



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

La microbiota humana como estrategia
farmacológica en el entorno regulatorio europeo

Autor:

Luis Gosálbez Cisneros-Miret

Director:

Dr. Daniel Ramón Vidal

Murcia, junio de 2016



UCAM

UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO
Programa de Doctorado en Ciencias de la Salud

La microbiota humana como estrategia
farmacológica en el entorno regulatorio europeo

Autor:

Luis Gosálbez Cisneros-Miret

Director:

Dr. Daniel Ramón Vidal

Murcia, junio de 2016



UCAM
UNIVERSIDAD CATÓLICA
DE MURCIA

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR DE LA TESIS
PARA SU PRESENTACIÓN

El Dr. D. Daniel Ramón Vidal como Director de la Tesis Doctoral titulada “La microbiota humana como estrategia farmacológica en el entorno regulatorio europeo” realizada por D. Luis Gosálbez Cisneros-Miret en el Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Católica de Murcia, autoriza su presentación a trámite dado que en su opinión reúne todas las condiciones necesarias para su defensa.

Lo que firmo, para dar cumplimiento al Real Decreto 99/2011, 1393/2007, 56/2005 y 778/98, en Paterna, a 29 de junio de 2016

AGRADECIMIENTOS

Es difícil decir adiós, y con este trabajo digo adiós a mucha gente; gente con la que he vivido tantísimo y con la que casi exclusivamente he pasado buenos momentos. Y no tengo la sensación de que esto se deba al sesgo de una memoria selectiva.

Gracias a Álex, Diego, Martita, Antonia, Dani, Irina, Guille, Carol, Josep, Ester, Silbia, Vero, Pedro, María Sanchís y Tati, y a su interminable lista de becarios, que día tras día trataban de convencerme para que me alimentara de algo más que de proteínas, y por decirme sólo que era por mi salud y no porque mis músculos no fueron diseñados para crecer; a Marta y Boro, de cuya experiencia tanto he aprendido; a Ángela, por hacerse cargo de algún que otro polizón; a Patri y Empar, por ayudarme cada vez que necesitaba algo; a Jose, a quien arrebaté un mes de su vida con mis Exceles; a Ana, por solucionar todo lo solucionable y guardarme pisco-labis de la sala de reuniones a pesar de los ataquitos al corazón ocasionados por mis comentarios políticos y políticamente incorrectos; a mis becarios, Isabel, William, Nacho y muy especialmente Tamer por su enorme trabajo, y de quien estoy seguro que está destinado a hacer algo importante en su amada Epigenética; a todos los que con su trabajo hacen que la empresa siga en pie: a Vicky, Lola, Bea Casinos, Rosa Canales, Queralt, María Enrique, Rosa Suntaxi, Andrea, Aida, Pepa, Meritxell, Nuria, Silvia, Roberto, David, Dani y Javi y Jose Simarro. A los otros miembros de nuestra gran familia: Paco, Juan, Jota, Eric, Mari Carmen, Cris, Laura y Vanessa. A todos, de verdad, gracias.

Gracias a Javier por contagiarme constantemente su pasión por la empresa, que le hace tener que repetirse a sí mismo casi a diario, para terminar de convencerse, que sus intenciones son las de jubilarse pronto. Y gracias muy especialmente a la gente que ha sido mi pequeña familia durante este tiempo a orillas del Turia: Violeta, sin quien tomar algo fresquito (o calentito) a las diez y veinte no será lo mismo; a quienes por la decisión del destino de colocarnos en la misma oficina más han aguantado mis sandeces, Iryna y Belén; y a Bea, que siempre me ha apoyado dentro y fuera del trabajo y cuya amistad es una de las mejores cosas que me llevo de Valencia. Echaré de menos absolutamente todo. Ese *Hola Iryna* de las cuatro y media. Un *Oh, sorry!* cuando menos te lo esperas. El pánico,

combinado con unas ganas irrefrenables, de que nos empezara a hablar aquella señora en Angresola. El sonido mezclado de fichas de dominó, Ana Rosa y hielos de patxaranes en los jubilados.

Gracias, en definitiva, a Biopolis, que no sólo ha financiado este trabajo sino que me ha dado la oportunidad de desarrollarme tanto, y tanto desde el punto de vista personal, como profesional, como académico. No me olvido de agradecer también a Dani, Nacho y Gianfranco a los que, por uno u otro motivo, considero *biopolitanos* de corazón. Y eso para mí es un halago.

Gracias también a la Universidad Católica de Murcia (UCAM), cuyo programa de Doctorado me ha permitido desarrollar este trabajo; por su actitud pionera en promover la transferencia de tecnología y conocimiento en España. Estoy muy especialmente agradecido a Rosana, Andrés, María del Mar, Estrella y Julia. Sin vuestra ayuda y esfuerzo no estaría escribiendo estas líneas ni todas las (muchas) que vienen detrás.

Gracias a mi padre por dedicar este último año a construir un robot que desafiara a las leyes de la Física que tanto venera, y que al final acabaron ganando la batalla; y a mi madre por dedicar los últimos 30 a conseguir que yo sea feliz.

Gracias a mis dos *María Josés*. A la una por inducirme mi incurable adicción por la Biología y a la segunda por hacer esa adicción aún más grave y por hablarme por primera vez de *aquel señor que había fundado una biotecnológica en Valencia*.

Pero gracias sobre todo *a aquel señor*. Gracias por haber sido el mejor jefe, el mejor director de tesis, el mejor amigo y la mejor persona que uno pueda imaginar. Nadie nunca había confiado tanto en mí ni había valorado tanto mi trabajo. Me alegro inmensamente de haberte mandado aquel mail, hablándote de usted, en el que te pedía la *marcianada* de hacer la tesis doctoral contigo. Me alegro aún más de los dos años que he trabajado junto a ti y aún más si cabe de que, sabiendo que era importante para mí, hicieras que esa *marcianada* se haya convertido en realidad. Porque antes dejas de dormir que un mail de un becario sin contestar. Porque del año te importa más el número de bebés que el EBITDA. Biopolis es un sitio increíble porque tiene mucho de ti. No dejes que, pase lo que pase, eso cambie nunca. Te estaré eternamente agradecido, Daniel.

*"Si hubiera preguntado a la gente qué querían,
me habrían dicho que un caballo más rápido".*

Atribuida a Henry Ford
(1863-1947)

ÍNDICE GENERAL

AUTORIZACIÓN DEL DIRECTOR.....	5
AGRADECIMIENTOS	7
ÍNDICE GENERAL.....	11
SIGLAS Y ABREVIATURAS	14
ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS	16
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. LOS MICROORGANISMOS EN LA NATURALEZA.....	19
1.2. EL CONCEPTO DE MICROBIOTA.....	22
1.3. SIMBIOSIS MICROBIANAS ANCESTRALES.....	26
1.4. LOS VIRUS Y SU PARTICIPACIÓN EN LOS GENOMAS EUCARIOTAS	31
1.5. GENES DE BACTERIAS Y ARQUEAS EN GENOMAS EUCARIOTAS	32
1.6. LAS RELACIONES ENTRE LA MICROBIOTA Y SU HOSPEDADOR.....	38
CAPÍTULO II: JUSTIFICACIÓN.....	43
CAPÍTULO III: OBJETIVOS	47
CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS	51
4.1. ASPECTOS CIENTÍFICO-TÉCNICOS.....	53
4.2. ASPECTOS DE MERCADO.....	55
4.3. ASPECTOS CLÍNICOS.....	57
4.4. ASPECTOS REGULATORIOS	58
CAPÍTULO V: RESULTADOS.....	59
5.1. ANÁLISIS DEL POTENCIAL COMERCIAL ACTUAL LIGADO AL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA HUMANA	61
5.1.1. Microbiota del tracto digestivo	65
5.1.1.1. <i>Microbiota de la cavidad oral</i>	65
5.1.1.2. <i>Microbiota del estómago</i>	66
5.1.1.3. <i>Microbiota del intestino</i>	68
5.1.1.3.1. Generalidades	68
5.1.1.3.2. Microbiota intestinal en la enfermedad	72
5.1.2. Microbiota del aparato reproductor femenino	76

5.1.3. Microbiota del aparato urinario	79
5.1.4. Microbiota de la piel	83
5.1.5. Microbiota del tracto respiratorio	88
5.1.6. Microbiota y desarrollo del metabolismo y de los sistemas inmune y nervioso	93
5.1.7. Cambios históricos de la microbiota humana	95
5.2. MICROBIOLOGÍA Y MICROBIOTA APLICADAS EN LOS SECTORES ALIMENTARIO Y FARMACÉUTICO	98
5.2.1. Microbiología en el sector alimentario	98
5.2.2. Microbiología en medicina y en el sector farmacéutico.....	101
5.2.3. Estrategias terapéuticas o clínicas basadas en microorganismos.....	104
5.2.3.1. Sector alimentario: intervenciones nutricionales con probióticos. Evidencia científica y clínica de su eficacia.....	104
5.2.3.2. Sector médico-farmacéutico: microorganismos-medicamentos y productos sanitarios en Europa	105
5.2.3.2.1. Enfoques para el uso farmacológico de microorganismos y/o la microbiota.....	105
5.2.3.2.2. Clasificación regulatoria actual de los microorganismos terapéuticos	122
5.2.3.2.3. Las declaraciones, alegaciones e intencionalidad como impulsores de la regulación aplicable y del posicionamiento de producto en Europa	126
5.2.3.2.4. Regulación de la aprobación de nuevos alimentos, medicamentos y productos sanitarios en Europa. Aplicación y aplicabilidad a los microorganismos.....	131
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN.....	163
6.1. CLASIFICACIÓN REGULATORIA DE CADA ENFOQUE DE TERAPIAS DE LA MICROBIOTA.....	165
6.2. CLASIFICACIÓN Y RUTA REGULATORIA DE LOS LBP	173
6.3. ASPECTOS PRÁCTICOS DE LOS PROGRAMAS DE DESARROLLO DE FÁRMACOS BASADOS EN LA MICROBIOTA	185
6.3.1. Identidad y denominación de la sustancia medicamentosa	190
6.3.2. Caracterización y composición del medicamento. La dosis, la potencia y la importancia del mecanismo de acción.....	196
6.3.3. Ensayos preclínicos: pruebas <i>in vitro</i> y modelos animales.....	205

6.3.4. Biomarcadores, seguridad, toxicidad, eficacia clínica e interacciones.....	211
6.3.5. Pruebas clínicas: representatividad y relevancia.....	234
6.3.6. Conceptos de farmacodinámica y farmacocinética aplicados	237
CAPÍTULO VII: LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN	247
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES.....	251
CAPÍTULO IX: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	255
CAPÍTULO X: ANEXOS	311

SIGLAS Y ABREVIATURAS (orden alfabético)

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEMPS	Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios
ANSM	Por las siglas de “Agence Nationale de Sécurité de Médicament et des Produits de Santé”
(r)ARN	Ácido ribonucleico (ribosómico)
AN	Agencia(s) Nacional(es)
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
CFTR	Por las siglas de “Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator”
CHMP	Acrónimo asignado al “Committee for Medicinal Products for Human Use”
dTMP	Desoxitimidina monofosfato
dUMP	Desoxiuridina monofosfato
EFSA	Por las siglas de “European Food Safety Authority”
EM	Estado Miembro (de la UE)
EMA	Por las siglas de “European Medicines Agency”
EPOC	Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
EEUU	Estados Unidos de América
FDA	Por las siglas de “Food and Drug Administration”
FIMEA	Por las siglas de “Finnish Medicines Agency”
FMT	Por las siglas en inglés de “Fecal Microbiota Transplantation”
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HMP	Por las siglas de “Human Microbiome Project”
HMPC	Acrónimo asignado al “Committee on Herbal Medicinal Products”
IBD	Enfermedad Inflamatoria Intestinal, por las siglas en inglés de “Inflammatory Bowel Disease”

IBS	Síndrome del Colon Irritable, por las siglas en inglés de “Irritable Bowel Syndrome”
IMC	Índice de Masa Corporal
IND	Por las siglas de “Investigational New Drug”
LBP	Por las siglas de “Live Biotherapeutic Product”
OMG	Organismo Modificado Genéticamente
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTC	Medicamento o sujeto a prescripción médica, por las siglas en inglés de “Over The Counter”
OTU	Por las siglas de “Operational Taxonomic Unit”
PCR	Por las siglas de “Polymerase Chain Reaction”
PRI	Por las siglas de “Pharmabiotic Research Institute”
qPCR	Por las siglas de “Quantitative Polymerase Chain Reaction”
QPS	Por las siglas de “Qualified Presumption of Safety”
RFLP	Por las siglas de “Restriction Fragment Length Polymorphism”
SCFA	Por las siglas de “Short Chain Fatty Acid”
SIDA	Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida
TJUE	Tribunal de Justicia de la Unión Europea
UCAM	Universidad Católica de Murcia
UE	Unión Europea
ufc	Unidades Formadoras de Colonias
VIH	Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y ANEXOS

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Estrategias farmacológicas a través de la microbiota	107
Figura 1a. Visión general de diferentes estrategias farmacológicas a través de la microbiota	107
Figura 1b. Leyenda y detalle de las distintas estrategias farmacológicas a través de la microbiota de la cavidad oral, de la piel y de la vagina	108
Figura 1c. Detalle de las distintas estrategias farmacológicas a través de la microbiota de intestinal.....	109
FIGURA 2. Localización de las distintas estrategias terapéuticas a través de la microbiota dentro del marco regulatorio europeo	180

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. Listado de compañías y proyectos de estrategias terapéuticas.....	57
TABLA 2. Listado de especies de bacterias y levaduras usualmente empleadas como probióticos	99
TABLA 3. Resumen de las consideraciones especiales para las estrategias terapéuticas a través de la microbiota.....	186

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I. Impacto generado.....	313
ANEXO II. Listado completo de compañías estudiadas	315
ANEXO III. Listado de microorganismos QPS.....	316
ANEXO IV. Puntos 2, 3 y 4 del Anexo I de la Directiva 2001/83/CE	320

I – INTRODUCCIÓN

I - INTRODUCCIÓN

1.1 LOS MICROORGANISMOS EN LA NATURALEZA

Los seres humanos tenemos la falsa sensación de que somos la forma de vida dominante en nuestro planeta. Ya en 1996, el biólogo evolutivo y paleontólogo Stephen Jay Gould escribió en el Washington Post un artículo en el que defendía que no sólo vivimos actualmente en la era de las bacterias, sino que el planeta nunca ha dejado de estar en esa era desde hace 3.000 millones de años (1). Es obvio que por su abundancia y su capacidad para colonizar cualquier nicho ecológico imaginable las bacterias son, sin duda, la forma de organismo, micro o macroscópico, más exitosa evolutivamente.

El origen de la vida se sitúa entre 3.600 y 2.700 millones de años, cuando apareció el primer organismo unicelular (2). Este evento dio lugar a la versión primitiva de lo que hoy se denominan procariotas (bacterias y arqueas). Tras diversos pasos evolutivos sobre los que todavía se especula (2-5), hace unos 1.500 millones de años (6) surgieron organismos unicelulares de mayor tamaño y complejidad que se denominan eucariotas. Más tarde, hace unos 1.200 millones de años, se produjeron agregaciones coloniales entre organismos unicelulares, algunas de ellas constituidas por eucariotas, que evolucionaron hacia la pluri o multicelularidad, dando origen (7) a los ancestros de la actual vida macroscópica o visible (plantas, hongos y animales).

Los primeros fósiles de animales morfológicamente complejos datan de hace 540 millones de años (2). No obstante, no todos los organismos eucariotas desarrollaron la pluricelularidad, permaneciendo entonces como formas unicelulares microscópicas. Algunos ejemplos son los actuales protozoos y muchas especies de algas y hongos como las levaduras.

El origen de los virus es más discutido. La teoría reinante hasta muy recientemente es que habían surgido tras la vida celular, dado que son parásitos intracelulares obligados y necesitan la maquinaria de su hospedador celular para

replicarse. Sin embargo, el descubrimiento en 2003 (8) de los virus gigantes, algunos de los cuales conservan elementos para su propia replicación pese a seguir siendo parásitos (9), pone en duda la teoría clásica. Hay incluso autores que defienden un origen vírico de la vida en la Tierra (10). En cualquier caso, los virus se consideran entidades biológicas acelulares y no seres vivos, al ser dependientes de infectar seres vivos celulares (bacterias, arqueas, plantas, hongos o animales) para su replicación.

Los virus son omnipresentes en todos los ambientes y ecosistemas y se encuentran en concentraciones extraordinariamente elevadas, de alrededor de 10^8 /ml en agua marina (11) y de hasta 10^{11} /g en heces humanas (12). Estas concentraciones son del orden de 10 a 100 veces superiores a las de otros organismos que son sus hospedadores (13). De hecho los virus son considerados las entidades biológicas más exitosas por número, ya que se estima que hay unas 10^{31} partículas víricas en el planeta Tierra (12). A pesar de que este campo está en las fases más iniciales de su estudio, se sabe que los virus cumplen un papel ecológico sumamente importante en el control de poblaciones microbianas en los ecosistemas.

Por su parte, existen unos 40 millones de células bacterianas en cada gramo de tierra y un millón en cada mililitro de agua dulce. Se estima que la biomasa de las bacterias en el planeta es igual a la de las plantas (14). Un ejemplo de la capacidad de las bacterias de influir sobre su entorno es la transformación de la atmósfera terrestre por parte de las cianobacterias en una mezcla de gases rica en oxígeno hace 2.500 millones de años (15). Las arqueas son menos abundantes que las bacterias, con una presencia entre 10 y 100 veces menor en ecosistemas terrestres (16) y marinos someros (17). Sin embargo, tienen una enorme importancia ecológica al ser capaces de colonizar ambientes extremos en temperatura, presión y composición química. De hecho, llegan a encontrarse en concentraciones similares a las bacterias a grandes profundidades en el mar (17). Estos microorganismos tienen una gran importancia ecológica. Por ejemplo, entre otras actividades, son los responsables de toda la síntesis biológica de metano del planeta. Otros microorganismos como hongos y protozoos, aunque abundantes, se hallan normalmente en menor medida.

Una de las principales causas por las que los microorganismos han sido clásicamente subestimados es porque no han podido ser estudiados, ya que la inmensa mayoría de las bacterias y arqueas no son cultivables en condiciones y medios de laboratorio. Los porcentajes de no cultivables varían desde un 80% en muestras ambientales (18,19), entre un 60 y un 80% en muestras de heces humanas (20) y un 50% en muestras de cavidad oral humana (21,22). Por el contrario, prácticamente casi todas las bacterias presentes en la vagina de la mujer son cultivables (23). Otras estimaciones afirman que el porcentaje de bacterias cultivables es tan sólo del 1% (24). Como se discutirá posteriormente, sólo el desarrollo y el uso masivo en tiempos recientes de técnicas de análisis independientes de cultivo, por medios genético-moleculares, ha permitido profundizar en su estudio.

1.2 EL CONCEPTO DE MICROBIOTA

Todo organismo pluricelular, micro o macroscópico, se encuentra asociado íntimamente a un conjunto de microorganismos más o menos característico, conocido como microbiota. En el reino vegetal, esto es cierto desde las algas microscópicas (25,26) hasta las plantas terrestres (27,28). En estas últimas han sido descritas relaciones con bacterias cruciales para la salud de la planta presentes tanto en la superficie de sus raíces y de sus hojas, como en estructuras internas.

En el caso de los metazoos, la naturaleza y complejidad de estas comunidades biológicas varía en función de un gran número de factores, como la región del cuerpo, la filogenia del animal, la temperatura corporal, o el tipo de alimentación. Incluso animales sencillos como los poríferos (29), los nematodos como *Caenorhabditis elegans* (30) e insectos como *Drosophila melanogaster*, poseen una microbiota característica que requieren para su correcto funcionamiento y homeostasis (31–33). En estos animales la asociación con poblaciones microbianas es particularmente sorprendente dado que se alimentan de microorganismos, lo que denota la existencia de mecanismos de discriminación que respetan ciertas especies microbianas.

La principal característica de las microbiotas es su relación de carácter mutualista y simbiótico con el hospedador. Es decir, se trata de una colonización normal, fruto de una coevolución, en la que normalmente tanto huésped como hospedador salen beneficiados. La evidencia de esta coevolución son las marcadas diferencias existentes entre comunidades microbianas asociadas a animales frente a las presentes en vida libre (34).

En condiciones normales la microbiota no produce ningún daño al hospedador. Es más, no es infrecuente que la microbiota normal de un animal incluya organismos patógenos que no expresan su virulencia contra el hospedador que los alberga. Estos individuos son conocidos como portadores sanos o asintomáticos y pueden encontrarse en poblaciones humanas y animales. No obstante, y generalmente como manifestación secundaria de condiciones patológicas como infecciones por patógenos exógenos o inmunodepresión, determinados elementos de la microbiota normal pueden comportarse como oportunistas, causando complicaciones clínicas al hospedador.

Esta flora normal cumple diversas funciones para el hospedador. En el ámbito de la nutrición se han descrito las relaciones mutualistas entre animales cuya alimentación contiene un alto contenido en celulosa y microorganismos de su sistema digestivo capaces de degradarla de forma más eficiente que sus hospedadores. Tal es el caso de las bacterias, hongos y, sobre todo, protozoos flagelados en el intestino de las termitas. De hecho estos protistas poseen a su vez relaciones simbióticas, en ocasiones incluso endosimbióticas, con bacterias que contribuyen a esa labor (35). Esta relación mutualista entre un animal y un microorganismo es la más antigua de la que se tiene evidencia científica, remontándose a 100 millones de años (36). No es sorprendente tampoco que en el intestino de las abejas estén presentes de forma ubicua bacterias del género *Gilliamella* que están especializadas en la degradación de las pectinas que componen la pared del polen de las plantas (37), o que en ambientes marinos existan relaciones mutualistas en las que fotobacterias producen bioluminiscencia para su hospedador (38) como método defensivo u ofensivo.

No obstante el estudio de las microbiotas en animales también arroja sorpresas, como por ejemplo el hecho de que la microbiota intestinal del oso panda, que se alimenta casi exclusivamente de bambú muy rico en fibra, sea más propia de un mamífero carnívoro y de hecho sea relativamente deficitaria en genes y géneros microbianos implicados en la degradación de la celulosa (39,40). Los expertos explican estos resultados basándose en que el origen evolutivo de esta especie son los osos carnívoros por lo que han mantenido un sistema digestivo estructuralmente más similar al de los mamíferos que se alimentan de carne que al de herbívoros estrictos (39). Este ejemplo contrasta con las asunciones generales de que la microbiota intestinal está principalmente influida por la alimentación y ligada al proceso de especiación, que se discutirán más adelante.

En muchas ocasiones, sin embargo, el servicio de la microbiota al hospedador es menos evidente que el meramente colaborador en la digestión. Muchos autores se refieren a la microbiota como comensal en lugar de como mutualista. En muchos casos el microbio parece simplemente habitar y alimentarse de sustancias que el hospedador secreta o ingiere sin producir nada a cambio, aunque se ha demostrado que en realidad la mayoría de esos elementos de la flora son de extraordinaria importancia, ya que suponen un elemento de

competencia en forma de una barrera física y/o química frente a especies patógenas que puedan colonizar la superficie de, por ejemplo, el tracto digestivo, el genital, o la piel. Los casos de parasitismo son infrecuentes en esta microflora normal. De hecho, durante la última década se ha prestado especial atención al papel que juega la microbiota en otros procesos fisiológicos de crucial importancia como la educación, el desarrollo y el correcto funcionamiento de los sistemas inmune y nervioso. Aunque esta ciencia se encuentra en sus inicios, el descubrimiento de este tipo de relaciones complejas entre representantes de distintos reinos ha supuesto un cambio de paradigma, una revolución en el modo de entender la microbiología, la fisiología, la inmunología y la biología de sistemas.

Algunos estudios sugieren que la microbiota influye o incluso determina el proceso de especiación. Un estudio publicado en 2013 asegura que dos especies de avispas del género *Nasonia*, cuyas microbiotas intestinales difieren ligeramente, generan híbridos con una composición microbiana alterada que causa su inviabilidad, o al menos contribuye a ello de forma significativa junto con otros factores genéticos (41). Si este fenómeno fuera cierto, demostraría la rapidez con la que la microbiota es capaz de cambiar y la convertiría en un factor importante en las etapas tempranas de la divergencia evolutiva entre especies, en lugar de una mera característica adaptable a los cambios en el hospedador. No obstante, esta teoría ha sido criticada y ha de ser tomada con cautela (42). Otros experimentos, quizás más sólidos, han demostrado que la composición de la microbiota resultante de la dieta juega un papel decisivo en la preferencia de *D. melanogaster* a la hora de escoger pareja de apareamiento (43), lo que lleva a plantear la posibilidad de que la flora microbiana influya cuantitativamente en los niveles de feromonas, lo cual podría influir en el proceso de divergencia evolutiva entre poblaciones.

Por el contrario, en un estudio con ratones *Mus musculus* híbridos de las subespecies *musculus* y *domesticus* se decanta más por la teoría de que son los genes del hospedador, especialmente aquellos relacionados con el sistema inmune, los que determinan las composiciones de microbiota intestinal específicas, y no al revés (44). Como se discutirá posteriormente, sí parece clara la implicación de la flora normal en el desarrollo del sistema inmune adaptativo

propio de los vertebrados (45), de modo que la interacción sistema inmune-microbiota podría ser bidireccional. Es más, en babuinos hay experimentos (46) que demuestran que la composición de la microbiota intestinal de estos mamíferos es característica de cada grupo social debido a las interacciones entre individuos, y que este efecto es independiente del entorno, de la dieta y del parentesco.

En lo que existe consenso es en que la alimentación supone un elemento central en el proceso de divergencia evolutiva y es uno de los principales factores que afectan a la microbiota. Por ejemplo, se cree que cuando los mamíferos surgieron en el Jurásico hace 160 millones de años todos eran carnívoros. Sin embargo, la mayoría de las especies de este grupo han aparecido en el período Cuaternario (1,8 millones de años hasta el presente) (47), caracterizado por una notable expansión de las praderas de plantas C4 debido a la caída en los niveles de CO₂ atmosférico y a otros cambios climáticos (48,49). La consecuencia fue una presión selectiva a favor de los mamíferos con alimentación herbívora, hasta el punto de que todos los grupos de mamíferos tienen representantes herbívoros y el 80% de todos los mamíferos actuales lo son. Las adaptaciones anatómicas y fisiológicas en el sistema gastrointestinal necesarias para la alimentación basada en vegetales han ido acompañadas de una modificación acorde de la microbiota digestiva, hasta tal punto que en los herbívoros la complejidad de la microbiota en cuanto a riqueza de especies es la mayor de todos los mamíferos, seguida de la de los omnívoros y carnívoros (50).

Todo esto hace que actualmente se piense en los animales y otros seres vivos como superorganismos, supraorganismos u holobiontes (43). Son entidades a cuyo funcionamiento contribuyen los representantes de todos los reinos que los componen, lo que supone un nivel de complejidad superior al de la pluricelularidad. Estos holobiontes poseen un hologenoma (51), compuesto por toda la información genética del hospedador más la de su microbiota normal. Las relaciones ecológicas y fisiológicas de estos sistemas trans-reino son tan extraordinariamente complicadas que actualmente sólo se acierta a intuir las, aunque existen estudios que asocian la presencia de determinados alelos del genoma del hospedador, sobre todo los relacionados con su sistema inmune, con la composición y estructura de la microbiota (44).

1.3 SIMBIOSIS MICROBIANAS ANCESTRALES

De acuerdo con la Teoría Endosimbionte de Lynn Margulis (52), ampliamente aceptada aunque con detalles aún sometidos a debate (2–5), determinados orgánulos subcelulares como las mitocondrias y los cloroplastos, así como todas las estructuras derivadas de ellos por evolución reductiva (hidrogenosomas, mitosomas (5,53,54), tanosomas (55)) son el resultado de la simbiosis íntima hace 1.500 millones de años entre dos células procariotas. Es más, se piensa que las mitocondrias surgieron cuando una proteobacteria (6), uno de los filos bacterianos más abundantes en la microbiota humana, fue englobada por una arquea (56). Disponer de un aparato energético tan sofisticado como las mitocondrias permitió a esa arquea (convertida desde ese momento en una célula eucariota) alcanzar tamaños 15.000 veces superiores a la bacteria media y soportar genomas 5.000 veces más grandes, con una media de 200.000 veces más energía por gen que los procariotas (57). Esta asociación puede, por tanto, ser considerada como una relación simbiótica análoga a algunas relaciones hospedador-microbiota actuales.

La definición clásica de célula eucariota es aquella que posee compartimentación celular, con orgánulos y principalmente un núcleo diferenciado. Sin embargo, en los últimos años se han hallado organismos procariotas que han desarrollado estructuras o características propias de eucariotas por analogía evolutiva como los filos bacterianos *Planctomycetes*, *Verrucomicrobia* y *Chlamydia* (58). Por lo tanto la principal diferencia entre ambos no es la existencia del núcleo en sí, sino de la polarización genómica de los eucariotas, en las que un gigantesco genoma nuclear se encuentra soportado energéticamente por múltiples genomas mitocondriales (59).

La simbiosis entre los organismos que dieron lugar a las mitocondrias y cloroplastos y las células hospedadoras ha llegado al extremo de que el material genético de los orgánulos ha perdido todos los genes no relacionados con sus funciones simbiotes. Incluso la mayoría de los genes implicados en su función generadora de energía y de su propia replicación independiente de la célula hospedadora han pasado al núcleo de ésta (2,60). De hecho, las mitocondrias de los vertebrados conservan únicamente 37 genes (61), un genoma mínimo, un genoma mitocondrial central, extraordinariamente conservado evolutivamente en

todos los eucariotas (62,63). Tras un proceso de coadaptación extrema, lo que un día fueron dos organismos simbiotes pero independientes se han convertido en una sola entidad biológica, de forma que no pueden subsistir el uno sin el otro.

Se considera que los orgánulos como las mitocondrias, de los que pueden existir hasta 2.000 copias por célula (64), y el resto de la célula constituyen una misma entidad biológica. Es por tanto necesario que exista un entendimiento, una compatibilidad entre mitocondria y célula hospedadora para que el conjunto de la célula eucariota pueda respirar, obtener energía y en último término ser viable. La necesidad de esa armonía genética núcleo-mitocondria es probablemente mayor de lo que comúnmente se ha considerado.

A pesar de la necesidad de ese entendimiento, los genomas mitocondrial y nuclear evolucionan de manera radicalmente diferente. Mientras que el núcleo está sujeto a la reproducción sexual de generación en generación, las mitocondrias se reproducen únicamente por vía asexual. Además, la tasa de mutación del ADN mitocondrial es de 10.000 a 100.000 veces superior a la del núcleo eucariota, lo que lleva a las mitocondrias a disfrutar de una tasa evolutiva de 10 a 30 veces mayor a la de los animales que las hospedan (65). A la luz de estas diferencias, resulta obvio que los genomas nuclear y mitocondrial tienen que adaptarse mutuamente, y existen numerosas evidencias de que lo demuestran (59,66).

Pese a tener una menor importancia directa para cuestiones relativas a la salud humana, biológicamente hay que destacar que la mayoría de lo descrito anteriormente es aplicable también a los cloroplastos, los orgánulos que permiten a todos los eucariotas fotosintéticos obtener energía de la luz solar. En este caso, se piensa que la endosimbiosis surgió hace alrededor de 1.000 millones de años entre una célula eucariota que ya contenía mitocondrias y una cianobacteria ancestral capaz de realizar la fotosíntesis (67). Estos orgánulos, al igual que las mitocondrias, han perdido la inmensa mayoría de su información genética, reteniendo exclusivamente la necesaria para llevar a cabo sus funciones, repartida entre su propio genoma y el núcleo de la célula hospedadora (68), lo cual denota el alto grado de sintonía y coadaptación entre núcleo y orgánulo. No obstante, y al contrario de lo que se piensa acerca de las mitocondrias, existen evidencias de que este tipo de endosimbiosis han ocurrido al menos dos veces independientes en la historia evolutiva, al descubrirse que la ameba *Paulinella chromatophora* posee

unas estructuras fotosintéticas muy distantes genéticamente de los cloroplastos, mucho más cercanas a cianobacterias modernas de vida libre y que de hecho conservan aún la pared celular propia de las cianobacterias, que los cloroplastos han perdido (68). Se estima que esta endosimbiosis ocurrió hace sólo 60 millones de años (69).

Los eucariotas poseen otros muchos rasgos propios y conservados, como la capacidad de apoptosis, las características del proceso de especiación, el envejecimiento y la capacidad de realizar reproducción sexual con la existencia de sexos diferenciados. Muchos autores defienden que estos rasgos, especialmente el que atañe a la reproducción entre sexos diferenciados, están relacionados con la necesidad del núcleo de la célula de encontrarse en armonía con los genes mitocondriales.

La reproducción sexual requiere la fusión de dos gametos, pero no existen razones biológicas que obliguen a la existencia de dos sexos distintos. Aun así, incluso los eucariotas unicelulares más simples, como las levaduras, que producen isogametos, poseen dos formas sexuales diferenciadas (70). Aunque existen contadísimas y matizadas excepciones (59), algo que virtualmente todos los procesos de reproducción sexual tienen en común es que uno de los dos gametos implicados proporciona todos los orgánulos subcelulares (mitocondrias, y cloroplastos en su caso) al cigoto, como fuente de información genética extracromosómica, mientras que el otro sólo proporciona su información genética nuclear (70). Como en casi todos los organismos eucariotas (71), en el ser humano es únicamente el óvulo femenino quien dona todas las mitocondrias que el cigoto, primero, y todas las células del individuo a lo largo de toda su vida, después, contendrán. Las mitocondrias del gameto masculino son destruidas o inactivadas, según el organismo (72).

Lo más llamativo es que, como se ha dicho, existen muy contadas excepciones a esta herencia uniparental en el árbol de la vida y que, además, las situaciones en las que, por accidente o fruto de la experimentación con cualquier eucariota, se generan mezclas de mitocondrias procedentes de ambos gametos parentales en el cigoto (heteroplasmia), se producen consecuencias frecuentemente fatales para la célula resultante (las conocidas como incompatibilidades mitonucleares). Sharpley y colaboradores (73) demostraron en

un experimento que se extendió durante más de 14 años, con 500 ratones, que las heteroplasmas causan inestabilidad genética a nivel celular y desórdenes fisiológicos y cognitivos a nivel sistémico. También demostraron que este desenlace es independiente de la existencia de mutaciones deletéreas en el ADN mitocondrial y que se da incluso al mezclar dos clases de mitocondrias que individualmente son igualmente compatibles con una misma dotación genética nuclear. El problema de las heteroplasmas reside en la falta de optimización de la interacción entre el núcleo y las mitocondrias del citoplasma, aspecto que se ha demostrado de forma experimental significativamente mejorado cuando la herencia de las mismas es uniparental (66). Se piensa, por tanto, que la evolución ha favorecido enormemente el que sólo un gameto, casi siempre el femenino, transfiera todo elemento de información genética extracromosómica.

Aunque existen varias teorías que podrían considerarse complementarias, se entiende que la falta de complementariedad entre proteínas de la cadena respiratoria procedentes del núcleo y de las mitocondrias desencadena un desacoplamiento en el transporte de electrones en la membrana mitocondrial, lo que conlleva una producción deficiente de energía en forma de ATP, la generación excesiva de radicales libres, lo cual lleva a la célula a entrar en apoptosis (59). Se presume que existe una escala de compatibilidad mitonuclear, entre la inducción de la apoptosis y el acoplamiento óptimo, que supone un carácter de selección evolutiva (59). Conviene recordar que las enfermedades mitocondriales como determinadas miopatías, el Síndrome de Leigh y la atrofia óptica de Leber, que suelen revestir bastante gravedad, no son consecuencia de herencia biparental ni de heteroplasmas, sino de simples mutaciones en el ADN mitocondrial o del ADN nuclear ligado a la cadena respiratoria.

Assumiendo que esta teoría es cierta, no parece descabellado pensar que las incompatibilidades núcleo-mitocondria juegan un papel importante en la compatibilidad reproductiva entre especies, y por tanto en el proceso de especiación en sí (61,74). En los organismos fotosintéticos, en los que la endosimbiosis es a tres bandas, la comunicación energética y redox también se da entre la célula hospedadora, la mitocondria y el cloroplasto (75).

El que todas las mitocondrias de una célula procedan de un único progenitor no quiere decir que todas las mitocondrias en el citoplasma de todas

las células de un organismo pluricelular sean idénticas. Dentro de virtualmente todas las células existen pequeñas diferencias genéticas entre los cientos de mitocondrias presentes (76), existiendo por tanto una variabilidad intraindividual relativamente grande. Estas diferencias podrían estar ya presentes en el gameto materno y haber sido heredadas, o pueden haberse generado *a posteriori* fruto de la normal replicación o de la actividad oxidante de estos orgánulos. Muy significativamente, este tipo de heteroplasmas menores también han sido relacionadas con multitud de dolencias no relacionadas con enfermedades mitocondriales, y más bien asociadas al envejecimiento, tales como diabetes tipo 2, cáncer y enfermedades neurodegenerativas (73,76–81).

La relación evolutiva entre distintos tipos de microorganismos ha dado lugar a estructuras complejas que hoy se conciben como una única entidad: las células eucariotas. La coadaptación entre esos microorganismos ha llevado a una transferencia horizontal de genes entre unos y otros: la translocación de genes mitocondriales y cloroplásticos al núcleo de la célula para optimizar la función de los orgánulos. No obstante, se tienen evidencias sólidas de que la interacción con microorganismos ha continuado dando forma a la estructura de la célula eucariota y, en último término, a los organismos que estas componen, incluyendo al ser humano. No hay que olvidar que la célula eucariota se ha relacionado con células procariotas en su entorno a lo largo de toda su existencia evolutiva (82).

1.4 LOS VIRUS Y SU PARTICIPACIÓN EN LOS GENOMAS EUCARIOTAS

La cantidad de partículas víricas en el cuerpo humano es inmensa (83,84). Estos virus infectan por igual a las células del cuerpo humano y a los procariotas que conviven en su interior. Sin embargo, la relación evolutiva entre células humanas y virus ha dado como resultado una interacción genómica sumamente íntima entre ambos grupos.

