



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO
Probiogenómica y salud humana

Autor: Paula Navarro Carrera

Tutor: Carmina Rodríguez Fernández

Convocatoria: Junio 2018

RESUMEN

Bifidobacterium y *Lactobacillus* son dos géneros bacterianos, presentes en la microbiota intestinal, ampliamente utilizados en la industria alimentaria y farmacéutica por su carácter probiótico o beneficioso para la salud humana. Sin embargo, los mecanismos moleculares que permiten a estas bacterias tener dicho efecto en el organismo todavía no se conocen en profundidad. Por este motivo, estos microorganismos constituyen actualmente una de las dianas de estudio en el campo de la genómica, biología molecular y de la genética.

El desarrollo de estas ciencias, en los últimos años, ha permitido la secuenciación de un gran número de cepas de ambos géneros, dándose a conocer la información genética completa de varios miembros representativos de estos grupos de bacterias.

Surge así una nueva disciplina, la *probiogenómica*, con el objeto de profundizar en los mecanismos moleculares que regulan los efectos probióticos de dichas cepas.

En este trabajo se recogen diferentes análisis genómicos realizados en ambos géneros, que ayudan a comprender mejor los mecanismos de adaptación de estas bacterias al tracto gastrointestinal, así como la función de determinados genes en el fenómeno de la probiosis.

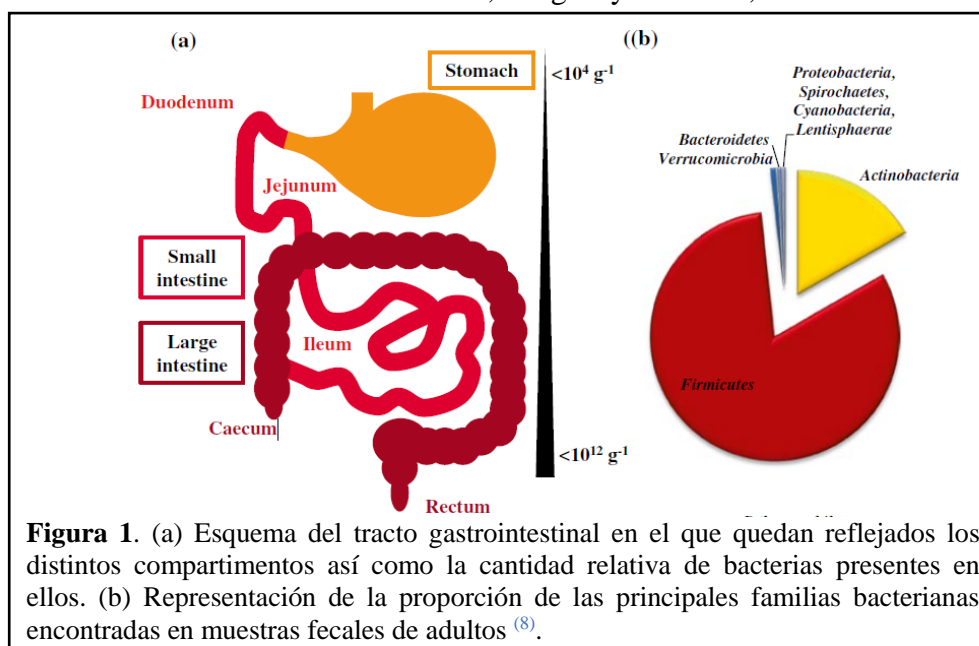
Palabras clave: probiogenómica, *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, probióticos, genómica, probiosis.

1. INTRODUCCIÓN

El intestino humano representa un ecosistema complejo, colonizado por una amplia y dinámica colección de bacterias que parece exceder en número al de células humanas y que en conjunto representa una mayor **variedad genética** que los genomas de sus huéspedes⁽¹⁾.

La colonización bacteriana del intestino comienza con el nacimiento y continúa durante toda la vida, con cambios importantes en función de la edad, la dieta, los tratamientos y patologías sufridas. La diversidad y las características de la microbiota difieren notablemente dependiendo de la región del intestino (Fig. 1) y pueden variar en función de diversos factores asociados al huésped (pH, ácidos biliares o mucus), factores ambientales (nutrientes y medicamentos) y factores microbianos (capacidad de adhesión, metabolismo, producción de bacteriocinas)⁽²⁾. Alteraciones en la composición

de la microbiota intestinal han sido recientemente vinculadas a varios procesos, tales como la enfermedad inflamatoria intestinal, alergias y obesidad, entre otros^(3,4,5,6,7).



La microbiota intestinal está constituida principalmente por especies de cinco Phyla bacterianos: *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Proteobacteria*, *Actinobacteria* y *Verrucomicrobia*, y se ha demostrado que algunas de ellas son necesarias para mantener el bienestar del huésped.

El concepto de **probiótico** se remonta al año 1908 cuando Metchnikoff declara que el consumo de ciertos alimentos fermentados tiene efectos positivos en la salud humana⁽⁹⁾. En esa misma época, el pediatra francés Henry Tissier observó que los niños con diarrea tenían en sus heces un escaso número de bacterias que, por el contrario, eran abundantes en niños sanos. Sugirió la posibilidad de administrar estas bacterias a pacientes con diarrea para facilitar el restablecimiento de una flora intestinal sana.

La definición actualmente aceptada de probiótico fue aprobada por la FAO y la OMS en el 2001 y ha sido revisada recientemente en el 2014 por la Asociación Científica Internacional de Probióticos y Prebióticos: “Los probióticos son microorganismos vivos que al ser administrados en la cantidad adecuada confieren un beneficio para la salud del huésped”.

Esta definición implica que la **seguridad** y la **eficacia** deben demostrarse para cada cepa probiótica. Hasta la fecha no se han propuesto criterios específicos para la selección de nuevos probióticos, pero existen requisitos generales que deben cumplirse como son la capacidad de adhesión a la mucosa intestinal y la tolerancia a ácidos y bilis^(10,11). Además, existen resultados científicos que sugieren que los probióticos tienen

otra serie de funciones, como son: actividad antiinflamatoria, prevención de infecciones gastrointestinales, reducción de intolerancias a la lactosa, reducción de la inflamación intestinal, alivio del estreñimiento, etc^(12,13,14). Sin embargo, los **mecanismos moleculares** implicados en todas ellas permanecen aún sin desvelar. La elucidación del genoma microbiano ofrece, en este sentido, la posibilidad de acelerar la investigación en materia de probióticos^(15,16,17).

Durante la última década, la investigación en microbiología ha dado un cambio importante gracias al empleo de nuevas técnicas de secuenciación, que han permitido la secuenciación del genoma de más de 1.000 bacterias, recogidos en la base de datos NCBI, lo que ayuda a comprender mejor la biología bacteriana.

Los esfuerzos iniciales fueron dirigidos principalmente a la secuenciación del genoma de bacterias patógenas⁽¹⁸⁾ debido a su mayor impacto en la salud humana. Los datos genómicos obtenidos han abierto nuevas vías de investigación e incluso, han permitido el nacimiento de nuevas disciplinas enfocadas al estudio del genoma de bacterias utilizadas en alimentación, comensales intestinales y bacterias probióticas. Fue en 2009 cuando surge la disciplina a la que hace referencia este trabajo, la **probiogenómica**, que tiene por objetivo revelar las bases moleculares que confieren a las bacterias probióticas la capacidad de promover la salud.

