LC, et al. Exploration of microbiota targets for major depressive disorder and mood related traits. *J Psychiatr Res*. 2019 Apr 1;111:74–82.
185. Chen Z, Li J, Gui S, Zhou C, Chen J, Yang C, et al. Comparative metaproteomics analysis shows altered fecal microbiota signatures in patients with major depressive disorder. *Neuroreport*. 2018 Mar; 29(5):417–25. Available from: <http://journals.lww.com/00001756-201803020-00013>
186. Kelly JR, Borre Y, O' Brien C, Patterson E, El Aidy S, Deane J, et al. Transferring the blues: Depression-associated gut microbiota induces neurobehavioural changes in the rat. *J Psychiatr Res*. 2016 Nov 1;82:109–18.
187. Valles-Colomer M, Falony G, Darzi Y, Tigchelaar EF, Wang J, Tito RY, et al. The neuroactive potential of the human gut microbiota in quality of life and depression. *Nat Microbiol*. 2019 Apr 1;4(4):623–32.
188. 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 Mar 1;32(3):315–20.
189. Slykerman RF, Hood F, Wickens K, Thompson JMD, Barthow C, Murphy R, et al. Effect of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 in Pregnancy on Postpartum Symptoms of Depression and Anxiety: A Randomised Double-blind Placebo-controlled Trial. *EBioMedicine*. 2017 Oct 1;24:159–65.
190. 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 Apr 1;38(2):522–8.

191. Miyaoka T, Kanayama M, Wake R, Hashioka S, Hayashida M, Nagahama M, et al. Clostridium butyricum MIYAIRI 588 as Adjunctive Therapy for Treatment-Resistant Major Depressive Disorder. Clin Neuropharmacol. 2018 Sep 1 [cited 2020 May 12];41(5):151–5. Available from: <http://journals.lww.com/00002826-201809000-00001>
192. Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. Neurogastroenterol Motil. 2011 Mar 1;23(3):255–e119. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x>
193. Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, Vancassel S, Cardona A, Daugé V, et al. Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats. Psychoneuroendocrinology. 2014 Apr 1;42:207–17.
194. Colica C, Avolio E, Bollero P, Costa De Miranda R, Ferraro S, Salimei PS, et al. Clinical Study Evidences of a New Psychobiotic Formulation on Body Composition and Anxiety. 2017; Available from: <https://doi.org/10.1155/2017/5650627>
195. Chong HX, Yusoff NAA, Hor YY, Lew LC, Jaafar MH, Choi SB, et al. Lactobacillus plantarum DR7 alleviates stress and anxiety in adults: A randomised, double-blind, placebo-controlled study. Benef Microbes. 2019 Mar 18;10(4):355–73.
196. 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(MAR):1–15.
197. Suez J, Zmora N, Segal E, Elinav E. The pros, cons, and many unknowns of probiotics. Nat Med. 2019; 25(May). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41591-019-0439-x>
198. Doron S, Snyderman DR. Risk and safety of probiotics. Clin Infect Dis. 2015;60(Suppl 2):S129–34.

## **Agradecimientos,**

En la realización de este trabajo he aprendido a nivel académico y a nivel personal. No sólo he aumentado muchísimo mis conocimientos sobre la microbiota y su futuro potencial como diana terapéutica, sino que también he aprendido a organizarme para realizar un trabajo con un nivel de implicación tan exigente.

Me gustaría dar las gracias a quien tuvo la idea inicial sobre el tema expuesto, el Dr. Francisco Javier Adín Ibarra. La microbiota me interesaba mucho y cuando vi que él era el tutor, no me costó mucho elegir este trabajo. Siempre ha sido un profesor muy entregado a sus alumnos y de quien tuve la oportunidad de aprender y disfrutar en sus clases durante la carrera y finalizar esta etapa realizando el trabajo de fin de grado con él, me parecía una gran oportunidad. Aunque las circunstancias no fueran las deseadas y Javier no pudiera terminar el trabajo conmigo, quiero agradecer el cariño y la confianza que puso en mí para escribir este trabajo, que le dedico de manera especial.

La otra persona fundamental a quien quiero agradecer este trabajo ha sido la Dra. Mónica Tramullas Fernández, quien cogió las riendas y se mostró disponible a ayudarme desde el primer momento. Me ha acompañado durante la realización del trabajo, dedicándome su tiempo, aconsejándome y guiándome para poder finalizar esta etapa. Sin la disponibilidad que ha mostrado desde nuestra primera reunión, a pesar de esta situación de pandemia, y sin su implicación, no habría podido finalizar el trabajo.

También me gustaría dar las gracias a todos aquellos investigadores que han empleado su tiempo y esfuerzo en la investigación de la microbiota. Sin sus hallazgos y logros científicos, no habría sido posible plantear la realización de este trabajo.

Por último, agradecer a mi familia y en especial a mi hermana Mónica. Ella es investigadora científica en otras áreas, pero realizando este trabajo he sido más consciente del papel fundamental que desempeña ella y el resto de los investigadores en el conocimiento y la divulgación científica. Además, como siempre, me ha demostrado su apoyo incondicional en todos mis proyectos personales y académicos.