Hoy en día se sabe que el 8% del material genético del núcleo de todas las células humanas procede de retrovirus (85,86) que infectaron a la especie en algún momento de su historia evolutiva. Esto supone unos 100.000 virus de 50 familias diferentes en cada una de las células del cuerpo (86). La posesión de secuencias retrovirales no es exclusiva de los humanos, ya que se da en todos los integrantes del reino animal y en plantas, donde llegan a ser elementos mayoritarios del genoma (87). En el caso de *Homo sapiens* se piensa que la mayoría de estas infecciones ocurrieron recientemente, entre 50 y 10 millones de años (88). Independientemente de que en ocasiones se consideren parte del mal llamado ADN basura, o elementos genéticos móviles de función aún incierta, o se les atribuya participación en procesos patológicos (87), se sabe que algunos de estos elementos han jugado un papel crucial en el desarrollo de la especie humana. Aun así, algunos autores consideran que su relación con enfermedades en humanos no ha sido comprobada totalmente (89,90) y que su papel evolutivo no se debe exclusivamente a su capacidad mutagénica.

Existen evidencias sólidas que indican que algunas secuencias retrovirales juegan un papel crucial en el desarrollo de una estructura tan característica de los mamíferos como la placenta (87). El caso más llamativo es el de la sincitina, una proteína fundamental para su desarrollo durante la gestación, cuyo origen es el gen de la envuelta de un retrovirus acantonado en el genoma humano, HERV-W. Otras dos proteínas, la pleiotropina y el receptor de endotelina B, son expresadas diferencialmente en la placenta bajo promotores procedentes de retrovirus (88,91). Además, datos recientes indican que, además, ese 8% de material genético vírico juega un papel crucial en la defensa contra la infección por parte de otros virus (92,93).

1.5 GENES DE BACTERIAS Y ARQUEAS EN GENOMAS EUCARIOTAS

Es probable que este fenómeno de integración de genes no se haya limitado a los virus. La secuenciación del genoma humano llevó al descubrimiento de 113 genes presentes exclusivamente en procariotas y vertebrados, y ausentes en el resto de formas de vida eucariotas (94). Aunque no se trata de la única explicación posible, los autores del estudio defienden que lo más probable es que esa información genética haya llegado a los vertebrados por transferencia horizontal desde bacterias y arqueas. El análisis funcional de estos genes reveló que en su mayoría codifican enzimas intracelulares. La lista completa está disponible en la publicación de la secuenciación del genoma humano (94) e incluye fundamentalmente genes que codifican enzimas implicadas en el metabolismo de xenobióticos y respuesta al estrés, lo cual no es característico de innovaciones evolutivas de vertebrados, que suelen basarse en el desarrollo de proteínas extracelulares. Algunos de estos genes codifican diversas hidrolasas y dos enzimas parálogas de la monoamina oxidasa, una enzima de la membrana mitocondrial con un papel central en el metabolismo de neurotransmisores que es la diana terapéutica de medicamentos psiquiátricos (95–98).

El hecho de que estos genes bacterianos con homología se encuentren en grupos bacterianos muy dispares y también en el genoma de arqueas sugiere que no fue una transferencia puntual. Por el contrario, lleva a pensar en un proceso continuo de adquisición de genes que doten de ventajas adaptativas a lo largo de la historia evolutiva de los vertebrados desde una comunidad compleja de microorganismos con la que estos animales han estado en contacto íntimo. De hecho los mejores homólogos para esos genes se encuentran en organismos con los que el ser humano ha tenido una larga relación, simbiote o de parasitismo, como *E. coli*, *P. aeruginosa*, *H. influenzae*, *M. tuberculosis* y *B. burgdorferi* (94). No obstante, un análisis posterior (99) ha reducido el número de genes humanos probablemente procedentes de procariotas a entre 41 y 46 y defiende que la transferencia horizontal entre procariotas y humanos es muy poco probable biológicamente y que no puede explicar la presencia de decenas de genes procariotas en el genoma humano. Argumenta que esos genes no se encuentran en invertebrados debido a un proceso normal de pérdida genética a lo largo de su evolución y aduce limitaciones en el análisis de la información genética. A pesar

de que esta última teoría que refuta la posibilidad de un origen bacteriano de estos genes humanos es la dominante actualmente (100), no es descartable que los avances en el campo de la microbiota humana deparen alguna sorpresa en este aspecto.

Una de las teorías más sugerentes, aunque con un apoyo moderado, es la que defiende que muchas de las enzimas implicadas en la síntesis de hormonas del sistema endocrino de vertebrados han sido adquiridas evolutivamente por éstos a través de transferencia horizontal de genes de distintos grupos bacterianos tras la separación de los clados eucariotas hongos-animales. Los defensores de esta teoría se basan en la existencia de rutas biosintéticas de determinadas hormonas, así como de sus receptores, únicamente en animales y bacterias, y en el hecho de que tanto bacterias como animales responden a estímulos neuroendocrinos generados recíprocamente (101,102).

En lo que la teoría escéptica con la transferencia horizontal entre reinos es acertada es en que ese fenómeno es biológicamente muy complicado, especialmente si el receptor es un organismo pluricelular y de gran tamaño, como un vertebrado. Para que un elemento genético se mantenga en una población y, en definitiva, en una especie, ha de transmitirse a la línea germinal y mantenerse de forma estable, en su núcleo o como elemento genético extracromosómico. Además, para no ser eliminado por selección natural, ha de conferir al hospedador algún tipo de ventaja competitiva o, en su defecto, exhibir algún mecanismo de supervivencia “egoísta” (99). Hasta hace poco los únicos casos documentados de transferencia genética horizontal a animales desde microorganismos implicaban genes de las bacterias endosimbiontes intracelulares del género *Wolbachia* a invertebrados de múltiples grupos (103–105). El estudio en profundidad de esta relación simbiótica llevó al descubrimiento de que el 33% de los artrópodos estudiados (106) contenían secuencias procedentes de *Wolbachia* en su genoma, sugiriendo que la transferencia genética horizontal es más frecuente en animales de lo que se pensaba. No obstante, este ejemplo es similar al de la transferencia de genes desde mitocondrias y cloroplastos al núcleo de la célula eucariota, dado que estas bacterias viven en el citoplasma de las células de sus hospedadores y se transmiten también por vía uniparental, materna, a la descendencia (107,108). Además, en este caso no se tienen evidencias de que esta

información transferida confiera ninguna característica fenotípica al hospedador invertebrado (106). Es la evolución en curso.

Sí se conocen casos en los que genes transferidos desde bacterias confieren ventajas competitivas a invertebrados. Por ejemplo, el gorgojo del café (*Hypothenemus hampei*) posee en su genoma una mananasa procedente de *Bacillus* que le ha permitido a este insecto colonizar el nicho ecológico de las plantaciones de café, cosa que sus parientes cercanos no han logrado (106,109). Es más, se ha comprobado que este insecto, que ocasiona pérdidas multimillonarias en la industria del café cada año, es capaz de detoxificar la cafeína que para otras especies es letal gracias a, entre otras, bacterias del género *Pseudomonas* de su intestino que utilizan la cafeína como única fuente de carbono y nitrógeno (110).

Se han descrito fenómenos similares en nematodos parásitos de plantas que poseen en su genoma enzimas como celulasas, pectato liasas y proteínas análogas a las expansinas para degradar paredes vegetales. En el caso de *Meloidogyne incongita* estos genes ascienden a un total de 60 que muy raramente se encuentran en animales (106,111).

Se puede ir un paso más allá. En la Naturaleza existen ejemplos de cooperación bacteria-invertebrado sumamente complejos, como el caso de las cochinillas de la harina *Planococcus citri*. Estos artrópodos poseen una bacteria endosimbionte, *Tremblaya princeps*, que a su vez posee otra bacteria endosimbionte en su interior, *Moranella endobia*. En este animal, determinadas rutas biosintéticas son mixtas e implican enzimas codificadas por genes del endosimbionte obligado *T. princeps* y genes nucleares de la cochinilla, que a su vez se han identificado como procedentes de bacterias simbióticas pertenecientes a los géneros *Proteobacteria* y *Bacteroidetes* (106,112).

Hay casos de posible transferencia horizontal desde bacterias más cercanas a vertebrados, como el gen de la celulosa sintasa en tunicados como *Ciona intestinalis*. Estos animales poseen la capacidad única de sintetizar celulosa, y se ha propuesto que se deba a un fenómeno de transferencia horizontal desde una cianobacteria (113). Dentro incluso de los vertebrados se ha propuesto que las enzimas del ciclo del glioxilato procedan de bacterias (114) y existe también la teoría de que determinadas proteínas anticongelantes presentes en peces sean fruto de una transferencia horizontal entre éstos vía parásitos, virus o mediante

absorción de material genético por parte del esperma en la fecundación externa que se da en esos peces (115).

Es cierto que en vertebrados esta transferencia genética horizontal desde bacterias o arqueas es más complicada que en animales menos complejos, ya que el aislamiento físico e inmunológico de sus células de la línea germinal las hacen menos accesibles al contacto con la mayoría de los microorganismos (106). Se considera por tanto más probable que se dé una transferencia a células somáticas, especialmente aquellas más expuestas a microbios como las epiteliales intestinales, pero estos fenómenos no se transfieran a la descendencia con lo que tienen menos importancia evolutiva.

Muchos autores relacionan estos eventos de integración en células somáticas con el desarrollo de cáncer en el ser humano (106,116). Recientemente se ha descrito un mecanismo mediado por un intermediario de ARN por el que la información genética de procariotas se integra en células somáticas humanas (116). Los autores del estudio describen el hallazgo de ADN con similitudes al de *Acinetobacter* en mitocondrias de muestras de leucemia aguda mieloide y al de *Pseudomonas* en las proximidades de proto-oncogenes presentes en células de adenocarcinoma de estómago, aunque reconocen carecer de evidencias para afirmar si la relación entre ADN bacteriano y el cáncer es causal o se debe a una permeabilidad celular alterada.

En lo que respecta las células germinales, se ha documentado la transferencia de ADN de *T. cruzi*, el protozoo causante de la enfermedad de Chagas, al 30% de los individuos infestados, así como a algunos de sus descendientes (117). Este dato confirma que la transferencia genética horizontal a la línea germinal humana es posible. Sin embargo, este es el caso de un parásito eucariota intracelular que es capaz de replicarse en el interior de las células germinales masculinas y femeninas (118). Por tanto, y a pesar de la existencia de algunas teorías descritas anteriormente y de que es un evento biológicamente posible, se considera que no existen pruebas de que la transferencia genética horizontal desde procariotas a las células germinales de vertebrados se haya producido nunca.

No hay que olvidar, sin embargo, que la inmensa mayoría de las relaciones funcionales animal-microorganismo conocidas no surgen de la transferencia o

integración genética. Existen distintos grados de interacción que no implican la modificación de la información genética del animal. Los casos mencionados de *Paulinella* con sus cloroplastos (68) y *Wolbachia* con distintas especies de artrópodos (103–105) son ejemplos en los que el microorganismo no ha transferido su información genética al hospedador y se ha constituido como un orgánulo subcelular en su lugar. No obstante, es posible que estos casos de evolución en curso lleven a situaciones de transferencia genética en el largo plazo, del mismo modo que ha ocurrido con mitocondrias y cloroplastos.

La literatura también contiene casos que podrían considerarse intermedios entre un orgánulo subcelular y un organismo simbiote. Varias especies de babosas marinas como *Elysia chlorotica* pueden retener los cloroplastos de las algas de las que se alimentan, distribuirlos por sus propios tejidos en un estado funcional y utilizarlos posteriormente para realizar la fotosíntesis. Este fenómeno, también conocido como cleptoplastidia, es un caso de relación quasi-endosimbiote en el que los cloroplastos no eran organismos libres de forma previa a su incorporación al animal y no son capaces de reproducirse en él, muriendo y teniendo que ser repuestos eventualmente al no poder proporcionar el hospedador la información genética que los orgánulos han transferido evolutivamente al núcleo de su hospedador natural, la célula vegetal.

Un último ejemplo de transferencia de material biológico entre organismos de diferentes reinos es el reportado por Hehemann y colaboradores que estudiaban la microbiota intestinal de humanos en Japón (119). Los investigadores observaron que bacterias como *Bacteroides plebeius* aisladas del intestino de japoneses habían adquirido genes codificantes de enzimas porfiranasas y agarasas para la degradación de polisacáridos sulfatados como el porfirano presente en algas del género *Porphyra* desde bacterias marinas como *Zobellia galactanivorans*. Los autores comprobaron además que estas enzimas son frecuentes en los metagenomas intestinales de japoneses (120) pero que están ausentes en sus equivalentes norteamericanos. La explicación más sencilla a este fenómeno es que, debido a la importancia de las algas, especialmente del “nori” (*Porphyra* spp.), en la dieta de aquel país (121), es probable que bacterias asociadas a las algas hayan alcanzado el intestino, donde las bacterias residentes han hallado una importante ventaja competitiva al adquirir fragmentos de ADN codificantes de

estas enzimas. Cabe destacar que estas proteínas degradadoras de polisacáridos complejos no se encuentran en el genoma humano, aunque son extraordinariamente abundantes en la microbiota intestinal. Uno de sus miembros, *Bacteroides thetaiotaomicron*, posee casi 500 enzimas implicadas en el uso de diferentes polisacáridos y el almidón (122–125).

Sin embargo, la mayoría de las cooperaciones animal-microorganismo no implican una relación más íntima que la del contacto físico entre células o, sin ser este siquiera necesario, de las interacciones químico-metabólicas entre ellas. Por ejemplo, las funciones digestivas llevadas a cabo por las bacterias del rumen o las del tracto digestivo de las abejas son llevadas a cabo sin que el microorganismo se haya establecido intracelularmente en su hospedador.

Por tanto, se puede concluir que las relaciones establecidas entre organismos con sus microbiotas a lo largo de la historia evolutiva han determinado la naturaleza de dichos organismos tal y como son hoy en día. A pesar de que en algunas ocasiones ese mutualismo se ha hecho tan estrecho que ha llegado a la fusión celular o incluso genómica, la mayoría de las relaciones entre organismos pluricelulares y sus microbiotas no ha implicado, al menos todavía en términos evolutivos, una unión más íntima que la cohabitación de las microbiotas en el interior o sobre los hospedadores.

1.6 LAS RELACIONES ENTRE LA MICROBIOTA Y SU HOSPEDADOR

Del mismo modo que el entendimiento entre mitocondrias y célula hospedadora es crucial para la supervivencia de la propia célula y del organismo, es probable que tenga que existir un alto grado de entendimiento entre el organismo y al menos determinados miembros de su microbiota o de las actividades metabólicas que estos lleven a cabo. Existen múltiples indicios, que se detallarán posteriormente, de que la evolución ha diseñado mecanismos para el establecimiento, mantenimiento, comunicación y herencia transgeneracional de la microbiota. Las modificaciones sufridas por la microbiota vaginal materna a lo largo de la gestación para proporcionar grandes cantidades de lactobacilos que permitan al bebé procesar su primer alimento; el contacto entre el recién nacido con material fecal de la madre durante el parto; o el mecanismo, aún desconocido, por el que bifidobacterias y otros microorganismos viajan del intestino a la leche de la madre para ser transferidos al bebé del mismo modo que ocurre con los nutrientes, con las inmunoglobulinas y con los oligosacáridos para que esa microbiota prospere, parecen formar parte de un plan evolutivo demasiado bien urdido para ser casual. Incluso dejando aparte argumentos poco constatados como el que la microbiota pueda jugar un papel en el proceso de especiación o de selección de la pareja de apareamiento, el hecho de que esté evolutivamente previsto que elementos genéticos extragenómicos sean heredados de forma sistemática y que éstos jueguen un papel potencialmente importante en la adaptación, supervivencia y la capacidad reproductiva de los animales, incluido el hombre, supone un remarcable matiz a las teorías clásicas de la evolución.

En este sentido, la hipótesis de la higiene ha encontrado en la ciencia del estudio de la microbiota un importante refuerzo. La constatación de la función defensiva del organismo que la microbiota ejerce por sí misma, así como su papel en la educación del sistema inmune adaptativo de los vertebrados, están empezando a arrojar algo de luz a las incógnitas sobre las bases mecanísticas de esta teoría.

El hecho de que la conservación de la microbiota tenga que ser entendida como fundamental no resta ni un ápice de importancia a los logros alcanzados hasta ahora en términos de sanitización, práctica médica aséptica y desarrollo de vacunas y terapias antimicrobianas. En el año 1900 la esperanza media de vida en

el mundo era tan sólo de 31 años, alcanzando 50 en países industrializados (126). Este hecho se debía en gran medida a que el 30-40% de los niños morían entre el nacimiento y antes de cumplir los 5 años (127). En la década de 1840 en torno al 20-30% de las madres que daban a luz en hospitales morían de fiebre puerperal debida a infecciones (128). En aquel tiempo el médico húngaro Ignaz Semmelweiss implantó en el Hospital General de Viena la simple práctica de que los médicos lavaran sus manos y sus instrumentos con agua con cloro de forma previa a las intervenciones, consiguiendo reducir esa tasa hasta cifras inferiores al 1% (128). La extensión de estas prácticas de higiene junto con el empleo de las vacunas, y, sobre todo, de los antibióticos han logrado sólo un siglo más tarde duplicar la esperanza media de vida en el mundo hasta los 71,4 años (129) y reducir la mortalidad infantil (130) a un 9,1% en 1990 y a un 4,6% en 2015. No obstante, tampoco hay que olvidar que a pesar de los grandes avances en medicina y armamento farmacológico cada minuto dos niños mueren de diarrea en el mundo (131).

Esta espectacular mejora en la calidad y la esperanza de vida parece haber tenido un precio. En el contexto de la hipótesis de la higiene, hoy se achacan a la excesiva sanitización y al uso de antibióticos gran parte de las llamadas plagas modernas, enfermedades occidentales o de los países ricos tales como la obesidad, las alergias, las intolerancias alimentarias, las enfermedades autoinmunes como la psoriasis, la artritis reumatoide y la esclerosis múltiple, las dolencias gastrointestinales como el Síndrome del Colon Irritable (IBS) o la Enfermedad Inflamatoria Intestinal (IBD) y las enfermedades psiquiátricas como la depresión o el autismo. Muchas de ellas se han relacionado con composiciones más o menos determinadas de las microbiotas de diferentes localizaciones corporales, como el intestino o la piel.

Los defensores de esta teoría esgrimen además que las modificaciones sufridas por las microbiotas de los seres humanos modernos pueden ser irreversibles tanto en el individuo en concreto, como a nivel de toda la especie. La evolución parece haber diseñado los mecanismos para que los microorganismos adecuados sean transmitidos en el momento preciso de progenitores a prole. Prácticas como el uso extensivo del nacimiento por cesárea, la sustitución de la lactancia por fórmulas lácteas, los tratamientos de

antibióticos y otros fármacos, la falta de contacto con elementos medioambientales, el exceso de limpieza, o simplemente una alimentación poco variada y escasa en elementos como la fibra, pueden estar causando una extinción masiva, silenciosa, trans-generacional e irreversible de elementos de la microbiota o de genes extragenómicos, que han coevolucionado con el ser humano durante miles o millones de años (132).

La secuenciación del genoma humano no ha dado con la rapidez que se presuponía los frutos clínicos esperados. Es más, la inmensa mayoría de las epidemias del ser humano actual son multifactoriales y no pueden ser achacadas a un gen o alelo en particular. Es en ese contexto de la multifactorialidad donde se enclava la microbiota como elemento clave de traducción de señales ambientales y de señales biológicas y químicas de la dieta dentro del organismo. Resulta poco sensato ignorar la contribución a la biología del organismo de un elemento como la microbiota intestinal de cuya composición depende la concentración del 10% de los metabolitos de la sangre (133). Por eso en los últimos años los factores de esta compleja ecuación diferentes de la genética humana, como puede ser el ambiente, la dieta, la microbiota, la epigenética e incluso la relación entre ambas últimas (134–136) están ganando peso.

Esta nueva visión holobiótica del cuerpo humano, puesta en su contexto evolutivo, junto con la mejora de las tecnologías de secuenciación para el estudio de las comunidades microbianas, está llevando a la revisión que la medicina tiene de los microorganismos, de la microbiología clínica y del uso de la microbiota como estrategia farmacológica. Ésto a su vez se ha traducido en un enorme interés en la investigación básica y aplicada, tanto en el ámbito académico como en el industrial. Iniciativas públicas como el Proyecto MetaHIT (<http://www.metahit.eu>) en Europa cifrado en 22 M€, o como las tres fases del HMP (Human Microbiome Project; <http://hmpdacc.org/>) en EEUU con un total 215 M€, se han lanzado al estudio de la microbiota en un intento de establecer los valores de la normalidad en la composición de los microorganismos asociados al cuerpo humano, así como buscar posibles marcadores de enfermedad. Se han multiplicado también las empresas privadas basadas en el desarrollo de productos terapéuticos centrados en la microbiota, así como los proyectos que

buscan una explotación comercial de la microbiota en empresas alimentarias y farmacéuticas.

Un porcentaje elevado de estas múltiples iniciativas comerciales que utilizan la microbiota como estrategia para la mejora de la salud humana ha arrojado resultados sorprendentes en términos de seguridad y de eficacia, lo que ha generado una atmósfera de gran expectación, e incluso excitación, alrededor de su futuro potencial clínico. No obstante, y dado lo novedoso y lo particular de la mayoría de estas estrategias terapéuticas, existe la preocupación, también generalizada y hasta cierto punto constatada, de que los actuales marcos regulatorios farmacéuticos pueden suponer un obstáculo para el desarrollo de este tipo de medicamentos y, por tanto, retrasar el acceso de los pacientes a los mismos.

Por lo tanto se considera necesario establecer un diálogo entre científicos, industria y autoridades para que, sin comprometer la seguridad de los pacientes, se logre que estas terapias se prescriban con la mayor celeridad posible dado su impacto potencialmente positivo en la salud.

II – JUSTIFICACIÓN

II - JUSTIFICACIÓN

Como se ha mencionado en el capítulo previo de “Introducción” el desarrollo de las tecnologías de secuenciación genómica masiva durante la última década ha permitido profundizar en el estudio de la microbiota y de cómo ésta actúa como factor determinante de la salud o la enfermedad del ser humano. No obstante, y a pesar del notable aumento en la producción científica en esta materia, estos avances no se han traducido aún en un beneficio para la sociedad.

Como consecuencia de un estudio académico previo (137), en el transcurso de este trabajo se han identificado los aspectos regulatorios como el principal factor limitante para el acceso de estas tecnologías al mercado y, en consecuencia, a los pacientes. Más concretamente, la incertidumbre regulatoria en el sector farmacéutico es uno de los principales factores de riesgo identificados por parte de los inversores a la hora de apoyar este tipo de proyectos.

Por otra parte, y dado su alto potencial clínico-terapéutico, también se ha detectado en las autoridades regulatorias un gran interés en estas tecnologías. Para este colectivo la mayor incertidumbre emana de los aspectos meramente científico-técnicos, dadas sus características especiales y sus diferencias con cualquier otro fármaco o mecanismo de acción evaluado hasta la fecha.

A todo ello se unen los cambios regulatorios en sectores adyacentes al farmacéutico en los que los productos a base de microorganismos juegan un papel importante. Por una parte, las decisiones adoptadas en el sector alimentario por EFSA (“European Food Safety Authority”) sobre probióticos son la causa de importantes desencuentros entre la industria y las autoridades, especialmente en la UE. Por otra, los usos previstos de los probióticos en el sector de los productos sanitarios en esa misma región geográfica abre un interrogante legal.

Considerando todo lo expuesto en los párrafos anteriores se han diseñado los objetivos de esta tesis doctoral que se detallan en el siguiente capítulo de este documento. Con ellos se pretende ayudar al entendimiento entre actores de

diferente naturaleza (industria y autoridades), considerando las diferentes industrias (alimentaria, de productos sanitarios y farmacéutica).

III - OBJETIVOS

III – OBJETIVOS

El objetivo principal de esta Tesis es analizar la situación actual en torno al conocimiento de la microbiota humana y sus aplicaciones comerciales, particularmente en el sector farmacéutico, donde tendrán especial relevancia. Para ello se prestará especial atención a la problemática ligada al posicionamiento legal y los pasos de investigación y desarrollo comercial que conduzcan a la puesta en el mercado de estos productos.

Para ello se proponen tres objetivos secundarios que se definen a continuación:

- Realizar una revisión sobre el conocimiento actual acerca de la importancia ecofisiológica de las microbiotas humanas de distintos órganos en la salud y la enfermedad y sus posibles aplicaciones comerciales
- Analizar la legislación en torno a la comercialización de estos productos basados en la microbiota y definir la categoría regulatoria a la que se deberían adscribir
- Estudiar la problemática ligada a la comercialización de estos productos, en particular la relativa a su desarrollo como fármacos, y sugerir estrategias de trabajo para facilitar y lograr su acceso al mercado

IV - MATERIALES Y MÉTODOS

IV - MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se ha basado en la recogida de datos sobre microbiota humana y su posterior análisis e integración considerando cuatro aspectos distintos: científico-técnico, mercado, clínico y regulatorio.

4.1 ASPECTOS CIENTÍFICO-TÉCNICOS

Para tener una visión completa del estado del conocimiento sobre la microbiota humana, se ha efectuado una revisión sistemática de la literatura científica en lengua inglesa con fecha de publicación posterior a 2005, utilizando las palabras clave “microbiota” y “microbiome”. Se ha analizado su presencia asociada a los distintos sistemas, órganos o aparatos del cuerpo humano. Para ello se ha utilizado el buscador “Pubmed” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Se han priorizado publicaciones recientes y de revisión. La selección a partir de este año se debió a dos razones. Por un lado porque a partir de este año el número de publicaciones acerca de la microbiota comenzó a crecer exponencialmente (138). Por otro, porque fue el año posterior a la publicación del trabajo responsable del renacimiento del interés por la microbiota en la comunidad científica (139).

Este ejercicio ha rendido unos resultados preliminares de naturaleza científica que fueron ampliados mediante una revisión no sistemática de la literatura relevante para aspectos asociados a ellos en el ámbito epidemiológico, social y económico. Asimismo se han analizado las referencias bibliográficas consideradas más relevantes de entre las citadas en los trabajos seleccionados utilizando el mismo buscador indicado anteriormente.

Los resultados técnicos se han completado con una revisión no sistemática de la literatura relativa a aspectos de microbiología general o ambiental. Para la situación de la microbiota de los metazoos en el contexto evolutivo, así como para otras consideraciones de esa misma índole (Teoría Endosimbionte, transferencia horizontal de genes, etc.), la búsqueda se ha realizado usando las palabras clave

“hologenome” y “hologenomic” en publicaciones posteriores al año 2008, fecha en la que ese concepto apareció por primera vez en la literatura científica (51).

Con este ejercicio se ha generado la base teórica y el criterio científico sobre el que posteriormente se han llevado a cabo las discusiones acerca de aspectos clínicos y regulatorios (ANEXO 1).

4.2 ASPECTOS DE MERCADO

A lo largo de este trabajo su autor ha asistido a una serie de ferias, congresos y conferencias con participación de miembros del sector. Se han visitado los eventos de índole académica, industrial, o de espíritu mixto que se enumeran a continuación:

- “BioSpain”, septiembre de 2014, Santiago de Compostela (España)
- “CPhI Worldwide”, octubre de 2014, París (Francia)
- “Probiota Europe”, febrero de 2015, Ámsterdam (Países Bajos)
- “Keystone Symposium on Gut Microbiota Modulation of Host Physiology: The Search for Mechanism”, marzo de 2015, Keystone, CO (EEUU)
- “1st Annual Translational Microbiome Conference”, mayo de 2015, Boston, MA (EEUU)
- “3rd Microbiome R&D and Business Collaboration Forum”, septiembre de 2015, San Diego, CA (EEUU)
- “CPhI Worldwide”, octubre de 2015, Madrid (España)
- “Pharmabiotic Conference”, octubre de 2015, París (Francia)
- “4th International Conference and Exhibition on Probiotics, Functional and Baby Foods”, noviembre de 2015, Valencia (España)
- “Keystone Symposium on Gut Microbiota, Metabolic Disorders and Beyond”, Newport, RI (EEUU)

En dichos eventos se ha contactado con investigadores académicos, científicos de la industria, inversores especializados y reguladores, tanto del sector de la alimentación, como de los productos sanitarios y de la industria farmacéutica. El objetivo fue comprender la base científica, la variedad de enfoques clínicos y la problemática regulatoria.

Con todos estos datos se ha elaborado un listado de 59 compañías biofarmacéuticas privadas focalizadas en el campo de la terapéutica a través de la microbiota (**ANEXO II**). No se han considerado desarrolladores o comercializadores de probióticos en el sector alimentario. Con ello se ha logrado

un marco de referencia mucho más completo que los disponibles hasta ese momento en la literatura (140).

Para esta búsqueda, además de la asistencia a eventos, se utilizaron diversos recursos “online” como el anteriormente citado “Pubmed”, otros buscadores o agencias de noticias.

4.3 ASPECTOS CLÍNICOS

Se han analizado en detalle las carteras de proyectos, así como la literatura científica de dominio público, de las 59 compañías previamente mencionadas. Se han seleccionado para un análisis más profundo aquéllas que cuentan con proyectos en fase clínica, en preclínica tardía o aquéllas cuyo enfoque se consideró particularmente atractivo, relevante o ilustrativo por motivos científicos o regulatorios. Por ese procedimiento la lista de compañías se redujo a 26 (TABLA 1).

Este análisis rindió un total de 41 proyectos o productos terapéuticos a través de la microbiota, de los cuales se han estudiado con mayor profundidad 32, prestando especial atención a los aspectos relacionados con el diseño de los ensayos preclínicos y clínicos, sus resultados y sus implicaciones regulatorias.

Para esta labor, además de las respectivas páginas web corporativas, se han utilizado las páginas de agencias de noticias y de prensa, tanto generalista como especializada. Para la información relativa a los ensayos clínicos se ha empleado el buscador “Pubmed” y la base de datos de ensayos clínicos “Clinical trials” (www.clinicaltrials.gov).

Enfoque	Empresa	País	Producto	Microorganismo o fuente	Indicación	Fase
LBP	Osel, Inc.	EEUU	CBM588	<i>Clostridium butyricum</i> MIYAIRI 588®	<i>C. difficile</i>	2
	Oxthera AB	Suecia	Oxabact	<i>Oxalobacter formigenes</i>	Hiperoxaluria	3
	Shire Pharmaceuticals	Irlanda	VP20621 = NTC-D-M3	<i>Clostridium difficile</i> M3	<i>C. difficile</i>	2
LBP-tópico	AOBiome, LLC.	EEUU	B244	<i>Nitrosomonas eutropha</i> D23	Acné	Preclínico
	Dermala, Inc.		N/D	N/D	Acné y otras	
LBP-modificado	Osel, Inc.	Países Bajos-EEUU	Lactin-V	<i>Lactobacillus crispatus</i> CTV-05	Vaginosis	Preclínico
	ActoGeniX BV (Intrexon)		ActoBiotics	<i>Lactococcus lactis</i>	IBD	
	Oragenics, Inc.		AC013	<i>Lactococcus lactis</i>	Mucositis	
	Osel, Inc.		MucoCept	<i>Lactobacillus jensenii</i> 1153 (GMO)	Prevención de VIH	
	Synlogic, Inc.		SYN2010	<i>E. coli</i> Nissle	Fenilcetounuria	
	Vithera Pharmaceuticals, Inc.		SYNB1010	<i>Lactococcus lactis</i>	Ciclo de la Urea	
	Xyrobe Therapeutics, Inc.		VT301	<i>Propionibacterium acnes</i>	IBD	
LBP-Consorcio definido	Vedanta Biosciences, Inc.	EEUU	VE202	Clostridios	IBD	Preclínico
	Seres Therapeutics, Inc.		SER-301	Consorcio	Colitis ulcerosa y otras	
LBP-Consorcio poco definido	OpenBiome, Inc.	Francia	SER-109	FMT	<i>C. difficile</i>	2
			SER-287		Enfermedad de Crohn	
FMT heterólogo	Rebiotix, Inc.	EEUU	FMT Capsule G3	<i>C. difficile</i>	1	
FMT autólogo	MaaT Pharma S.A.	Francia	RBX2660	N/D	2	
Phantom probiotic	Manremyc S.L.	España	Nyaditum resae	<i>Mycobacterium manresiensis</i>	Tuberculosis	Preclínico
Postbiótico	Amrita Therapeutics Ltd.	India	AT-01C	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Oncología	Pre-IND
	AvidBiotics Corp.	EEUU	N/D	N/D	Antimicrobianos	Preclínico
Bacteriófago	Symbiotix Biotherapies, Inc.	EEUU	PSA	<i>Bacteroides fragilis</i>	IBD, Esclerosis Múltiple	Preclínico
Bacteriófago modificado	Intralix, Inc.	Francia	N/D	N/D	IBD, Enfermedad de Crohn	Preclínico
	Eligo Bioscience S.A.S.		EB 8018		Antimicrobianos	
Molécula pequeña	Enterome S.A.	EEUU	SGM-1019	N/D	IBD, Enfermedad de Crohn	IND
	Second Genome, Inc.		N/D		Enfermedad de Crohn	
	Synder, Inc.		N/D		Diarrea por quimioterapia	
	Synthetic Biologics, Inc.		SYN-010		Colon Irritable (Constipación)	
Otro/no definido	EnBiotix, Inc.	EEUU	SYN-004	N/D	<i>C. difficile</i> y diarrea por antibióticos	2
			EPP-001		Antimicrobianos	

TABLA 1. Listado de compañías y proyectos de estrategias terapéuticas

4.4 ASPECTOS REGULATORIOS

Se ha realizado un resumen de toda la normativa aplicable a los productos a base de microorganismos destinados al consumo humano. Se ha estudiado con especial profundidad la legislación farmacéutica, independientemente de su aplicación histórica a los microorganismos. La totalidad de la normativa ha sido analizada y resumida para su posterior discusión.

De forma adicional, y dado el mayor avance regulatorio en EEUU, se han incluido documentos y guías procedentes de ese país. Se han transcrito de forma literal fragmentos seleccionados de la normativa, dada la importancia de la redacción en el campo del Derecho Administrativo. Se ha utilizado la legislación española traspuesta y consolidada por defecto. En momentos puntuales, para el caso de la normativa europea, y en todos los casos en la americana, se han realizado traducciones literales de los textos en inglés.

En función del marco regulatorio se han empleado como fuentes las páginas web de distintos organismos como la EMA (Agencia Europea del Medicamento o "European Medicines Agency", <http://www.ema.europa.eu/ema/>), la FDA ("Food and Drug Administration", <http://www.fda.gov/>), el Boletín Oficial del Estado (<https://www.boe.es/>), la AEMPS (Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, <http://www.aemps.gob.es/>), o la EFSA (<https://www.efsa.europa.eu/>).

V - RESULTADOS

V – RESULTADOS

Este apartado contiene los datos necesarios para abordar el estudio del primer objetivo secundario de esta tesis, consistente en realizar una revisión sobre el conocimiento actual acerca de la importancia ecofisiológica de las microbiotas humanas de distintos órganos en la salud y la enfermedad y sus posibles aplicaciones comerciales.

5.1 ANÁLISIS DEL POTENCIAL COMERCIAL ACTUAL LIGADO AL ESTUDIO DE LA MICROBIOTA HUMANA

El cuerpo de todos los metazoos se encuentra habitado de forma natural por un gran número de organismos microscópicos a los que se conoce como microbiota, microflora o flora normal. Estas comunidades, compuestas principalmente por bacterias, aunque también por arqueas, levaduras, hongos filamentosos, virus procariotas y eucariotas, protozoos e incluso, en animales superiores, pequeños metazoos como helmintos, coloniza cualquier superficie del cuerpo con cierto grado de exposición al medio ambiente. La principal característica de la microbiota es su relación de carácter mutualista y/o simbiótico, con el hospedador.

El cuerpo humano no es una excepción dentro de los mamíferos y alberga una enorme diversidad de organismos. Como en el resto de los animales, la microflora tiene un carácter mutualista y en condiciones normales no produce daños al hospedador. No obstante, existen individuos conocidos como portadores sanos que albergan microorganismos patógenos como integrantes de su flora normal y que son capaces de infectar a otros humanos que no los poseen. Existen multitud de situaciones en las que esa microbiota normal puede convertirse en patógena oportunista, llegando incluso a acabar con la vida del hospedador.

Estos organismos son principalmente bacterias (aproximadamente un 95%, calculado en términos de cantidad de secuencias de ADN). Las arqueas, levaduras, hongos filamentosos, protozoos y pequeños animales (helmintos) se encuentran presentes en menor medida (141). El caso de los virus es un tanto

especial al no ser considerados organismos vivos. Aunque no se dispone de información fiable al respecto, existen estimaciones que indican que los virus contabilizados en número de partículas frente a número de células se encuentran en cantidades 10 veces superiores al de las bacterias (83,84).

Durante años existió la creencia generalizada de que el número de células bacterianas en el cuerpo humano era 10 veces superior al número de células somáticas y germinales y que, por tanto, era acertado decir que el 90% de las células del organismo humano no eran humanas (142). Sin embargo, estimaciones recientes indican que la proporción es mucho más cercana a una célula bacteriana por cada célula humana, contabilizándose del orden de un total de unas 3×10^{13} células humanas (siendo el 80%, en número, eritrocitos) (143) frente a 10^{14} células bacterianas. Es importante destacar que existen 10^{11} bacterias en cada gramo de heces (144).

A pesar de ser mil veces más pequeñas que las células humanas, en un individuo medio, únicamente las bacterias del intestino suponen unos 2 kg de peso, lo que supone algo más de un 2% del peso corporal. Es una masa superior a la del cerebro (1,4 kg) o el hígado (1,6 kg) y similar a la del total de los eritrocitos de un adulto (145–147). La fracción de la microflora más abundante es la residente en el intestino, donde se encuentra más del 70% de estos organismos (14,148). Esto, junto con su importancia fisiológico-metabólica, ha llevado a muchos autores a elevar a la microbiota, especialmente la intestinal, a la categoría de órgano (149,150), por lo que se habla de esta microbiota como el último órgano en ser descubierto en el cuerpo humano. El tracto genitourinario, especialmente el femenino, también posee una microbiota muy característica (151) y de gran relevancia biológica (152). Otras regiones del cuerpo humano en las que la flora microbiana toma relevancia son la cavidad bucal, la piel y el tracto respiratorio, cuyo extremo más distal con respecto al exterior, los pulmones, se creía estéril hasta tiempos recientes (153).