Integrar la información de la expresión génica en el intestino humano con los datos que aporta la *probiogenómica* y la genómica funcional permitiría ampliar el conocimiento sobre las funciones de la microbiota probiótica en las interacciones con otras bacterias presentes en el intestino y con el propio huésped⁽¹⁶⁾.

Con este trabajo se pretende hacer una revisión de los últimos estudios del genoma de la microbiota probiótica. En todos ellos se emplea la genómica como herramienta, así como otras *ciencias ómicas* que facilitan el análisis simultáneo de gran número de genes y de proteínas⁽¹⁹⁾, con el objeto de lograr una visión global sobre diversos aspectos de la evolución y la adaptación al intestino humano de estas bacterias.

En concreto, se han elegido dos modelos probióticos: *Bifidobacterium* spp. y *Lactobacillus* spp., pertenecientes a los Phyla *Actinobacterias* y *Firmicutes*, respectivamente. Ambos son microorganismos Gram positivos utilizados en la industria como bacterias probióticas y suelen clasificarse dentro de un mismo grupo debido a que comparten ciertas características metabólicas, como es la producción de ácido láctico; aunque desde el punto de vista filogenético existe cierta distancia entre ambos géneros⁽²⁰⁾.

2. OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo son:

1. Profundizar en el conocimiento de las bacterias probióticas.
2. Revisar las nuevas exigencias de los organismos internacionales (OMS y FAO) en materia de probióticos.
3. Analizar la *probiogenómica* como nueva disciplina y definir sus dianas de estudio.
4. Considerar los beneficios que aporta en el desarrollo de una nueva generación de probióticos.

3. METODOLOGÍA

Revisión bibliográfica en la que se han empleado diferentes fuentes: revistas de divulgación científica, como *Nature*, *Elsevier*, *Bioengineered bugs* y *Annual Reviews of Microbiology, Nutrition and Food Science and Technology*, así como artículos de investigación publicados en diferentes bases de datos como *Pubmed* y *Google académico*.

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>)

Med Line (<https://www.nlm.nih.gov/bsd/pmresources.html>)

Web of Science (<https://login.webofknowledge.com>)

Bucea (<http://biblioteca.ucm.es>) Cisne (<http://cisne.sim.ucm.es>)

Google Scholar (<https://scholar.google.co.in/schhp?hl=en>)

Elsevier (www.elsevier.com); Science Direct (<http://www.sciencedirect.com>)

Las palabras clave de búsqueda fueron: *microbiome*, *human microbiome*, *human microbiota*, *probiotics*, *probiogenomics*, *probiotics reviews disease microbiome*, *intestinal microbiome*.

Web de *Probiogenomics Lab* (http://probiogenomics.unipr.it/photos_lab.html) de la Universidad de Parma, que recoge las publicaciones más relevantes de los grupos de investigación que actualmente trabajan en esta nueva disciplina.

Se consultaron documentos publicados por organismos oficiales tales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), la Sociedad Española de Probióticos y Prebióticos, la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN), la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA).

Así mismo, se ha utilizado la herramienta BUCEA que mediante una única consulta, busca simultáneamente en las múltiples bases de datos y colecciones electrónicas de la Biblioteca Complutense.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Nacimiento de la probiogenómica

La Consulta Mixta de Expertos **FAO/OMS** sobre Evaluación de las Propiedades Saludables y Nutricionales de los Probióticos en los Alimentos, que tuvo lugar en Argentina en el 2001, reconoció la necesidad de establecer un criterio sistemático para la evaluación de probióticos en los alimentos con la finalidad de justificar las declaraciones de propiedades saludables. Concretamente se propuso que se llevaran a cabo experimentos moleculares claros (*in vitro* y/o *in vivo*) para determinar los **mecanismos de probiosis**, como el análisis genético de estas bacterias.

Como respuesta a estos nuevos requerimientos por parte de los organismos internacionales, y gracias al importante avance en las técnicas de secuenciación genómica en los últimos años, surge la *probiogenómica* como una disciplina que se basa en la genómica funcional y la bioinformática para caracterizar molecular y funcionalmente a las bacterias probióticas.

Esta nueva especialidad aporta información relevante en cuanto a la capacidad metabólica de los probióticos, la interacción con el huésped, la adaptación genética para la supervivencia y la colonización del intestino humano, así como aspectos relacionados con la bioseguridad.

Además, permite obtener la huella genética completa de los microorganismos facilitando su identificación taxonómica, y rastrear su presencia y estabilidad genética en ecosistemas complejos y productos comerciales. Por lo tanto, la *probiogenómica* es esencial en el proceso de desarrollo de **nuevas generaciones de cepas probióticas**.

No obstante, será necesario estudiar experimentalmente las características predichas a partir del genoma mediante técnicas genómicas funcionales *in vivo* (por ejemplo, durante la colonización del intestino). Los experimentos funcionales probiogenómicos determinarán los genes cuya expresión se ve modificada en el microorganismo probiótico durante la colonización del intestino humano. De esta forma, se conseguiría revelar los mecanismos genéticos y moleculares que regulan los efectos probióticos de las bacterias.

4.2 Mecanismos de evolución de las bacterias probióticas

Desde una perspectiva evolutiva, las bifidobacterias y lactobacilos utilizados como probióticos han evolucionado aumentando su arsenal genético con el fin de colonizar con éxito el intestino humano y competir con otros miembros de la microbiota autóctona. La disponibilidad de las secuencias completas del genoma de bacterias presenta una gran oportunidad para reconstruir eventos de la evolución del genoma.

En la era pre-genómica se pensaba que los genomas bacterianos se habían originado a partir de un ancestro con el genoma más pequeño a través de numerosos eventos de duplicación de genes⁽²¹⁾. Sin embargo, un reciente análisis basado en los datos disponibles del genoma bacteriano no apoya esta teoría; demuestra que la duplicación de genes es un fenómeno que contribuye sólo en parte a la evolución del genoma⁽²²⁾. Se ha comprobado que existen otros eventos genéticos que contribuyen al genoma final.

Los principales motores de la evolución incluyen la duplicación de genes, la transferencia horizontal de genes, la pérdida de genes y el reordenamiento cromosómico.