La importancia de la microbiota no viene determinada únicamente por el número de células, sino también por su diversidad genética y por tanto metabólica. El conjunto de toda la información genética contenida en la flora normal del hombre contiene unos 3 millones de genes (154), lo que supone 150 veces más que los 23.000 genes de su hospedador. Esta gigantesca diversidad

genética otorga al ser humano una variedad de actividades metabólicas esenciales, pero ausentes en él como animal. Desde el punto de vista evolutivo, estos genes son actividades de las que la especie se ha beneficiado durante miles de años sin tenerlas que desarrollar ella misma (155). Además de este papel activo derivado de su actividad metabólica, la microbiota posee un papel pasivo por su interacción con los sistemas inmune, nervioso y endocrino, que según los indicios actuales puede tener consecuencias fisiológicas todavía más relevantes que las descritas con anterioridad.

Se puede considerar que la existencia de esta microflora en el ser humano se intuye desde muy antiguo. Algunos de sus miembros se observaron por primera vez en el siglo XVII con la invención del microscopio por Anthony van Leeuwenhoek. En todo caso, se conocen bien desde el siglo XIX, con la formulación de la teoría microbiana de la enfermedad. La noción de que los microorganismos que viven dentro del cuerpo humano pueden jugar un papel importante en la salud fue obra del ucraniano Iliá Metchnikoff (1845-1916), quien recibió el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1908 por sus trabajos sobre el sistema inmunitario. Metchnikoff teorizó con que la longevidad de los campesinos búlgaros se debía al consumo de leches fermentadas. En su obra “La prolongación de la vida” (1909) especulaba con las propiedades beneficiosas de las bacterias del yogur (principalmente de *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus*) y del ácido láctico para la salud humana. A pesar de que en muchas ocasiones se le atribuyen conceptos diferentes, más cercanos al concepto de efecto prebiótico o bifidogénico, con lo que realmente teorizó es con la posibilidad de que el ácido láctico producido por las bacterias del yogur actuara como conservante natural en el intestino del mismo modo al que actúa en la leche. Se puede entender por tanto que su visión de la microbiota intestinal era hasta cierto punto la de un conjunto de microorganismos comensales o incluso potencialmente patógenos.

Al igual que en todas las aplicaciones de la microbiología, el estudio de los elementos que componen la microbiota humana ha estado limitado por el hecho de que sólo una fracción de ella es cultivable en condiciones de laboratorio. Según los autores consultados, esta fracción varía entre un 20 y un 40% en muestras de heces humanas (20) y un 50% en muestras la cavidad oral (21), mientras que se cultiva prácticamente la totalidad de especies presentes en muestras de vagina de

mujer (23), dadas las especiales características de la microbiota de esta localización. Otras estimaciones arrojan porcentajes mucho más pesimistas acerca del porcentaje de bacterias cultivables (24). En cualquier caso, sólo el desarrollo y el uso generalizado en tiempos recientes de las técnicas independientes de cultivo, aplicando métodos moleculares, han permitido profundizar en su estudio.

La dificultad de recolectar muestras, unida a la limitación de las técnicas de cultivo, llevó a pensar durante décadas que determinadas localizaciones del cuerpo humano, como los pulmones o el útero, estaban libres de microorganismos en condiciones normales y no patológicas. Hoy, sin embargo, se sabe que no es así, aunque aún existe una falta importante de conocimiento sobre la composición de las microbiotas de las diferentes localizaciones del cuerpo humano.

El sistema en el que más se centran las investigaciones es el digestivo por un doble motivo. Por un lado contiene el mayor número de microorganismos, y por otro se considera que su microbiota tiene potencialmente la mayor importancia científica, biológica y económica. La obtención de muestras de este sistema es sencilla en sus extremos, mediante muestras de saliva, raspado dental o lingual en la boca y por heces en el caso del colon. Las localizaciones intermedias como el estómago, o la mucosa del intestino grueso, requieren endoscopia y toma de biopsias.

5.1.1 Microbiota del tracto digestivo

5.1.1.1 Microbiota de la cavidad oral

En términos históricos, se podría decir que la microbiota de la cavidad oral fue la primera en ser estudiada, ya que fue una de las primeras muestras que van Leeuwenhoek colocó bajo su microscopio en Delft en 1683. Desde entonces, y debido en gran parte al atractivo mercado que constituye la odontología, se han hecho grandes esfuerzos por comprender la compleja comunidad microbiana que reside dentro de las estructuras de la boca.

La cavidad oral es el inicio del tubo digestivo, la estructura que recibe los alimentos y en la que se produce la masticación y comienza la digestión. Pese a tener acceso constante y directo al medio externo, posee unas condiciones bastante estables de temperatura y humedad, que son fundamentales para la supervivencia de los microorganismos. Tiene además un aporte constante de nutrientes, no sólo por los restos de la dieta, sino también por la saliva y la descamación constante del epitelio bucal. Además, posee dos clases de estructuras muy características, como son la lengua y los dientes con todas sus caras que por una parte aumentan la superficie de crecimiento para los microorganismos y por otra generan nichos ecológicos muy diferentes en muy poco espacio. Pero si algo destaca en la microbiota de la boca es la existencia de biofilms que los microorganismos forman para soportar las presiones químicas y sobre todo mecánicas a las que se ven sometidos.

En la boca se han detectado varios centenares de especies microbianas distintas, de las cuales sólo el 50% han podido ser cultivadas (21,22), siendo las más abundantes los representantes del filo *Firmicutes* (156). Existen géneros bacterianos como *Neisseria*, *Cardiobacterium*, *Haemophilus*, *Campylobacter* (*Proteobacteria*); *Streptococcus*, *Granulicatella* y *Veillonella* (*Firmicutes*); *Fusobacterium* (*Fusobacteria*); *Rothia*, *Actinomyces*, y *Atopobium* (*Actinobacteria*); y *Prevotella*, *Capnocytophaga*, y *Bergeyella* (*Bacteroidetes*), que tienden a estar en la saliva de todos los individuos estudiados. Es una población microbiana bastante estable y que no sufre cambios circadianos significativos y que de forma similar a lo que ocurre con las heces procedentes del colon, es una mezcla de microorganismos procedentes de diferentes localizaciones. Por el contrario, la placa dental tiende a

ser más rica en *Actinomyces* y *Streptococcus* (157), mientras que el dorso de la lengua tiene mayor presencia de *Prevotella* y *Veillonella* (158). En las encías, además de un biofilm exterior, existe una microbiota intracelular de las células epiteliales, en la que destaca *Porphyromonas gingivalis*, que puede ser tanto comensal como patógeno oportunista (159).

Los estudios de la microbiología de las patologías orales son de los más antiguos del mundo de la microbiota. Así, por ejemplo, se conoce sobradamente la implicación de *Streptococcus mutans* y de *Nocardia* en la aparición y el desarrollo de las caries. La enfermedad periodontal está ampliamente distribuida y se atribuye a un aumento en el número de microorganismos y en la diversidad taxonómica de los biofilms del surco gingival. Éste se encuentra de forma normal poblado por anaerobios facultativos Gram-positivos como *Streptococcus anginosus*, pero con la falta de higiene pasa a estar dominado por Gram-negativos como *Porphyromonas*, *Campylobacter*, causando la enfermedad (160).

Es interesante observar que individuos con mala higiene oral son propensos a sufrir endocarditis (frecuentemente causada por *Streptococcus viridans* procedente de la boca) y a la invasión del torrente sanguíneo por parte de bacterias orales que pueden causar graves complicaciones en el cerebro, el hígado y los pulmones (161,162). Es también llamativo el hecho de que la microbiota oral parece ser el reservorio del que proceden muchos de los elementos de microbiotas tan diversas como la del tracto respiratorio (163), del tracto digestivo inferior y la de la placenta (151).

5.1.1.2 Microbiota del estómago

El estómago era uno de los órganos clásicamente considerados estériles debido a su producción de ácido, lo que lo hace teóricamente inhóspito para las bacterias. Hasta hace pocos años se consideraba que una de las principales funciones de la acidez del estómago era precisamente la de minimizar la cantidad de microorganismos que pudieran atravesarlo y prevenir enfermedades intestinales. Pero el descubrimiento de *Campylobacter pyloridis* en 1982 supuso el fin de este dogma. La bacteria, renombrada *Helicobacter pylori* dos años más tarde,

es capaz de colonizar la mucosa gástrica y causar daños en ella. Se descubrió también que *H. pylori* no es un microorganismo acidófilo en sí, sino que es capaz de escapar a la acidez del estómago mediante su potente enzima ureasa, que degrada urea produciendo amonio, que neutraliza el HCl de forma local. Esta bacteria ha sido relacionada con graves problemas de salud como la gastritis, que puede desembocar en úlcera gástrica y en cáncer de estómago (164,165), lo que ha llevado a tratarla como un agente infeccioso clásico, buscando su eliminación del cuerpo con antibióticos. Sin embargo, también se ha observado que los individuos que poseen *H. pylori* como miembro de su microbiota gástrica e intestinal son menos propensos a sufrir enfermedades como el asma y las alergias (166). Esto sugiere que este microorganismo puede jugar un papel importante en la educación del sistema inmune, especialmente en edades tempranas. Esta nueva visión de este microorganismo está llevando a un replanteamiento de los riesgos y beneficios del tratamiento contra él (167). Dado que *H. pylori* suele causar problemas únicamente a partir de la edad adulta, existe una corriente de científicos que defienden que la estrategia óptima para la gestión de *H. pylori* sería mantenerlo en su población habitual constante hasta cierta edad, permitiendo que complete su papel de educación de la inmunidad, y eliminarlo únicamente cuando esta labor haya terminado y antes de que dé lugar a complicaciones clínicas.

Hay otros microorganismos que son capaces de establecer de forma pasajera pequeñas colonias en el estómago. Pertenecen a los géneros *Veillonella*, *Lactobacillus*, *Clostridium* y *Streptococcus*, y generalmente proceden de la microbiota oral (168–171). Los estudios que han evaluado la composición de esta microbiota en individuos de diferentes localizaciones geográficas no han hallado diferencias entre ellas (169). Los factores que sí han demostrado modificarla son la dieta, aunque con poco nivel de evidencia en humanos, el uso de medicamentos y la colonización previa por *H. pylori*. En el caso de las medicaciones, el uso prolongado de antiácidos se ha relacionado con sobrecrecimiento bacteriano en el estómago (172), así como con la colonización de este órgano por parte de microorganismos más propios del intestino y de la orofaringe (172,173) que pueden tolerar valores de pH menos ácidos.

Existe un gran interés en conocer cómo la microbiota del estómago puede afectar la capacidad de colonización de *H. pylori* y viceversa. A pesar de que los estudios no siempre coinciden, se ha visto que una presencia o abundancia de *Prevotella* y *Eubacterium*, proteobacterias, espiroquetas y acidobacterias y/o un descenso de *Bifidobacterium*, *Clostridium*, proteobacterias, *Bacteroidetes*, actinobacterias y *Firmicutes* (171,174–176) dificulta el asentamiento de *H. pylori*. Por otra parte, también se conocen los cambios en la microbiota del estómago inducidos por *H. pylori*. Están relacionados con su capacidad para producir inflamación, disminuir la motilidad gástrica, aumentar el pH y sintetizar amonio y bicarbonato que sirven de sustrato para otros microorganismos que dejan de ser pasajeros para colonizar el estómago. No obstante, también existen estudios que indican que la microbiota del estómago no varía entre individuos con y sin *H. pylori* (174–177).

5.1.1.3 Microbiota del intestino

5.1.1.3.1 Generalidades

Como se indicó anteriormente, el intestino es la localización del cuerpo humano en donde se concentra la mayor cantidad de integrantes de la microbiota, aproximadamente un 70%. Es también el órgano cuya microbiota ha sido más estudiada, aunque su complejidad hace que aún existan más incógnitas que certezas sobre ella.

Anatómicamente, el intestino es un tubo largo (de unos 8,5 m en total), recubierto de una mucosa y con unas condiciones constantes de temperatura y humedad. Se encuentra dividido en tres partes desde el estómago hasta el ano: el intestino delgado (primeros 7 m), el intestino grueso (1,5 m) y el recto (últimos 15 cm). Al ser el órgano en el que se lleva a cabo la digestión y la absorción de nutrientes, su cara interior posee criptas, vellosidades y microvellosidades con el fin de aumentar la superficie de intercambio con el contenido del lumen, lo que hace que tenga una superficie aproximada de 32 m², de los cuales 2 m² corresponden al intestino grueso (178). La microbiota intestinal cubre la práctica

totalidad de esta superficie, cumpliendo una labor de defensa por exclusión espacial de potenciales patógenos, metabólica y de educación del sistema inmune.

Las condiciones ambientales, sobre todo químicas, son bastante constantes para cada parte del tracto intestinal, y vienen dadas mayoritariamente por su distancia al estómago, lo que a su vez determina la composición del contenido del tubo digestivo, su riqueza en nutrientes, su valor pH, o la presión de O₂. Existen factores, como la alimentación o los medicamentos, que pueden alterar significativamente las condiciones ambientales del intestino. Aun así, y dadas las condiciones ambientales, más del 99% de las especies microbianas que lo habitan son anaerobias estrictas o facultativas (179).

La teoría clásica decía que los primeros microorganismos pobladores del intestino se adquirirían al pasar el feto por el canal del parto en el nacimiento. Si bien es cierto que la gran mayoría de la carga microbiana intestinal se adquiere en ese momento, estudios relativamente recientes ponen de manifiesto que las estructuras intrauterinas, y por tanto el feto y su intestino, no son estériles en el vientre materno (180–184). Se especula además con que la presencia de esos microorganismos juegue un papel importante en el desarrollo del feto (185).

Como se indicará posteriormente, esa primera microbiota cuantitativamente significativa procedente del tracto reproductor de la madre y está principalmente compuesta por lactobacilos, el género mayoritario en la microbiota vaginal al avanzar la gestación. Está diseñada para procesar la leche materna de la que el bebé se alimentará durante sus primeros meses de vida. Algunos autores además defienden que el hecho de que el ano se encuentre tan cerca de la vagina no es evolutivamente casual sino que responde a la necesidad del bebé de adquirir cierta cantidad de microbiota intestinal de la madre, que también se sabe que sufre unos cambios determinados a lo largo de la gestación (186,187). Conviene destacar que se ha observado que los bebés nacidos por cesárea en lugar de por parto natural tienen un déficit de carga microbiana y de microorganismos procedentes de la vagina y el intestino de la madre (188–190), lo que se ha relacionado con la aparición de determinadas enfermedades, sobre todo de tipo alérgico o atópico (191–193). Además de a raíz de su vida en comunidad, el bebé tiene una fuente de microorganismos intestinales presentes en la leche materna durante la lactancia, ya que, por mecanismos que aún no se conocen,

determinados microorganismos de la microbiota intestinal de la madre, como bifidobacterias, alcanzan la leche materna para ser transmitidos al bebé (194–196).

Otro punto a considerar es la importancia que la evolución otorga a los microorganismos intestinales. Se sabe que la leche materna posee más de 200 tipos de oligosacáridos especiales, algunos con estructuras y modificaciones químicas muy complejas, que a pesar de suponer el tercer componente de la leche tras la lactosa y los lípidos (197), son indigeribles por parte del metabolismo humano, y por tanto, del bebé, por lo que están específicamente dirigidos a alimentar y ayudar a prosperar a los microorganismos del intestino del lactante (198–200). Desde esta situación inicial en que la microbiota intestinal está compuesta por unos pocos géneros bacterianos, en los que, por ejemplo, en general se encuentran ausentes las arqueas metanógenas, el ecosistema intestinal va madurando. Se observa un cambio al final de la lactancia. Entonces la microbiota comienza a diversificarse y aumenta el contenido en especies productoras de butirato como *Bacteroides* y algunas especies del género *Clostridium* (201,202). Hacia los tres o cinco años de edad, la composición de la microbiota es prácticamente la de un adulto (203,204).

La composición de la microbiota intestinal se estudia de una forma indirecta, analizando las heces. Es una muestra no invasiva y conveniente. No obstante, no hay que olvidar que aunque las heces contienen un 80% de los microorganismos intestinales, sobre todo representan los que están presentes en el lumen de la parte final del intestino grueso. Existen estudios sobre la microbiota más íntimamente ligada a la mucosa del colon obtenida por biopsia o cepillo de citología a través de colonoscopia, técnicas que rinden resultados similares entre sí (73), pero diferentes con respecto a las procedentes de muestras de heces o del recto por medio de un hisopo rectal (74). Mediante estos métodos se obtienen unos resultados de composición de la microbiota intestinal que indican que las bacterias son mayoría en diversidad y en número. Existen cientos, miles o incluso decenas de miles (205) de especies diferentes, pertenecientes a dos filos dominantes: *Bacteroidetes* y *Firmicutes* (206). Se asume que en la microbiota de un individuo sano los últimos dominan sobre los primeros (154). Es un ecosistema muy diferente de cualquier otro ecosistema microbiano conocido, con especies exclusivas, lo que indica un alto grado de coevolución con el hospedador

(125). Hoy se acepta que los humanos adultos poseen una microbiota-núcleo de unas cuarenta especies bacterianas que suponen el 60-75% del total de la microbiota en términos de abundancia (207,208).

Si se analizan las distintas partes del intestino se encuentra que el intestino delgado contiene una microbiota menos densa y diversa (unas 10^2 - 10^3 unidades formadoras de colonias por gramo, ufc/g) que las partes más bajas del tracto digestivo. Muy probablemente se deba a la mayor acidez y la presencia de sales biliares y de péptidos antimicrobianos producidos por las células epiteliales. En esta zona existe una abundancia relativamente alta de clostridios, lactobacilos y proteobacterias, así como de enterobacterias (209). En el intestino grueso es donde se concentra la mayor diversidad y número de bacterias, con valores de hasta 10^{11} ufc/g (12,144). A esta parte del tracto digestivo es a la que llegan las sustancias que no han podido ser digeridas o absorbidas por el hospedador y que quedan por lo tanto disponibles para los microorganismos. Son fermentadas produciendo grandes cantidades de ácidos orgánicos, SCFA (por las siglas en inglés de "Short Chain Fatty Acid") y gases como CO_2 , H_2 , H_2S y CH_4 . Se trata, por tanto, de un ambiente altamente anaerobio y reductor en el que la hidrogenotrofia generada por las bacterias sulfatorreductoras, las arqueas metanógenas y las bacterias acetogénicas juega un papel fundamental en el equilibrio bioenergético y de óxido-reducción del ecosistema (210). Este hecho pone de manifiesto la importancia de las interrelaciones tróficas entre los diferentes miembros de la microbiota, y de éstos con el hospedador. Otro ejemplo ampliamente citado e ilustrativo es la absorción por parte del hospedador de los SCFA producidos por la microbiota que para los enterocitos que recubren la luz del intestino suponen la principal fuente de energía (211).

En el intestino no sólo existe una distribución biogeográfica en el sentido longitudinal del tubo sino también en sentido transversal. Existen microorganismos especializados en la supervivencia en las capas más compactas y profundas de la capa de mucus intestinal, como por ejemplo *Bacteroides fragilis* o *Acinetobacter*. Otros encuentran su nicho en la capa de mucus más externa y laxa, como es el caso de *Akkermansia muciniphila* (209). Finalmente, la edad del individuo también es un factor que influye en la composición de la microbiota intestinal. Se manifiesta en una alteración de la relación *Firmicutes versus*

Bacteroidetes que disminuye con la edad, así como una pérdida relativa de bifidobacterias, *Bacteroides* y determinados tipos de clostridios (212,213).

Pero si algo hay destacable en la microbiota de esta zona del cuerpo es que, además de diversidad taxonómica, lo que existe a lo largo y ancho de la microbiota del intestino es una enorme diversidad genética y metabólica. De los tres millones de genes diferentes presentes en la microbiota humana, una gran mayoría se localizan en los microorganismos del intestino (154), ya que los productos génicos que codifican son los responsables de degradar y metabolizar gran cantidad de componentes de la dieta que el hombre no puede digerir. Un caso claro son los polisacáridos complejos. De hecho, y a pesar de las simplificaciones en términos de contenido de especies realizadas anteriormente, la variabilidad de taxones entre diferentes individuos, o incluso en un mismo individuo a lo largo del tiempo, es muy notable. Siendo cierto que un grupo de unas cuarenta especies constituyen esa microbiota-núcleo, factores como un tratamiento de antibióticos (214), un cambio en la dieta (215), el simple hecho de ingerir alimentos, o incluso una alteración ligera del ritmo circadiano como el “jet lag” (216) son capaces de alterar la composición de especies microbianas del intestino. Es por ello que muy frecuentemente se recurre al nivel de clase (cuatro niveles por encima del de especie) para caracterizar o clasificar las microbiotas intestinales, ya que a ese nivel la variabilidad es menor. Sin embargo, si en lugar de a criterios taxonómicos se recurre a criterios genético-metabólicos-metagenómicos o de función ecológica, la estabilidad observada, tanto en la microbiota intestinal como en virtualmente cualquier otra del cuerpo humano, es mucho mayor (206). Aunque se han realizado avances notables en los últimos años, aún no se ha establecido un consenso acerca de la normalidad o los límites de referencia en términos de composición de la microbiota intestinal, ni de ninguna otra del cuerpo humano, con la posible excepción de la vagina.

5.1.1.3.2 Microbiota intestinal en la enfermedad

Se ha avanzado notoriamente en la identificación de biomarcadores en la microbiota de individuos afectados por una gran variedad de patologías. Es lógico inferir que la falta de normalidad establecida resta significación a este tipo de estudios. Además, tal y como se discutirá en repetidas ocasiones, en la mayoría

de los casos existe una gran incertidumbre acerca de si las posibles diferencias observadas son la causa de la enfermedad, una consecuencia, una mezcla de ambas, o algo irrelevante. El caso más claro en el que existe una relación entre composición de la microbiota y una dolencia es probablemente la diarrea asociada a antibióticos, especialmente la ocasionada por *Clostridium difficile*. Normalmente esta bacteria anaerobia estricta y esporulada se encuentra en bajas cantidades en un porcentaje relativamente elevado de la población, sin causar problemas clínicos de ningún tipo (217). Es determinadas ocasiones, típicamente tras la medicación con antibióticos, la microbiota se ve seriamente alterada. En ese momento las cepas productoras de toxinas de *C. difficile* se encuentran sin competencia en el intestino, crecen y se comportan como patógenos oportunistas, causando una diarrea severa que puede resultar incluso fatal. Las causas exactas del establecimiento de la enfermedad en determinados individuos y de su altísima tasa de recurrencia cifrada entre el 20 y el 30% de los casos no están totalmente claras (218), aunque se especula con factores ecológicos microbianos, como la posesión de una microbiota más diversa y/o rica en *Firmicutes*, especialmente otros clostridios no toxigénicos, que puedan competir con el patógeno en las citadas condiciones. También se ha observado que una microbiota que sobreexpresa genes de biosíntesis de aminoácidos aromáticos y de respuesta al estrés, como los que inducen la esporulación, puede ofrecer protección frente a esta invasión (219). El hecho de que los niños estén frecuentemente colonizados por la bacteria y que raramente desarrollen la enfermedad ha llevado a pensar que determinados factores del hospedador, como la falta de un receptor necesario para la infección, puedan ser relevantes (220).

Otra de las condiciones patológicas cuya relación con la microbiota intestinal es de gran interés es la obesidad. Se piensa que puede estar relacionada con el papel de los microorganismos en el aprovechamiento de la energía de la dieta. El análisis de experimentos de trasplante de material fecal entre ratones (139,221) así como observaciones realizadas entre gemelos humanos discordantes para la obesidad (222) han llevado a reforzar esta teoría. Aunque no existe consenso al respecto, muchos autores coinciden en que una menor diversidad de especies, unida a un aumento en la proporción *Firmicutes versus Bacteroidetes* son marcadores de la microbiota intestinal de personas obesas (223,224).

La IBD se caracteriza por una inflamación crónica del intestino y tiene dos formas: la enfermedad de Crohn y la colitis ulcerosa. Se trata de dos condiciones cuyas causas se desconocen y para las que no existen tratamientos eficaces. Se ha observado que en los pacientes con IBD existe una bajada relativa, tanto de *Firmicutes* como de *Bacteroidetes*, que está compensada por un aumento de las actinobacterias y proteobacterias (205). Además se ha relacionado un descenso de la diversidad de especies con el desarrollo de la IBD. También se han descrito diferencias entre ambas formas, como el desarrollo de anticuerpos contra *Saccharomyces cerevisiae* en el caso de la enfermedad de Crohn (225), y un sobrecrecimiento de bacterias sulfatorreductoras productoras de H₂S en el caso de la colitis ulcerosa (226).

Se han establecido relaciones entre la microbiota intestinal y el desarrollo del cáncer colorrectal, que en algunas ocasiones es una consecuencia de la IBD. Estas relaciones comprenden la interacción inmunológica y la capacidad proinflamatoria de determinadas especies a la producción de determinados metabolitos irritantes, e incluso fenómenos de transferencia horizontal de material genético de las bacterias a las células del hospedador (227).

La microbiota intestinal, por su conocido papel en la educación del sistema inmune del hospedador, se ha relacionado también con enfermedades mediadas por la inmunidad y que no se manifiestan en el propio intestino. Tal es el caso de las alergias (228), el asma (229) y la dermatitis atópica (230). Los mecanismos exactos que median en estos casos son desconocidos, aunque suelen encuadrarse en el marco de la hipótesis de la higiene.

La fibrosis quística o mucoviscidosis es una enfermedad multiorgánica caracterizada por una alta viscosidad de todas las secreciones corporales exocrinas. Afecta principalmente a las pulmonares, lo que ocasiona el 95% de los fallecimientos por la enfermedad, aunque también puede hacerlo a las intestinales (jugos gástricos, hígado, páncreas e intestino). La enfermedad está causada por mutaciones en la proteína CFTR (por las siglas en inglés de "Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Receptor"), siendo la más frecuente la delección de una fenilalanina en el codón 508, responsable del 70% de los casos, aunque hay descritas más de 1.600 mutaciones diferentes de ese gen que dan lugar a la enfermedad. Es la afección genética más frecuente en poblaciones caucásicas, con

una incidencia de 1/2.500 nacimientos (231). Se trata por tanto de una enfermedad genética en la que la microbiota, *a priori*, no juega ningún papel en su etiología. Sin embargo la microbiota intestinal se ve significativamente alterada. En estos enfermos se observa una disminución de la diversidad de especies y una bajada tanto en *Firmicutes* como en *Bacteroidetes*, acompañada de una subida en la presencia de especies potencialmente patógenas (232).

5.1.2 Microbiota del aparato reproductor femenino

Otra microbiota muy estudiada es la vaginal (152). La vagina es un ambiente favorable para el crecimiento bacteriano al ser un entorno húmedo, con temperatura constante y con disponibilidad de nutrientes gracias a la frecuente descamación del epitelio que la recubre. Esto se traduce en un elevado número de bacterias, pero no en una elevada diversidad de especies (233). De hecho la vagina puede considerarse un ecosistema oligárquico claramente dominado por *Firmicutes*. A pesar de la disparidad de opiniones en ciertos detalles, consideraciones y métodos de análisis y evaluación, sí existe consenso en lo referente a la composición de la flora vaginal considerada sana. Se encuentra generalmente dominada por una única especie bacteriana y esta especie es, en la mayor parte de los casos, un lactobacilo. La pérdida de esa dominancia y por tanto el aumento de la diversidad es la causa de desórdenes como la vaginosis bacteriana. La mayoría de autores han establecido clásicamente cinco grupos de tipos de microbiota vaginal según la especie microbiana dominante. Los cuatro primeros grupos son aquellos en los que la vagina sana se encuentra dominada por una única especie de *Lactobacillus*. En el grupo I domina *Lactobacillus crispatus*, en el II *Lactobacillus iners*, en el III *Lactobacillus jensenii* y en el IV *Lactobacillus gasseri*, siendo los dos primeros grupos los más frecuentes en la población (151,152). El quinto grupo, también denominado grupo diverso o V, contiene microbiotas vaginales que no están dominadas por una única especie de lactobacilo, o incluso en las que la especie dominante no es un lactobacilo sino otra especie, generalmente anaerobia, que en muchas ocasiones está relacionada con vaginosis, tales como *Gardnerella vaginalis* o *Prevotella* spp. (152). En muchos casos también se asignan a este grupo microbiotas vaginales inclasificables (151). En cualquier caso, la causa de la pertenencia de una determinada mujer a un grupo de microbiota concreto no se conoce. Cualquiera de las composiciones bacterianas normales mantienen unas condiciones de pH ácido con valores entre 3,8 y 4,5 (234) y de oxidación mediante la producción de H₂O₂ (235), lo que previene el sobrecrecimiento de especies patógenas y oportunistas, y por tanto los estados de disbiosis.

Se sabe que la composición de la microbiota vaginal varía entre etnias (151), pero no se conoce cómo el ciclo menstrual o la edad afecta su composición. Sí se

sabe que la gestación conlleva cambios significativos, asociándose a un aumento en los niveles de lactobacilos, especialmente *L. crispatus*, y una disminución en la diversidad de especies bacterianas (236,237). La microbiota de las embarazadas tiende a ser más estable que la de las no embarazadas (238), aunque se observa frecuentemente un aumento en la dominancia de los lactobacilos a medida que el embarazo progresa, siendo máxima en el último mes de embarazo. Tras el parto, la carga de lactobacilos tiende a disminuir, aumentando de nuevo las especies anaerobias (239). Dado que la primera microbiota intestinal del bebé es adquirida a través del canal del parto, este aumento en la cantidad de lactobacilos hacia el final del embarazo puede tener el sentido biológico, como anteriormente se indicó, de dotar al recién nacido de una primera población bacteriana capaz de metabolizar la leche materna y dar lugar a un correcto desarrollo del sistema inmune y del metabolismo.

Históricamente se pensaba que las partes más internas de la vagina y el útero y las estructuras intrauterinas gestacionales, desde la placenta hasta el tracto digestivo del feto, pasando por el líquido amniótico, eran estériles en condiciones normales (240). La presencia de microorganismos en estas estructuras se consideraba patogénica y causante de condiciones como infección intra-amniótica, sepsis neonatal, aborto y parto prematuro. En varios estudios recientes se han hallado microorganismos en sangre del cordón umbilical, líquido amniótico, placenta y meconio de embarazos con desarrollo normal, indicando que las estructuras de soporte y el propio feto no son estériles en condiciones normales, y que de hecho una exposición temprana a los microorganismos es necesaria para el correcto desarrollo metabólico e inmunológico del feto (185).

Fuera del embarazo, la implicación de la microbiota del tracto genital femenino en enfermedades del mismo es conocida desde los inicios de su estudio. Sin embargo, tanto los detalles del proceso de establecimiento de la vaginosis, como su implicación en otros fenómenos como la infección por patógenos de transmisión sexual, infecciones urinarias e incluso la fertilidad, se están empezando a conocer. En este sentido, las vaginitis son la principal causa de visitas ginecológicas y afectan al 25% de las mujeres en países occidentales a lo largo de su vida (241) con una altísima tasa de recurrencia (242). Esta patología, que cursa con picor, descarga vaginal anómala y olor desagradable, se debe

principalmente a tres causas: enfermedades infecciosas de transmisión sexual como tricomoniasis y clamidiasis, candidiasis y vaginosis bacteriana. Las dos últimas son responsables de hasta el 80% de los casos (243) y ocurren por desequilibrios en la microbiota normal de la vagina y no por infecciones por parte de agentes externos.

La vaginosis bacteriana es considerada una enfermedad polimicrobiana de tipo disbiótico que ocurre cuando el equilibrio ecológico de la flora normal de la vagina sana se ve alterado. Como anteriormente se indicó, esto supone en la mayoría de los casos la pérdida de la dominancia del ecosistema por parte de lactobacilos, con el subsiguiente sobrecrecimiento de otras especies bacterianas preexistentes en la cavidad vaginal pertenecientes a los géneros *Gardnerella*, *Prevotella*, *Atopobium* o *Eggerthella*. Estas disbiosis pueden llevar también asociada una mayor carga bacteriana de la normal, aunque esta condición no es necesaria para la aparición de la patología (244). La alteración de la población microbiana, se caracteriza por un aumento de la presencia de especies normalmente muy minoritarias, lo que ocasiona un aumento del valor de pH por encima del normal de 4,5. Este hecho favorece aún más el crecimiento de especies distintas de los lactobacilos. Además de la inusual abundancia de especies no dominantes en condiciones normales, se ha observado que los lactobacilos vaginales se ven obligados a expresar diferencialmente hasta el 10% de su genoma en condiciones de disbiosis, sobreexpresando determinadas enzimas que pueden dirigir su metabolismo hacia la producción de SCFA en lugar de hacia el ácido láctico, lo que retroalimenta el estado disbiótico (245). En algunas ocasiones la causa primera de esa alteración microbiológica es conocida. Por ejemplo, es relativamente frecuente que tanto vaginosis bacterianas como candidiasis aparezcan como efectos secundarios tras el tratamiento con antibióticos u otras medicaciones. También aparecen por cambios hormonales o por un exceso de higiene que merme la población predominante o altere el pH. Algunos estudios correlacionan la vaginosis bacteriana con la actividad sexual pese a no tratarse de una enfermedad infecciosa de transmisión sexual (246,247). Sin embargo en la mayoría de los casos la causa de la alteración es desconocida, e incluso los mecanismos por los que las causas antes citadas llevan a la vaginosis no se conocen.

5.1.3 Microbiota del aparato urinario

Hasta hace poco se pensaba que en personas sanas únicamente la parte más inferior del aparato urinario, tanto masculino como femenino, albergaba una microbiota. Las zonas superiores como la vejiga se creían estériles, y de hecho ésta no fue incluida en los programas iniciales del HMP (248). Esta creencia llevaba a la idea de que la orina era estéril en origen, y que los escasos microorganismos observados en ella procedían de contaminación a su paso por las partes distales no estériles. De hecho esta última asunción es cierta, ya que está demostrado que el perfil microbiológico de la orina es muy similar al de la uretra (249). Es por ello que la denominada bacteriuria, es decir, la presencia mayor aunque no excesivamente alta de microorganismos en la orina, se ha considerado el principal signo de las infecciones urinarias. Las pruebas de laboratorio para el diagnóstico de estas infecciones se centran en el análisis microbiológico de muestras de orina de media micción. Aunque los criterios difieren, la presencia de cantidades tan bajas como 10^2 - 10^5 bacterias, normalmente coliformes, por mililitro de orina es considerada indicativa de infección urinaria (250). A pesar de que esos estándares basados en la idea de la esterilidad del sistema excretor superior suelen ser acertados a nivel clínico para definir las infecciones urinarias, esta asunción se ha demostrado errónea a nivel biológico, ya que existen diversos estudios (251,252) que demuestran que la orina de personas sin sintomatología de infección urinaria posee cantidades significativas de microorganismos, o que personas sintomáticas tienen resultados microbiológicos negativos y su vejiga contiene microorganismos.

Como en casi todos los casos en los que la microbiota se ha estudiado a fondo por técnicas independientes de cultivo, se ha comprobado que las especies a las que clásicamente se ha denominado uropatógenos como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Pseudomonas aeruginosa* o especies de la levadura *Candida* (253,254), no son deletéreos por su mera presencia sino que son en realidad miembros de la microbiota urinaria de mujeres sanas. Pese a que el conocimiento es aún escaso, se sospecha que los microorganismos localizados a todos los niveles del sistema excretor pueden tener importancia en la salud y enfermedad (255) y, como en el caso de las afecciones del tracto genital, son las disbiosis o sobrecrecimientos

microbianos los que causan enfermedades en el aparato urinario. Algo que todos los estudios ponen de manifiesto es que los métodos de cultivo son limitados para el diagnóstico microbiológico en orina y totalmente inadecuados para el estudio de la microbiota urinaria normal, dado que una gran cantidad de microorganismos hallados o bien no son cultivables, son difíciles de cultivar o desconocidos (248,256).

En los dos sexos, la parte distal de la uretra está parcialmente colonizada por microorganismos de la piel o del aparato reproductor, aunque con una mayor abundancia de organismos anaerobios por las condiciones ambientales en este conducto. En el caso de los varones se ha observado que la microbiota de la uretra es menos estable que la de la superficie del pene, siendo *Propionibacterium* y *Lactobacillus* los géneros característicos, y detectándose otros minoritarios como *Anaerococcus*, *Corynebacterium* y *Staphylococcus* procedentes de la piel circundante (257). En el caso de las mujeres la microbiota uretral está también relacionada con la de los aparatos reproductor y digestivo, aunque posee ciertas particularidades (255). En cuanto a las zonas más altas del tracto urinario, la mayoría de los experimentos se han centrado en la microbiota de la vejiga para tratar de comprender la composición microbiana de la orina en origen. En un estudio Wolfe y colaboradores (258) demostraron que la vejiga de la mayoría de las mujeres contiene una microbiota residente y característica, y que ésta puede incluir uropatógenos incluso en mujeres asintomáticas (259). Las zonas más altas del tracto urinario, los uréteres y los riñones, se consideran estériles en condiciones normales.

Se ha comprobado que la microbiota urinaria de hombres y mujeres difiere significativamente, lo que podría influir en su distinta susceptibilidad a las enfermedades urinarias (255). Se ha visto que las mujeres contienen una microbiota más compleja y heterogénea (256,260). Tanto la composición de la orina como la frecuencia de micción se ven modificadas con la edad. Este y otros factores tienen un efecto sobre la composición de la microbiota. En el estudio anteriormente citado (256) se observó que en las mujeres la diversidad taxonómica tiende a reducirse, mientras que en los varones tiende a aumentar con la edad. En lo que a carga bacteriana se refiere, ésta tiende a disminuir en ambos sexos.