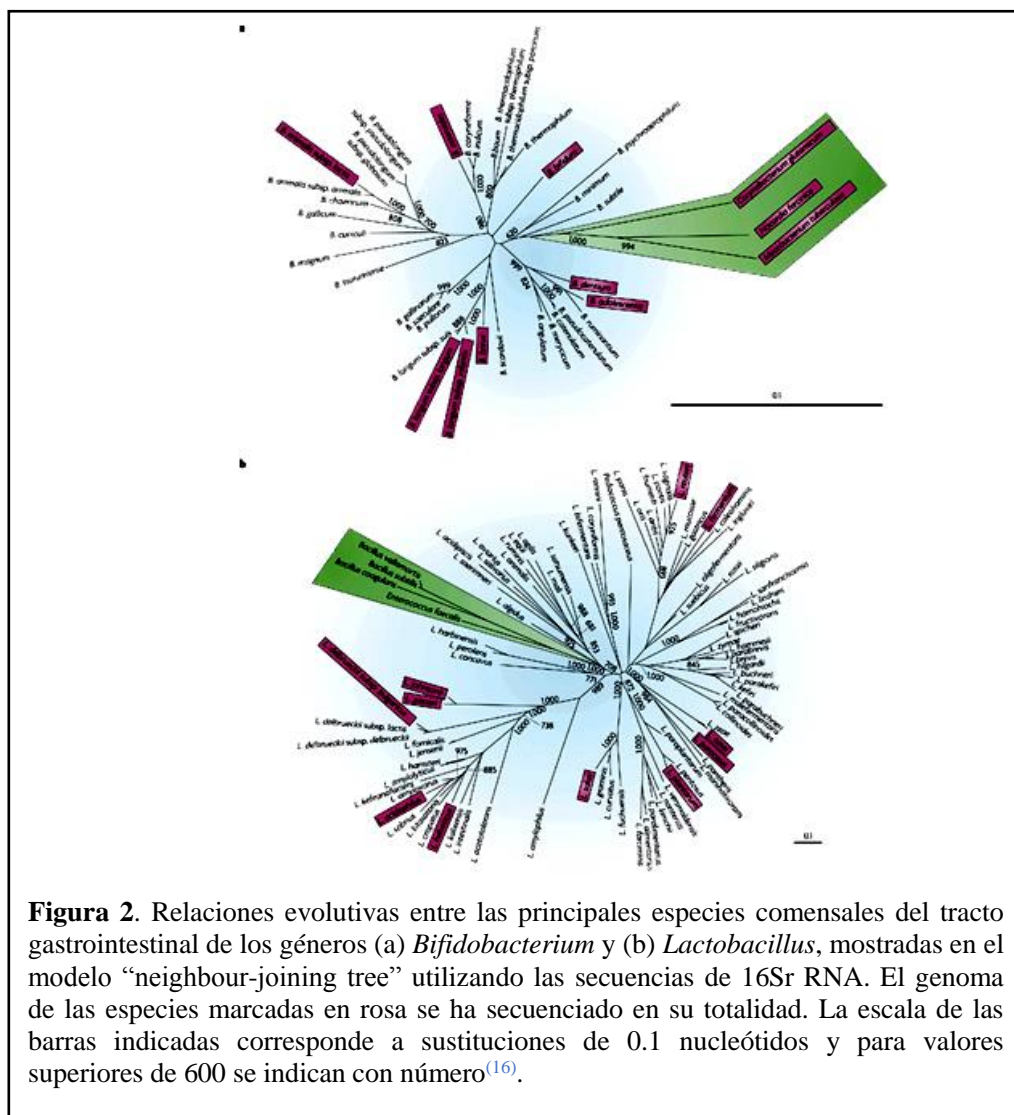
Los eventos de transferencia horizontal son responsables de la introducción de una variedad de funciones en los genomas bacterianos y, en consecuencia, han mejorado la competitividad de las bacterias en sus entornos naturales. Los genes que codifican transportadores de azúcares e hidrolasas de hidratos de carbono pueden ser un ejemplo de genes adquiridos por este mecanismo, al igual que los genes implicados en la producción de exopolisacáridos en la especie *B. longum* biotipo *longum* NCC2705, que participan en la adaptación de este organismo a un nicho ecológico específico. Por todo ello, el concepto actual de evolución incluye tanto las variaciones genéticas generadas verticalmente como las adquiridas horizontalmente⁽²³⁾.

4.3 Genómica de las bacterias probióticas

Disponer de la secuencia del genoma completo de los microorganismos utilizados como probióticos ha ampliado considerablemente el conocimiento de su biología y, además, ha generado una gran cantidad de información acerca de la filogenia, de la genética y de las capacidades metabólicas de estas bacterias.

Actualmente, de 37 especies conocidas del género *Bifidobacterium*, sólo 11 genomas de bifidobacterias han sido totalmente secuenciados y se encuentran en la base

de datos NCBI. Sin embargo, hasta el momento, el estudio genómico se ha dirigido principalmente al género *Lactobacillus*, decodificándose más de 26 genomas, ya que dichas bacterias se incluyen como activos en diferentes alimentos funcionales. Así, diversas cepas probióticas han sido secuenciadas (*Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*, *L. fermentum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii*, *L. plantarum*, *L. salivarius* y *L. reuteri*) y la información genética obtenida ha mejorado considerablemente el conocimiento acerca de la funcionalidad de estas especies, así como de sus mecanismos de adaptación al entorno del tracto gastrointestinal y de interacción con el huésped.



Las diferencias entre los genomas de bifidobacterias y lactobacilos ponen de manifiesto su distinta filogenia (Fig. 2), pero además reflejan los diferentes nichos que ocupan y las actividades metabólicas que desempeñan. El genoma de *Bifidobacterium* refleja su prototrofia y, por tanto, su buena adaptación en medios con bajas concentraciones de nutrientes como aminoácidos, nucleótidos o vitaminas⁽²⁴⁾. Un

ejemplo de ello es la especie *B. breve* UCC2003, cuyo genoma codifica para homólogos que participan en la síntesis de nucleótidos a partir de glutamina. Al contrario ocurre en el género *Lactobacillus*, cuyo genoma muestra auxotrofia por estos mismos compuestos.

4.3.1 *Bifidobacterium* y adaptación al medio intestinal

Estudios comparativos del genoma de bifidobacterias revelan que el pangenoma de este género consta de más de 5.000 genes⁽²⁵⁾. La función de muchos de éstos es todavía desconocida, pero se puede predecir que son de verdadera importancia para la colonización y la supervivencia en el intestino.

Se observó que todas las cepas secuenciadas compartían un grupo de 967 genes, la mayoría implicados en tareas de replicación, transcripción, translación o traducción de señales⁽²⁵⁾. Este estudio también permitió la identificación de genes únicamente presentes en una de las cepas (TUG, *truly unique genes*), que posiblemente aporten a estas bacterias funciones determinadas. A pesar de ello, el genoma de *Bifidobacterium* está bastante conservado⁽¹⁶⁾ (Fig. 3), lo contrario ocurre en el género *Lactobacillus*, en el que existe gran heterogeneidad desde el punto de vista filogenético, fenotípico y ecológico⁽²⁶⁾.