Como se indicó anteriormente, el interés en el estudio de la microbiota urinaria se debe principalmente a su posible relación con las enfermedades de este tracto. Las infecciones urinarias se encuentran entre las infecciones bacterianas más comunes, afectando a 150 millones de personas cada año en el mundo (261). Si bien las formas complicadas no son las más frecuentes y no suelen tener graves secuelas, en EEUU son causantes de más de diez millones de visitas ambulatorias y unos tres millones de visitas a urgencias (262,263), con un coste de unos 3.500 millones de dólares. De acuerdo con la teoría clásica, estas infecciones están causadas por la colonización de las zonas consideradas estériles del tracto urinario por distintos patógenos, siendo el agente causante más común *E. coli*, seguido de *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida* spp. (264). La causa más frecuente de las formas complicadas es la introducción de sondas y catéteres uretrales que causan un desplazamiento físico de microorganismos de vías inferiores a zonas superiores del sistema excretor.

La mayor susceptibilidad a las infecciones urinarias de determinados grupos de edad, especialmente del sexo femenino, hace pensar que la microbiota normal puede jugar un papel en estas dolencias. La alta tasa de recurrencia de hasta el 25% de estas infecciones, así como la frecuencia de hasta siete veces al año de estas recidivas en individuos concretos refuerza esta teoría (265). Dada la relación en mujeres entre la flora vaginal y la urinaria, los primeros estudios se centraron en determinar la susceptibilidad a infección urinaria en relación a la microbiota de la vagina, obteniéndose resultados similares a los detallados en la susceptibilidad a vaginosis: más de la mitad de las mujeres con infecciones urinarias de repetición tienen una disminución en lactobacilos y una mayor presencia de especies potencialmente patógenas en su flora vaginal. No obstante, a pesar de esta tendencia, la diferencia en composición poblacional microbiana no alcanzó diferencias significativas (266). Aun así, se ha analizado la relación de la microbiota de la vejiga de mujeres con las infecciones urinarias tras una operación (259). Se observa que las mujeres en las que se desarrolla infección urinaria poseen elementos característicos en su microbiota urinaria. La microbiota de las vejigas es relativamente sencilla, con entre uno y once géneros y siempre

dominada por lactobacilos, lo que facilita la infección. Estos resultados han sido confirmados en estudios posteriores (267).

5.1.4 Microbiota de la piel

La piel es el órgano más grande del cuerpo. Ocupa una superficie de 1,8m² con multitud de pliegues que constituyen hábitats muy diversos (268). La piel tiene como principal objetivo la relación del cuerpo con el medio externo. Por una parte supone una barrera física efectiva contra sustancias químicas, agentes biológicos y otros tipos de estrés como los de tipo mecánico o la deshidratación. Por otra, las múltiples estructuras del sistema inmune, sobre todo linfocitos T, repartidas por toda su superficie tienen una función protectora. Además, también tiene una importante función secretora con dos tipos de glándulas. Las más abundantes y ubicuas, llamadas glándulas sudoríparas ecrinas, producen sudor, una secreción acuosa-salina que excreta electrolitos del medio interno además de termorregular y acidificar la piel hasta un valor de pH de en torno a 5. Las glándulas sudoríparas apocrinas, localizadas en las axilas, alrededor de los pezones y en el área genito-anal, producen una secreción blanquecina, viscosa e inodora. El olor comúnmente asociado con el sudor es en realidad debido a la degradación de la secreción de las glándulas apocrinas por parte de la microbiota de la piel (269–271). El tercer tipo de glándulas son las sebáceas, asociadas al folículo piloso y que secretan una sustancia lipídica llamada sebo que lubrica y protege la piel de agentes físicos, químicos y biológicos.

Al ser la parte del cuerpo más directamente expuesta al medio externo, es lógico pensar que la piel se encuentra poblada por gran cantidad de microorganismos, sobre todo bacterias y virus, aunque también hongos, y algunas arqueas (272), así como en ocasiones ácaros del género *Demodex*, principalmente asociados al folículo piloso. Todos estos organismos se alimentan de las células muertas y de las secreciones del hospedador. La función de las bacterias en la piel es protectora en dos aspectos: por un lado ejercen una exclusión competitiva a nivel físico y ecológico y por otro juegan un papel en la educación de los linfocitos T asociados a la piel. Estas bacterias, pertenecientes a cientos o miles de especies diferentes (273), pueden encontrarse en números de entre 10² y 10⁷/cm² en superficie en función de la parte del cuerpo, aunque pueden alcanzar las 10⁹/cm² si se incluyen aquellas acantonadas en las glándulas y en los folículos pilosos (274).

Desde un punto de vista filogenético, la microbiota de la piel es un ecosistema oligárquico en el que hay unas pocas especies presentes en la mayoría de los individuos. La mayoría de las especies minoritarias suponen individualmente menos de un 1% de la diversidad (275), y su papel y su importancia están aún muy escasamente estudiados. Estas bacterias de la piel pertenecen a los cuatro filos más representados en otras partes del cuerpo: actinobacterias, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y proteobacterias, siendo las del primer grupo las dominantes en la piel. La diversidad taxonómica de la piel es baja a nivel de filo, pero alta a nivel de especie (273). El siguiente grupo microbiano más representado son los hongos, especialmente especies del género *Malassezia* que puede llegar a representar el 80% de la población fúngica (276) y, en menor medida, *Debaryomyces*, *Cryptococcus* (277) y *Candida* en condiciones patológicas y/o de inmunosupresión (278,279).

Se pueden distinguir tres tipos de regiones en la piel, que constituyen ecosistemas muy diferentes y que por tanto contienen comunidades microbianas con diferentes características. La primera se corresponde con las regiones húmedas, cálidas y parcialmente ocluidas como la axila, la ingle y los espacios interdigitales de los pies, donde el pH es ligeramente superior al de otras regiones. En estas regiones habita *Staphylococcus epidermidis*, que puede suponer hasta el 90% de la flora aerobia de la piel (274), bacilos Gram-negativos que hasta recientemente se creían escasos o ausentes en la piel (278,280) y bacterias coriniformes, *Staphylococcus aureus* y *Streptococcus pyogenes*, que pueden comportarse como patógenos (278). Estas regiones poseen una amplia diversidad, detectándose más de cien especies microbianas distintas en un ombligo (272). La segunda son las regiones secas, más fluctuantes térmicamente y expuestas y que corresponden a brazos y piernas. Contienen la menor cantidad de microorganismos, sobre todo bacterias Gram-negativas (275), pero la mayor diversidad (281–283). Finalmente, se encuentran las regiones sebáceas donde la concentración de glándulas homónimas es alta. Se corresponde con la cara, el pecho y la espalda. Son las áreas donde se halla la menor diversidad de especies bacterianas (273). Se detectan microorganismos lipofílicos, como los representantes del género bacteriano *Propionibacterium* y fúngico *Malassezia* (278). El interior de las glándulas sebáceas ofrece un ambiente anóxico, apto para el

crecimiento de bacterias anaerobias y sobre todo de *Propionibacterium acnes* que es una especie muy relevante en la fisiología cutánea (277,284).

La primera microbiota cutánea se adquiere con el paso del feto por el canal del parto, donde abundan los lactobacilos. Posteriormente evoluciona, de forma que en un principio está dominada por *Firmicutes*, especialmente estafilococos, lo que denota un mayor grado de hidratación de la piel del bebé con respecto a la del adulto. La evolución de las comunidades microbianas prosigue, aumentando en diversidad de especies, hasta que a los 12-18 meses de vida ya es bastante similar a la de un adulto (285), prevaleciendo las actinobacterias. No obstante, la microbiota de la piel continúa evolucionando a lo largo de toda la vida del individuo, de forma diferente en cada microecosistema cutáneo (281,283) y en función de una gran cantidad de factores. Entre estos últimos se puede destacar su genética, sexo (las mujeres tienen una diversidad microbiana mayor que los hombres) (286–288), localización geográfica, ocupación y hábitos de vida, tipo de ropa, hábitos higiénicos (desde la frecuencia del lavado de manos hasta el uso de jabones, cosméticos, entre otros) o el uso de antibióticos. Comparada con las otras microbiotas humanas, la de la piel es la que más variabilidad experimenta a lo largo del tiempo (283), especialmente en las áreas con una mayor diversidad, que coinciden con las más expuestas al medio externo tales como los brazos y las manos. De hecho, existen estudios que demuestran que las manos de un mismo individuo sólo comparten un 17% de las especies bacterianas, mientras que manos de distintos individuos comparten un 13% (286). La gran variabilidad temporal de la microbiota de la piel viene dada, en gran parte, por el cambio significativo que sufre con la edad en términos que alteran el ecosistema microbiano de forma importante, tales como la aparición de pliegues y arrugas o la deshidratación.

Como en virtualmente todos los casos, la simbiosis entre hospedador y microbiota es la base de un mecanismo de defensa para el primero. En primer lugar los microorganismos suponen una primera barrera física que dificulta el establecimiento de otros organismos potencialmente patógenos sobre la piel, compitiendo por espacio y recursos. En segundo lugar la actividad de los microorganismos supone una defensa química contra patógenos. Las bacterias lipofílicas como *Propionibacterium acnes* degradan los triglicéridos del sebo

liberando ácidos grasos libres que contribuyen a la acidificación de la superficie de la piel, lo que limita el crecimiento de bacterias patógenas u oportunistas como *S. aureus* (289). Otras especies, como *S. epidermidis*, producen proteínas con actividad antibiótica llamadas bacteriocinas (274), que afectan a patógenos como *S. aureus* y *Streptococcus pyogenes*, pero no a los integrantes de su propia especie (290). Se considera por tanto que la microbiota normal ayuda a la inmunidad innata del hospedador. Por último la microbiota de la piel también ha demostrado ser educadora y estimulante del sistema inmune adquirido del hospedador. Aunque estas relaciones son mucho más complicadas y menos conocidas, se sabe que existe una intercomunicación entre queratinocitos, células del sistema inmune y microorganismos mediada por péptidos antimicrobianos y citoquinas. A pesar de estar expuesta a un gran número de microorganismos, la piel sana discrimina entre microorganismos inofensivos y patógenos. Los mecanismos de esta inmunotolerancia se desconocen (273).

Un gran número de enfermedades dermatológicas no infecciosas han sido asociadas a alteraciones del balance entre microorganismos. De forma empírica, se observa que muchas de ellas mejoran al lavar la piel con sustancias antisépticas y/o al hacer uso de antibióticos de uso tópico o por vía oral (273). Como en el resto de los casos de asociación microbiota-enfermedad, se desconoce si estas composiciones alteradas son la causa o una consecuencia de la función incorrecta de algún elemento del epitelio, del sistema inmune o del sobrecrecimiento de patógenos (275). En estas enfermedades el tratamiento con inmunosupresores como corticoides, o incluso anticuerpos monoclonales en casos extremos, es muy común, indicando que el componente inmune es también de indudable importancia. Es probable que en muchos casos la etiología de la enfermedad radique en respuestas inmunes excesivas contra microorganismos de la microbiota normal que por cualquier causa hayan aumentado sus niveles o invadido áreas poco comunes para ellos, por lo que las relaciones pueden ser bastante complicadas (273). Un buen ejemplo es el acné. Es una afección que cursa con la inflamación del folículo pilosebáceo que en países occidentales afecta entre el 79 y el 95% de los adolescentes y entre el 40 y el 54% de las mujeres mayores de 25 años (291), lo que supone que sea la octava enfermedad más común a nivel mundial con 650 millones de individuos afectados. Tradicionalmente se ha asociado con el sobrecrecimiento de *P. acnes*, que secreta lipasas, proteasas y

hialuronidasas al medio para degradar el sebo, lo cual daña colateralmente la piel (292). En algunos casos se ha demostrado que pacientes con acné no poseen significativamente más *P. acnes* ni *Staphylococcus* que individuos no afectados (293). De forma complementaria a este último punto, otros estudios han hallado una mayor riqueza de especies microbianas en los folículos de pacientes con acné que en los de personas sanas, que sí se encuentran dominados claramente por *P. acnes* (294). Se especula que el hongo *Malassezia globosa* (293), al que también se relaciona con la dermatitis seborreica en el cuero cabelludo, podría tener un papel en esta patología (273).

La dermatitis atópica, también conocida como eczema, es una dolencia crónica y recurrente que afecta en países occidentales al 15% de los niños y al 2% de los adultos. En estos países industrializados su prevalencia prácticamente se ha triplicado durante las tres últimas décadas sin causas claras. Clásicamente se ha asociado a niveles elevados de *S. aureus*, lo que conlleva una disminución en la diversidad microbiana de la piel. De hecho más del 90% de los pacientes están colonizados por este microorganismo, tanto en las áreas de las lesiones como en las no lesionadas, frente a menos de un 5% de los individuos sanos (273,295,296). También se ha demostrado que las poblaciones de especies del género *Staphylococcus* (incluyendo *S. aureus* y *S. epidermidis*) aumentan su prevalencia de un 35% a un 90% en los enfermos durante los brotes. La severidad de los síntomas muestra una correlación directa con la disminución de la diversidad microbiana (297). Entender las relaciones ecológicas entre el sistema inmune, las diferentes especies de estafilococos y las otras especies cuya prevalencia también varía en estos brotes será crucial para comprender la etiología de la dermatitis atópica (297).

5.1.5 Microbiota del tracto respiratorio

El sistema respiratorio es una de las regiones corporales que se presumían estériles en condiciones de salud, a pesar de que se sabía que la microaspiración de fluidos nasofaríngeos hacia el tracto respiratorio por parte de individuos sanos es normal (298) y que la noción de que el aire inspirado contiene bacterias es tan antigua como la propia teoría microbiana de la enfermedad de Louis Pasteur (299). Desde el primer artículo sobre la identificación de la microbiota pulmonar normal por métodos independientes de cultivo (300) ningún estudio ha hallado pulmones estériles en personas sanas o enfermas (301).

Anatómicamente, el aparato respiratorio es un ecosistema muy especial y heterogéneo en sus diferentes regiones. Se trata de una estructura tubular de aproximadamente medio metro de longitud con una atmósfera rica en oxígeno. Su temperatura es similar a la del ambiente en el extremo más distal y evoluciona hasta alcanzar la temperatura fisiológica de 37°C en los alveolos (302). Está recubierta por una mucosa cuya superficie también varía en composición desde la riqueza en mucus y proteínas glicosiladas de la tráquea y los bronquios hasta el recubrimiento con surfactante lipídico y bacteriostático en la mayor parte de las áreas del pulmón (303). La densidad bacteriana de las vías respiratorias es mucho menor que la de otras zonas del cuerpo (300). Lo mismo sucede con las concentraciones de elementos del sistema inmune como IgA o macrófagos, lo que determina que las interacciones intermicrobianas y entre los microbios y el hospedador sean muy características.

La composición de la microbiota respiratoria está determinada por su adquisición del aire inspirado que contiene entre 10^4 y 10^6 bacterias/mm³ (304), de la microaspiración subclínica de contenidos del tracto respiratorio superior y de la eliminación de microorganismos por los cilios, por la tos y por el sistema inmune. En el tracto respiratorio hay especies que están mejor adaptadas a sus condiciones y/o son mejor toleradas por el sistema inmune, lo que determina un crecimiento diferencial entre microorganismos que en último término influyen sobre la composición poblacional microbiana en el sistema respiratorio. Se sabe que la microbiota oral es la principal fuente de microorganismos para las vías respiratorias. Varios estudios han mostrado que la población microbiana de las

mismas es más similar a la de la orofaringe que a la del aire inspirado, la nasofaringe o el sistema digestivo (163,305–307). Por su parte, la microbiota de las fosas nasales es más similar a la cutánea que a la de los pulmones (301).

En condiciones normales, y a pesar de las existentes discrepancias entre estudios, se acepta que el género bacteriano más abundante es *Streptococcus*, que suele dominar las microbiotas de todos los individuos estudiados. Los géneros *Neisseria* y *Gemella* suelen ser los siguientes en abundancia, y miembros de *Prevotella* y *Veillonella* suelen encontrarse también en todos los individuos sanos. Otras bacterias como *Haemophilus*, *Rothia* y *Leptotrichia* también son frecuentes, aunque no se encuentran en todos los individuos (308). En general, se considera que una mayor estabilidad taxonómica de la microbiota respiratoria está relacionada con una mejor salud del hospedador (309) aunque, como se discutirá más adelante, la relación entre diversidad de especies y salud es discutible. Además, se ha reportado que factores como el sexo, el tipo de muestra empleada (hisopo, aspirado o esputo) o el consumo de tabaco no modifican la composición de la microbiota, mientras que la edad aparece reiteradamente como un factor muy determinante (308).

Durante la enfermedad, el ecosistema de las vías respiratorias cambia drásticamente, y consecuentemente la composición de la comunidad bacteriana existente. No existe consenso acerca de si la riqueza de especies en las vías respiratorias está relacionada con salud o enfermedad, existiendo estudios con resultados tanto a favor (308) como en contra. Un estudio que analizó las microbiotas de adultos con infección respiratoria aguda por diferentes tipos de virus (308) y pares asintomáticos identificó diferencias significativas entre ambas, ya que mientras los primeros contenían una mayor presencia de *Haemophilus* y *Moraxella*, los sanos estaban mayormente colonizados por *Streptococcus*, *Neisseria*, *Gemella*, *Aggregatibacter* y *Actinobacillus*. Estas interacciones entre virus, bacterias y las mucosas han sido descritas en el tracto respiratorio y otras localizaciones, y sugieren una relación entre composición vírica y bacteriana y la posible patogenicidad de ambos (310,311).

La neumonía es una condición inflamatoria que afecta a los alveolos del pulmón. Se achaca a la infección por bacterias, entre las que destaca *S. pneumoniae*, pero también *H. influenzae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *S.*

aureus y *Moraxella catarrhalis*. También puede ser ocasionada por virus, hongos y parásitos. Al estudiar la microbiota orofaríngea de pacientes con neumonía mayores de 65 años y adultos menores de 65, así como de sus correspondientes pares sanos (312), se observaron diferencias significativas entre todos ellos, tanto debidas a la edad como al estado de salud. Los enfermos tenían mayor presencia de *Streptococcus* y *Rothia* y una disminución de *Gemella*, *Prevotella* y *Veillonella*, entre otras. En este caso la riqueza de especies bacterianas estaba incrementada en los ancianos enfermos frente a los sanos, aunque esta diferencia no se observó en los adultos más jóvenes. De forma más significativa, la densidad bacteriana de las muestras era mayor en enfermos ancianos, correspondiendo la menor abundancia a los adultos sanos. Dentro de los enfermos, tanto adultos como ancianos, la densidad bacteriana se reveló como directamente proporcional a la gravedad de la enfermedad. Sin embargo, los autores concluyeron el estudio reconociendo que no podían extraerse conclusiones acerca de si las diferencias observadas eran la causa o una consecuencia de la enfermedad.

El asma es una enfermedad crónica de tipo inflamatorio que afecta a las vías respiratorias de unos 250 millones de personas en todo el mundo (313). Considerada una enfermedad del primer mundo, su prevalencia se encuentra en marcado aumento en países en desarrollo. Como otras enfermedades mediadas por el sistema inmune, especialmente las de tipo alérgico, las causas de su origen son poco claras, aunque han sido relacionadas con la microbiota y con la hipótesis de la higiene. Es más, la microbiota con la que más se relaciona el asma es la intestinal, fundamental en la educación del sistema inmune (229,314). Como se detalló anteriormente, se ha observado que la presencia elevada de especies del género *Candida* en el intestino, en donde en condiciones normales se halla en bajos recuentos, está relacionada con la aparición de reacciones de hipersensibilidad, aunque el mecanismo se desconoce (229). El papel de la microbiota de los pulmones en el asma está menos estudiado. En uno de los pocos análisis realizados se llegó a la conclusión de que los asmáticos podrían tener una mayor concentración de proteobacterias que de actinobacterias y *Firmicutes*, aunque las diferencias halladas no alcanzaron significación estadística (315).

La EPOC (Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica) es una enfermedad caracterizada por la destrucción del parénquima pulmonar, lo que provoca

inflamación y obstrucción de las vías respiratorias y causa enfisema y bronquitis/bronquiolitis crónica. Es actualmente la cuarta causa de muerte en el mundo y se espera que sea la tercera en veinte años (316). Se calcula que el 90% de los casos de EPOC están causados por el tabaquismo, aunque es cierto que sólo una minoría de los fumadores desarrollan EPOC (317). No obstante, ni el mecanismo exacto por el que el tabaquismo causa EPOC, ni la totalidad de las bases moleculares de la enfermedad están definidos. Los estudios microbiológicos clásicos indicaban que los bronquios de los pacientes con EPOC contenían pequeñas cargas de microorganismos potencialmente patógenos, mientras que los de los sanos estaban estériles (231). Hoy se piensa que los pacientes con EPOC pueden tener una mayor diversidad de especies bacterianas en su tracto respiratorio por lo observado en muestras de esputo, aspirado bronquial y lavado broncoalveolar, siendo las más comunes *Streptococcus*, *Prevotella*, *Moraxella*, *Haemophilus*, *Acinetobacter*, *Fusobacterium* y *Neisseria*. Lo observado en pacientes con EPOC muy severa es que poseen una diversidad taxonómica aún mayor que los enfermos con formas menos severas de la dolencia, aunque con cargas microbianas muy bajas (318).

La fibrosis quística, tratada anteriormente en el apartado de microbiota intestinal, es una enfermedad genética que ocasiona que todas las secreciones corporales, incluidas las pulmonares, sean viscosas. Aunque la enfermedad no suele ser mortal en sí misma, sí facilita las infecciones respiratorias en los afectados, que suelen fallecer por infecciones pulmonares causadas por *Pseudomonas* o *Staphylococcus* (319) que producen complicaciones. Estudios recientes han demostrado que existe una gran variabilidad interindividual en estos enfermos en lo que a composición de la microbiota pulmonar se refiere. Se observa una tendencia a una composición polimicrobiana más compleja y diversa que lo considerado normal, con colonización de las vías aéreas inferiores por parte de microorganismos propios de las superiores como *Prevotella*, lo que puede deberse a la dificultad de estos enfermos de expulsar el mucus (320).

Contrariamente a lo que en general ocurre al estudiar la relación entre microbiota y enfermedad, estos dos últimos casos, la EPOC y la fibrosis quística, parecen ser claros ejemplos de alteraciones de la microbiota secundarias a la enfermedad, dado que lo que se conoce de su etiología no apunta a factores

microbianos. La situación puede ser similar en el caso del asma, donde existe una inflamación permanente que puede modificar la respuesta inmune y la permeabilidad del tejido. Por lo tanto se presupone que son las alteraciones ecológicas causadas por las enfermedades las que llevan al cambio de la composición de las poblaciones microbianas residentes. Al no haberse descrito aún ninguna relación causa-efecto entre la composición microbiana y una enfermedad no infecciosa, es razonable mantener la duda sobre si las diferencias observadas entre las microbiotas de individuos sanos y enfermos son la causa o la consecuencia de la aparición de dicha enfermedad en cualquier localización corporal.

5.1.6 Microbiota y desarrollo del metabolismo y de los sistemas inmune y nervioso

A pesar de que esta área de investigación no está demasiado desarrollada, existen múltiples indicios de que la microbiota juega un papel fundamental, tanto en la fisiología del adulto como en el correcto desarrollo de estructuras del sistema inmune y neuroendocrino en las etapas tempranas de la vida. Por experimentos con animales libres de gérmenes se ha demostrado que el genoma de los vertebrados, desde el pez cebra hasta el ser humano (321,322), no contiene todos los genes para la completa y correcta formación del organismo. Hay moléculas efectoras producidas por microorganismos de la microbiota, como polisacáridos, glicosilceramidas, ácidos nucleicos y SCFA que, además de facilitar la digestión y modular la biodisponibilidad de los nutrientes para el individuo, son fundamentales en el desarrollo de estructuras corporales sanas (323). Los animales libres de gérmenes tienen serios problemas inmunitarios y una susceptibilidad aumentada a la infección, especialmente en el intestino, en el que se observa un subdesarrollo del sistema inmune asociado a mucosas. Por ejemplo, hay menos placas de Peyer y las existentes son más pequeñas. También hay menos ganglios linfáticos mesentéricos y se detecta una morfología de las criptas alterada y un grosor del mucus reducido (324,325). A nivel celular, se observan alteraciones en el balance entre diferentes clases de linfocitos T y la producción de interleuquinas (326–328) y los linfocitos B de estos animales producen menos cantidad de IgA, esencial en la defensa de las mucosas (329). Además en estos animales se observan alteraciones en el comportamiento y en la respuesta al estrés (330) que se atribuyen a niveles reducidos de dopamina, noradrenalina y serotonina. Todas ellas son hormonas importantes para el desarrollo del sistema nervioso entérico y actúan como moléculas señalizadoras en el eje hipotálamo-pituitario-adrenal (331,332). La dependencia de la microbiota para el correcto desarrollo del sistema neuro-inmune-endocrino, así como los mecanismos de comunicación bidireccional entre él y los microorganismos del intestino de cuya importancia se tiene evidencia creciente, han llevado al desarrollo del concepto del eje intestino-cerebro (333,334). Además, se ha demostrado que las anomalías causadas por la falta de una microbiota son reversibles mediante la constitución de una microbiota en esos individuos, por ejemplo mediante trasplante fecal

(335). Incluso la ingesta de determinadas cepas probióticas aisladas, no de microbiotas completas y complejas, ha demostrado ser efectiva en experimentos con animales (336).

En humanos, en los que los experimentos con individuos libres de gérmenes no son posibles, se tienen evidencias menos directas del papel de la microbiota en el desarrollo de la inmunidad y del sistema nervioso. En el caso del sistema inmune, y englobado en la hipótesis de la higiene, existen multitud de estudios que relacionan el modo de vida occidental con el desarrollo de enfermedades de tipo alérgico, atópico y de hipersensibilidad. Por ejemplo, se sabe que la dermatitis atópica y las alergias son más frecuentes en niños que viven en áreas urbanas (337), que no se exponen a animales o mascotas en sus primeros años de vida (338), que son expuestos de forma temprana a antibióticos (339), con padres con un nivel más alto de educación (340), o en cuyas casas los platos son lavados a máquina y no manualmente (341).

Conviene destacar que en el desarrollo del sistema nervioso y cognitivo se tiene una gran esperanza depositada en la posible relación entre la microbiota intestinal y el autismo (342,343) y la depresión (344). Aunque existen sugerencias, la mecánica de estas interacciones o incluso si realmente existe una relación causa-efecto o efecto-cause entre la microbiota y enfermedades humanas no se conoce.

5.1.7 Cambios históricos de la microbiota humana

Los estudios sobre la composición de la microbiota humana que se llevan realizando de forma intensiva durante la última década están centrados generalmente en la perteneciente a individuos de países desarrollados, principalmente EEUU y Europa. Todos los expertos asumen que la composición de las microbiotas de personas de países industrializados está muy lejos de la microbiota original del ser humano, si es que eso existe. En este sentido hay que recordar que existen muchos factores que influyen sobre la microbiota, desde una dieta rica en grasas e hidratos de carbono refinados, al acceso a agua potabilizada, pasando por el uso de hábitos de higiene cuya implantación es muy reciente o al uso de medicamentos, especialmente antibióticos. Todos ellos determinan que la microbiota de estos individuos, incluso de los sanos, no sea la normal del ser humano como animal. Como prueba de ello baste citar que en su libro *The good gut* (345), Justin y Erica Sonnenburg, de la Universidad de Stanford, describen esta situación como “los restos del siniestro de la microbiota occidental”, y los definen con la analogía de que intentar conocer cómo es la microbiota normal del ser humano a partir de muestras de individuos occidentales es como “intentar saber cómo es un avión sin saber nada de aviación y con tan sólo una foto de los restos de un accidente aéreo”.

Se tiene acceso a la composición de la microbiota de los antepasados de los hombres modernos gracias al registro fósil en especímenes arqueológicos y paleontológicos de coprolitos, lo que da una estimación del perfil de la microbiota intestinal, y de la placa dental calcificada que estima la microbiota oral. A pesar de que la información que se puede extraer de estas muestras es limitada, sí se han identificado cambios drásticos en la microbiota en momentos clave de la historia, como el desarrollo de la agricultura y la ganadería en el neolítico (10.000 años a.C.) y a partir de la revolución industrial (mediados del siglo XIX) (346). Se ha analizado también el microbioma intestinal de una momia de los Andes del siglo XI, muy anterior a la llegada de los europeos, detectándose secuencias homólogas a *Clostridium botulinum*, *Trypanosoma cruzi* y papilomavirus, así como secuencias de resistencia a antibióticos beta-lactámicos, a la fosfomicina,

cloranfenicol, aminoglicósidos, macrólidos, quinolonas, tetraciclina y vancomicina (347).

Las mejores estimaciones de la posible composición de la microbiota de las primeras poblaciones humanas son los estudios con tribus no contactadas entre sí de África, Asia y América (348–350). Estos ensayos son particularmente ilustrativos porque suelen centrarse además en las diferencias existentes entre las microbiotas de las poblaciones indígenas y las de pares equivalentes para sexo y edad de poblaciones con un estilo de vida occidental. Todos estos estudios coinciden en que las microbiotas de las poblaciones occidentales tiene una diversidad taxonómica muchísimo menor que la de las poblaciones indígenas. La razón probablemente es una alimentación más homogénea, su hipersanitización y el uso de los antibióticos. De hecho, el análisis metagenómico de las actividades metabólicas presentes en las microbiotas de las poblaciones no industrializadas revela que la diversidad metabólica de estos ecosistemas microbianos es también mucho mayor.

Tanto los estudios arqueopaleontológicos como los de poblaciones aisladas del modo de vida occidental coinciden en que el factor fundamental que ha determinado la evolución de la microbiota característica del hombre es su alimentación (125) y su estilo de vida, principalmente sus estándares de higiene (349,350). Como resultado de una alimentación cada vez menos variada y más procesada y de unas condiciones de vida asépticas los seres humanos han ido progresivamente perdiendo diversidad de especies microbianas en todas sus microbiotas. A pesar de que las microbiotas de individuos modernos y occidentales, sanos o enfermos, no arrojan resultados concluyentes y sólidos acerca de la relación entre la composición de la microbiota y la salud o enfermedad, se tiene la sensación generalizada de que el estilo de vida occidental causa alteraciones en la microbiota que llevan al desarrollo de determinadas dolencias propias de la industrialización. Esta noción es simplemente un factor añadido a la clásica hipótesis de la higiene. La teoría que, formalmente desde principios del siglo XX, las industrias alimentaria y farmacéutica mantienen es que estrategias modificadoras de la microbiota pueden revertir los cambios patológicos sufridos por ella, ya sean éstos fruto de la occidentalización o de cualquier otro factor, mejorando la salud o curando las enfermedades. El

principal problema al que esta teoría se enfrenta es que, salvo en contadas ocasiones y como se ha detallado anteriormente, la relación entre composición de la microbiota, salud y enfermedad es débil. Más concretamente, el problema último radica en que incluso en aquellos casos en los que se han establecido diferencias claras y significativas en la microbiota de personas sanas y enfermas para una determinada condición, existe un alto grado de incertidumbre en si esos cambios son la causa de la enfermedad, una consecuencia de ella, o una mezcla de ambas.

Por lo tanto, tal y como se adelantó en el capítulo de “Introducción”, existen multitud de indicios que apuntan a que las microbiotas asociadas a las distintas localizaciones del cuerpo humano juegan un papel determinante en su biología, en su fisiología y por lo tanto en su salud. No obstante, existen si cabe aún más incógnitas acerca de los mecanismos que conforman esta relación entre el hombre y sus microbios. A pesar de la incertidumbre, las industrias alimentaria y farmacéutica se han aventurado, en muchas ocasiones de forma más empírica que racional, pero con muy buenos resultados, al diseño de estrategias para preservar o devolver la salud a las personas a través de intervenciones sobre su microbiota.

5.2 MICROBIOLOGÍA Y MICROBIOTA APLICADAS EN LOS SECTORES ALIMENTARIO Y FARMACÉUTICO

Desde la aparición de la especie humana, ésta ha tenido una estrecha relación con los microorganismos. Además de sufrir infecciones, el ser humano ha utilizado durante siglos de forma empírica los microorganismos para su beneficio, tanto en la conservación como en la producción de alimentos fermentados. Posteriormente, tras descubrir su existencia empezó a aprender a defenderse de ellos y a utilizarlos con un alto nivel de sofisticación.

5.2.1 Microbiología en el sector alimentario

El sector industrial alimentario es el que ha tenido una relación más prolongada con la microbiología, aunque haya sido de forma más o menos intencionada. Esta relación se ha producido en un doble sentido. Por una parte el hombre siempre ha sido consciente del deterioro de los alimentos causado por los microorganismos, así como de los efectos de las toxiinfecciones alimentarias, a pesar de que hasta el siglo XIX no fuera plenamente conocedor de su funcionamiento. Por ese motivo se comenzaron a desarrollar técnicas para la conservación de los alimentos desde muy antiguo, desde el desecado y salado hasta la ultracongelación y los conservantes químicos modernos, pasando por la pasteurización. Por otra parte, y probablemente al ser descubiertos de forma casual como resultado del deterioro de alimentos y/o como mecanismos de conservación, se conocieron las conversiones microbianas, generalmente por procesos de fermentación, de alimentos y bebidas. Un estudio reciente reporta evidencias de fermentación de pescado como método de conservación hace 9.000 años en Escandinavia, lo que supone la evidencia del uso más temprano de esta tecnología (351).

Esta segunda faceta de la relación hombre-microbio-alimento podría considerarse intencionada hasta el siglo XIX, aunque inconsciente en lo que a la naturaleza o funcionamiento se refiere. Con los avances en la microbiología a lo largo del siglo XX, estos procesos fermentativos se han ido sofisticando y mejorando para obtener mayores rendimientos, seguridad o mejores propiedades

organolépticas en los productos. Además de su uso para la obtención de productos de alto valor añadido como la cerveza, el vino, la mantequilla o los quesos, los procesos de fermentación de alimentos son actualmente un motor de la alimentación funcional (352). En este contexto de expansión de los alimentos fermentados y la microbiota intestinal, los probióticos y los prebióticos han ganado gran importancia en los últimos años en la industria alimentaria.

Los probióticos se definen como microorganismos vivos que consumidos en cantidades adecuadas confieren beneficios para la salud (353). Suponen un mercado global de alrededor de 35.000 millones de dólares con previsiones de crecimiento hasta los 47.000 millones de dólares en 2020. En la práctica, se ha trabajado con una veintena de especies probióticas de bifidobacterias y lactobacilos (TABLA 2). Recientemente, y dado el crecimiento de la demanda de productos, han salido al mercado gran diversidad de productos con probióticos, lo que también ha propiciado el uso de especies microbianas nuevas.

Reino	Género	Especie
Bacterias	<i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i>
		<i>animalis</i> ssp. <i>lactis</i>
		<i>bifidum</i>
		<i>breve</i>
		<i>longum</i>
		<i>longum</i> biotipo <i>infantis</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>
		<i>delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i>
		<i>casei</i>
		<i>crispatus</i>
		<i>fermentum</i>
		<i>gasseri</i>
		<i>helveticus</i>
		<i>johnsonii</i>
		<i>paracasei</i>
		<i>plantarum</i>
		<i>reuteri</i>
		<i>rhamnosus</i>
		<i>salivarius</i>
	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>	
Hongos (levaduras)	<i>Saccharomyces</i>	<i>(cerevisiae</i> ssp.) <i>bouardii</i>

TABLA 2. Listado de especies de bacterias y levaduras usualmente empleadas como probióticos

Los prebióticos son ingredientes fermentables no digestibles que ocasionan cambios específicos beneficiosos para la salud en la composición y/o la actividad de la flora intestinal (354). Suponen un mercado de 3.000 millones de euros dentro del sector alimentario. En la actualidad se usan principalmente tres clases de fibras prebióticas: fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) e inulina. La demanda de estos productos en alimentación funcional probablemente propicie la aparición de nuevos prebióticos.

La industria alimentaria ha hecho grandes esfuerzos por demostrar los beneficios derivados del consumo de probióticos y prebióticos para la salud intestinal, inmune y metabólica. La gran heterogeneidad de productos (matriz alimentaria, cápsulas, etc.), la diversidad de cepas microbianas utilizadas o el diseño experimental empleados en algunos ensayos clínicos, hace que los resultados sean discrepantes y difícilmente interpretables. Aun así, algunos resultados provenientes de estos trabajos, junto la mayor capacidad de estudio de la microbiota humana desarrollada recientemente, han llamado la atención de la industria farmacéutica, que ve en el uso de estrategias de modificación de la microbiota, incluido el de células microbianas vivas, la vía para obtener nuevos desarrollos con potencial terapéutico y/o farmacológico.

5.2.2 Microbiología en medicina y en el sector farmacéutico

La relación del ser humano con los microorganismos patógenos es tan antigua como su propia existencia como especie. Probablemente, las enfermedades infecciosas comenzaron a expandirse rápidamente en poblaciones sedentarias y crecientemente densas desde la invención de la agricultura y la ganadería. De hecho, existe evidencia de la viruela en momias egipcias de 3.000 años de antigüedad, así como papiros con representaciones relacionadas con enfermedades infecciosas y la poliomielitis. Entre los siglos IV y V a.C. Hipócrates escribió sobre la dispersión de las enfermedades por medio del aire y el agua. En un principio la transmisión de las enfermedades infecciosas se achacaba a los miasmas (del griego μίαισμα, contaminación), unas formas nocivas de vapores o mal aire emanante de materia en descomposición. En 1546 Girolamo Fracastoro propuso que la enfermedad podría diseminarse gracias a partículas semejantes a semillas por contacto directo, por fómites o por el aire. La invención del microscopio en el siglo XVII permitió la observación de los microorganismos y en el siglo XIX se desarrollaron las técnicas de cultivo microbiológico. Así en la segunda mitad del siglo XIX Louis Pasteur sembró las bases de la teoría microbiana de la enfermedad que defendía que las bacterias eran los agentes causantes de las enfermedades infecciosas. Los virus se unieron a esta teoría al ser descubiertos en la década de 1890.

En 1884 el médico alemán Robert Koch desarrolló una metodología experimental y unos criterios conocidos como los Postulados de Koch para demostrar que una especie microbiana concreta es la causa de una determinada enfermedad. Los criterios se enumeran a continuación (355):

- El agente patógeno debe estar presente en todos los organismos que sufren la enfermedad y ausente en los sanos
- El agente debe ser cultivado en un cultivo axénico puro aislado del cuerpo del organismo enfermo
- El agente aislado en un cultivo axénico debe provocar la enfermedad en un organismo sano al ser inoculado

- El agente debe ser aislado de nuevo de los animales de experimentación y ser idéntico al inoculado originalmente

Estos criterios han permitido la identificación de los microorganismos causantes de multitud de enfermedades. A pesar de que siguen siendo la base teórica de la microbiología clínica, como se verá más adelante, tiene notables limitaciones.

Desde la formulación de los Postulados de Koch la práctica médica, la industria químico-farmacéutica y las autoridades de salud pública han centrado sus esfuerzos en luchar contra los microorganismos. Históricamente, la palabra bacteria ha tenido connotaciones negativas relacionadas con la enfermedad y falta de higiene. En un principio esta concepción negativa de los microorganismos tuvo consecuencias enormemente positivas para el ser humano. El primer hito significativo en la batalla del hombre contra los microorganismos patógenos fue la primera vacunación contra la viruela llevada a cabo por Edward Jenner en Inglaterra en 1796, al inocular a un niño de ocho años con pus de una granjera con la enfermedad. Jenner ni siquiera conocía la existencia de los microorganismos, y mucho menos de los virus que fueron descubiertos 75 años tras su muerte. Aun así, desarrolló el concepto de vacuna desde la sabiduría popular de que las vaqueras sólo sufrían la viruela una vez en su vida. A partir de entonces, y a pesar de los movimientos en su contra, las vacunas han sido uno de los factores más importantes implicados en la drástica reducción de la mortalidad y morbilidad del ser humano, especialmente la infantil, y del aumento de la esperanza de vida.

Otro hecho importante en la lucha contra las enfermedades infecciosas fue el desarrollo de los antibióticos. Se suele asociar el inicio de los antibióticos al médico escocés Alexander Fleming en 1928. Esta fecha se corresponde con el descubrimiento de uno de los antibióticos más eficaces como es la penicilina, pero el primer paso en el descubrimiento de los antibióticos lo dieron los químicos Paul Ehrlich y Alfred Bertheim y el bacteriólogo Sahachiro Hata con la invención del Salvarsan, un derivado organoarsénico para el tratamiento de la sífilis, en 1909. Su versión mejorada Neosalvarsan fue el medicamento más prescrito hasta la llegada de la penicilina en los años 40 (356). El desarrollo de la sulfonamidocrisoidina por químicos de la empresa alemana Bayer en los años 30

también supuso un ejemplo anterior de antibiótico previo a la penicilina (356). Incluso antes de eso, en 1899 dos médicos alemanes observaron que *Pseudomonas aeruginosa*, antes conocida como *Bacillus pycyanus*, producía compuestos activos contra distintas bacterias y emplearon un extracto de esta bacteria, al que llamaron piocianasa. En realidad se trataba de moléculas de “quorum sensing”, para tratar diferentes enfermedades infecciosas, pero la poca consistencia de los resultados y la toxicidad del producto llevaron al abandono de su uso (356). Antes del uso generalizado de la penicilina, ya se había descrito la capacidad de algunas bacterias para degradarla enzimáticamente (357). Actualmente, tras décadas de uso intensivo de antibióticos, existe una gran cantidad de bacterias patógenas que resisten el tratamiento con las más de 20 fuentes y clases químicas de antibióticos descubiertas o desarrolladas hasta ahora. Estas infecciones multiresistentes son una de las mayores causas de preocupación para las autoridades sanitarias y suponen unas 25.000 muertes al año en la Unión Europea (UE) (358) y unas 63.000 en EEUU (359).

Nuestra relación con los microorganismos ha cambiado radicalmente en los últimos doscientos años. Por una parte, y gracias a las vacunas y los antibióticos, las enfermedades infecciosas ya no suponen una causa mayoritaria de muerte para el ser humano. Las que más mortalidad causan son las infecciones del tracto respiratorio inferior (3,1 millones de muertes en 2012), que se encuentran en el cuarto lugar por detrás de las enfermedades cardiovasculares, los accidentes cerebro-vasculares y la EPOC, todas ellas plagas modernas no transmisibles. El SIDA o las diarreas, con 1,5 millones de muertes anuales cada una, y la tuberculosis, con unas 900.000, ocupan el sexto, séptimo y décimo lugar de esa lista, respectivamente (360).

Por todo ello, la comunidad científica y gran parte de la población general son conscientes de que la microbiota juega un papel crucial en el desarrollo y el buen funcionamiento del cuerpo humano. Esto, junto con el temor al aumento de las resistencias, no sólo afecta a la generalización de políticas de uso racional de los antibióticos sino también a otras prácticas médicas, como el parto por cesárea, que afectan a la composición de la microbiota.

5.2.3 Estrategias terapéuticas o clínicas basadas en microorganismos

5.2.3.1 Sector alimentario: intervenciones nutricionales con probióticos. Evidencia científica y clínica de su eficacia.

La investigación sobre la interacción de productos con microorganismos con la salud humana es muy intensa. Dado que los productos basados en microorganismos se han posicionado clásicamente en el campo de la alimentación y que muchos de esos productos han ido tradicionalmente dirigidos a la población infantil, una gran parte del esfuerzo de investigadores industriales y académicos se ha centrado en demostrar su seguridad. Cientos de estudios y décadas de uso por parte de la población general hacen asumir que todas las cepas microbianas actualmente utilizadas tienen un buen perfil de seguridad. Los eventos adversos registrados en el uso de probióticos y otros microorganismos no van más allá de la flatulencia o ligeras molestias intestinales. Hay unos pocos casos excepcionales en los que se han descrito problemas de seguridad ligados al uso de probióticos y en todos ellos los afectados eran personas con inmunodepresión (361). Por el contrario, la evidencia de su eficacia está mucho más discutida.

Existen cientos de estudios acerca de la eficacia de la ingesta de probióticos como estrategia nutricional para la gestión de una gran diversidad de dolencias, desde la obesidad y el síndrome metabólico hasta la depresión, pasando por enfermedades dermatológicas y determinados cánceres. Las conclusiones de esos estudios son dispares, y van desde excelentes resultados clínicos, por ejemplo, en la detención del avance e incluso la disminución de tamaño de los tumores hepáticos (362), a la ausencia de eficacia. La disparidad de poblaciones, dolencias, diseños experimentales, productos y cepas, entre otros múltiples factores, hacen que extraer conclusiones acerca de la eficacia de los probióticos como conjunto resulte imposible. Existen también numerosas revisiones de la literatura y meta-análisis que, del mismo modo, llegan a conclusiones dispares y muchas veces contradictorias.

Con el fin de arrojar luz sobre este asunto, y con el objetivo de proporcionar a los médicos una herramienta para la toma de decisiones, un grupo de médicos

canadienses elaboró una base de datos que se actualiza anualmente (www.probioticchart.ca). En ella se listan productos o combinaciones concretas de cepas probióticas específicas en formatos o matrices alimentarias determinadas, que han demostrado eficacia en ensayos clínicos doble-ciegos, aleatorizados y controlados por placebo. Las dolencias para cuyo tratamiento o gestión existen productos con probióticos con alto nivel de evidencia científica de eficacia según los criterios de estos investigadores son la diarrea asociada a antibióticos, infecciosa o del viajero en adultos y en niños, el estreñimiento, la enterocolitis necrotizante en recién nacidos, la prevención de la diarrea por *C. difficile*, la colitis ulcerosa, el IBS, la infección por *H. pylori* (terapia adjunta) y las enfermedades infecciosas del tracto respiratorio, tanto en adultos como en niños. En todas ellas se ha demostrado que determinados probióticos son capaces de reducir la frecuencia o el tiempo de recuperación.

5.2.3.2 Sector médico-farmacéutico: microorganismos-medicamentos y productos sanitarios en Europa

La industria farmacéutica no sólo se ha centrado en el desarrollo de estrategias para destruir microorganismos. Existen también determinados medicamentos cuyo objetivo es preservar o repoblar el cuerpo humano con microorganismos. No obstante, a pesar de que suponen la mayoría de los medicamentos basados en microorganismos aprobados o en investigación hasta ahora, los productos basados en microbios vivos administrados por vía oral no son la única opción que la industria biofarmacéutica se está planteando.

5.2.3.2.1 Enfoques para el uso farmacológico de microorganismos y/o la microbiota

El conocimiento creciente acerca del papel de la microbiota en la salud del ser humano ha conllevado un incremento en los recursos dedicados a la investigación en este campo. En poco tiempo se ha generado una gran diversidad de estrategias o enfoques para el uso de la microbiota como producto o diana

terapéutica, no sólo en el ámbito académico sino también en el mundo de la inversión privada (ver **FIGURA 1** y **TABLA 1**).

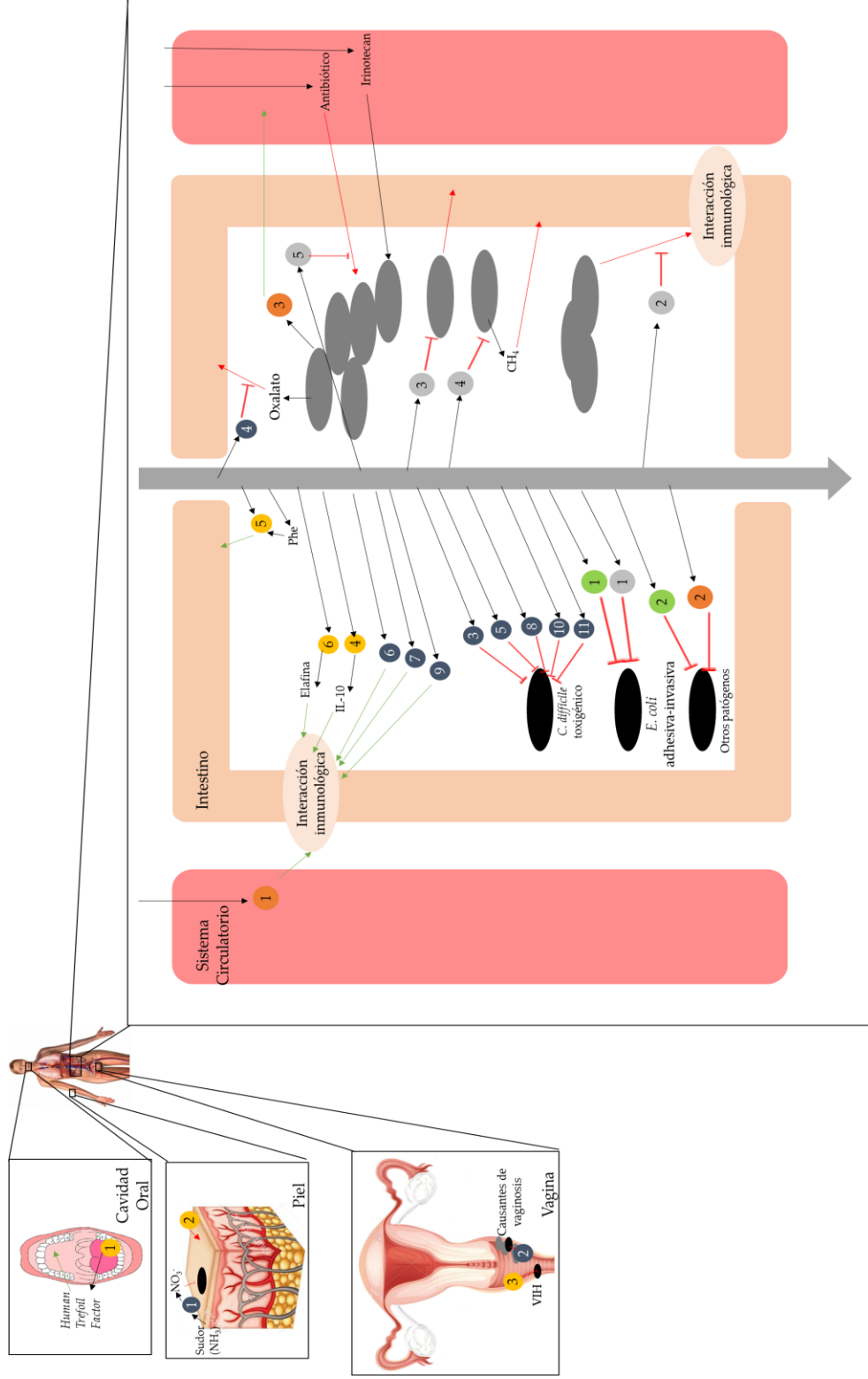


FIGURA 1. Estrategias farmacológicas a través de la microbiota. (a) Visión general de diferentes estrategias farmacológicas a través de la microbiota

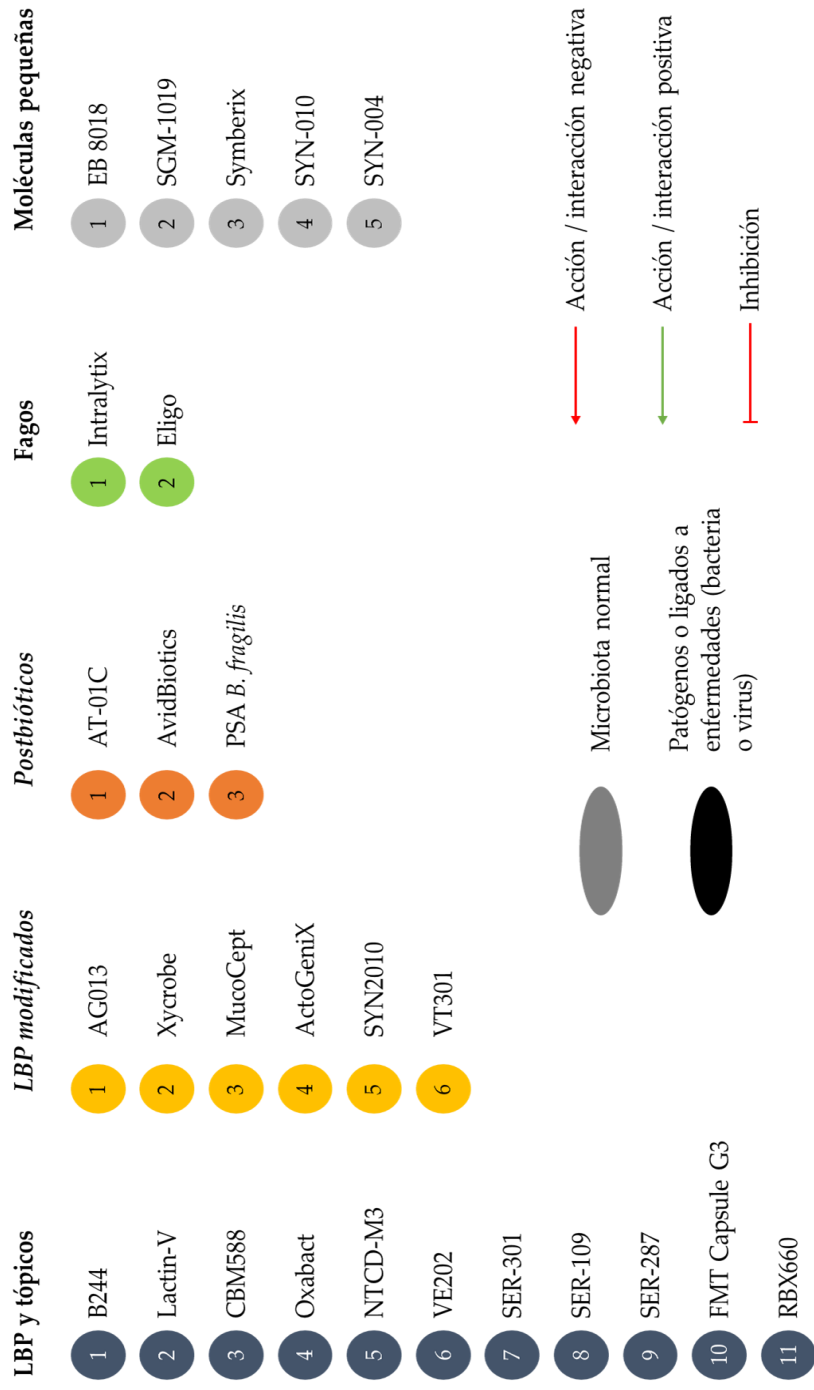


FIGURA 1 (cont.). Estrategias farmacológicas a través de la microbiota **(b)** Leyenda y detalle de las distintas estrategias farmacológicas a través de la microbiota de la cavidad oral, de la piel y de la vagina

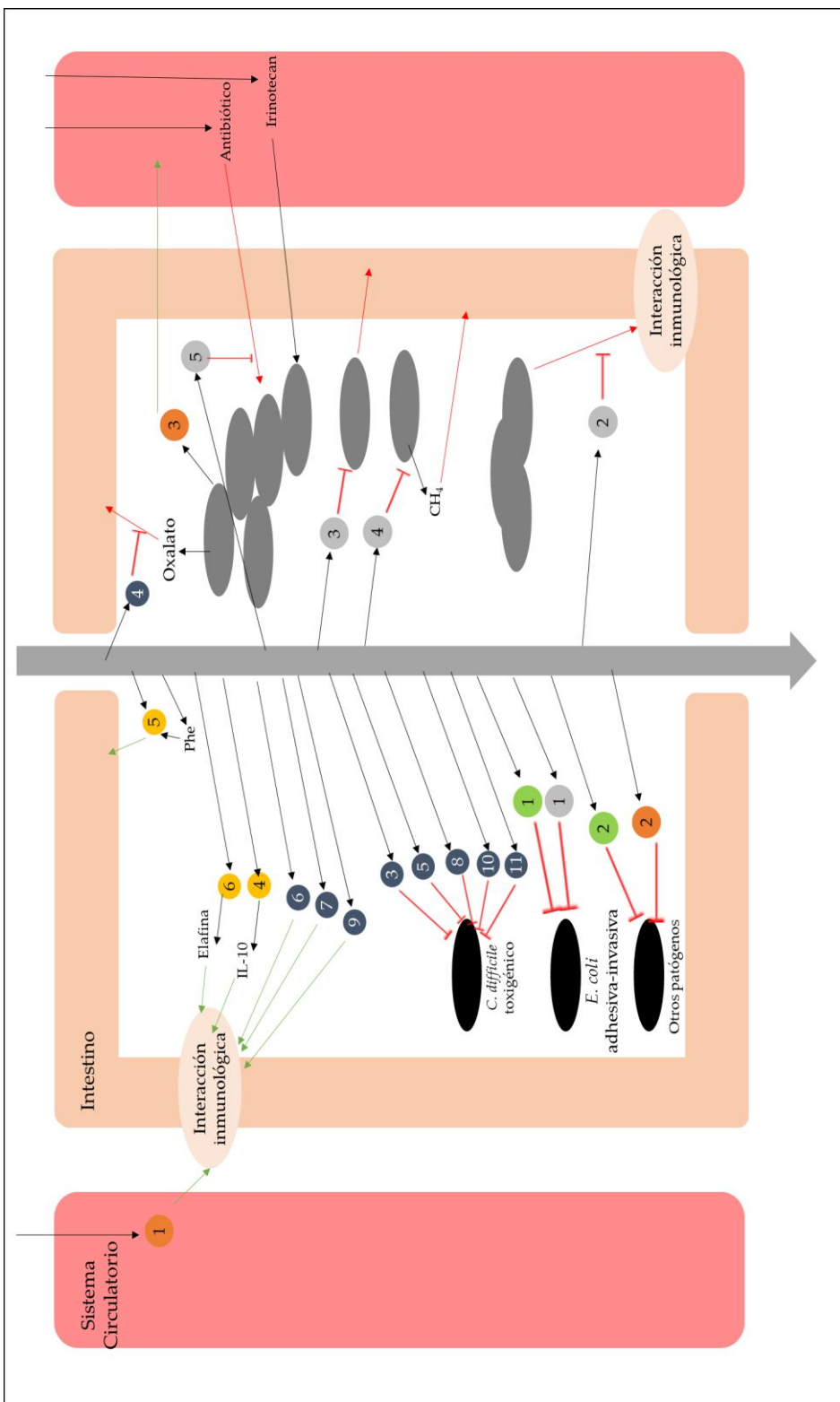


FIGURA 1 (cont.). Estrategias farmacológicas a través de la microbiota. (c) Detalle de las distintas estrategias farmacológicas a través de la microbiota de intestinal

En muchos países de Europa existen distintos productos formulados con microorganismos como lactobacilos, bifidobacterias o levaduras que se regulan como fármacos desde hace décadas. En otros países europeos y en EEUU la situación es diferente, ya que los productos con microorganismos se han clasificado históricamente como ingredientes y complementos alimenticios. El más estudiado de todos es la ingestión de uno o varios probióticos vivos con el objetivo de que colonicen el intestino e interactúen con los otros elementos de ese ecosistema ejerciendo un efecto beneficioso. En esta variante el número de especies o cepas microbianas contenidas en el producto puede variar desde una a decenas. La simplicidad tecnológica de estos desarrollos y su poco contenido científico hizo que durante bastantes años la industria farmacéutica no tuviera un gran interés en el uso de microorganismos como medicamentos. Sin embargo, como antes se indicó, desde hace unos pocos años y coincidiendo con la llegada de las tecnologías de análisis de microbiomas, un número creciente de compañías biotecnológicas han retomado estos esfuerzos.

Un primer ejemplo es CBM588 de la empresa Osel, Inc. (Mountain View, CA, EEUU), un producto que contiene la cepa MIYAIRI 588® de *Clostridium butyricum*. Está destinado a administración oral para la prevención de la diarrea asociada a antibióticos. Los resultados *in vitro* con este producto indican que podría ser eficaz también frente a la diarrea causada por *C. difficile*, que también puede estar asociada al uso de antibióticos (363). Este mismo producto está siendo investigado por la empresa a nivel preclínico para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal en base a resultados positivos de eficacia en modelos murinos (364,365). La seguridad de la cepa ha sido estudiada tanto *in vitro* como *in vivo* (366). Otro ejemplo es el de Shire Pharmaceuticals (Dublín, Irlanda), que tras comprar Viropharma en 2013 está desarrollando un fármaco conocido como VP20621 o NTCD-M3 también contra la infección por *C. difficile*. Este producto está basado en una composición definida de esporas no toxigénicas de *C. difficile* (cepa M3) para la inhibición ecológica y metabólica del patógeno. Como se verá más adelante, la infección por *C. difficile* es una de las principales aplicaciones a corto plazo de las estrategias terapéuticas a través de la microbiota, muy especialmente en el campo del trasplante fecal.

Otras empresas no están empleando cepas aisladas de microorganismos sino consorcios, definidos pero complejos, de microbios como medicamentos. Tal es el caso de Vedanta Biosciences, Inc. (Boston, MA, EEUU), que está desarrollando conjuntamente con Janssen Biotech, una filial de Johnson & Johnson, un producto denominado VE202 consistente en la asociación de 17 cepas de clostridios para modular la mucosa intestinal y tratar la IBD.

Los microorganismos empleados en los medicamentos son, en general, de tipo bacteriano. No obstante, uno de los fármacos microbianos más exitosos y ampliamente distribuidos en el mundo es la levadura *Saccharomyces boulardii* de la empresa Biocodex S.A. (París, Francia). Es más, un mayor conocimiento de la ecología de la microbiota intestinal permite el uso de formas microbianas no exploradas hasta tiempos recientes como los bacteriófagos. Un ejemplo de esta última estrategia es la terapia para enfermedad de Crohn en desarrollo conjunto por Intralytix, Inc. (Baltimore, MD, EEUU) y Ferring Pharmaceuticals (Saint-Prex, Suiza), basada en el uso de bacteriófagos contra *E. coli* adherente-invasiva, que ha sido relacionada con el desarrollo de esta dolencia.

A pesar de que la mayoría de los ejemplos de fármacos microbianos se encuentran en el ámbito de la microbiota intestinal, existen también ejemplos de empresas trabajando en estrategias similares para la microbiota de otras localizaciones corporales. En el caso de la microbiota de la piel, la empresa americana AOBiome, LLC. (Cambridge, MA, EEUU) ha desarrollado una línea de cosméticos y está desarrollando otra de fármacos basados en bacterias nitrificantes. Su proyecto más avanzado a nivel clínico está en fase 2 para acné vulgar. Se denomina B244 y es un producto tópico que contiene *Nitrosomonas eutropha* (NCT02656485). La empresa planea utilizar la misma estrategia de uso de bacterias nitrificantes para otras enfermedades inflamatorias de la piel como la dermatitis atópica infantil, el eccema en adultos y la rosácea. La compañía Dermala, Inc. (San Francisco, CA, EEUU) ha seguido una estrategia similar y tiene hasta ocho proyectos para desórdenes dermatológicos.

La piel no es la única localización corporal en la que el uso tópico de microorganismos es posible. La antes citada Osel posee uno de sus productos más avanzados en desarrollo clínico en el ámbito de la microbiota de los tractos genital y urinario de la mujer. Lactin-V es un producto de aplicación tópica vaginal que

contiene la cepa *Lactobacillus crispatus* CTV-05 y que se encuentra en fase 2, tanto para vaginosis bacteriana recurrente como para infecciones recurrentes del tracto urinario femenino (367,368). El producto ha pasado satisfactoriamente los ensayos de fase 1 para la comprobación de su seguridad (369,370).

Generalmente los microorganismos empleados como fármacos suelen estar vivos, por eso se les denomina LBP (por las siglas en inglés de “Live Biotherapeutic Product”). No obstante, en otros casos pueden estar muertos o inactivados. A este tipo de productos se les denomina probióticos fantasma. Uno de estos productos está en el mercado desde hace décadas y se denomina Lacteol. La empresa catalana Manremyc, S.L. está trabajando en un concepto similar al que llama *Nyaditum resae*. Se ha desarrollado como un complemento alimentario y está basado en micobacterias de la especie *Mycobacterium manresiensis* muertas. Se ha diseñado para evitar la aparición de los síntomas de la tuberculosis en individuos infectados mediante la “educación” de su sistema inmune.

Un caso particular del uso de consorcios microbianos como medicamentos es el trasplante fecal (FMT por las siglas en inglés de “Fecal Microbiota Transplantation”). Esta técnica emplea heces humanas procesadas como medicamentos mediante su trasplante desde un donante sano a un receptor enfermo mediante enema, colonoscopia, cápsula o sonda naso-entérica. El objetivo es establecer o reestablecer una comunidad microbiana sana en el receptor. Como se detallará más adelante, las principales barreras que esta práctica tiene son de tipo regulatorio (371). En realidad se trata de una técnica antigua. Se tiene constancia de la práctica del FMT desde el siglo IV en China, cuando el médico Ge Hong describió la administración oral de materia fecal de donantes sanos para el tratamiento de intoxicaciones alimentarias o diarreas severas. Existe más registro en China en el siglo XVI para el tratamiento de enfermedades abdominales (372). En el siglo XVII el anatomista italiano Girolamo Fabrizi d'Acquapendente explicó la técnica de inoculación de rumen de vacas sanas a otras que aparentemente habían perdido la capacidad de rumiar (373). Esta práctica sigue realizándose a día de hoy (374). En humanos se volvió a documentar el empleo de FMT hace casi sesenta años, cuando el Dr. Ben Eiseman trató con enemas fecales a cuatro pacientes con enterocolitis pseudomembranosa (probablemente diarrea por *C. difficile*) (375). Desde entonces se han descrito en la

literatura más de quinientos casos (376–378). Sin embargo, no fue hasta 2013 cuando se realizó el primer ensayo clínico aleatorizado y controlado (379) con más de cuarenta participantes con infecciones recurrentes por *C. difficile* en los que la primera línea de terapia basada en el tratamiento con el antibiótico vancomicina había fracasado. En el ensayo, un grupo recibió un segundo tratamiento estándar de vancomicina y el otro el antibiótico junto con un fluido de heces sanas filtradas a través de una sonda nasal. Este ensayo tuvo que ser cancelado por motivos éticos ya que el FMT se mostró igualmente seguro pero más del doble de efectivo que el tratamiento con antibióticos por sí solo (81% frente a 30% de eficacia), de modo que se consideró una falta de ética clínica no tratar a todos los pacientes con FMT. Otros estudios con FMT no aleatorizados que suman cientos de pacientes con diarrea por *C. difficile* han tenido tasas de éxito cercanas al 90% (380). Además de su extraordinario perfil de eficacia, lo que destaca de los resultados con FMT es la seguridad que han mostrado. Existe un único caso documentado (381) en el que se registró un evento adverso. Se trataba de una mujer de 32 años con diarrea recurrente por *C. difficile* a la que se trasplantó material fecal de su hija sana. Durante los dieciséis meses posteriores a la intervención reportó una ganancia de peso no intencionada de 61 kg a 77 kg, lo que supuso un cambio en su IMC (Índice de Masa Corporal) de 26 (ligero sobrepeso) a 33 (obesidad moderada). Los autores describen en el trabajo que la hija donante también paso en el mismo periodo de tiempo de un peso de 61kg e IMC de 26,4 a un peso de 80 kg e IMC de 34,5. Dado lo inexplicable del caso, y al tratarse del único descrito, se considera que el FMT es una técnica muy segura.

No obstante, y dadas las incógnitas que aún rodean a esta técnica, es práctica habitual someter a los donantes y al material fecal a exhaustivos controles. En heces se examina la presencia de *C. difficile*, *E. coli* enterocolítica y sus toxinas, *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella* y sus toxinas, *Campylobacter*, *Yersinia*, *H. pylori*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *S. aureus* meticilin-resistente, *Vibrio* y *Listeria*. Los tests serológicos suelen incluir VIH tipos 1 y 2, Hepatitis A, B y C, sífilis y un panel de salud hepática. Suele incluirse, además, un cuestionario de salud digestiva y general (382). Los tests llegan a ser tan exigentes que sólo el 3% de los donantes son admitidos (383).

Dada la alta eficacia observada en ensayos clínicos, existen diferentes empresas trabajando en el FMT para distintas indicaciones, desde la diarrea por *C. difficile* en la que trabajan la mayoría y en la que todas se encuentran más avanzadas en su fase clínica, hasta la colitis ulcerosa, la obesidad y la encefalopatía hepática. Todas estas empresas, aunque coinciden en sus estándares de seguridad y control de calidad, difieren en el método de preparación del material fecal de forma previa a su trasplante y por lo tanto en su composición, en su posología e incluso en su modo de aplicación.

En ocasiones se transfiere un material fecal relativamente poco procesado, en el que la virtual totalidad de la comunidad bacteriana intestinal del donante se transfiere al receptor. Este es el caso de OpenBiome, una asociación sin ánimo de lucro que actúa como banco de heces intermediario entre donantes anónimos, gastroenterólogos y pacientes y cuyo FMT Capsule G3 está dirigido contra la diarrea por *C. difficile*. También es el caso de la empresa Rebiotix, Inc. (Roseville, MN, EEUU). En este caso el producto RBX2660 se encuentra en fase 2 para la infección por *C. difficile* recurrente (382). A pesar de la relativa incertidumbre con respecto a su composición, la FDA ha catalogado el producto como medicamento y le ha otorgado el estatus de huérfano. En otro enfoque del FMT, la empresa MaaT Pharma S.A. opta por prescindir de donantes de material fecal, realizando FMT autólogos.

El FMT no deja de ser una práctica que se ha extendido hace poco tiempo y que resulta extraña, muy especialmente a unos legisladores farmacéuticos y sanitarios acostumbrados a lidiar con productos relativamente sencillos desde los puntos de vista químico y biológico. Esta es la causa de que su regulación sea controvertida, como se detallará más adelante. Precisamente por estos problemas regulatorios y de otros tipos que supone el uso de material fecal como terapia, existen compañías que aspiran a identificar dentro del material fecal los microorganismos concretos capaces de mediar el efecto beneficioso para la salud. Tal es el caso de Seres Therapeutics, Inc. (Cambridge, MA, EEUU) cuyo producto líder es SER-109, un medicamento huérfano en fase 2b de ensayos clínicos frente a diarrea por *C. difficile* (384). La FDA lo ha designado "breakthrough therapy". Es un consorcio parcialmente definido de esporas de cincuenta especies de *Firmicutes* purificadas a partir de heces de donantes sanos y administrado por vía oral. La

composición exacta no se especifica y es hasta cierto punto desconocida o incierta, debido al proceso de elaboración del producto. De hecho la patente del fármaco únicamente indica que al menos uno de los componentes microbianos del producto debe ser *Collinsella aerofaciens* (OTU, por las siglas en inglés de “Operational Taxonomic Unit”, con al menos 97% de identidad en rARN 16S) y que debe contener al menos un segundo componente microbiano (OTU con al menos el 97% de identidad en rARN 16S) de una lista de más de dos mil especies anexa a la patente. Los datos que ofrece Seres en su último ensayo clínico publicado (384) indican que el producto contiene una media de 50 (± 8) OTU distintas. Destaca, además, que a pesar de las diferencias entre las microbiotas intestinales de siete donantes diferentes, la composición taxonómica al nivel de familia se mantuvo constante en el producto procesado. En el producto procedente de estos donantes se hallaron las familias *Clostridiaceae*, *Erysipelotrichaceae*, *Eubacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae* y *Ruminococcaceae*, y en seis de los siete se halló la familia *Oscillospiraceae*. Adicionalmente la empresa está embarcada en otro producto a base de consorcios complejos de esporas, desarrollado por la misma tecnología, para el tratamiento de colitis ulcerosa denominado SER-287. Existe un tercer producto, SER-301, definido por la compañía como un “producto sintético, con un diseño racional, compuesto por especies bacterianas cultivadas *in vitro*” para colitis ulcerosa y otras enfermedades gastrointestinales cuya composición no es pública.

Hay más trasplantes de microbiota que los investigadores se están planteando. Para enfermedades como la dermatitis atópica existen ya ensayos clínicos fase 2 propuestos por entidades de investigación que comprenden trasplantes autólogos de microbiota de la piel (NCT02144142).

Otro enfoque que algunas investigaciones están adoptando es el de no usar microorganismos completos como medicamentos sino moléculas producidas por ellos. Los microorganismos que componen la microbiota humana producen una gran cantidad de compuestos con los que se comunican con los sistemas inmune y neuro-endocrino del hospedador. Estas moléculas pueden liberarse al medio como fruto del metabolismo microbiano, o pertenecer a estructuras celulares de la membrana o la pared. Pueden, a su vez, ser de distinta naturaleza química, típicamente sacarídica, proteica o de tipo SCFA. Estas moléculas con potencial

terapéutico producidas por miembros de la microbiota son conocidas como “postbióticos” y han despertado un gran interés en la investigación académica e industrial.

En el caso de moléculas de naturaleza proteica, la investigación se centra en la búsqueda *in silico* de proteínas de pequeño tamaño con dominios de secreción extracelular en los metagenomas de microbiota intestinal. El objetivo es hallar péptidos que potencialmente sirvan de mensajeros entre los microorganismos y el hospedador. La empresa Amrita Therapeutics Ltd. (Ahmedabad, India) está en trámites para iniciar ensayos clínicos con su candidato terapéutico más avanzado denominado AT-01C. Se trata de un péptido natural derivado de *Mycobacterium tuberculosis* con capacidad de supresión de tumores sólidos de los tractos genitourinario y gastrointestinal, hepáticos y del sistema nervioso central. Se sabe que este péptido actúa inhibiendo la expresión de oncogenes y se poseen indicios de que tiene un perfil de seguridad y toxicidad adecuado. La empresa declara también estar trabajando de forma simultánea en un diagnóstico compañero basado en el biomarcador SMAR-1, una proteína de unión al ADN a través de la cual AT-01C media su actividad. El potencial de las micobacterias para el tratamiento de tumores era ya conocido, ya que la vacuna frente al *Bacillus Calmette-Guérin* (BCG), producida con células de *Mycobacterium bovis* debilitadas, se ha utilizado tanto contra la tuberculosis como frente al cáncer de vejiga (385). Con un enfoque similar, Enterome Bioscience S.A. (París, Francia) está desarrollando un producto denominado EB110 que es una proteína secretada por una bacteria de reciente descubrimiento y puede usarse como inmunomodulador para el tratamiento de la enfermedad de Crohn.

Sin embargo, donde probablemente resida el mayor reservorio de químicos producidos por la microbiota sea en el reino de las moléculas pequeñas, resultantes del metabolismo de una especie bacteriana, del acoplamiento metabólico entre distintas especies bacterianas, o incluso resultante del metabolismo conjunto de representantes de diferentes reinos como bacterias, arqueas, hongos y el propio hospedador. Este compendio de especies químicas es tan enorme como inexplorado (386). Es más que probable que determinadas moléculas que los microorganismos expongan en su superficie, por ejemplo en la pared bacteriana, cumplan una función comunicadora con el hospedador. Es de

sobra conocida la capacidad, tanto del lipopolisacárido de la membrana externa de las bacterias Gram-negativas como de los mananos presentes en la pared celular de las levaduras, de provocar reacciones de tipo inmune y metabólico en el hospedador, así como de causar reacciones en la microbiota que potencialmente pueden traducirse en cambios fisiológicos del hospedador. De hecho Symbiotix Biotherapies, Inc. (Boston, MA, EEUU) está desarrollando fármacos orales basados en polisacáridos de la cápsula de *Bacteroides fragilis* con capacidad inmunomoduladora para el tratamiento de diferentes afecciones mediadas por el sistema inmune como la IBD y la esclerosis múltiple.

El estudio de las interacciones entre la microbiota y el hospedador puede además permitir definir nuevas dianas terapéuticas en el hospedador. La compañía Second Genome, Inc. (South San Francisco, CA, EEUU) está desarrollando el producto SGM-1019, una molécula pequeña inhibitoria que actúa sobre la interacción entre una proteína secretada por un miembro de la microbiota intestinal y el tejido humano que lleva a la activación de una ruta inflamatoria implicada en enfermedad de Crohn.