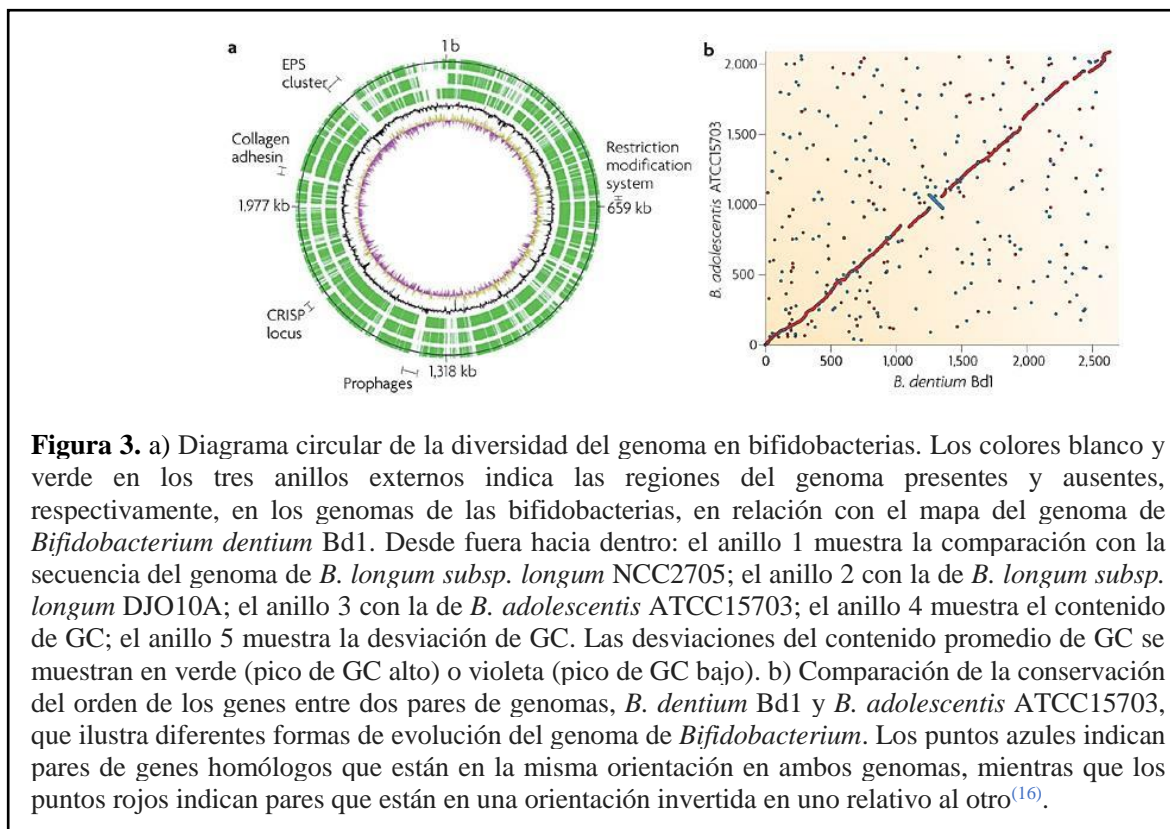
El ejemplo más característico de adaptación de las bacterias probióticas al intestino humano, es la capacidad de éstas de metabolizar diferentes tipos de carbohidratos que el sistema enzimático del huésped no consigue degradar.

Así, el género *Lactobacillus* aparece especialmente en la parte superior del intestino donde fermenta mono-, di- y trisacáridos, mientras que en la región del colon se encuentran principalmente bacterias del género *Bifidobacterium*, capaces de metabolizar carbohidratos complejos. En concreto, el 10% del genoma de bifidobacterias codifica proteínas de transporte y metabolismo de carbohidratos, un 30% más que otra serie de microorganismos que pueden colonizar el intestino.

Como ejemplo se puede mencionar el cluster “*life-style adaptation*” de *B. longum* biotipo *longum* NCC2705, que incluye genes que codifican enzimas de degradación de azúcares complejos; alfa-manosidasas y endo-beta-NAcetil-glucosaminidasas, entre otras⁽²⁷⁾.

Un miembro importante de la población de bifidobacterias, que se encuentra con frecuencia en la microbiota intestinal del lactante es *B. longum* biotipo *infantis* ATCC 15697, cuyo genoma contiene características que explican la capacidad de esta cepa

para consumir carbohidratos específicos de la leche humana conocidos como oligosacáridos humanos de la leche (HMO). En concreto, esta subespecie alberga un grupo de genes que codifica varias glucosil hidrolasas y transportadores de carbohidratos necesarios para el transporte y el metabolismo de estos HMO.



Además, el genoma de este microorganismo contiene *loci* adicionales que codifican fucosidasas y sialidasas, así como una ureasa, implicada en la utilización de urea, la cual representa una importante fuente de nitrógeno en la leche⁽²⁸⁾.

Otro ejemplo de adaptación al ambiente intestinal puede observarse en la especie *B. bifidum*⁽²⁹⁾. Dentro de este género, se trata de la especie que cuenta con mayor capacidad para metabolizar los glicanos derivados del huésped, como la mucina del epitelio intestinal⁽³⁰⁾, consiguiendo así un aporte de carbono en un ambiente pobre en nutrientes como es el del colon. La degradación de la mucina por parte de estas bacterias puede estimular su secreción por las células epiteliales, siendo de gran importancia en pacientes que sufren la enfermedad de colon irritable⁽⁸⁾.

Alguno de los mediadores importantes de la interacción con el huésped son los inhibidores de proteasas de tipo serpina, codificados por *B. longum* biotipo *longum* NCC2705 y *B. breve* UCC2003⁽³¹⁾. La serpina codificada por *B. longum* biotipo *longum* NCC2705 es un inhibidor eficiente de neutrófilos humanos y elastasas pancreáticas,

cuya liberación por neutrófilos activados en los sitios de inflamación intestinal representa un mecanismo de control de la inmunidad innata. Esta propiedad hace que estos microorganismos puedan emplearse como terapia probiótica en la colitis ulcerosa⁽³²⁾. Un ensayo reciente indica la presencia de este gen en siete especies diferentes de bifidobacterias, tres de los cuales, *B. longum* biotipo *longum*, *B. longum* biotipo *infantis* y *B. breve*, se encuentran comúnmente dentro de la microbiota intestinal humana⁽³³⁾. La presencia de dicho inhibidor de proteasa puede proporcionar una ventaja ecológica a bifidobacterias ya que la actividad de la serpina puede protegerlos contra las proteasas del huésped⁽³⁴⁾.

Además, el estudio del genoma de bifidobacterias también ha permitido la identificación de genes implicados en la resistencia a altas temperaturas, a la acidez del estómago, la presencia de sales biliares en el intestino o cambios de presión osmótica. Las bifidobacterias entéricas cuentan con un arsenal de chaperonas, bombas de eflujo de bilis, hidrolasas de sales y ATPasas para hacer frente a estas condiciones de estrés.

Por ejemplo, la F1-F0 ATPasa codificada en el operón *atp* de *Bifidobacterium spp.*, es una enzima esencial para el crecimiento de estas bacterias en medio ácido⁽²⁷⁾. Conocer esta serie de genes ha permitido desarrollar probióticos con propiedades tecnológicas adecuadas y que además sobrevivan al paso por el tracto gastrointestinal.

4.3.2 *Lactobacillus* y adaptación al medio intestinal

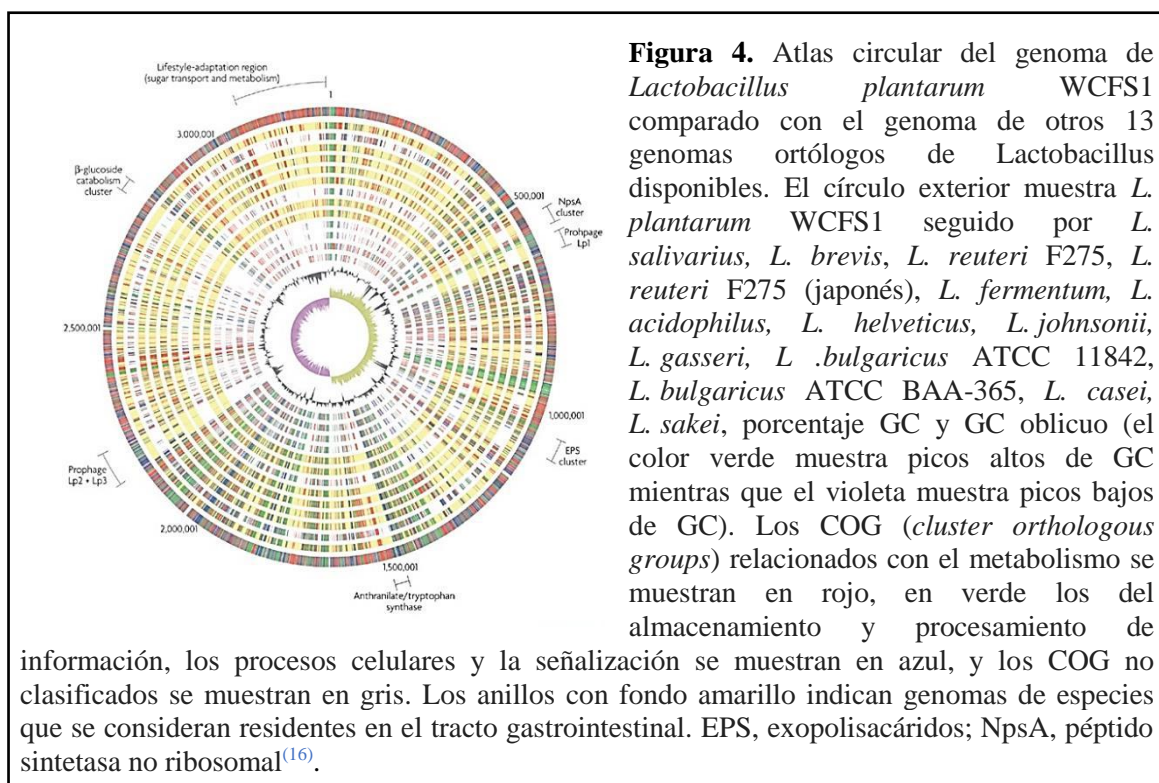
La duplicación génica en el género *Lactobacillus* se da principalmente en genes que codifican peptidasas y proteínas transportadoras de aminoácidos, así como genes implicados en el metabolismo y transporte de carbohidratos⁽³⁵⁾.

Además, análisis comparativos entre las diferentes especies que colonizan el tracto gastrointestinal, como *L. acidophilus*, *L. gasseri* y *L. johnsonii* y las presentes en la leche, como *L. helveticus* y *L. bulgaricus*, revelan cambios genéticos que parecen haber sido el resultado de la presión selectiva en determinados nichos, permitiendo la evolución de la especie^(35,36,37). Un ejemplo de ello son los genes que codifican enzimas metabolizadoras de azúcares en la leche, que se encuentran en el genoma de las especies *L. helveticus* y *L. bulgaricus*.

Un signo claro de adaptación al intestino humano son una serie de hidrolasas y transglucosilasas codificadas en el genoma de *L. plantarum* WCFS1 implicadas en la unión a colágeno o mucina⁽³⁸⁾, las adhesinas de unión al epitelio identificadas en el

genoma de *L.acidophilus* NCFM⁽³⁹⁾ o las hidrolasas de sales biliares (BSH) codificadas por todos los lactobacilos intestinales secuenciados⁽⁴⁰⁾.

Los análisis comparativos del genoma de la especie *L. plantarum* (Fig. 4) revelaron la existencia de una región de DNA, llamado *life-style cassette*, que engloba los genes que parecen intervenir en el metabolismo de carbohidratos (representados por los sistemas PEP-PTS y las glicosil hidrolasas)⁽⁴¹⁾.



Además de la duplicación génica, la adquisición de genes en el género *Lactobacillus* ha sido a través de transmisión horizontal (HGT) de los mismos. Los genes que codifican receptores de superficie en *L. johnsonii* y el cluster de exopolisacáridos en el complejo *L. acidophilus* son claros ejemplos de HGT en lactobacilos probióticos⁽³⁷⁾.

También se ha descrito en el género *Lactobacillus* la transferencia de material extracromosómico, como el megaplásmido UCC118 encontrado en *L. salivarius*, que representa alrededor del 11% de la capacidad codificante del genoma de esta especie. Este megaplásmido contiene la información necesaria para la producción de bacteriocinas, hidrolasas de sales biliares y dos genes implicados en la ruta de la fosfoetolasa, enzima que interviene en la fermentación heteroláctica de la glucosa⁽⁴²⁾.

4.4 Mecanismos de probiosis

Los mecanismos moleculares de las bacterias probióticas en el huésped pueden resumirse en los siguientes (Fig. 5):

1. Modulación de la composición y de la función de la microbiota. La mayoría de probióticos son productores de ácido láctico y tienen actividad antimicrobiana. Otros mecanismos más específicos incluyen la inhibición de patógenos por producción de bacteriocinas, competición por nutrientes y alteración del metaboloma intestinal.
2. Regulación de la función de la barrera epitelial por disminución de la permeabilidad, favorecer la proliferación e inhibir la apoptosis de células epiteliales.
3. Modulación de la respuesta inmunitaria. Todos los probióticos presentan PAMPs (patrones moleculares asociados a patógenos), pequeñas secuencias de moléculas encontradas en patógenos que son reconocidos por receptores específicos, tales como TLR, NLR y RLR en el huésped y que tienen efecto en la respuesta inmunitaria innata y adaptativa, principalmente a través de interacciones con monocitos, macrófagos y células dendríticas, modulando la respuesta de T-helpers, células T reguladoras o la producción de anticuerpos por las células B.
4. Modulación de procesos metabólicos por producción de hidrolasas de sales biliares, efecto en hormonas de la saciedad o regulaciones endocrinas.
5. Señalización a través del sistema nervioso a través de la vía del triptófano, del GABA o la producción de oxitocina⁽⁴³⁾.

A continuación, se exponen algunos ejemplos de estos mecanismos que han sido estudiados en bacterias de los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*.

Lactobacillus rhamnosus GG es uno de los microorganismos probióticos clínicamente más documentados y comercializados, con beneficios para el huésped que van desde la salud gastrointestinal⁽⁴⁴⁾ hasta efectos inmunomoduladores, como la prevención de enfermedades del tracto respiratorio superior⁽⁴⁵⁾ o el eczema atópico en niños⁽⁴⁶⁾.

El estudio del mecanismo de acción de esta bacteria ha sido difícil debido a la presencia de pili SpaCBA en su superficie. Los análisis comparativos de estos pili aislados y *L. rhamnosus* GG han demostrado que éstos son clave para la adhesión al mucus humano y al epitelio intestinal, modulan las interacciones inmunoregulatoras con monocitos y células dendríticas, e incluso promueven la exclusión de patógenos como *Enterococcus faecium*⁽⁴⁷⁾.

Se ha comprobado que *L. rhamnosus* GG disminuye la producción de citoquinas inflamatorias en respuesta a *Salmonella*, al menos parcialmente, a través de la subunidad SpaC de los pili⁽⁴⁸⁾. Además del pili, otras moléculas con una función esencial han sido identificadas en *L. rhamnosus* GG como promotoras de la salud, es el caso de las proteínas p40 y p75 (enzimas que degradan el peptidoglicano) que evitan la apoptosis y la colitis inducidas por citoquinas y protegen frente al daño epitelial inducido por TNF⁽⁴⁹⁾, el ácido lipoteicoico que modula negativamente la colitis⁽⁵⁰⁾ y el ADN rico en CpG que suprime la IgE específica de alérgeno⁽⁵¹⁾.