Otra posibilidad cualitativamente diferente que los microorganismos ofrecen es la de convertirse en biofactorías de medicamentos a largo plazo en el interior del cuerpo humano. Mediante el uso de organismos modificados genéticamente (OMG) puede conseguirse que éstos expresen un metabolito, por ejemplo una proteína, con capacidad terapéutica. La situación ideal sería que estos microorganismos colonizaran la parte del cuerpo correspondiente de forma controlada y secretarán el fármaco de forma controlada. En este sentido, la compañía ViThera Pharmaceuticals, Inc. (Cambridge, MA, EEUU) ha desarrollado una cepa OMG de *Lactococcus lactis* denominada VT301 que se administra oralmente, coloniza el intestino y secreta una proteína humana antiinflamatoria, la elafina, para el tratamiento de la IBD (387). Este proyecto se encuentra aún en fase preclínica. Por su parte, Synlogic, Inc. (Cambridge, MA, EEUU) emplea formas modificadas del probiótico comercial *E. coli* Nissle para colonizar el intestino de pacientes con distintas dolencias metabólicas. Su candidato SYN2010 está indicado para la fenilcetonuria, al degradar posibles trazas de fenilalanina que los pacientes pudieran ingerir por la dieta. Otro

candidato, SYN1010, tiene como objetivo tratar a individuos con desórdenes del ciclo de la urea. Ambos proyectos están aún en fase preclínica.

Como en casos anteriores, la tecnología de la microbiota no tiene sólo aplicación en el intestino. Oragenics, Inc. (Tampa, FL, EEUU) está desarrollando una cepa genéticamente modificada de *L. lactis* denominada AG013 que secreta el factor trébol 1 humano para el tratamiento de la mucositis oral ligada a la quimioterapia contra el cáncer. El producto se aplica de forma tópica en la cavidad bucal y ha recibido el estatus de medicamento huérfano en la UE completando satisfactoriamente un estudio fase 1. Este proyecto fue iniciado por ActoGeniX B.V. (Gante, Bélgica), que en 2015 fue adquirida por Intrexon Corp. (Germantown, MD, EEUU). La tecnología ActoBiotics dio lugar a otra cepa OMG de *L. lactis* denominada AG013 que secreta en el intestino la IL-10 humana para el tratamiento de la IBD, en fase 2.

Dentro del uso tópico, en aplicación vaginal se ha desarrollado MucoCept de Osel, una cepa modificada de *Lactobacillus jensenii* que expresa el gen que codifica el receptor CD-4 al que se une el virus VIH para iniciar su infección. El racional detrás del desarrollo es inhibir la infección viral. Este proyecto se encuentra actualmente en fase 1. En el campo de la dermatología destaca Xycrobe Therapeutics, Inc. (San Diego, CA, EEUU) que trabaja a nivel preclínico con cepas modificadas de *Propionibacterium* para que secreten *in situ* moléculas terapéuticas tales como citoquinas y hormonas.

No hay que olvidar que la diversidad metabólica microbiana es tan amplia que permite alcanzar objetivos similares al anterior sin emplear organismos transgénicos. Tal es el caso de la estrategia de OxThera AB (Estocolmo, Suecia) cuyo producto Oxabact, basado en la bacteria *Oxalobacter formigenes*, tiene como objetivo introducir la ruta metabolizadora del ácido oxálico, último metabolito resultante de la degradación del ácido ascórbico, en el intestino de pacientes con hiperoxaluria. Estos pacientes sufren cólicos nefríticos de repetición a causa de la acumulación de ácido oxálico en sus riñones. Este producto se encuentra en fase 3 de ensayos clínicos.

Aun considerando todo lo anteriormente expuesto, la opción de terapias a través de la microbiota con más impulso empresarial es la basada en fármacos de tipo convencional, generalmente moléculas pequeñas. El ejemplo más clásico se

basa en el empleo de prebióticos o simplemente la ingesta de fibra. Ambos enfoques tienen como objetivo promocionar el crecimiento de un amplio espectro de microorganismos del intestino y la producción de SCFA. Se están utilizando estrategias análogas para afectar a espectros más concretos de microorganismos. Tal es el caso de Synthetic Biologics, Inc. (Rockville, MD, EEUU) con su producto SYN-010, una forma modificada de la estatina lovastatina que tiene como objetivo la inhibición de determinados metabolismos de las arqueas metanógenas intestinales, especialmente *Methanobrevibacter smithii*, para el tratamiento del IBS asociado a diarrea y que se encuentra en fase 2. El candidato líder de la ya nombrada Enterome, EB 8018, tiene un objetivo muy similar al de la terapia de Intralytix y Ferring antes mencionada. La molécula pequeña EB 8018 también pretende reducir la carga de *E. coli* adherente-invasiva mediante la inhibición de adhesinas bacterianas para el tratamiento de la enfermedad de Crohn.

Tras décadas de intentos de obtener antibióticos activos frente al mayor espectro de microorganismos posible, la tendencia en tiempos recientes es la contraria. Por eso empresas como AvidBiotics Corp. (South San Francisco, CA, EEUU) están desarrollando terapias microbicidas mucho más focalizadas que los antibióticos tradicionales a partir de bacteriocinas, unas moléculas antibacterianas con alto nivel de especificidad que son producidas naturalmente por una gran cantidad de microorganismos. Por su parte, Eligo Bioscience S.A.S. (París, Francia) utiliza como sistema antimicrobiano cápsides de bacteriófagos dirigidas contra bacterias concretas (388,389). También usa bacteriófagos modificados EnBiotix, Inc. (Cambridge, MA, EEUU), además de otras estrategias basadas en metabolitos potenciadores que, combinados con antibióticos, pretenden aumentar la especificidad de estos últimos. De forma análoga, la antes citada Synthetic Biologics está desarrollando el producto SYN-004, una forma oral de beta-lactamasa que tiene como objetivo evitar el daño a la microbiota intestinal por parte de los antibióticos intravenosos mediante su degradación en la luz del intestino. Este daño se asocia al desarrollo de infección por *C. difficile*.

Otro foco de interés es explorar cómo el metabolismo de las bacterias puede afectar a la forma en la que el cuerpo humano procesa los fármacos. Uno de los primeros casos en los que se puso de manifiesto fue la observación de que la bacteria intestinal *Eggerthella lenta* tiene la capacidad de reducir el medicamento

oral utilizado en desórdenes cardiovasculares digoxina a una forma inactiva (390,391). Se ha demostrado además que este fenómeno puede modularse mediante la modificación de la dieta en roedores, y que la administración de antibióticos puede duplicar la concentración de la forma activa del medicamento en sangre en animales con este microorganismo en su aparato digestivo. Se especula que casos como este justifiquen, al menos parte, la variabilidad en la respuesta a la medicación observada en humanos.

Los microorganismos pueden tener un papel indirecto en el metabolismo del hospedador mediante la inducción de los sistemas de metabolismo de xenobióticos, por ejemplo, el citocromo P450, la competición por sistemas de detoxificación (392), o por una combinación de ambos. Todos estos procesos modifican las características de absorción, distribución, metabolismo, excreción y toxicidad de los fármacos (392,393). Un ejemplo de esto último es la habilidad para predecir la dinámica metabólica individual del analgésico paracetamol analizando el perfil de metabolitos presentes en una muestra de orina tomada de forma previa a su administración (394). Al aplicar esta estrategia se observa que los individuos que excretan altas concentraciones de p-cresol sulfato antes de tomar paracetamol tienden a excretar menos paracetamol sulfato y más paracetamol glucurónido tras la ingesta de la dosis. El paracetamol y el p-cresol son estructuralmente similares y compiten por la sulfatación necesaria para su detoxificación. Por acaparar parte de la capacidad de sulfatación del hígado, además de por otros mecanismos como el descenso en los niveles de glutatión (395–397), la exposición continuada al p-cresol da lugar a un hígado más vulnerable a daños inducidos por paracetamol. Lo importante es que el p-cresol, un derivado del fenol formado en el metabolismo de aminoácidos aromáticos, no es derivado de ningún metabolismo humano sino que lo producen exclusivamente bacterias del intestino. Es entonces absorbido y distribuido por el sistema circulatorio al hígado, donde modifica el modo en el que el cuerpo metaboliza los medicamentos. Es por eso que se especula con que el perfil personalizado de toxicidad de un medicamento pueda ser determinado mediante el estudio de la microbiota intestinal, y que consecuentemente dicha toxicidad pueda ser prevenida mediante actuaciones sobre ella. De hecho el uso prolongado de antiinflamatorios no esteroideos como el paracetamol está ligado a efectos tóxicos en el tracto gastrointestinal inferior y a la aparición de úlceras, IBS e

inflamación intestinal. Se ha identificado que la enzima beta-glucuronidasa bacteriana, ampliamente distribuida en estos organismos, juega un papel importante en la generación de las formas tóxicas derivadas de estos fármacos. En base a ello la empresa Symberix, Inc. (Durham, NC, EEUU) está desarrollando fármacos inhibidores selectivos de la beta-glucuronidasa bacteriana que no afectan a la forma humana de la enzima (398). La aspiración de estos medicamentos en investigación es la de convertirse en terapia adjunta a los antiinflamatorios para reducir su toxicidad a largo plazo. La propia Symberix afirma que este proyecto surgió a partir de su proyecto líder, también centrado en la búsqueda de inhibidores específicos de la beta-glucuronidasa bacteriana, que aspira a convertirse en terapia adjunta a la quimioterapia contra el cáncer. En este caso la enzima reactiva es el irinotecan o CPT-1, un agente ampliamente usado en el intestino que causa diarreas severas (399).

Se puede concluir este apartado afirmando que el hecho de que la enorme cantidad de microorganismos que habitan el cuerpo humano y su amplia variedad de metabolismos jueguen un papel importante en cómo los humanos responden a los fármacos es una posibilidad contemplada por la comunidad científica desde tiempos recientes y que aún no ha sido incorporada como variable a la mayoría de los programas de desarrollo de fármacos. Es probable que distintas composiciones de microorganismos, o incluso de binomios genético-metabólicos o microbiota-hospedador, determinen el destino de las moléculas terapéuticas una vez aplicadas al cuerpo humano y, por tanto, su perfil de seguridad y eficacia. Existen además una gran cantidad de potenciales dianas terapéuticas en la microbiota, especialmente relevantes en áreas de la medicina con necesidades no cubiertas, que únicamente han empezado a ser exploradas. Adicionalmente, es posible que la microbiota se revele como un importante factor en el contexto de la medicina estratificada y personalizada.

5.2.3.2.2 Clasificación regulatoria actual de los microorganismos terapéuticos

Los microorganismos con capacidad terapéutica están comercializados en todos los países de la UE desde hace décadas, si bien, bajo formas regulatorias diferentes. Por lo reciente de su creación y su bajo nivel de armonización, el marco regulatorio europeo establece que la decisión acerca de la aprobación o reprobación y de la clasificación regulatoria de los alimentos, los medicamentos y los productos sanitarios recae sobre los estados miembro (EM) en lugar de sobre un organismo centralizado. Este fenómeno es la razón de la disparidad de criterios entre los distintos EM con respecto a la autorización del cultivo de plantas transgénicas, de que determinados compuestos sean considerados medicamentos en unos países y productos sanitarios en otros, requieran prescripción médica o no, o de que determinados medicamentos OTC (por las siglas en inglés de “Over The Counter”) puedan venderse sin supervisión de un farmacéutico en algunos Estados.

La inmensa mayoría de los productos que contienen microorganismos vivos destinados a consumo humano en España, es decir, los comúnmente llamados probióticos en productos lácteos o en cápsulas, se regulan como ingredientes alimentarios o complementos alimenticios. No obstante, en España existen cinco productos con contenido de microorganismos vivos regulados como fármacos que se detallan a continuación.

El primero de ellos es Ultra-Levura. Es un medicamento OTC biológico no sustituible por el farmacéutico comercializado por Laboratorios Zambon bajo licencia de Biocodex, que contiene la levadura *S. boulardii* en cápsulas. Está indicado para el tratamiento sintomático de las diarreas agudas inespecíficas en pacientes mayores de doce años y en la prevención y tratamiento sintomático de los procesos diarreicos producidos por la administración de antibióticos, reemplazando la flora patógena del intestino por otra similar a la fisiológica. El segundo es Casenfilus. Es un medicamento OTC biológico no sustituible por el farmacéutico comercializado por Laboratorios Casen Recordati, que contiene la bacteria *L. acidophilus*. Está indicado para el tratamiento sintomático de los procesos diarreicos agudos o repentinos y la prevención y tratamiento de las

diarreas producidas por la administración de antibióticos. El tercero es Inflan. Es un medicamento OTC biológico no sustituible por el farmacéutico comercializado por Laboratorio Farmacéutico S.I.T., que contiene las bacterias *L. acidophilus* y *Lactobacillus bifidus*, nombre con el que colectivamente se conocía antes de los años 1960 al género *Bifidobacterium*, en cápsulas. Está indicado para el tratamiento sintomático de los procesos diarreicos agudos o repentinos y la prevención y tratamiento de las diarreas producidas por la administración de antibióticos. El cuarto es Lacteol. Es un medicamento OTC biológico no sustituible por el farmacéutico comercializado por Laboratorios Ramón Sala y fabricado por Aptalis Pharma, que contiene bacterias muertas de la especie *L. acidophilus* cepa Lacteol. En su prospecto identifican esta cepa con *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus delbrueckii*. Está indicado en el tratamiento sintomático de las diarreas inespecíficas y en la prevención y tratamiento sintomático de los procesos diarreicos causados por la destrucción de la flora intestinal. El último es Lactofilus. Es un medicamento OTC biológico no sustituible por el farmacéutico comercializado por Instituto Llorente S.A., que contiene *L. acidophilus* para el tratamiento sintomático de los procesos diarreicos agudos o repentinos y la prevención y tratamiento de las diarreas producidas por la administración de antibióticos, restaurando la flora intestinal.

Existe también un producto sanitario en forma de gel tópico vaginal que contiene diferentes microorganismos (*Lactobacillus fermentum* LF 11 y *Lactobacillus salivarius* CLR 1328) llamado Ginega Candida. Está comercializado por Laboratorios Menarini, y se indica como coadyuvante en el tratamiento de las vulvovaginitis por levaduras del género *Candida*. Su mecanismo de acción consiste en la competición física y biológica de los dos lactobacilos con otros microorganismos cuyo sobrecrecimiento es potencialmente patógeno, así como la producción de ácido que restablece el pH normal de la vagina, inhibiendo especies patógenas.

En el mercado español se pueden encontrar decenas de productos conteniendo las mismas especies, o incluso cepas, que los enumerados como medicamentos en el párrafo anterior, que están clasificados como alimentos. Además, los productos basados en microorganismos vivos considerados medicamentos en España y antes citados no poseen una clasificación uniforme

entre distintos países de Europa. Mientras que países europeos del entorno de España como Portugal, Francia, Alemania, Italia, Bélgica, Países Bajos, Austria, Suecia y Finlandia sí los regulan como medicamentos en general, países como Reino Unido y los de la Europa del Este tienden a favorecer su clasificación como alimentos.

En lo referente a la clasificación de los microorganismos como productos sanitarios o dispositivos médicos a nivel europeo, existen diversos casos en los que la falta de armonización ha llevado a disputas entre empresas y agencias nacionales. Uno de los casos más sonados fue el que enfrentó a Laboratorios Lyocentre y a la FIMEA (siglas en inglés de “Finnish Medicines Agency”) sobre el producto de uso tópico vaginal con lactobacilos vivos para el restablecimiento de la flora vaginal GynOcaps (400). Dicho producto había estado comercializado en Finlandia como producto sanitario o dispositivo médico, con el marcado CE propio de estos productos, desde el año 1984 hasta 2008, cuando la FIMEA observó que un producto similar a GynOcaps estaba siendo comercializado en Finlandia como medicamento por otra compañía. Este era también el caso de España, Francia, Italia y Austria. Al revisar el dossier de GynOcaps, la Agencia Finlandesa estimó que el principal mecanismo de acción del producto era “corregir o restablecer determinadas funciones fisiológicas a través de una acción metabólica y farmacológica”. Así descrito, se trata de un perfil correspondiente a un medicamento y no a un producto sanitario, y por tanto requiere una Autorización de Comercialización en lugar del Marcado CE que el producto ostentaba. Esta decisión fue recurrida por la empresa titular del producto al Tribunal Supremo Administrativo de Finlandia, que a su vez refirió al caso al Tribunal de Justicia de la Unión Europea (TJUE), que determinó que:

- 1) “La clasificación de un producto, en un Estado miembro, como producto sanitario [...] no se opone a que las autoridades competentes de otro Estado miembro clasifiquen ese mismo producto, debido a su acción farmacológica, inmunológica o metabólica, como medicamento
- 2) Dentro de un mismo Estado miembro, en principio [sic], no puede comercializarse como producto sanitario [...] un producto que si bien no es estrictamente idéntico a otro producto clasificado como medicamento, tiene en común un mismo componente y ejerce el mismo modo de acción que éste,

salvo que otra característica propia de ese producto [...] exija su calificación y comercialización como producto sanitario, circunstancia que corresponde comprobar al órgano jurisdiccional remitente”.

Con anterioridad a este caso, otros productos sanitarios en el límite, sin microorganismos, basados en extractos de plantas y destinados a la prevención y al tratamiento de las infecciones urinarias (Urell de Pharmatoka y *Cys*-control de Arkopharma) habían perdido su estatus de producto sanitario en Francia. En este caso la Agence Nationale de Sécurité de Médicament et des Produits de Santé (ANSM) había obligado a repositionarlos como fármacos o como complementos alimenticios, eligiendo ambas empresas este último mecanismo para continuar con su comercialización (401). También en el ámbito de los productos límite, en abril de 2016 la empresa ProbioTech elevó una petición a la FDA para la modificación de la ley “Dietary Supplement Health and Education Act 1994” de modo que la definición de complemento nutricional incluyera a los supositorios (402). La petición alega que

“los probióticos que no están en forma de píldora, cápsula, pastilla o líquido y que no encajan en la definición de medicamento, producto sanitario o biológico deberían ser considerados un complemento alimenticio”

La empresa consideraba que el supositorio rectal que aspira a comercializar

“no debería ser considerado un nuevo medicamento ya que no pretende diagnosticar, curar, mitigar, tratar o prevenir una enfermedad” y que por tanto “no debe ser puesto en el oneroso proceso de solicitud y aprobación de un nuevo medicamento”.

En su blog legal (403), entre otras oposiciones preliminares a la petición de ProbioTech, la FDA expresó su política general de que

“los artículos cuya finalidad no es ser ingeridos no pueden ser clasificados como complementos alimenticios”

5.2.3.2.3 Las declaraciones, alegaciones e intencionalidad como impulsores de la regulación aplicable y del posicionamiento de producto en Europa

Una de las principales intenciones de los desarrolladores y comercializadores de este tipo de productos en Europa, es que el marco legal existente entre alimentos, fármacos y dispositivos médicos esté basado en la intención que el producto tiene, lo que determina el mensaje con fines comerciales que éste puede enviar al consumidor.

El canal alimentario ha sido el elegido tradicionalmente por la mayoría de los productores industriales de microorganismos para el lanzamiento de sus productos. De acuerdo con el Reglamento (CE) 178/2002, un alimento o producto alimenticio (404) es

“cualquier sustancia o producto destinados a ser ingerido por los seres humanos o con probabilidad razonable de serlo, tanto si han sido transformados entera o parcialmente como si no. Alimento incluye las bebidas, la goma de mascar y cualquier sustancia, incluida el agua, incorporada voluntariamente al alimento durante su fabricación, preparación o tratamiento”.

Por lo establecido en el Reglamento (CE) 1924/2006, los alimentos pueden transmitir cuatro tipos de mensajes (405):

- Información nutricional y de contenido de ingredientes: “hace referencia a la relativa a la presencia de valor energético y de determinados nutrientes en los alimentos” y es obligatoria. Son mensajes como por ejemplo “Contiene aceite de oliva”, “43 kcal/100g”, “1% de la ingesta diaria de un adulto medio”.
- Declaración nutricional: “declaración que afirme, sugiera o dé a entender que un alimento posee propiedades nutricionales benéficas específicas con motivo del aporte energético que proporciona, que proporciona en un grado reducido o incrementado, o que no proporciona, y/o de los nutrientes u otras sustancias: que contiene, que contiene en proporciones reducidas o incrementadas, o que no contiene”, como por ejemplo “Bajo en grasas”, “Bajo en calorías”, “Bajo en sal”, “Rico en proteínas”, “Fuente natural de potasio”.

Las normas para la aplicabilidad de estos mensajes aparecen (406) en el Anexo del Reglamento (CE) 1924/2006 modificado por el Reglamento (UE) 1047/2012.

- Declaración de propiedades saludables: “declaración que afirme, sugiera o dé a entender que existe una relación entre una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes, y la salud”, como por ejemplo “Los fitostanoles y fitosteroles contribuyen al mantenimiento de niveles normales de colesterol en sangre” (407).
- Declaración de reducción del riesgo de enfermedad: “declaración de propiedades saludables que afirme, sugiera o dé a entender que el consumo de una categoría de alimentos, un alimento o uno de sus constituyentes reduce significativamente un factor de riesgo de aparición de una enfermedad”, como por ejemplo “Los esteroides y estanoles vegetales han demostrado reducir el colesterol en sangre. Altos niveles de colesterol suponen un factor de riesgo para el desarrollo de enfermedades coronarias” (408).

Resulta evidente que los cuatro tipos de mensajes se encuentran ordenados según su fortaleza comercial y, por tanto, la mayoría de los desarrolladores y comercializadores de productos alimenticios aspiran a utilizar los dos últimos, conocidos común y colectivamente en la industria como declaraciones o alegaciones funcionales o “claims” por su nombre en inglés.

Existe un registro positivo de 256 declaraciones específicas aprobadas por EFSA (409) para determinados ingredientes alimentarios, desde el agua hasta los polifenoles del aceite de oliva (410) o los flavonoles del cacao (411), pasando por las vitaminas y muchos minerales y micronutrientes.

En este caso existe un mecanismo centralizado y canalizado a través de EFSA para la obtención del permiso para transmitir una nueva alegación funcional sobre un determinado ingrediente. Este procedimiento se encuentra definido en el Reglamento 1924/2006 citado anteriormente y se basa en la aportación de evidencia científica sobre la eficacia de dicho ingrediente para la promoción de la salud o la reducción del riesgo de aparición de una enfermedad en humanos. Este procedimiento entró en vigor en el año 2012 con el objetivo de proteger a los consumidores de mensajes publicitarios engañosos y, desde el punto de vista

regulatorio, supuso un hito que marcó la introducción del concepto de eficacia en el sector alimentario. Este concepto tradicionalmente se había centrado exclusivamente en torno a la eficacia de los alimentos.

Independientemente de otras consideraciones que quedan algo alejadas del ámbito del presente trabajo, los más de cien intentos de la industria alimentaria de obtener la aprobación de una declaración funcional para un microorganismo o consorcio concreto de microorganismos han resultado infructuosos. Únicamente los cultivos vivos del yogur o leche fermentada han sido reconocidos con la capacidad de “mejorar la digestión de la lactosa en individuos que tienen dificultad digiriendo la lactosa” (412). Las causas que han llevado a este extremo son múltiples y varían entre: i) posibles errores procedimentales a la hora de comunicar la información a EFSA por parte de la industria, ii) escasa fortaleza científica de los dossiers presentados, y iii) posibles motivos políticos. La situación ha derivado en el extremo de que por la percepción general del término, incluso la palabra “probiótico” se considera una declaración funcional, y se ha prohibido su uso a la industria europea al no estar autorizada por EFSA (413).

Esta situación ha dejado a la pujante industria europea de los probióticos en una posición complicada a la hora de posicionar sus productos en el mercado. Como consecuencia, se buscan estrategias alternativas para la comunicación comercial de los productos con microorganismos.

En el mundo del medicamento la situación es distinta. Como se indicó anteriormente, existen en determinadas jurisdicciones productos basados en microorganismos comercializados como fármacos. De acuerdo con la Directiva 2001/83/CE/CE, un medicamento (414) es

“toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades humanas”

Es de destacar la marcada diferencia con cualquiera de las declaraciones funcionales permitidas para alimentos. Como se ha detallado anteriormente existen determinadas cepas, consorcios de ellas o productos con probióticos que han demostrado su eficacia frente a determinadas indicaciones en programas rigurosos de desarrollo en animales y en humanos. Ante la negativa de las autoridades alimentarias a otorgar declaraciones funcionales a ningún producto

probiótico, algunos miembros de la industria de los probióticos han considerado la posibilidad de desarrollar productos farmacéuticos. Esta ruta regulatoria permite, además, realizar alegaciones de curación o prevención de enfermedad, mucho más potentes desde el punto de vista mercadotécnico. No obstante, como se detallará en la siguiente sección, el camino para el registro de microorganismos vivos en el entorno regulatorio farmacéutico actual plantea múltiples desafíos.

De forma adicional y muy relevante, cada vez se tiene una mayor evidencia del papel potencialmente crucial que las microbiotas asociadas al ser humano tienen en su salud y enfermedad. Este es, de hecho, el principal factor que conduce tanto a la industria, principalmente farmacéutica, aunque también determinados representantes de la alimentaria, y a las distintas agencias del medicamento a interesarse por el desarrollo de microorganismos como nuevos fármacos.

Finalmente, en la parcela de los dispositivos médicos o productos sanitarios hay que considerar la Directiva 93/42/CEE que define producto sanitario (415) como

“cualquier instrumento, dispositivo, equipo, programa informático, material u otro artículo, utilizado sólo o en combinación, incluidos los programas informáticos destinados por su fabricante a finalidades específicas de diagnóstico y/o terapia y que intervengan en su buen funcionamiento, destinado por el fabricante a ser utilizado en seres humanos con fines de:

- diagnóstico, prevención, control, tratamiento o alivio de una enfermedad,
- diagnóstico, control, tratamiento, alivio o compensación de una lesión o de una deficiencia,
- investigación, sustitución o modificación de la anatomía o de un proceso fisiológico,
- regulación de la concepción,

y que no ejerza la acción principal que se desee obtener en el interior o en la superficie del cuerpo humano por medios farmacológicos, inmunológicos ni metabólicos, pero a cuya función puedan contribuir tales medios”.

De dicha definición pueden extraerse dos conclusiones. La primera es que los productos sanitarios pueden ostentar alegaciones de prevención, control,

tratamiento o alivio de una enfermedad. La segunda que los microorganismos, vivos o muertos, no están explícitamente excluidos del alcance de la Directiva, por lo que podrían ser clasificados como productos sanitarios siempre y cuando “no ejerza[n su] acción principal... por medios farmacológicos, inmunológicos ni metabólicos”. La conjunción de estos factores, junto con la negativa del reconocimiento de declaraciones para probióticos en el campo de la alimentación y las dificultades regulatorias en el sector farmacéutico, ha llevado a algunos desarrolladores de microorganismos a seleccionar la ruta de los productos sanitarios alegando que su principal mecanismo de acción era meramente físico y que no se ejercía a través de medios farmacológicos, inmunológicos ni metabólicos. Aun así hay que destacar que como se detallará más adelante, hay en fase de discusión un nuevo marco legal para los productos sanitarios que, a pesar de contemplar la misma definición que el actual para los productos sanitarios, supondrá determinadas modificaciones muy relevantes con respecto a éste (416).

La mayoría de estos productos están destinados al uso tópico vaginal para salud femenina, aunque existen otros ejemplos de microorganismos usados como dispositivos médicos en el mercado europeo. No se han dado casos similares en EEUU. Uno de los ejemplos más conocidos fuera del ámbito ginecológico es un producto combinado con simeticona y la levadura *S. boulardii* para el tratamiento de desórdenes dispépticos, flatulencia e IBS (417). Cabe destacar que la simeticona a su vez también se encuentra regulada de manera discrepante entre EM, poseyendo el estatus de principio activo farmacéutico en algunos, y de producto sanitario, en otros, lo cual está amparado por la legislación europea y las decisiones del TJUE (400). Ambos ingredientes presentan un buen perfil de seguridad por separado. Por ejemplo, ambos son medicamentos no sujetos a prescripción médica en España y la simeticona se encuentra en el listado de “especialidades farmacéuticas publicitarias” (418). Sin embargo, este producto combinado se encuentra registrado como producto sanitario de clase IIa, de riesgo medio debido a la duración temporal de su interacción con el cuerpo humano y su invasividad dentro del organismo (419). Otro producto que recibió el estatus de producto sanitario fue la cepa de *L. johnsonii* EU1 para el tratamiento de la diarrea. En este caso el dispositivo fue clasificado, por los mismos motivos que el anterior, como clase III de riesgo elevado (420).

Como último apunte de esta sección acerca de las declaraciones y alegaciones, cabe destacar la opinión reciente del TJUE acerca de la aplicabilidad de la regulación de estas alegaciones de los productos también al ámbito de las transacciones comerciales entre empresas no limitando su alcance a la venta al público (421).

5.2.3.2.4 Regulación de la aprobación de nuevos alimentos, medicamentos y productos sanitarios en Europa. Aplicación y aplicabilidad a los microorganismos.

En este apartado se debe diferenciar entre la comercialización de un nuevo alimento, de un nuevo producto sanitario o de un medicamento. Comenzando con los nuevos alimentos, hay que recordar que la inmensa mayoría de los microorganismos destinados a consumo o uso humano están registrados en Europa como ingredientes alimentarios o complementos alimenticios. En general la comercialización de un producto alimenticio nuevo en Europa como los que contienen probióticos se realiza mediante la notificación basada en la equivalencia sustancial del producto con otro preexistente. Para ello el producto ha de ser aprobado por las autoridades nacionales competentes que pueden solicitar consejo a EFSA en base a esa equivalencia sustancial. Una vez aprobado, la compañía solicitante ha de comunicar a la Comisión Europea su intención de comercializar el producto según lo establecido en el Reglamento (CE) 258/97 en base a la decisión de un EM (422). Para los productos alimenticios más innovadores, ese mismo Reglamento sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios establece el marco regulatorio para

“la puesta en el mercado en la Comunidad de alimentos y de ingredientes alimentarios que, hasta el momento, no hayan sido utilizados en una medida importante para el consumo humano en la Comunidad, y que estén incluidos en las siguientes categorías: [...] alimentos e ingredientes alimentarios consistentes en microorganismos, hongos o algas u obtenidos a partir de éstos; [...]”

Este texto supone *de facto* que cualquier alimento o ingrediente, incluidos los microorganismos, que no fuera consumido de forma significativa por humanos en la UE con anterioridad al 15 de mayo de 1997 necesita someterse a evaluación por parte de EFSA (423). De acuerdo con ese mismo Reglamento, estos nuevos alimentos han de ser “seguros para el consumidor y correctamente etiquetados para no causar confusión”(422).

En el aspecto de la seguridad, EFSA publicó en 2008 una lista conocida como QPS (por las siglas en inglés de “Qualified Presumption of Safety”) que actualizó en 2013 en la que aparecen en la actualidad un total de ochenta y ocho especies de bacterias y levaduras (424) (ANEXO III). De todas ellas existe suficiente certeza sobre su seguridad para el consumo humano. De acuerdo con lo establecido por EFSA, cualquier cepa identificada como perteneciente a una de estas especies microbianas por el comercializador o desarrollador del alimento está automáticamente considerada como segura. Contrasta esta ligereza en la asunción de la seguridad con la rigidez en otras apreciaciones de EFSA, sobre todo si se tiene presente que entre cepas de la misma especie pueden existir variaciones genómicas con claras repercusiones en la seguridad alimentaria, como por ejemplo la presencia de genes de resistencia a antibióticos.

A pesar de que existe un procedimiento para la solicitud de inclusión de nuevas especies en el listado QPS, los desarrolladores de microorganismos y productos que los contienen están utilizando preferentemente el procedimiento de nuevo alimento o ingrediente alimentario para la comercialización de sus productos. Tales son los casos de los productos lácteos tratados térmicamente fermentados con *Bacteroides xylanisolvens* DSM 23964 (425) o el procedimiento actualmente abierto para el uso de *Mycobacterium aurum*, una bacteria ambiental e intestinal, en leche y derivados, refrescos, panadería y suplementos nutricionales, con el objetivo de restablecer la exposición natural a microorganismos ambientales, una estrategia relacionada desde el punto de vista teórico con la hipótesis de la higiene (426).

El procedimiento de nuevos alimentos y nuevos ingredientes dura una media de tres años y medio. Ha sido ampliamente criticado desde la industria, tanto por su lentitud como por sus costes y por la escasa protección de la innovación que ofrece. De hecho, y según fuentes oficiales (427) entre los años

1997 y 2015 sólo se recibieron ciento ochenta solicitudes, de las cuales únicamente fueron aprobadas ochenta. Esta falta de operatividad llevó a su revisión, que comenzó en 2008 y que culminó con el acuerdo entre el Parlamento Europeo y el Consejo el 25 de noviembre de 2015 (423). El Reglamento entró en vigor el 31 de diciembre de 2016 y se implantará (428) a partir del 1 de enero de 2018. A pesar de su espíritu agilizador hay muchas voces en la industria que se han mostrado escépticas sobre su posible efectividad cuando se implante (429).

En cuanto a los productos sanitarios, el actual entorno legislativo europeo de dispositivos médicos está compuesto por tres textos legales: la Directiva 93/42/CEE relativa a los productos sanitarios (415), la Directiva 90/385/CEE relativa a los productos sanitarios implantables activos (430) y la Directiva 98/79/CE relativa a los productos sanitarios de diagnóstico *in vitro* (431).

La primera de ellas, conocida como la Directiva de los Dispositivos Médicos, es la más relevante en términos de definición del marco regulatorio general. Como se explicó anteriormente, dicha Directiva ha permitido, no sin controversias, el registro de microorganismos y de otros productos, como los extractos de arándanos, como dispositivos médicos en el límite. Esas controversias y la disparidad de criterios que propicia el actual entorno regulatorio son las principales causas por las que las normas sobre los productos sanitarios están en proceso de cambio significativo con el Reglamento de productos sanitarios que está en discusión (416). El primer cambio significativo que introducirá será el unificar todo el marco regulatorio de estos productos en dos textos en lugar de tres. El segundo será permitir que ambos textos tengan la naturaleza de Reglamento en lugar de Directiva, aumentando significativamente el grado de armonización entre EM de la UE. Tras varios giros de redacción, el primero de estos nuevos textos introduce también cambios cualitativos en la regulación de los dispositivos médicos ya que, entre otras cosas, limita el espectro de productos que pueden ser considerados productos sanitarios y explicita, en el Artículo 1 del primer Capítulo de su versión más reciente (septiembre de 2015) que dicho

“Reglamento no será aplicable a: [...]

(b) medicamentos tal y como están definidos en la Directiva 2001/83/CE.

Para la decisión acerca de si un producto se encontraría en el ámbito de la

Directiva 2001/83/CE o en el de este Reglamento [refiriéndose a la propuesta de Reglamento de productos sanitarios], particular atención ha de prestarse al principal mecanismo de acción del producto [...]

(ba) terapias avanzadas cubiertas por el Reglamento 1394/2007 [...]

(f) Productos [...] que contengan o consistan en sustancias u organismos biológicos viables [...] incluyendo microorganismos vivos, bacterias, hongos o virus para conseguir o dar soporte a la funcionalidad del producto”

Es necesario volver a destacar que la propuesta ha sufrido pequeñas modificaciones a lo largo de su historia, algunas de las cuales podrían seguir permitiendo el desarrollo de microorganismos como productos sanitarios. No obstante, la última versión antes descrita fechada el 21 de septiembre de 2015 parece descartar esa posibilidad.

Finalmente, si se considera el marco regulatorio de medicamentos común a nivel europeo, se constata que ha ido desarrollándose desde la década de los 60 del siglo pasado y ha alcanzado un alto nivel de complejidad. Dado lo complejo de la aprobación de medicamentos, el marco regulatorio puede dividirse en los siguientes apartados:

- Mecanismos de autorización para la comercialización, normas de constante supervisión tras su autorización, así como reglas de producción, venta y publicidad de los medicamentos. Se encuentran definidos en la anteriormente mencionada Directiva 2001/83/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano y en el Reglamento (CE) 726/2004 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos (432).
- Otras normas específicas para ciertos tipos de medicamentos o áreas terapéuticas concretas. En este caso hay que considerar los medicamentos huérfanos cuyas peculiaridades se encuentran reguladas por el Reglamento (CE) 141/2000 (433), los medicamentos pediátricos, enmarcados en el Reglamento (CE) 1901/2006 (434), los medicamentos de terapia avanzada, cuyas particularidades están reguladas en el

Reglamento (CE) 1394/2007 (435) y los medicamentos tradicionales a base de plantas, reguladas por la Directiva 2004/24/CE (436).

- Ensayos clínicos, es decir, las investigaciones en humanos destinadas a descubrir o verificar los efectos de medicamentos de forma previa a su autorización, regulados por el recientemente aprobado Reglamento (UE) 536/2014 (437).

Existen otros textos y guías, con distinto nivel de carácter vinculante, emitidos por distintas autoridades para clarificar aspectos concretos del desarrollo y registro de fármacos a nivel comunitario o nacional.

Por otra parte, es muy relevante destacar que, atendiendo a criterios de autoridad competente, existen tres procedimientos distintos para la obtención de la autorización de comercialización de medicamentos (438). El procedimiento clásico y aún vigente, que posibilita la comercialización de un medicamento en un único EM, es el conocido como procedimiento nacional. Esta es la ruta regulatoria que siguieron todos los medicamentos aprobados en los países europeos antes del año 1998 por parte de sus respectivas AN. En la práctica, actualmente se utiliza como primer paso en los procedimientos de reconocimiento mutuo y reconocimiento descentralizado, respectivamente. Estos dos mecanismos son facilitadores de la aprobación de medicamentos en diferentes EM. El primero de ellos, el reconocimiento mutuo, es aplicable a la mayoría de los productos farmacéuticos convencionales y se basa en el principio de reconocimiento de una autorización de comercialización ya existente en un EM por parte de otro EM. Desde el 1 de enero de 1998 este procedimiento es obligatorio para todos los medicamentos que busquen ser comercializados en un país diferente al de su autorización inicial (denominado EM de referencia). Es un procedimiento relativamente rápido por el que la autorización de un medicamento por parte de un EM se aplica de forma automática a otros EM, ya que por lo dispuesto en la Directiva 2001/83/CE

“cada Estado miembro aceptará la primera autorización de comercialización concedida por el Estado miembro de referencia [salvo que] consider[e] que existen motivos para pensar que la autorización de comercialización del medicamento puede presentar un riesgo para la salud pública”.