Dentro de la especie *L. acidophilus* existen varias cepas que se emplean como probióticos, siendo *L. acidophilus* NCFM la cepa modelo. Una de las características más importantes de la superficie celular de *L. acidophilus* NCFM son sus proteínas de superficie (S-Layer) codificadas por tres genes: slpA (LBA0169), slpB (LBA0175) y slpX (LBA0512). Se ha demostrado que estas proteínas protegen frente a la infección viral, sirven de anclaje para enzimas asociadas a la superficie y facilitan la adhesión celular a través de receptores inmunes. Concretamente, SlpA se une a la lectina de tipo C -el receptor inmunitario del huésped SIGNR3- y actúa mitigando la colitis y protegiendo la mucosa intestinal en ratones⁽⁵²⁾. Del mismo modo, un mutante *knock-out* de *L. acidophilus* NCFM para el ácido lipoteicoico, también es capaz de mitigar la colitis a través de un mecanismo que involucra IL-10 y CD4(+) FoxP3(+) T reguladoras para reducir la inflamación de la mucosa⁽⁵³⁾.

Otras moléculas con efecto probiótico también se han identificado en otras cepas. Por ejemplo, usando mutantes *knock-out* de *Lactobacillus salivarius* UCC118 para la bacteriocina Abp118, se ha demostrado que Abp118 limita la infección por *Listeria monocytogenes* en ratones. *L. salivarius* UCC118 también es capaz de proteger frente a *Salmonella*, pero sin participación de la bacteriocina Abp118. Se cree que el mecanismo de probiosis en este caso es menos específico, pudiendo ser por inmunomodulación, por exclusión competitiva o por la presencia de ácido láctico, a la que *Salmonella* es bastante sensible *in vitro*⁽⁵⁴⁾. El peptidoglicano de *Lactobacillus casei* también es importante en la inhibición de la síntesis de IL12p40, lo que conduce a una reducción en la secreción de IL12 e IL23, dos citoquinas implicadas en enfermedades autoinmunes y en enfermedades inflamatorias intestinales⁽⁵⁵⁾.

En comparación con la mayoría de los lactobacilos, las bifidobacterias son más refractarias a la ingeniería genética, pero también se han logrado avances importantes en este género. El análisis del genoma de *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveló

información respecto a su adaptación genética a la colonización y persistencia en el intestino humano a través de la producción de *pili* tipo IVb o Tad-*pili*. En *Bifidobacterium longum* 35624, se mostró que los exopolisacáridos de la superficie son esenciales en el control de las respuestas pro-inflamatorias y en las mediadas por Th17⁽⁵⁶⁾.

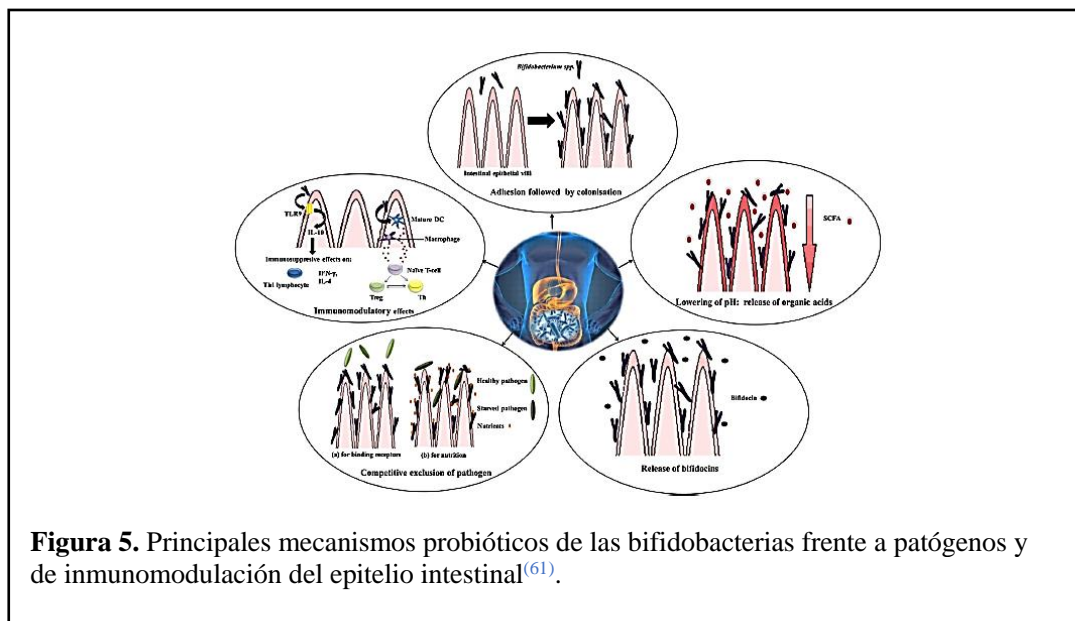
Se sabe que los metabolitos producidos en las rutas fermentativas de *Bifidobacterium* como los ácidos grasos (AG) de cadena corta, derivados de ácidos grasos poliinsaturados, peróxidos de hidrógeno, diacetilos y dióxidos de carbono inhiben el crecimiento de los patógenos. Entre los AG de cadena corta se incluyen lactatos, formatos, acetatos, propionatos y butiratos. Éstos y otros ácidos orgánicos son fundamentales en la reducción del pH intestinal, evitando el crecimiento y la colonización por patógenos⁽⁵⁷⁾. Varios experimentos *in vivo* han demostrado la función protectora del acetato de bifidobacterias contra *Escherichia coli* O157: H7 enterohemorrágica.

Los efectos antimutagénicos de las bifidobacterias han fomentado el uso de cepas de este género para reducir los niveles de enzimas cancerígenas y el cáncer colorrectal. Se sabe que los metabolitos tales como propionatos y butiratos ejercen un efecto antagónico especialmente sobre la proliferación celular del carcinoma de colon. Otras vías biosintéticas de las bifidobacterias como la síntesis de vitamina B12 y folatos, confieren protección contra el cáncer. Los AG poliinsaturados son particularmente interesantes debido a las propiedades anticancerígenas, antiinflamatorias, antiaterogénicas y antidiabéticas⁽⁵⁸⁾. Por tanto, la fermentación de componentes de carbohidratos en la dieta por especies probióticas confiere una amplia gama de efectos beneficiosos para la salud.

Uno de los mecanismos sugeridos para el efecto probiótico de las bifidobacterias es a través de la liberación de bacteriocinas. Estos compuestos generalmente tienen una amplia actividad contra algunas especies de los géneros *Bacillus*, *Enterococcus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium*, *Shigella*, *Staphylococcus* y *Streptococcus*. La bifidocina A aislada de *B. animalis* BB04 muestra actividad bactericida frente a bacterias Gram positivas y negativas y algunas levaduras, a través de la lisis celular de patógenos; mientras que la acidocina B aislada de *Bifidobacterium spp.* inhibe *Clostridium spp.* en productos alimenticios fermentados⁽⁵⁹⁾.

Las bifidobacterias probióticas estimulan la secreción de mucus en el epitelio intestinal, una capa que se reemplaza constantemente, evitando así la fuerte adhesión de

patógenos. El daño producido por el factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) sobre la barrera epitelial también se vio frenado gracias a algunas especies de bifidobacterias⁽⁶⁰⁾.



Las bifidobacterias probióticas estimulan la secreción de mucus en el epitelio intestinal, una capa que se reemplaza constantemente, evitando así la fuerte adhesión de patógenos. El daño producido por el factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) sobre la barrera epitelial también se vio frenado gracias a algunas especies de bifidobacterias⁽⁶¹⁾.

Un ejemplo de la función inmunomoduladora específica de bifidobacterias se ha comprobado en las cepa. *B. adolescentis* DB-2458 y *B. longum* subsp. *infantis* GB-1496 aisladas de la leche materna humana, ambas regulan los niveles de citocinas asociadas a la respuesta Th1 / Th2⁽⁶²⁾.

Con ejemplos como los anteriores, se comprende que la eficacia probiótica depende de un conjunto de interacciones de carácter multifactorial entre la microbiota humana y el huésped. Varias de las moléculas descritas no son específicas de una cepa, sino que también tienen homólogos en otras cepas y especies o incluso en todo el género, como ocurre con el Tad pili de *Bifidobacterium*.

Por otro lado, la presencia o ausencia de un mecanismo específico en un probiótico puede no traducirse en un beneficio neto en la salud. Cada especie probiótica tiene unas características específicas de pared celular, DNA/RNA, proteínas, metabolitos primarios y secundarios, y enzimas como lactasas e hidrolasas de sales biliares. Todas estas moléculas, junto con el contexto ambiental al que se exponen, serán determinantes en el efecto final del producto probiótico en el individuo. Para

obtener una nueva generación de probióticos cuyo beneficio quede justificado científicamente, es preciso tener en cuenta factores no sólo dependientes de la cepa en sí, sino también otros como la dosis, la viabilidad, la respuesta específica en el huésped, la diana de acción, el tiempo de duración de la actividad probiótica y posibles efectos sumatorios con otras cepas, entre otros⁽⁴³⁾.

5. CONCLUSIONES

1. Prácticamente la totalidad de los probióticos basados en *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, actualmente en el mercado, fueron seleccionados según su estabilidad y resistencia durante el procesamiento de alimentos y el almacenamiento, o atendiendo a algún fenotipo fácilmente medible como la capacidad de tolerar las sales biliares o sobrevivir al paso GIT, pero no necesariamente por aportar beneficios probados en la salud del huésped.
2. Actualmente las exigencias regulatorias en materia de probióticos, se orientan hacia la necesidad de comprender los mecanismos moleculares concretos por los cuales las bacterias probióticas influyen beneficiosamente en la salud humana. La caracterización de estas bacterias, empleando la genómica y la metabolómica, puede ser una de las vías más adecuadas para alcanzar este objetivo.
3. La probiogenómica pretende demostrar, en este sentido, que las características genómicas de estas bacterias reflejan su adaptación al intestino humano y que además aportan información en cuanto a sus mecanismos de probiosis.
4. Un estudio más exhaustivo de la composición y funcionalidad de la microbiota en el tracto gastrointestinal podría proporcionar la información necesaria para predecir la susceptibilidad de las personas con un genotipo concreto a determinados cepas probióticas, con el objetivo final de lograr una mayor eficacia en el individuo.
5. Estos estudios también podrían avalar terapias probióticas de prevención o tratamiento de patologías en las que se ha visto que la participación de estas bacterias es clave.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Backhed F, Ley R. E, Sonnenburg J. L, Peterson D. A, Gordon J. I. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*. 2005. 307:1915–1920.
2. Prakash S, Rodes L, Coussa-Charley M, Tomaro-Duchesneau C. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics*. 2011. 5:71-86.

3. Ley R. E, Peterson D. A., Gordon J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell*. 2006. 124: 837–848.
4. Turnbaugh P. J, *et al*. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006. 444:1027–1031.
5. Frank D. N, *et al*. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2007. 104:13780–13785.
6. Kassinen A, *et al*. The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology*. 2007. 133: 24–33.
7. Manichanh, C. *et al*. Reduced diversity of faecal microbiota in Crohn’s disease revealed by a metagenomic approach. *Gut*. 2006. 55: 205–211.
8. Turróni F, Ventura M, Buttó L.F, *et al*. Molecular dialogue between the human gut microbiota and the host: a *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* perspective. *Cell. Mol. Life Sci*. 2014. 71(2):183-203.
9. Metchnikoff E. The prolongation of life. Optimistic studies. 1908. *G.P. Putnam’s Sons*
10. Salminen S, Nurmi J, Gueimonde M. The genomics of probiotic intestinal microorganisms. *Genome Biol*. 2005. 6:225.
11. Dunne C, Murphy L, Flynn S, *et al*. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999. 76:279-92.
12. Goldin BR. Health benefits of probiotics. *Br J Nutr*. 1998. 80:203-207.
13. Saxelin M, Tynkkynen S, Mattila-Sandholm T, de Vos WM. Probiotic and other functional microbes: from markets to mechanisms. *Curr Opin Biotechnol*. 2005. 16:204-11.
14. Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002. 82:279-289.
15. Turróni F, Ribbera A, Foroni E, van Sinderen D, Ventura M. Human gut microbiota and bifidobacteria: from composition to functionality. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2008. 94:35-50.
16. Ventura M, O’Flaherty S, Claesson MJ, *et al*. Genome-scale analyses of health-promoting bacteria: probiogenomics. *Nat Rev Microbiol*. 2009. 7:61-71.
17. Turróni F, van Sinderen D, Ventura M. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium*. *Int J Food Microbiol*. 2011. 149:37-44.
18. Pallen MJ, Wren BW. Bacterial pathogenomics. *Nature*. 2007. 449:835-842.
19. Joyce A. R, Palsson, B. O. The model organism as a system: integrating ‘omics’ data sets. *Nature Rev. Mol. Cell Biol*. 2006. 7:198–210.
20. Ventura M, Turróni F, and van Sinderen D. Probiogenomics as a tool to obtain genetic insights into adaptation of probiotic bacteria to the human gut. *Bioengineered Bugs*. 2012. 3(2):73–79.
21. Kunisawa T. Identification and chromosomal distribution of DNA sequence segments conserved since divergence of *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *J Mol Evol*. 1995. 40:585–593.
22. Gevers D, Vandepoele K, Simillon C, Van de Peer Y. Gene duplication and biased functional retention of paralogs in bacterial genomes. *Trends Microbiol*. 2004. 12:148–154.
23. Woese CR. Interpreting the universal phylogenetic tree. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000. 97:8392–8396.
24. Ventura M, Canchaya C, Tauch A, *et al*. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007. 71:495-548.
25. Bottacini F, Medini D, Pavesi A, *et al*. Comparative genomics of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology*. 2010. 156:3242-54.
26. Claesson MJ, van Sinderen D, O’Toole PW. *Lactobacillus* phylogenomics-towards a reclassification of the genus. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2008. 58:2945-54.
27. Ventura M, Canchaya C, Fitzgerald GF, Gupta RS, van Sinderen D. Genomics as a means to understand bacterial phylogeny and ecological adaptation: the case of bifidobacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2007. 91(4):351-72.
28. Sela DA, Chapman J, Adeuya A, *et al*. The genome sequence of *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* reveals adaptations for milk utilization within the infant microbiome. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008. 105:18964-9.