En caso de falta de acuerdo entre los EM con respecto a la decisión se pone en marcha un procedimiento arbitrado por la EMA y similar al de reconocimiento centralizado. En la práctica es utilizado para obtener autorizaciones de comercialización de medicamentos ya aprobados en un país para diferentes países.

Finalmente, el reconocimiento descentralizado fue introducido por la Directiva 2004/27/CE (439), que modificaba la Directiva 2001/83/CE. Como en el caso del reconocimiento mutuo, se basa en el principio de reconocimiento de las respectivas agencias nacionales (AN) de las decisiones de agencias de diferentes países. En la práctica se utiliza para la obtención de la autorización de comercialización de un medicamento nuevo, no aprobado previamente por ningún EM. Es, de hecho, un procedimiento muy similar al de reconocimiento mutuo antes descrito.

Puede existir un cuarto tipo de sistema de autorización llamado procedimiento centralizado, cuya estructura actual esté descrita en el Reglamento 726/2004 por el que se creó la EMA (432). Este procedimiento, que empezó a funcionar en 1995, permite al solicitante obtener la autorización de comercialización de un medicamento para todos los EM mediante una sola solicitud ante la EMA. Es un procedimiento obligatorio para determinados tipos de fármacos y opcional para otros. Los que pueden acogerse de forma opcional al mismo son, según el Artículo 3 (2) de ese Reglamento, todos aquellos principios activos no autorizados con anterioridad al 20 de mayo de 2004 (fecha de la entrada en vigor del Reglamento 726/2004) o para productos que “constituy[an] una innovación significativa desde el punto de vista terapéutico, científico o técnico, o [cuya] concesión de una autorización [...] present[e] para los pacientes [...] un interés en el ámbito comunitario”. En estos casos la decisión acerca del procedimiento reside en el solicitante de autorización (440).

Por su parte, el Artículo 3 (1) de ese Reglamento define los productos que deben obligatoriamente acogerse al procedimiento centralizado, remitiéndose al Anexo I del mismo documento, que especifica:

“Medicamentos desarrollados por medio de uno de los siguientes procesos biotecnológicos:

- tecnología de ADN recombinante, expresión controlada de genes codificantes de proteínas biológicamente activas en procariotas y eucariotas incluidas células de mamífero transformadas, hibridoma y anticuerpos monoclonales”
- Medicamentos para uso humano con un nuevo principio activo que, a la fecha de entrada en vigor de este Reglamento, no se encontraba autorizado en la Comunidad, y para el que la aplicación terapéutica es el tratamiento de cualquiera de las siguientes enfermedades: SIDA, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, y con efecto desde el 20 de mayo de 2008 enfermedades autoinmunes y otras disfunciones inmunes y enfermedades víricas.
- Medicamentos designados como Medicamentos Huérfanos”.

Este procedimiento centralizado supone el envío de una única solicitud a la EM y la revisión única por parte del CHMP (por su acrónimo en inglés). Permite la comercialización en todos los EM y es preferido por los solicitantes por la simplificación que supone. En última instancia la elegibilidad de un medicamento para el mismo es decidida caso por caso por parte de las autoridades.

Como ya se ha adelantado, el principal texto del marco regulatorio europeo es la Directiva 2001/83/CE, que regula “los medicamentos para uso humano producidos industrialmente y destinados a ser comercializados en los Estados miembros”. En su Artículo 6 (1) establece la necesidad de todo medicamento nuevo de obtener una autorización para su comercialización y en los Artículos 8, 10, 11 y Anexo I, que se analizarán más adelante, marcan el procedimiento para obtener dicha autorización y la información a presentar para la su obtención. Además, esta Directiva establece las bases legales de los distintos procedimientos existentes para solicitar la autorización de comercialización en sus artículos 8 (3) y 10. El Artículo 8 hace referencia al Anexo I en términos de documentación a presentar a la hora de solicitar la autorización para un nuevo medicamento, también conocida como solicitud completa. Excluyendo los meramente administrativos y legales, estos requisitos son los siguientes:

“ [...]

b) denominación del medicamento;

c) composición cualitativa y cuantitativa de todos los componentes del medicamento, de acuerdo con la terminología ordinaria, excluyendo las fórmulas químicas empíricas, y con la denominación común internacional recomendada por la Organización Mundial de la Salud, cuando exista tal denominación;

d) descripción del modo de fabricación;

e) indicaciones terapéuticas, contraindicaciones y reacciones adversas;

f) posología, forma farmacéutica, modo y vía de administración y período o plazo de validez previsto;

g) si ha lugar, las razones por las cuales han de tomarse medidas de precaución o de seguridad al almacenar el medicamento, al administrarlo a los pacientes y al eliminar los productos residuales, junto con la indicación de cualquier riesgo potencial que presente el medicamento para el medio ambiente;

[...]

i) resultado de las pruebas:

- fisicoquímicas, biológicas o microbiológicas;
- toxicológicas y farmacológicas;
- clínicas; [...]"

El Artículo 10 regula las solicitudes genéricas, biosimilares e híbridas. De acuerdo con este artículo un solicitante no necesita proporcionar información preclínica ni clínica si puede demostrar que su medicamento es un genérico de otro medicamento de referencia con una antigüedad de comercialización no inferior a ocho años en algún EM. Define medicamento genérico como

“todo medicamento que tenga la misma composición cualitativa y cuantitativa en sustancias activas y la misma forma farmacéutica, y cuya bioequivalencia con el medicamento de referencia haya sido demostrada por estudios adecuados de biodisponibilidad”

En cualquier caso, ningún producto queda exento de los requisitos de calidad. Según el Artículo 10(3), introducido por la Directiva 2004/27/CE, se definen los medicamentos que no puedan estrictamente ser incluidos

“en la definición de medicamento genérico [...] o cuando la bioequivalencia no pueda ser demostrada por medio de estudios de biodisponibilidad o en caso de que se modifiquen las sustancias activas, las indicaciones terapéuticas, la dosificación, la forma farmacéutica o la vía de administración con respecto a las del medicamento de referencia, deberán facilitarse los resultados de los ensayos preclínicos y clínicos adecuados.”

Estas solicitudes suelen justificarse parcialmente en datos del medicamento de referencia y en datos preclínicos y clínicos nuevos. Reciben el nombre de solicitudes híbridas.

El Artículo 10 *bis* (conocido como 10a en el texto en inglés), por la modificación de la Directiva 2001/83/CE por parte de la Directiva 2004/27, establece de manera análoga a lo anterior que

“el solicitante no tendrá obligación de facilitar los resultados de los ensayos preclínicos y clínicos si puede demostrar que las sustancias activas del medicamento han tenido un uso médico bien establecido al menos durante diez años dentro de la Comunidad y presentan una eficacia reconocida, así como un nivel aceptable de seguridad”.

Este concepto, ligeramente diferente del de medicamento genérico, es conocido como uso médico bien o claramente establecido. El Artículo 11 detalla la información a proporcionar acerca de las características del producto (no se detalla la información legal-administrativa ni la relativa a otros productos como radiofármacos):

[...]

- 1) denominación del medicamento;
- 2) composición cualitativa y cuantitativa en sustancias activas y en componentes del excipiente cuyo conocimiento sea necesario para una buena administración del medicamento; se emplearán las denominaciones comunes o las denominaciones químicas;
- 3) forma farmacéutica;
- 4) propiedades farmacológicas y, en la medida en que dichas informaciones sean útiles para la utilización terapéutica, elementos de farmacocinética;
- 5) informaciones clínicas:

- 5.1. informaciones terapéuticas,
 - 5.2. contraindicaciones,
 - 5.3. reacciones adversas (frecuencia y gravedad),
 - 5.4. precauciones particulares de empleo, [...]
 - 5.5. utilización en caso de embarazo y lactancia,
 - 5.6. interacciones con otros medicamentos y otras formas de interacción,
 - 5.7. posología y modo de administración para adultos y, en la medida en que ello sea necesario, para niños,
 - 5.8. sobredosis (síntomas, socorros de urgencia, antídotos),
 - 5.9. advertencias especiales,
 - 5.10. efectos sobre la capacidad de conducir y de usar máquinas;
- 6) informaciones farmacéuticas:
- 6.1. incompatibilidades mayores,
 - 6.2. duración, si fuera necesario tras la reconstitución del medicamento o cuando el acondicionamiento primario sea abierto por primera vez,
 - 6.3. precauciones particulares de conservación,
 - 6.4. naturaleza y contenido del acondicionamiento primario,
 - 6.5. precauciones especiales para eliminar medicamentos no utilizados o en su caso, residuos derivados de dichos medicamentos; [...]"

La modificación de esta Directiva por la Directiva 2004/27 introdujo además, en el Artículo 2, que

“en caso de duda, cuando, considerando todas las características de un producto, éste pueda responder a la definición de medicamento y a la definición de producto contemplada por otras normas comunitarias, se aplicará la presente Directiva”

Este apartado es de especial relevancia para los microorganismos como fármacos, dada la discrepancia regulatoria con respecto a ellos entre distintos EM. De hecho, en la Sentencia de 3/10/2013 respectiva al caso de Laboratoires Lyocentre (Asunto C-109/12) antes citado, el TJUE aludió a este Artículo para justificar su decisión. En ella se define “sustancia” como

“cualquier materia, sin distinción de origen, pudiendo ser éste:

- humano, como: la sangre humana y sus productos derivados;

- animal, como: los microorganismos, animales enteros, partes de órganos, secreciones animales, toxinas, sustancias obtenidas por extracción, productos derivados de la sangre;
- vegetal, como: los microorganismos, plantas, partes de plantas, secreciones vegetales, sustancias obtenidas por extracción;
- químico, como: los elementos, materias químicas naturales y productos químicos de transformación y de síntesis”

Define también “medicamento inmunológico” como

“todo medicamento consistente en vacunas, toxinas, sueros y alérgenos:

a) las vacunas, toxinas o sueros, que comprenden en particular:

- i) los agentes utilizados para provocar una inmunidad activa como la vacuna anticolérica, el BCG, la vacuna antipoliomelítica, la vacuna antivariólica;
- ii) los agentes utilizados para diagnosticar el estado de inmunidad, en particular la tuberculina y la tuberculina PPD, las toxinas utilizadas en los tests de Schick y de Dick, la brucelina;
- iii) los agentes utilizados para provocar una inmunidad pasiva, como la antitoxina diftérica, la globulina antivariólica, la globulina antilinfocítica;

b) los productos alérgicos comprendiendo cualquier medicamento destinado a detectar o provocar una alteración adquirida y específica en la respuesta inmunológica a un agente alergizante”

Sus Artículos 70 y 71 establecen que corresponde a las autoridades competentes

“especifica[r] la clasificación del mismo como: medicamento sujeto a receta médica [o] medicamento no sujeto a receta médica”, estipulando que “los medicamentos estarán sujetos a receta médica cuando:

- puedan presentar un peligro, directa o indirectamente, incluso en condiciones normales de uso, si se utilizan sin control médico, o
- se utilicen frecuentemente, y de forma muy considerable, en condiciones anormales de utilización, y ello pueda suponer, directa o indirectamente, un peligro para la salud, o

- contengan sustancias o preparados a base de dichas sustancias, cuya actividad y/o reacciones adversas sea necesario estudiar más detalladamente, o
- se administren por vía parenteral, salvo casos excepcionales, por prescripción médica.

[...]

- que el medicamento contenga [...] una sustancia clasificada como estupefaciente o psicotropo [...] o
- que el medicamento pueda ser objeto, en caso de utilización anormal, de riesgo considerable de abuso medicamentoso, pueda provocar tóxicodependencia o ser desviado para usos ilegales, o
- que el medicamento contenga una sustancia que, por su novedad o propiedades, pudiera considerarse como perteneciente al grupo contemplado en el segundo guion, como medida de precaución.

[...]

- que el medicamento, a causa de sus características farmacológicas o por su novedad, o por motivos de salud pública, se reserve para tratamientos que sólo pueden seguirse en medio hospitalario, que el medicamento se utilice en el tratamiento de enfermedades que deban ser diagnosticadas en medio hospitalario, o en establecimientos que dispongan de medios de diagnóstico adecuados, aunque la administración y seguimiento pueda realizarse fuera del hospital, o
- que el medicamento esté destinado a pacientes ambulatorios, pero cuya utilización pueda producir reacciones adversas muy graves, lo cual requiere, si es preciso, una receta médica extendida por un especialista y una vigilancia especial durante el tratamiento”.

Como se indicó anteriormente, los Artículos 8, 10, 11, junto con el Anexo I, establecen la información que el solicitante de una autorización para comercialización de un medicamento ha de presentar a las autoridades competentes. El Anexo I contiene

“secciones de carácter general, cuyas disposiciones se aplican a todas las categorías de medicamentos a las que se añaden secciones que definen disposiciones especiales adicionales aplicables a los radiofármacos y a los

medicamentos biológicos [...].Las disposiciones especiales adicionales para medicamentos biológicos se aplicarán también a los medicamentos obtenidos mediante los procedimientos mencionados en la parte A y en el primer guion de la parte B del Anexo del Reglamento (CEE) no 2309/93 del Consejo". [Este Reglamento fue derogado por el Reglamento 726/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos]"

Establece, en primer lugar, la obligatoriedad de incluir en el dossier del medicamento

"toda la información útil para la evaluación del medicamento, tanto si resulta favorable al producto como si no. En particular, se proporcionarán todos los datos pertinentes sobre toda prueba o ensayo, farmaco-toxicológico o clínico, incompleto o abandonado en relación con el medicamento".

El grueso de su texto se centra en detallar minuciosamente la estructura, forma de presentación y contenido del expediente a presentar a la hora de solicitar la autorización de un nuevo medicamento. Las grandes secciones de ese expediente son el resumen del expediente, las pruebas químicas, farmacéuticas y biológicas, las pruebas toxicológicas y farmacológicas y la documentación clínica. Cada una de estas secciones contiene múltiples apartados y matizaciones que aparecen en el **ANEXO IV**.

En cuanto a los medicamentos biológicos, hay que destacar que no existe una definición concreta y específica de medicamentos biológicos. La más precisa es la que aparece en la Directiva 2003/63/CE/CE, que modificaba la Directiva 2001/83/CE, que define "medicamento biológico" como

"un producto cuyo principio activo es biológico. Una sustancia biológica es aquella que se produce o se extrae a partir de una fuente biológica y que necesita, para su caracterización y determinación de su calidad, una combinación de ensayos físico-químico y biológico junto con el proceso de producción y su control".

Según este documento los biológicos abarcan, sin limitarse a:

- medicamentos inmunológicos: “todo medicamento consistente en vacunas, toxinas, sueros y alergenos:

a) las vacunas, toxinas o sueros, que comprenden en particular:

i) los agentes utilizados para provocar una inmunidad activa como la vacuna anticolérica, el BCG, la vacuna antipoliomelítica, la vacuna antivariólica;

ii) los agentes utilizados para diagnosticar el estado de inmunidad, en particular la tuberculina y la tuberculina PPD, las toxinas utilizadas en los tests de Schick y de Dick, la brucelina;

iii) los agentes utilizados para provocar una inmunidad pasiva, como la antitoxina diftérica, la globulina antivariólica, la globulina antilinfocítica;

b) los productos alergénicos comprendiendo cualquier medicamento destinado a detectar o provocar una alteración adquirida y específica en la respuesta inmunológica a un agente alergizante”

- medicamentos derivados de sangre y plasma humanos: “medicamentos a base de constituyentes sanguíneos preparados industrialmente por establecimientos públicos o privados; dichos medicamentos comprenden, en particular, albúmina, factores de coagulación e inmunoglobulinas de origen humano”

- Medicamentos en el ámbito de la Parte A del Anexo del Reglamento 2309/93 (derogado por el Reglamento 726/2004):

“1. Medicamentos de uso humano desarrollados por medio de uno de los siguientes procesos biotecnológicos:

– técnica del ADN recombinante

– expresión controlada de codificación de genes para las proteínas biológicamente activas en procariotas y eucariotas, incluidas las células de mamífero transformadas

– métodos del hibridoma y del anticuerpo monoclonal.

[...]

3. Medicamentos de uso humano que contengan una sustancia activa nueva que, en la fecha de entrada en vigor del presente Reglamento, no estuviera autorizada en la Comunidad y cuya indicación terapéutica sea el tratamiento de alguna de las enfermedades siguientes:

- el síndrome de inmunodeficiencia adquirida
- el cáncer
- los trastornos neurodegenerativos
- la diabetes,
- las enfermedades autoinmunes y otras disfunciones inmunes
- las enfermedades víricas.

4. Los medicamentos designados como medicamentos huérfanos de conformidad con el Reglamento (CE) no 141/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 1999.”.

- Los medicamentos de terapia avanzada, definidos en la Parte IV de esa Directiva (2003/63/CE) como aquéllos que “se basan en procesos de fabricación que se basan en diversas moléculas biológicas producidas por transferencia genética y/o en células terapéuticas modificadas biológicamente avanzadas como sustancias activas o parte de las mismas”.

En el caso de los medicamentos de terapia avanzada, el Reglamento (CE) 1394/2007 “establece normas específicas para la autorización, la supervisión y la farmacovigilancia de los medicamentos de terapia avanzada”. Adicionalmente a la definición de la Directiva 2003/63/CE antes citada, este Reglamento establece:

“Por «medicamento de terapia avanzada» se entenderá:

- un medicamento de terapia génica, tal como se define en el anexo I, parte IV, de la Directiva 2001/83/CE/CE, [texto que por su modificación sufrida (441)por la Directiva 2009/120/CE, define medicamento de terapia génica como “un medicamento biológico con las características siguientes:
 - a) incluye un principio activo que contiene un ácido nucleico recombinante, o está constituido por él, utilizado en seres humanos, o administrado a los mismos, con objeto de regular, reparar, sustituir, añadir o eliminar una secuencia génica;
 - b) su efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico depende directamente de la secuencia del ácido nucleico recombinante que contenga, o del producto de la expresión genética de dicha secuencia.

Los medicamentos de terapia génica no incluyen las vacunas contra enfermedades infecciosas.”]

– un medicamento de terapia celular somática, tal como se define en el anexo I, parte IV, de la Directiva 2001/83/CE/CE, [texto que, por su modificación sufrida (441) por la Directiva 2009/120/CE, define medicamento de terapia celular somática como “un medicamento biológico con las características siguientes:

- a) contiene células o tejidos, o está constituido por ellos, que han sido objeto de manipulación sustancial de modo que se hayan alterado sus características biológicas, funciones fisiológicas o propiedades estructurales pertinentes para el uso clínico previsto, o por células o tejidos que no se pretende destinar a la misma función esencial en el receptor y en el donante;
- b) se presenta con propiedades para ser usado por seres humanos, o administrado a los mismos, con objeto de tratar, prevenir o diagnosticar una enfermedad mediante la acción farmacológica, inmunológica o metabólica de sus células o tejidos.

A efectos de la letra a), no se considerarán manipulaciones sustanciales las enumeradas en concreto en el anexo I del Reglamento (CE) no 1394/2007.” {Dicho anexo cita las siguientes manipulaciones: Corte, trituración, moldeo, centrifugación, imbibición en disoluciones antibióticas o antimicrobianas, esterilización, irradiación, separación, concentración o purificación celular, filtrado, liofilización, congelación, criopreservación, vitrificación.}]

– un producto de ingeniería tisular [...]: que contiene o está formado por células o tejidos manipulados por ingeniería, y del que se alega que tiene propiedades, se emplea o se administra a las personas para regenerar, restaurar o reemplazar un tejido humano. Un producto de ingeniería tisular podrá contener células o tejidos de origen humano, animal, o ambos. Las células o tejidos podrán ser viables o no. Podrá también contener otras sustancias, como productos celulares, biomoléculas, biomateriales, sustancias químicas, soportes o matrices.”

En cuanto a los medicamentos huérfanos, desde el año 1983 en EEUU, 1993 en Japón y 2000 en Europa, existen marcos regulatorios específicos para medicamentos y diagnósticos destinados a afecciones poco frecuentes, y que históricamente han sido poco atendidas por la industria farmacéutica por sus elevados costes de desarrollo y reducido número de pacientes. Son las llamadas enfermedades huérfanas y medicamentos huérfanos, respectivamente. En el caso europeo, este marco está definido en el Reglamento 141/2000. Este texto, que prevé importantes incentivos para los desarrolladores de este tipo de medicinas, establece que un medicamento puede ser declarado “huérfano” si su promotor puede demostrar que dicho producto:

“a) se destina [...] una afección que ponga en peligro la vida o conlleve una incapacidad crónica y que no afecte a más de cinco personas por cada diez mil en la Comunidad en el momento de presentar la solicitud; o [...] una afección que ponga en peligro la vida o conlleve grave incapacidad, o de una afección grave y crónica, y que resulte improbable que, sin incentivos, la comercialización de dicho medicamento en la Comunidad genere suficientes beneficios para justificar la inversión necesaria;

y

b) que no existe ningún método satisfactorio autorizado en la Comunidad, de diagnóstico, prevención o tratamiento de dicha afección, o que, de existir, el medicamento aportará un beneficio considerable a quienes padecen dicha afección.”

Para el caso de los medicamentos pediátricos, el Reglamento 1901/2006 tiene como objetivo facilitar el desarrollo y la accesibilidad de medicamentos a la población pediátrica, entre el nacimiento y los 18 años, así como adecuar estos fármacos a dicho grupo en términos de seguridad y eficacia, por ejemplo, en lo relativo a la dosificación, sin someter a la población pediátrica a ensayos clínicos o de otro tipo innecesarios. Finalmente, en el caso de los medicamentos tradicionales a base de plantas, la Directiva 2004/24 modificó a la Directiva 2001/83/CE en lo relativo a medicamentos tradicionales a base de plantas, que

“cuentan con una larga tradición, pero no reúnen los requisitos de un uso farmacológico experimentado [...] por lo cual no se les puede conceder la autorización de comercialización.”

Para mantener esos productos en el mercado, esta Directiva estableció un procedimiento especial de registro simplificado para determinados medicamentos tradicionales cuya larga tradición de uso permite deducir su eficacia, reduciendo la necesidad de ensayos clínicos y su seguridad, y haciendo innecesarias las pruebas preclínicas. Estos hechos han de ser demostrados por el solicitante aportando literatura científica publicada

Esta Directiva introdujo las definiciones de:

- Medicamento a base de plantas: “cualquier medicamento que contenga exclusivamente como sustancias activas una o varias sustancias vegetales o uno o varios preparados vegetales, o una o varias sustancias vegetales en combinación con uno o varios preparados vegetales”
- Sustancias vegetales: “todas las plantas [...], las partes de plantas, algas, hongos y líquenes no tratados, normalmente en forma seca pero a veces frescos”
- Medicamento tradicional a base de plantas: “medicamento a base de plantas que cumpla [los requisitos para un procedimiento de registro simplificado (ver más abajo)]”
- Producto equivalente: [...] “se caracteriza por contener las mismas sustancias activas, independientemente de los excipientes utilizados, tener la misma o similar finalidad, poseer una posología o dosis equivalente y la misma o similar vía de administración que los del medicamento objeto de la solicitud”

Este procedimiento de registro simplificado, análogo al de los genéricos, biosimilares y medicamentos con uso médico bien establecido y regulado por el Artículo 16bis y siguientes de la Directiva 2001/83/CE, es aplicable a

“los medicamentos a base de plantas que cumplan los requisitos siguientes:

- a) que tengan indicaciones apropiadas exclusivamente para medicamentos tradicionales a base de plantas que, por su composición y finalidad, estén

destinados y concebidos para su utilización sin el control de un facultativo médico a efectos de diagnóstico o de prescripción o seguimiento de un tratamiento;

b) que se administren exclusivamente de acuerdo con una dosis o posología determinada;

c) que se trate de preparados para uso por vía oral, externo o por inhalación;

d) que haya transcurrido el período de uso tradicional [mínimo de 30 años anteriormente a la fecha de la solicitud, de los cuales al menos 15 años en la Comunidad];

e) que la información sobre el uso tradicional del medicamento sea suficiente, en particular que el producto demuestre no ser nocivo en las condiciones de uso especificadas y la acción farmacológica o la eficacia del medicamento se puedan deducir de su utilización y experiencia de larga tradición”

Este procedimiento, entre otros requerimientos, solicita principalmente

“referencias bibliográficas [...] en l[a]s que se demuestre que el medicamento en cuestión o un producto equivalente ha tenido un uso farmacológico durante un período mínimo de 30 años anteriormente a la fecha de la solicitud, de los cuales al menos 15 años en la Comunidad. [El Apartado 4 del Artículo 16 *quater* recoge supuestos especiales para productos con historia de comercialización en la Comunidad menor a quince años pero que cumplan el resto de los requisitos, que pasan por la elaboración de monografías].”

Con objeto de hacer más fácil el registro de determinados medicamentos tradicionales a base de plantas y de ampliar la armonización, esta Directiva se apoya de forma importante en la creación de documentos elaborados por un Comité de medicamentos a base de plantas (HMPC, por su acrónimo en inglés) cuya creación también se contempla en el texto. Estos documentos son:

- Listas comunitarias de sustancias y preparados vegetales y combinaciones de ellos que cuentan con un uso farmacológico durante un tiempo suficientemente largo, y en las que figuran la indicación, la

dosis y la posología especificadas, la vía de administración y cualquier otra información necesaria para un uso seguro de la sustancia vegetal como medicamento tradicional

- Monografías comunitarias sobre plantas medicinales para los medicamentos a base de plantas
- La exención de presentación de documentación preclínica y clínica, así como la posibilidad de aprobación por reconocimiento mutuo también quedan supeditadas a la inclusión de las plantas o sustancias en estas listas y monografías. En cualquier caso, ningún producto queda exento de los requisitos de calidad.

El HMPC comenzó a elaborar una lista que amplía periódicamente (442). También ha publicado hasta la fecha más de ciento ochenta monografías (443) sobre sustancias y preparados vegetales. La diferencia entre ambas radica en que, mientras que las monografías son opiniones científicas no vinculantes acerca de la seguridad, la eficacia y el uso de sustancias vegetales, la lista es un documento vinculante que ha de ser aceptado por todas las autoridades comunitarias a la hora de otorgar una autorización de comercialización de un medicamento a base de plantas. La solicitud de una sustancia vegetal reflejada en una lista es, por tanto, más sencilla que la de una sustancia vegetal para la que únicamente existe una monografía, al no tener la primera que presentar documentación o bibliografía relativa al uso médico o tradicional de esa sustancia.

Esto es relevante para los microorganismos. porque el HMPC hizo un requerimiento de información científica a todas las partes interesadas en el año 2014, para incluir la levadura *S. cerevisiae/S. boulardii* como una entrada en la lista comunitaria y/o para la elaboración de una monografía para ella (444). Cualquiera de esas dos acciones, especialmente la primera, facilitaría el registro de productos con *S. boulardii* como medicamentos en los distintos países de la Unión.

Existen otros documentos de relevancia más práctica para la industria que legislativa. Por ejemplo la monografía que la Farmacopea Europea está elaborando para los LBP. Aunque todavía no se conocen sus contenidos al ser por el momento confidencial, a buen seguro este trabajo tendrá un impacto en el entorno farmacéutico europeo al recoger este tipo de productos por primera vez en un documento oficial.

Como se mencionó antes hay guías, especialmente en términos de calidad de producto, tanto a nivel nacional, europeo e internacional que pueden ser relevantes para determinados aspectos del desarrollo de microorganismos como fármacos. La FDA americana publicó en septiembre de 2010 un documento, que actualizó en febrero de 2012, denominado “Guía para la industria sobre ensayos clínicos tempranos” con LBP (445), en el que establece recomendaciones no vinculantes y particularmente centradas en aspectos de calidad para los solicitantes de permisos para la realización de ensayos clínicos IND (siglas en inglés de “Investigational New Drug”) con LBP en EEUU. Tal y como especifica la propia Agencia, este documento también es relevante para “LBP legalmente comercializados como alimentos, convencionales o complementos alimenticios, [siempre y cuando los estudios con ellos no estén dirigidos a] evaluar su capacidad para modificar la estructura o alguna función del cuerpo”, en cuyo caso entrarían dentro de la legislación aplicable a alimentos aspirando a una declaración funcional. No obstante, destaca que la exención de IND no aplicaría si el uso que se pretende hacer del alimento es propio de un medicamento (diagnosticar, curar, mitigar, tratar o prevenir una enfermedad). También detalla que bajo la sección 201 (ff)(3)(B)(ii) de la FDA Act (446), si un complemento alimenticio o alimento comercializado con anterioridad se investiga como fármaco bajo un IND puede seguir comercializándose independientemente de la investigación bajo IND.

A pesar de no ser aplicable en la legislación europea, este documento tiene una gran importancia por ser el primero específicamente generado para los LBP a nivel mundial, y es utilizado como apoyo por otras agencias, incluyendo la europea, para la elaboración de guías o textos regulatorios relativos a estos productos. Un aspecto muy relevante de la Guía es la definición que establece para LBP:

“producto biológico que: 1) contiene organismos vivos, como bacterias; 2) es aplicable para la prevención, tratamiento o cura de una enfermedad o condición de seres humanos y 3) no es una vacuna”.

Excluye específicamente virus filtrables, bacterias oncolíticas y terapias génicas y aclara que estos productos son “generalmente no administrados mediante inyección”. Pone como ejemplo de LBP un producto con “una o más

cepas de lactobacilos administrados de forma oral para tratar pacientes con colitis ulcerosa, o administrados vaginalmente para prevenir la vaginosis bacteriana". Adicionalmente a esta definición, la Guía proporciona ejemplos de LBP, dosis, formas de administración, mecanismos de acción, áreas terapéuticas de aplicación y poblaciones-diana:

"microorganismos aislados de hospedadores humanos, y/o modificados para poseer funciones o características mejoradas. Las dosis y rutas de administración pueden variar desde preparaciones con la apariencia de un alimento o una bebida tradicional o aplicadores vaginales. Los mecanismos de acción propuestos son generalmente la interferencia con el crecimiento de un microorganismo patógeno o potencialmente patógeno en el cuerpo o la estimulación de procesos celulares potencialmente beneficiosos como resultado de su permanencia transitoria y/o de su colonización a largo plazo con los microorganismos contenidos en el LBP. Los objetivos de las investigaciones varían entre prevención o tratamiento, o como terapia única o adjunta con otra terapia (antimicrobiana, por ejemplo). Por ejemplo, indicaciones potenciales incluyen el tratamiento de vaginosis bacteriana en combinación con antibióticos, la prevención de la enterocolitis necrotizante, prevención de la rinitis alérgica y el mantenimiento de la remisión de la pouchitis aguda. Las poblaciones de estudio varían desde neonatos prematuros a adultos mayores, y desde individuos sanos en riesgo de una enfermedad a individuos afectados con condiciones o enfermedades precisas".

También especifica la definición para LBP recombinante:

"LBP compuesto de microorganismos que han sido modificados genéticamente mediante la adición, delección o modificación deliberada de material genético. Es probable que [estos productos] requieran consideraciones adicionales y que por ello tengan que información adicional con su solicitud IND".

Con respecto a aspectos de calidad, establece la necesidad de describir el LBP por sus características físicas, químicas o biológicas, incluyendo:

- "Nombre biológico y designación de cepa

- Fuente original de las células a partir de las cuales el medicamento se desarrolló
- Historia de cultivo de las cepas. Si las cepas fueron obtenidas de un espécimen clínico, una descripción de la salud clínica del/de los donante(s), si se conoce (mera obtención de un proveedor comercial no es adecuado)
- Resumen del fenotipo y genotipo de las cepas del producto, con especial atención a la actividad biológica o loci genéticos que puedan indicar actividad o potencia; y
- Documentación y resumen de las modificaciones, si las hubiera, [realizadas] al LBP, ej. introducción intencionada de genes foráneos o mutaciones, junto con detalles de la construcción genética"

Además incide en la necesidad de caracterizar el principio activo, incluyendo

“una descripción de los límites aceptables y métodos analíticos usados para asegurar la identidad, potencia, calidad y pureza de la sustancia medicamentosa [como los siguientes]:

- Identificación de las células utilizadas para el establecimiento del Banco de Células (MCB), [...] al nivel e especie y de cepa. Recomienda uso de dos métodos complementarios de identificación, por ejemplo bioquímica y genética.
- Determinación de las concentraciones mínimas inhibitorias o bactericidas para un panel de antibióticos propuestos por el investigador y determinar si las cepas de producto son sensibles o resistentes a [ellos]. Puede ser necesario el diseño de un ensayo para determinar si, o hasta qué punto, la resistencia antibiótica es transmisible desde el producto a flora microbiana relevante. Cuando se haya introducido intencionalmente una resistencia antibiótica en la(s) cepa(s) del producto para la selección o el mantenimiento de modificaciones genéticas, debe discutirse la necesidad de dicho gen y posibles enfoques alternativos.
- Deben proporcionarse los métodos empleados para atenuar cepas de otro modo virulentas, así como documentación acerca de la estabilidad de dicha atenuación.

- Si la habilidad de la la(s) cepa(s) del producto de cruzar la barrera mucosa es un punto de preocupación crítico, debe usarse un ensayo reproducible para translocación, preferentemente en un modelo animal adecuado, como animales libres de gérmenes para productos orales.
- Si el mecanismo de acción del producto es conocido, debe acompañarse el IND con datos que [lo] sustenten. Investigar el mecanismo de acción puede ser valioso para desarrollar criterios de calidad. Por ejemplo, si se identifican un número limitado de genes que puedan ser indicadores de la potencia, se recomienda investigar la estabilidad genética de esos genes.

[...]

Especificaciones de la sustancia medicamentosa: deben proporcionarse las especificaciones preliminares los tests para cada sustancia medicamentosa, que deben incluir, sin limitarse a: identidad, pureza, contaminación microbiológica [según la US Pharmacopoeia 31 USP <61>], potencia y/o medidas bioquímicas o fisicoquímicas que se piense que puedan predecir la potencia y, cuando proceda, medidas de estabilidad. Se recomienda incluir límites superiores e inferiores de variabilidad, así como una justificación para la elección de dichos límites. Es probable que las especificaciones se hagan más estrictas cuando se gane experiencia en el proceso de producción y de forma previa a los primeros estudios para la licencia.

La identidad de cada cepa microbiana presente en la sustancia medicamentosa [...] determinada usando un ensayo específico y reproducible. El testeo puede basarse en métodos bioquímicos como perfiles de fermentación, o genotípicos, incluyendo aquellos como *ribotyping*, RFLP, o ambos. Adicionalmente, si uno o más loci genéticos, tanto naturales como fruto de ingeniería, han sido identificados como críticos para la actividad biológica, se recomienda el desarrollo de un ensayo específico.

La potencia de productos microbianos vivos se mide generalmente como células viables por unidad o dosis, es decir, ufc. Medidas adicionales de la potencia del producto pueden ser aplicables en función de la(s) cepa(s) específica(s) y del conocimiento del mecanismo de acción.

Los tests de pureza de un LBP pueden incluir una evaluación del contenido de endotoxinas, antibióticos residuales y/o la cuantificación de componentes tóxicos residuales o contaminantes introducidos durante la producción”.

Atendiendo ya no a la sustancia activa sino al producto medicinal terminado:

“Otros ingredientes necesarios, activos o inactivos, pueden incluir adyuvantes, estabilizantes y/o excipientes

1. Composición: Una lista de todos los componentes del producto [...] incluyendo los límites superiores e inferiores aceptables de ufc de la[s] cepa[s] del producto
2. Producción: [...] incluyendo el procesado, la liofilización y el envasado
3. Especificaciones del producto medicamentoso: [...]
 - Identidad
 - Potencia
 - Ensayo de potencia: durante el desarrollo clínico temprano, el ensayo de potencia puede ser una evaluación de ufc. Con el avance del desarrollo, un ensayo de potencia alternativo o adicional puede utilizarse. Cuando sea posible, evidencias de que el ensayo de potencia seleccionado correlaciona con la actividad o la eficacia observada en ensayos clínicos debe proporcionarse.
 - Pureza
 - Contaminación microbiana
 - Test General de Seguridad
 - Apariencia visual
 - Cuando proceda, tests adicionales o modificaciones de los mismos, tales como porcentaje de células viables, determinación de materia particulada, test de pirogenicidad en conejo (USP 31 <151>), tests de pH y/o humedad residual
4. Estabilidad: Antes de la solicitud IND, debe desarrollarse un protocolo de estudio de estabilidad del producto demostrando la integridad del producto en investigación para la duración planeada de la investigación clínica. Para los productos liofilizados, debe desarrollarse [...] un protocolo

de estabilidad adicional que examine la estabilidad tras la reconstitución. Si el producto es congelado, deben generarse datos demostrando la estabilidad del producto a un número de ciclos de congelado-descongelado determinado. El protocolo de estudio de la estabilidad debe incluir, sin limitarse a: potencia, número de células viables, contaminación microbiológica, pH y humedad residual, si procede.

[...]

6. Evaluación ambiental [...] probablemente requerido para organismos virulentos, organismos que estén ecológicamente mejor adaptados que sus homólogos salvajes o para organismos cuya erradicación es problemática o difícil de documentar.”

En cuanto a la información no clínica o preclínica, establece que

“Debe enviarse información adecuada sobre estudios farmacológicos y toxicológicos del LBP en animales de laboratorio, o in vitro, para sustentar un ensayo clínico propuesto [...]. Se recomienda resumir la información disponible [...] también en la literatura. Conclusiones basadas en datos obtenidos [con] la formulación clínica o con ingredientes individuales presentes en la formulación clínica, por contra de [con] formulaciones similares o desconocidas, son siempre más [relevantes para apoyar] el ensayo clínico propuesto.”

Dependiendo del producto y del ensayo clínico propuesto, se recomienda abordar: toxicidad general; órganos o sistemas-diana; potencial teratogénico, carcinogénico o mutagénico de cualquier ingrediente del producto; cualquier relación de la dosis y la duración con la respuesta tóxica y la actividad farmacológica.”