29. Turróni F, Foróni E, Pizzetti P, *et al.* Exploring the diversity of the bifidobacterial population in the human intestinal tract. *Appl Environ Microbiol.* 2009. 75:1534-45.
30. Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Fernández-García M, de los Reyes-Gavilán CG, Margolles A. Mucin degradation by *Bifidobacterium* strains isolated from the human intestinal microbiota. *Appl Environ Microbiol.* 2008. 74:1936-40.
31. Motherway MO, Zomer A, Leahy SC, *et al.* Functional genome analysis of *Bifidobacterium breve* UCC2003 reveals type IVb tight adherence (Tad) pili as an essential and conserved host-colonization factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011. 108:11217-22.
32. Suzuki A, Mitsuyama K, Koga H, *et al.* Bifidogenic growth stimulator for the treatment of ulcerative colitis: a pilot study. *Nutrition.* 2006. 22:76-81.
33. Turróni F, Foróni E, O'Connell Motherway M, *et al.* Characterization of the serpin-encoding gene of *Bifidobacterium breve* 210B. *Appl Environ Microbiol.* 2010. 76:3206- 19.
34. Ivanov D, Emonet C, Foata F, *et al.* A serpin from the gut bacterium *Bifidobacterium longum* inhibits eukaryotic elastase like serine proteases. *J Biol Chem.* 2006. 281:17246- 52.
35. Makarova KS, Koonin EV. Evolutionary genomics of lactic acid bacteria. *J Bacteriol.* 2007. 189:1199-208.
36. van de Guchte M, Penaud S, Grimaldi C, *et al.* The complete genome sequence of *Lactobacillus bulgaricus* reveals extensive and ongoing reductive evolution. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006. 103:9274-9.
37. Altermann E, Russell WM, Azcarate-Peril MA, *et al.* Complete genome sequence of the probiotic lactic acid bacterium *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005. 102:3906-12.
38. Boekhorst J, Helmer Q, Kleerebezem M, Siezen RJ. Comparative analysis of proteins with a mucus-binding domain found exclusively in lactic acid bacteria. *Microbiology.* 2006. 152:273-80.
39. Buck BL, Altermann E, Svingerud T, Klaenhammer TR. Functional analysis of putative adhesion factors in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. *Appl Environ Microbiol.* 2005. 71(12):8344–8351.
40. Lambert JM, Siezen RJ, de Vos WM, Kleerebezem M. Improved annotation of conjugated bile acid hydrolase superfamily members in Gram-positive bacteria. *Microbiology.* 2008. 154:2492-500.
41. Siezen RJ, Johan, ET van Hylckama Vlieg. Genomic diversity and versatility of *Lactobacillus plantarum*, a natural metabolic engineer. *Microb Cell Fact.* 2011. 10(1):3.
42. Claesson MJ, Li Y, Leahy S, Canchaya C, *et al.* Multireplicon genome architecture of *Lactobacillus salivarius*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2006. 103:6718-23.
43. Lebeer S. *et al.* Identification of probiotic effector molecules: present state and future perspectives. *Current Opinion in Biotechnology.* 2018. 49; 217–223.
44. Liu S, Hu P, Du X, Zhou T, Pei X. *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for preventing respiratory infections in children: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled trials. *Indian Pediatr.* 2013. 50:377-381. 5.
45. Kalliomaki M, Salminen S, Arvilommi H, Kero P, Koskinen P, Isolauri E. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. *Lancet.* 2001. 357:1076-1079.
46. Segers ME, Lebeer S. Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG–host interactions. *Microb Cell Fact.* 2014. 13.
47. Tytgat HLP, Douillard FP, Reunanen J, *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG outcompetes *Enterococcus faecium* via mucus-binding pili: evidence for a novel and heterospecific probiotic mechanism. *Appl Environ Microbiol.* 2016. 82:5756-5762.
48. Ganguli K, Collado MC, Rautava J. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG and its SpaC pilus adhesin modulate inflammatory responsiveness and TLR-related gene expression in the fetal human gut. *Pediatr Res.* 2015. 77:528- 535.
49. Yan F, Liu L, Dempsey PJ, *et al.* A *Lactobacillus rhamnosus* GG-derived soluble protein, p40, stimulates ligand release from intestinal epithelial cells to transactivate epidermal growth factor receptor. *J Biol Chem.* 2013. 288:30742-30751.

50. Claes IJJ, Lebeer S, Shen C, Verhoeven TLA, *et al.* Impact of lipoteichoic acid modification on the performance of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in experimental colitis. *Clin Exp Immunol.* 2010. 162.
51. Iliev ID, Tohno M, Kurosaki D, *et al.* Immunostimulatory oligodeoxynucleotide containing TTTTCGTTT motif from *Lactobacillus rhamnosus* GG DNA potentially suppresses OVA-specific IgE production in mice. *Scand J Immunol.* 2008. 67:370-376.
52. Lightfoot YL, Selle K, Yang T, *et al.* SIGNR3-dependent immune regulation by *Lactobacillus acidophilus* surface layer protein A in colitis. *EMBO J.* 2015. 34:881-895.
53. Mohamadzadeh M, Pfeiler EA, Brown JB, *et al.* Regulation of induced colonic inflammation by *Lactobacillus acidophilus* deficient in lipoteichoic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011. 108:4623-4630.
54. Makras L, Triantafyllou V, Fayol-Messaoudi D, *et al.* Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. *Res Microbiol.* 2006. 157:241-247.
55. Shida K, Kiyoshima-Shibata J, Kaji R, Nagaoka M, Nanno M. Peptidoglycan from lactobacilli inhibits interleukin-12 production by macrophages induced by *Lactobacillus casei* through Toll-like receptor 2-dependent and independent mechanisms. *Immunology.* 2009. 128(1):858-869.
56. Schiavi E, Gleinser M, Molloy E, *et al.* The surface associated exopolysaccharide of *Bifidobacterium longum* 35624 plays an essential role in dampening host pro-inflammatory responses and in repressing local TH17 responses. *Appl Environ Microbiol.* 2016. 21:82(24):7185-7196.
57. Fukuda S, Toh H, Hase K. Bifidobacteria can protect from enteropathogenic infection through production of acetate. *Nature.* 2011. 469:543-547.
58. Gioia D.D, Gaggia F, Baffoni L, Stenico V. Beneficial microbes in fermented and functional foods. Role of Bifidobacteria in the Production of Bioactive Compounds and Detoxification of Harmful Compounds. *CRC Press, New York.* 2014. 16.
59. Liu G, Ren L, Song Z, Wang C, Sun B. Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium animalis* BB04 from centenarians' intestine. *Food Control.* 2015. 50:889-895.
60. Hsieh C.Y, Osaka T, Moriyama E, Date Y, Kikuchi J, Tsuneda S. Strengthening of the intestinal epithelial tight junction by *Bifidobacterium bifidum*. *Physiol. Rep.* 2015. 3:1-17.
61. Sarkar A, Mandal S. Bifidobacteria: Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action. *Microbiological Research.* 2016. 192:159-171.
62. Chiu Y.H, Tsai J.J, Lin S.L, Chotirosvakin C, Lin M.Y. Characterisation of bifidobacteria with immunomodulatory properties isolated from human breast milk. *J. Funct. Foods.* 2014. 7:700-708.