Con respecto a la información clínica, indica la necesidad de proporcionar información tanto como de la experiencia previa en humanos como de los estudios clínicos propuestos:

“La experiencia previa en humanos varía desde ensayos clínicos prospectivos a reportes de casos. Del mismo modo, distintos grados de caracterización pueden reportarse en los estudios. Extraer conclusiones o hacer asunciones sobre la relevancia de estudios previos puede ser difícil o

imposible sin la adecuada información sobre calidad. En general, la relevancia de la experiencia previa en humanos para sustentar un estudio propuesto se basa en la similaridad del/de los producto(s) en estudio, así como el diseño del estudio, objetivos y *endpoints*, el número de individuos expuestos, el nivel y la duración de la exposición, [...] y la recolección y el análisis de los datos.

[...]

Los datos de seguridad obtenidos de la administración de un producto en investigación a voluntarios sanos puede ser importante para identificar eventos adversos comunes asociados al producto antes de proceder a estudios en poblaciones más vulnerables [...]. Los estudios propuestos para evaluar los efectos de un tratamiento deben incluir la definición de enfermedad y criterios para empeoramiento, mejora, recaída, etc., aplicables a la enfermedad y a la población estudiadas.”

Con posterioridad a esa Guía para LBP, la FDA publicó otro documento también no vinculante, llamado “Guía para investigadores clínicos, patrocinadores, y paneles de revisión institucionales – Solicitudes para medicamentos en investigación: determinar si estudios de investigación con humanos pueden conducirse sin IND” (447) en el que describen cuando el largo, complejo y costoso procedimiento IND es necesario.

El texto especifica que el IND es necesario en medicamentos e investigaciones clínicas, aclarando que el concepto de medicamento “no se limita a compuestos con aspiración terapéutica”, entendida ésta como “diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento y prevención de una enfermedad”, sino que también incluye a “compuestos cuya intención es afectar estructuras o funciones en el cuerpo, independientemente de que de que el compuesto tenga como objetivo influir en un proceso patológico o no”. Apunta, sin embargo, que los suplementos nutricionales únicamente dirigidos a afectar estructuras o funciones del cuerpo no son considerados como poseedores de intención terapéutica. Con respecto a las investigaciones clínicas, aclara que sólo son aquellos “experimentos en los que un medicamento, aprobado o no, es administrado” a seres humanos. Sin embargo, el punto más relevante para los LBP reside en la sección dedicada a los organismos vivos, en los que incluye “virus, bacterias u hongos, tanto modificados como

silvestres". Establece que el proceso IND se requiere para estudios en los que cualquier organismo vivo sea administrado a sujetos para estudiar su patogénesis, la respuesta del hospedador al mismo, o su colonización en relación con el tratamiento o la prevención de una enfermedad con un desorden autoinmune crónico. Especifica que incluso cuando el organismo no tenga una intención terapéutica, se considerará que aspira a alterar estructuras o funciones en el organismo y que, por tanto, será un medicamento biológico según la sección 21 CFR 600.3 (h)(1)) y que, por lo tanto requerirá IND a no ser que sea un ingrediente en un complemento alimenticio, un alimento o una bebida. El texto también establece que los ensayos con ingredientes alimentarios sólo requerirán el procedimiento IND cuando estén "dirigido[s] a sustentar una nueva declaración de beneficio de la salud.

Existe también una reflexión en este documento acerca de los compuestos endógenos, no definidos como tales pero ejemplificados con moléculas como la bradiquinina, la histamina o la angiotensina. En cuanto a la mención a los productos medicamentosos basados en organismos vivos, hay en este documento dos hechos relevantes. El primero su mera presencia, ya que este tipo de productos no habían sido considerados en los textos regulatorios norteamericanos. El segundo, el hecho de que el principal precedente de exención de IND que llevó a la elaboración del documento fue el caso del FMT (a pesar de que este tipo de productos no aparecen nombrados en el texto).

Un caso aparte es el de los FMT. Al resurgir el FMT, en mayo de 2013 la FDA se posicionó respecto a este tipo de productos estableciendo que "la microbiota fecal para trasplante como producto, cuando tuviera como objetivo curar, tratar, mitigar o prevenir una enfermedad, cumplía las definiciones tanto de medicamento como de medicamento biológico". También estimaba que, al usar medicamentos biológicos en investigación, los ensayos de FMT requerirían someterse al procedimiento IND para garantizar la seguridad de los pacientes y la calidad del tratamiento. La Agencia también expresó su opinión de que el proceso de fabricación debía incluir desde el momento de la donación hasta su almacenamiento. Además reconocía que la definición y caracterización del producto presentaba dificultades, aunque se habían resuelto desafíos similares en el pasado como determinados productos basados en sangre y en células humanas.

La situación ideal sería identificar los microbios en el material fecal responsables de los efectos beneficiosos para llegar a productos eficaces y definidos para enfermedades específicas.

Esta decisión de considerar un IND necesario para el FMT fue criticada por la industria, por los médicos y por las asociaciones de pacientes. Los primeros esgrimieron que la complejidad química y biológica de un producto para FMT hacía imposible su caracterización al nivel que un dossier de IND requiere. Los otros adujeron que la decisión imposibilitaría el acceso a un tratamiento tan altísimamente efectivo (380) para pacientes cuya vida podía correr peligro. Por ello, en julio de 2013, la agencia americana reaccionó mediante la expedición de una “Guía para la industria” (448) estableciendo que continuaría requiriendo un IND para los ensayos con FMT, aunque haría una excepción con aquéllos con pacientes con infección por *C. difficile* sin respuesta al tratamiento estándar. Los tratamientos con FMT para *C. difficile* quedan regulados, por lo tanto, como un procedimiento similar a un trasplante de un órgano o un tejido, en EEUU (371).

En otro borrador de Guía (449) liberado en 2014, la FDA se reafirmó en su decisión de no exigir un IND para los FMT indicados para infección por *C. difficile* que no responden a terapias convencionales, pero matizó que esto podría ser así siempre y cuando se cumpliera que el facultativo obtuviera el consentimiento legal del paciente, que el material fecal fuera obtenido a partir de un paciente conocido bien por el paciente, bien por el facultativo, y que el donante y el material fecal fueran estudiados bajo la dirección del facultativo para el tratamiento de su paciente

En un tercer documento al respecto, la FDA en su versión definitiva (450), publicada muy recientemente en marzo de 2016, vuelve a ratificarse en lo esencial, pero establece mayores restricciones en términos de donaciones, sustituyendo el punto antes citado por “el producto FMT no es obtenido de un banco de heces”. Reconoce que el cambio responde a las críticas recibidas por el requerimiento de que el facultativo o el receptor del FMT conocieran al donante.

Define, a su vez, “banco de heces” como

“un establecimiento que recolecta, prepara y almacena productos FMT para su distribución a otros establecimientos, personal sanitario, u otras entidades para su uso en terapia para pacientes o en investigación clínica. Un

establecimiento que recolecta o prepara productos FMT únicamente bajo la dirección de facultativos con el propósito de tratar a sus pacientes (por ejemplo, un laboratorio de hospital) no se considera un banco de heces [...]. La FDA no tiene intención de eximir del IND a los bancos de heces que distribuyan productos FMT. Dichas distribuciones son objeto del requerimiento de que un sponsor, típicamente el banco de heces, tenga un IND en regla antes de la distribución del producto FMT a los investigadores". Añade que "la producción centralizada en bancos de heces representa un problema de seguridad al administrarse FMT desde un número limitado de donantes a un gran número de pacientes, [tales como] transmisión de agentes infecciosos y otros potenciales riesgos no identificados relativos a los cambios en el microbioma [sic]".

La Agencia dice mostrarse abierta, no obstante, a comentarios sobre esta decisión, así como sobre otros usos del FMT que no debieran regularse bajo IND (451). En ninguno de sus documentos la FDA ha establecido normas para la vía de administración del FMT (colonoscopia, sonda naso-entérica o cápsula oral).

Por el momento ninguna institución europea se ha pronunciado oficialmente acerca del FMT, aunque de forma extraoficial autoridades del Reino Unido, Francia y Alemania, así como la propia EMA, se han posicionado a favor de regularlo como un medicamento en lugar de como un procedimiento médico, cualquiera que sea su indicación.

Por último se debe citar un caso relevante en lo relativo a la relación entre cuerpos regulatorios y la microbiota. Se trata de una de las primeras evidencias del nivel de discusión que la microbiota está alcanzando en programas de desarrollo de fármacos. En noviembre de 2011, el Comité Asesor de Evaluación e Investigación de Medicamentos de la FDA se reunió con representantes de la empresa Salix Pharmaceuticals, Inc. (Raleigh, NC, EEUU). Esta empresa está especializada en el desarrollo de medicamentos de indicación gastrointestinal. Pretendían discutir aspectos del programa clínico de la rifaximina, un antibiótico que se administra oralmente y no es absorbido por el torrente sanguíneo, de forma que permanece en el lumen del tracto digestivo para y es eficaz en el tratamiento del IBS (452). Como se ha discutido anteriormente, se piensa y existen evidencias de que la microbiota puede jugar un papel en la etiología o en las

manifestaciones del IBS. La discusión se centraba concretamente en el diseño de los ensayos clínicos para evaluar la seguridad, la eficacia y la duración de la respuesta con tratamientos repetidos de Xifaxan, una rifaximina presumiblemente eficaz en el tratamiento de colon irritable con diarrea. Esta reunión fue una de las primeras ocasiones en las que la FDA se mostró abiertamente interesada por la microbiota, afirmando que “se necesitaban más datos acerca del mecanismo de acción [...] y su potencial para alterar la microflora entérica”, recomendando “incluir un estudio para evaluar cómo distintas dosis afectan a la microbiota”, sugiriendo el uso de “marcadores del microbioma [sic] como potenciales biomarcadores para identificar pacientes que responderían a la terapia” dada la escasa utilidad de los biomarcadores fisiológicos utilizados por norma general, insinuando que el uso continuado del tratamiento podría ocasionar “cambios en la microflora del intestino que podrían atenuar la respuesta al medicamento pero que podrían resultar también en exacerbación” y que esos cambios “podrían resultar en efectos adversos para la salud del paciente”, recomendando “estudios con métodos avanzados para evaluar estos cambios en la microflora del intestino”.

VI – DISCUSIÓN

VI - DISCUSIÓN

Este apartado contiene toda la documentación necesaria para abordar el segundo y tercer objetivo secundario de esta tesis consistentes en analizar la legislación en torno a la comercialización de los productos basados en la microbiota y definir la categoría regulatoria a la que se deberían adscribir y estudiar la problemática ligada a la comercialización de los mismos.

6.1 CLASIFICACIÓN REGULATORIA DE CADA ENFOQUE DE TERAPIAS DE LA MICROBIOTA

En cualquier marco legislativo, los productos del tipo de las terapias de la microbiota se regulan por la intención de su uso. Este hecho sigue siendo objeto de confusión y de debate entre la industria del sector alimentario y las autoridades. Por un lado está la existencia de la figura de las declaraciones funcionales para alimentos y las múltiples situaciones límite que supone. Por otro el hecho de que cualquier producto cuya intención sea la de diagnosticar, curar, mitigar, tratar o prevenir una enfermedad sea tratado legalmente como un medicamento o un producto sanitario y no como un alimento. Por eso resulta más obvio pensar en el uso farmacéutico de estos productos que en su uso alimentario. Tomando en consideración esta reflexión, se discutirá exclusivamente el uso farmacológico.

En la sección de “Resultados” se han descrito los múltiples enfoques que la industria biofarmacéutica está planteando para el uso de la microbiota como estrategia terapéutica en los seres humanos. Dichos enfoques pueden clasificarse desde múltiples puntos de vista que se detallan a continuación.

En primer lugar se puede considerar la diana de intervención. Es un error común pensar en la microbiota únicamente como estrategia terapéutica por medio de la administración de microorganismos vivos destinados a colonizar un hábitat concreto del cuerpo del hospedador para desarrollar su actividad beneficiosa. Si bien ese es uno de los enfoques más extendidos y clásicos, no es, ni mucho menos, el único. Las intervenciones con o sobre la microbiota pueden dividirse en dos grandes grupos con respecto a la diana de la intervención. El primero, el más

intuitivo, consiste en centrar el objetivo directamente en la microbiota para modificarla cualitativa y/o cuantitativamente y que ese cambio afecte de manera positiva a la salud del hospedador. Esa es la meta de la administración de LBP, incluyendo los de tipo FMT o LBP modificado, de antimicrobianos específicos o de moléculas modificadoras de determinados metabolismos microbianos. Obviamente la segunda opción se centra en el hospedador. Las actuaciones sobre él pueden ser mediante moléculas obtenidas de la microbiota, los llamados postbióticos, o de otro tipo. Por ejemplo, en las enfermedades en las que se especula con la implicación de anticuerpos contra componentes de la microbiota intestinal como la enfermedad de Crohn (453–455), la administración de inmunosupresores al hospedador tiene como objetivo, de forma más o menos indirecta, disminuir la beligerancia del mismo contra su microbiota normal.

Como en casi todos los casos en este campo, especialmente dada la incertidumbre mecanística que aún se tiene, existe la posibilidad de que una misma estrategia afecte tanto al hospedador como a su microbiota. Tal es el caso de los salicilatos empleados para el tratamiento de la colitis ulcerosa que son prescritos como antiinflamatorios. Dada la relación sugerida entre esta enfermedad y la excesiva producción de H₂S por parte de la microbiota intestinal (226), es probable que parte de su eficacia también se deba a su capacidad de inhibir el metabolismo sulfatorreductor que lleva a la producción de ese ácido (456).

Cabe destacar también que las intervenciones farmacológicas, muchas de las cuales ejercen un impacto sobre la microbiota, pueden tener consecuencias positivas para el hospedador de forma inmediata pero modificar la microbiota en una dirección que no sea beneficiosa para la salud del mismo a medio o largo plazo, como se estudia en el caso de los antibióticos.

Siguiendo con el razonamiento del comienzo de este apartado, también es posible considerar la localización de la diana de la intervención. Se han descrito implicaciones de la microbiota en procesos patológicos que afectan todas las partes del cuerpo, por lo que intervenciones sobre o a través de ella pueden ser necesarias en cualquier localización. Es importante recordar que, debido al carácter ecosistémico y holobiótico del organismo humano, puede no ser necesario intervenir sobre la microbiota de una localización para obtener resultados en esa misma localización. Por ejemplo, en el campo de la

dermatología existen estrategias clínicas orientadas a la actuación sobre la microbiota de la piel a nivel tópico pero también a nivel de la microbiota intestinal para obtener, igualmente, resultados clínicos dermatológicos. Ocurre lo mismo en el caso de las alergias y el asma en las que, como se ha dicho, se cree implicada la microbiota intestinal.

Generalmente la legislación no establece diferencias entre medicamentos según su ruta de administración. No obstante, en el caso de la microbiota hubo en EEUU una primera aproximación a hacer distinciones entre microorganismos vivos destinados a ser ingeridos o a ser aplicados de forma tópica. A esta última clase se le llama “Live Topical” (457), aunque todo parece indicar que estos productos serán tratados como LBP sin más matices.

Uno de los aspectos más interesantes desde el punto de vista científico es considerar el mecanismo de acción del producto. No obstante, y a pesar de que este asunto se tratará extensamente en el apartado dedicado a la potencia de los LBP, este aspecto no tiene por qué influir en la categoría regulatoria de ningún fármaco, con la excepción de que éste sea una vacuna, en cuyo caso quedaría excluido del ámbito de los LBP incluso tratándose de un microorganismo vivo. La vía de administración por inyección y un mecanismo de acción basado en la generación de inmunidad adquirida son aspectos generalmente excluidos en toda definición de LBP, lo que enlaza con el punto anterior.

En cuanto a la procedencia del producto de la intervención, se sabe que las intervenciones a través de la microbiota pueden realizarse con productos de origen diverso, desde sustancias diseñadas *de novo* por el hombre a microorganismos vivos obtenidos de muestras no humanas, pasando por compuestos más o menos sencillos producidos originalmente por miembros de flora normal y microorganismos completos procedentes de la misma.

En el caso de las moléculas simples, como ocurre con todos los fármacos, por motivos económicos, técnicos y regulatorios la industria convierte, siempre que sea posible y desde su fase preclínica tardía, la síntesis de moléculas pequeñas en procesos industriales de tipo estrictamente químico, independientemente de su origen. Salvo por la diferencia entre su fabricación por medios biotecnológicos frente a químicos, la normativa no contempla matices regulatorios para ninguna clase de fármaco, independientemente de su origen.

Los diferentes tipos de productos se clasificarán, por tanto, en función de su naturaleza bioquímica y su forma de fabricación.

En cuanto a la naturaleza química, biológica, taxonómica o bioquímica de la intervención, esta característica es en general la más determinante a la hora de clasificar los fármacos a grandes rasgos y es, de hecho, el criterio más relevante en el caso particular de las estrategias terapéuticas a través de la microbiota. Independientemente de la diana terapéutica y su localización pueden hacerse tres grandes grupos de intervenciones a través de la microbiota de acuerdo a su naturaleza química, biológica o bioquímica: “moléculas pequeñas”, “biológicos y estructuras intermedias” y “microorganismos y virus”.

El término “moléculas pequeñas” tiene un alto grado de ambigüedad, dado que no existe una definición formal, ni científica ni legal, de los que es una molécula pequeña. En el ámbito farmacéutico el término surgió por contraposición a los biológicos, medicamentos mucho más complejos y grandes que los clásicos generados por métodos químicos. En general se habla de moléculas pequeñas cuando un fármaco no ha sido fabricado por métodos biotecnológicos, su estructura química es sencilla y su peso molecular no excede los 900 Da (458). La inmensa mayoría de los medicamentos disponibles hoy en día son moléculas pequeñas, como también lo son muchos de los que la industria está favoreciendo para actuar a través de la microbiota. Por ejemplo SGM-1019 de Second Genome que actúa sobre la interacción entre una proteína secretada por un miembro de la microbiota y el hospedador como tratamiento de la enfermedad de Crohn, EB 8018 de Enterome, para la misma dolencia pero atacando a las adhesinas de *E. coli*, SYN-010 de Synthetic Biologics, que inhibe el metabolismo metanogénico para tratar el IBS o los postbióticos de tipo molécula pequeña que se buscan en bases de datos metagenómicas (386). Sea cual sea su diana terapéutica o su mecanismo de acción, los fármacos de tipo molécula pequeña no merecerán ni requerirán, en principio, un tratamiento regulatorio especial con respecto a cualquier otro fármaco no centrado en la microbiota.

En cuanto a los “biológicos y estructuras intermedias”, se ha hablado antes de la posibilidad de que un postbiótico sea de tipo peptídico en lugar de una molécula pequeña. Salvo los péptidos más pequeños como la insulina, las proteínas terapéuticas se producen por medios biotecnológicos y son reguladas

como medicamentos biológicos. Incluso determinados compuestos, por ejemplo de naturaleza sacarídica o glicoproteica, cuya estructura es muy compleja y requiere de una síntesis por medios biotecnológicos podrían ser regulados como biológicos. Este podría ser el caso de moléculas inspiradas en oligosacáridos de leche materna administradas para provocar el crecimiento selectivo de determinados componentes de la flora intestinal del paciente.

Finalmente, si se habla de “microorganismos y virus”, se puede comenzar describiendo los consorcios de microorganismos de composición total o parcialmente desconocida. Deberían incluirse aquí el FMT y todas sus variantes en las que la composición del material a trasplantar no está totalmente definida desde el punto de vista microbiológico salvo por la confirmación de la ausencia de agentes patógenos. Como se detalló anteriormente, en EEUU, únicamente en el caso de que vayan dirigidos a resolver una infección por *C. difficile*, este tipo de intervenciones se están regulando como procedimientos médicos, de forma análoga al tratamiento regulatorio que recibe un trasplante de un órgano. Para otras indicaciones serán considerados medicamentos de tipo LBP con las complicaciones en términos de calidad y reproducibilidad que ello acarrea. Aunque posible, se antoja bastante improbable que Europa tome una decisión similar a este respecto. De hecho incluso en EEUU RBX2660 de Rebiotix y SER-109 de Seres Therapeutics han sido considerados LBP, otorgándoles la categoría de huérfanos, a pesar de tener una composición no totalmente definida y estar destinados al tratamiento de la diarrea por *C. difficile*. En Europa, distintas autoridades han expresado de forma extraoficial su opinión de que el FMT debe ser regulado como un fármaco (es decir, como cualquier otro LBP), independientemente de su aplicación terapéutica.

Si se consideran microorganismos aislados o consorcios de microorganismos de composición definida, los grupos de microorganismos diseñados *in vitro* en lugar de aislados de muestras sujetas a variabilidad, como SER-301 de Seres Therapeutics o VP20621 de Viropharma, y los productos constituidos por cepas aisladas como Oxabact de OxThera, cuyo único componente microbiano es la bacteria *Oxalobacter formigenes*, son *a priori* los productos basados en microorganismos más sencillos desde el punto de vista regulatorio, en los que por el momento más esfuerzo se está poniendo en regular

y los que realmente necesitan matices en la legislación por sus especiales características. Es en este contexto donde surge la figura de los LBP, por ahora sólo reflejada en guías y otros documentos no vinculantes legalmente, y que se discutirán ampliamente en la siguiente sección. No hay que olvidar que en la mayoría de los casos el FMT será tratado como un LBP, por las razones antes expuestas. Considérese además que la mayoría de los LBP en los que la industria está trabajando son nativos, aunque existe un gran interés y potencial en el desarrollo de OMG terapéuticos, como SYN2010 y SYNB1010 de Synlogic para la microbiota intestinal; AG013 para la oral; MucoCept de Osel para la vaginal; y los conceptos de Xycrobe para la cutánea. Como se discutirá también en el siguiente punto, este tipo de LBP están siendo catalogados, al menos hasta el momento, como terapia génica a ambos lados del Atlántico.

En referencia a los microorganismos muertos o probióticos fantasma, aparte de los dos productos Lacteol y Nyaditum resae de Manremyc, el segmento de los microorganismos inactivados no está demasiado desarrollado fuera de la industria alimentaria, donde se pueden considerar un ingrediente más y no sujeto a las limitaciones del listado de especies QPS de la EFSA para los probióticos al no tener capacidad metabólica ni replicativa. Inicialmente cabría esperar que los reguladores farmacéuticos no asumieran la idea de que microorganismos completos pero en estado no viable, por ejemplo tras un choque térmico, se convirtieran en medicamentos. Cabría esperar que demandaran la elucidación del mecanismo de acción y con él la identificación de la(s) molécula(s) responsables del mismo, que podrían ser reguladas en función de sus características bioquímicas y su modo de fabricación.

No obstante, es también cierto que muchas vacunas son productos conceptualmente similares. Además, los reguladores están mostrando gran receptividad hacia las terapias a través de la microbiota y comprensión hacia la falta de conocimiento sobre el mecanismo de acción de estos productos. Hay que apuntar, sin embargo, que los microorganismos muertos no están contemplados en los borradores de documentos que están siendo discutidos por el momento, que se centran en microorganismos vivos. Es más, la respuesta a la solicitud de recomendación científica de septiembre de 2014 de la EMA a la empresa SporeGen Ltd. (Egham, Reino Unido), que está desarrollando un producto a base de esporas inactivadas de *Bacillus subtilis* que expresan un antígeno no toxigénico

de *C. difficile* para la prevención de la infección por este último en ancianos, fue la de que su producto no se encuentra en el ámbito de la definición de medicamento de terapia avanzada (459), en el que se han clasificado todos los LBP restantes en Europa. Es probable que, en este caso particular, la EMA considere este producto como más similar a una vacuna oral o sublingual que a otra modalidad de fármaco.

Como en muchas otras ocasiones con productos de difícil clasificación, el camino regulatorio debería discutirse caso por caso con las autoridades, que más que probablemente calificaran un producto de esas características como un biológico de algún tipo, tal y como está catalogado Lacteol a día de hoy en España y otros países europeos. Aunque ambos enfoques son cualitativamente muy diferentes, el hecho de que FMT de composición bastante indefinida como RBX2660 hayan sido admitidos como fármacos (LBP) sienta un precedente que invita al optimismo con todo el resto de fármacos de composición compleja, como lo serían estos probióticos fantasma.

Finalmente han de considerarse los bacteriófagos. Las guías para el desarrollo de microorganismos como medicamentos tienden a centrarse de forma especial en microorganismos de tipo celular. Los virus, sin embargo, especialmente los bacteriófagos, no se encuentran contemplados en estas regulaciones probablemente debido a que no son considerados seres vivos sino entidades biológicas acelulares. No obstante, existe un gran interés en la industria por desarrollar algunos de ellos como fármacos. La terapia con fagos ha sido usada desde los años 20 del siglo pasado en la Unión Soviética (460), aunque no han estado muy presentes en la medicina occidental reciente. Han sido utilizados desde hace años, de forma regulada, en el sector alimentario, tanto americano como europeo, para el control de *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 y *Salmonella* en carne y lácteos (460,461). De hecho Intralytix, antes nombrada por su proyecto con bacteriófagos para el tratamiento de la enfermedad de Crohn, surgió en 1998 como actor en este sector.

La limitada experiencia que se tiene con fagos como productos terapéuticos permite conocer que las autoridades los consideran productos biológicos a pesar de no encontrarse especificados en la normativa (462). No obstante, el caso de las vacunas que contienen virus vivos o atenuados es similar y estos productos no encuentran en la regulación mayores complicaciones. Es en este campo de las

vacunas donde los fagos pueden encontrar su precedentes regulatorios más valiosos. Un caso claro es FluMist de AstraZeneca (Cambridge, Reino Unido). Es una vacuna intranasal contra la gripe que contiene tres o cuatro cepas de virus vivos y que es reformulada cada año para ser efectiva contra las cepas más presentes en cada temporada de gripe. Para este producto las autoridades, en lugar de regular el contenido exacto sometándolo a ensayos clínicos cada año, establecen normas sobre el proceso por el que el producto se manufactura (463). En el caso de las estrategias con fagos antes nombradas, lo más probable es que estos productos se clasificaran también como biológicos, aunque no LBP en principio.

Esta estrategia de regular procesos en lugar de productos es, de hecho, el enfoque que las autoridades han tomado para la regulación del FMT. Sería posible una estrategia análoga para los productos a base de bacteriófagos. Por tanto, y a pesar de la ausencia de guías al respecto por el momento, es más que probable que las autoridades farmacéuticas tengan una actitud receptiva con respecto a estos fármacos al ser consultadas caso por caso.

6.2 CLASIFICACIÓN Y RUTA REGULATORIA DE LOS LBP

Existen distintas definiciones de LBP. En su “Guía para la industria sobre ensayos clínicos tempranos con LBP” de 2010 y 2012, la FDA los define como

“producto biológico que:

- 1) contiene organismos vivos, como bacterias;
- 2) es aplicable para la prevención, tratamiento o cura de una enfermedad o condición de seres humanos y
- 3) no es una vacuna”.

Excluye específicamente virus filtrables, bacterias oncolíticas y terapias génicas y aclara que estos productos son “generalmente no se administran mediante inyección”. Pone como ejemplo de LBP un producto con “una o más cepas de lactobacilos administrados de forma oral para tratar pacientes con colitis ulcerosa, o administrados vaginalmente para prevenir la vaginosis bacteriana”.

Por su parte, el Pharmabiotic Research Institute (PRI), un grupo de interés regulatorio en el desarrollo de microorganismos vivos como fármacos con sede en Aurillac (Francia), los define como un producto que

“contiene microorganismos bioterapéuticos vivos formulados con otros ingredientes necesarios que pueden ser usados sobre o administrados a seres humanos con el objetivo de restaurar, corregir o modificar funciones fisiológicas mediante acciones farmacológicas, inmunológicas o metabólicas, o haciendo un diagnóstico médico. Otros ingredientes necesarios, activos o inactivos, pueden incluir adyuvantes, estabilizantes y/o excipientes, y pueden también encontrarse separados de [la sustancia], como por ejemplo los diluyentes para su reconstitución”.

En cualquier caso son productos de distinto nivel de complejidad en su composición que contienen microorganismos vivos y que tienen como objetivo curar, mitigar, tratar o prevenir una enfermedad.

La primera disyuntiva regulatoria que ha de solventarse para estos microorganismos es si pertenecen por naturaleza a la clase de los alimentos o de los fármacos. Hay que destacar que esta disyuntiva se circunscribe a Europa, ya

que en EEUU no existen microorganismos como fármacos, salvo los que forman parte de las vacunas, regulados como algo diferente de los ingredientes o complementos alimenticios. Como se explicó anteriormente, en cualquier marco legislativo los productos de este tipo se regulan por la intención de su uso. A pesar de que en el sector alimentario sigue siendo objeto de confusión y de debate entre la industria y las autoridades, cualquier producto cuya intención sea la de “diagnosticar, curar, mitigar, tratar o prevenir una enfermedad” debe ser tratado como un medicamento o un producto sanitario y no como un alimento.

Como se detalló en el apartado de “Introducción”, los productos basados en microorganismos, no sólo de uso tópico sino también destinados a ser ingeridos, han logrado alcanzar el estatus de producto sanitario en distintos EM. Esta situación ha sido forzada por la industria para poder etiquetar sus productos con mensajes más potentes desde el punto de vista comercial. Ha llevado a situaciones extremas desde el punto de vista judicial que han finalizado con enfrentamientos entre la industria y EM dirimidos en el TJUE. Las discusiones han sido rocambolescas desde el punto de vista técnico, con microorganismos probióticos de reconocida inocuidad declarados productos sanitarios de alto riesgo por su nivel de invasividad y de permanencia en el cuerpo del paciente.

A pesar de que desde el punto de vista estrictamente jurídico esto fuera posible, es más que discutible que lo fuera desde el punto de vista técnico, ya que la normativa establece que los productos sanitarios no deben ejercer su “acción principal [...] en el interior o en la superficie del cuerpo humano por medios farmacológicos, inmunológicos ni metabólicos”. En el caso de los microorganismos destinados a colonizar el intestino y catalogados en su día como productos sanitarios, a saber *S. boulardii* y *L. johnsonii* EU1, debió haber existido al menos la duda razonable, que debía haber llevado a su falta de aceptación como productos sanitarios, dado que existen múltiples evidencias en la literatura científica que indican que es posible una interacción inmunológica entre la microbiota y muchos microorganismos (45,464–469). Dado que en ambos casos el objetivo del producto es que los microorganismos alcanzaran su estado viable en el intestino, colonizándolo durante un tiempo indefinido, la simple reflexión acerca de la capacidad de *S. boulardii* de fermentar azúcares a etanol debería haberse tenido en cuenta (470), por poner un ejemplo trivial.

En los productos con microorganismos para uso tópico vaginal el mecanismo de acción se supone únicamente físico y está basado en la exclusión de patógenos de la superficie de la mucosa vaginal o químico fundado en la acidificación del medio. Aunque de forma menos clara que en el caso anterior, la ausencia de interacción inmune y/o metabólica con el cuerpo es también discutible (471) y por tanto la figura de producto sanitario tampoco parece óptima para ellos.

Tras estos acontecimientos, y en aras de la armonización, el Reglamento de productos sanitarios actualmente en discusión pretende excluir a los microorganismos de su ámbito de aplicación. Por tanto, además de su uso clásico en alimentación como probióticos, los microorganismos que aspiren a “curar, mitigar, tratar o prevenir una enfermedad” parecen abocados al ámbito farmacéutico.

Por consiguiente, la siguiente pregunta es si la regulación farmacéutica contempla a los microorganismos como candidatos a medicamentos. En este caso la respuesta es afirmativa. En cualquier caso, además, lo que la Directiva 2004/27/CE sí explicita es que “en caso de duda, cuando [un producto] pueda responder a la definición de medicamento y a la definición de producto contemplada por otras normas comunitarias, se aplicará la [legislación farmacéutica]”, por lo que, aun por mero descarte, los productos límite como los microorganismos deberían ser regulados como medicamentos. A nivel nacional, como se detalló en el apartado de “Resultados”, los criterios de las autoridades de los distintos EM a la hora de catalogar los microorganismos han sido dispares. A nivel europeo, sin embargo, la Directiva 2001/83/CE define medicamento como:

“toda sustancia o combinación de sustancias que se presente como poseedora de propiedades curativas o preventivas con respecto a las enfermedades humanas”. A su vez, por su modificación por la Directiva 2004/27, sustancia queda definido como “cualquier materia, sin distinción de origen, pudiendo ser éste:

- humano, como: la sangre humana y sus productos derivados;
- animal, como: los microorganismos, animales enteros, partes de órganos, secreciones animales, toxinas, sustancias obtenidas por extracción, productos derivados de la sangre;

- vegetal, como: los microorganismos, plantas, partes de plantas, secreciones vegetales, sustancias obtenidas por extracción;
- químico, como: los elementos, materias químicas naturales y productos químicos de transformación y de síntesis”

Estas definiciones, además de reforzar la importancia de la intención del uso de un producto a la hora de clasificarlo como medicamento, aclaran la actitud de la normativa farmacéutica al considerar los microorganismos como medicamentos, a pesar de que científicamente la inclusión de los mismos en animales y vegetales, sobre todo en el primer grupo, sea confusa. Como se adelanta desde la definición, el origen de la sustancia medicamentosa, así como su naturaleza bioquímica, son de vital importancia para su catalogación dentro del reino de los productos medicinales.

La Directiva 2003/63/CE/CE, que modificaba la Directiva 2001/83/CE, define medicamento biológico como

“un producto cuyo principio activo es biológico. Una sustancia biológica es aquella que se produce o se extrae a partir de una fuente biológica y que necesita, para su caracterización y determinación de su calidad, una combinación de ensayos físico-químico y biológico junto con el proceso de producción y su control”

Esta categoría regulatoria es aplicable tradicionalmente a fármacos complejos como anticuerpos monoclonales o proteínas de fusión cuya producción se realiza por métodos biotecnológicos en cultivos celulares y cuya caracterización no es posible por métodos químicos. A pesar de que estos fármacos siguen siendo considerados complejos, el nivel de complejidad biológica y bioquímica de los medicamentos como los LBP es muy superior no sólo por su tamaño sino también por tratarse de células vivas con capacidad metabólica y replicativa. Esa misma Directiva 2003/63/CE establece que la categoría de medicamentos biológicos abarca, sin limitarse a:

- Medicamentos inmunológicos: vacunas, toxinas, sueros y alérgenos
- Medicamentos derivados de sangre y plasma humanos
- Medicamentos desarrollados por ADN recombinante, expresión controlada de proteínas y anticuerpos monoclonales

- Medicamentos de terapia avanzada, que por el Reglamento (CE) 1394/2007 incluyen:
 - o Medicamento de terapia génica, que incluye un principio activo que contiene un ácido nucleico recombinante, o está constituido por él, utilizado en seres humanos, o administrado a los mismos, con objeto de regular, reparar, sustituir, añadir o eliminar una secuencia génica del cual depende su efecto terapéutico, profiláctico o diagnóstico
 - o Medicamento de terapia celular somática, que contiene células o tejidos, [...] que han sido objeto de manipulación sustancial (corte, trituración, moldeo, centrifugación, imbibición en disoluciones antibióticas o antimicrobianas, esterilización, irradiación, separación, concentración o purificación celular, filtrado, liofilización, congelación, criopreservación, vitrificación.)
 - o Producto de ingeniería tisular, [...] que contiene o está formado por células o tejidos manipulados por ingeniería

La experiencia previa y la lógica científica y regulatoria apuntan a que los microorganismos vivos pueden ser regulados como fármacos también en el entorno normativo europeo actual, siempre que su intención sea la de tratar o prevenir una enfermedad de los seres humanos. Es importante recordar que el actualmente ya existen productos a base de microorganismos catalogados como medicamentos en distintos países europeos. Corresponden a mecanismos de aprobación antiguos, regidos por estándares muy diferentes a los existentes actualmente.

Dentro de los productos medicinales los LBP encajan a la perfección dentro de los medicamentos biológicos por sus características bioquímicas y sus métodos de manufactura, cualesquiera que estos sean en cada caso particular. Es también dentro de los medicamentos biológicos donde la FDA sitúa a los LBP. Dentro de los medicamentos biológicos, y más por eliminación que por encaje directo, los LBP están mejor clasificados dentro de los medicamentos de terapia avanzada, un pequeño cajón de sastre donde se incluyen muchos medicamentos biológicos inclasificables o complejos. Es de hecho en esta categoría donde la EMA ha posicionado cuantas solicitudes de orientación que ha recibido, con el único matiz

de que todos los casos presentados ante ella hasta la fecha (472) han sido LBP modificados, por lo que los ha clasificado en la subcategoría terapia génica dentro de la categoría medicamentos de terapia avanzada.

Conviene recordar que los LBP modificados o, en lenguaje de la FDA, LBP recombinantes, definidos como “LBP compuesto de microorganismos que han sido modificados genéticamente mediante la adición, deleción o modificación deliberada de material genético” estaban explícitamente excluidos del ámbito de aplicación de la guía FDA de 2010 y 2012, aludiendo al hecho de que ese tipo de productos requieren consideraciones adicionales no contempladas en dicha guía. Los tres casos con información publicada son los dos productos de ActoGeniX, constituidos por cepas de *L. lactis* modificadas para expresar el factor trébol humano 1 y la IL-10 humana, respectivamente, y AEZS-120 de Aeterna Zentaris (Charleston, SC, EEUU), que contienen la cepa *Salmonella typhi* Ty21a modificada para expresar el antígeno prostático específico para el tratamiento del cáncer de próstata.

Es en el marco de la terapia génica donde estos productos encajan mejor desde el punto de vista regulatorio. Cabe destacar que, por el momento, los proyectos más avanzados en este segmento son microorganismos modificados para expresar metabolitos humanos. Sin embargo no es descabellado pensar en la posibilidad de utilizarlos como agente terapéutico. Para ello se precisará un microorganismo cuya ingeniería molecular sea sencilla y que además tenga buenas capacidades de colonizar el intestino. Los candidatos obvios son *E. coli*, *L. lactis* o *Salmonella*. Pero también existe la posibilidad de que la modificación genética sufrida por el LBP sea distinta a la clonación o recombinación y resida simplemente en la alteración de su información genética con un fin distinto al de expresar una proteína heteróloga, en cuyo caso y, en sentido estricto, el epíteto recombinante no sería adecuado. Es más, a la luz de las nuevas tecnologías como CRISPR-Cas9, que permiten la modificación de organismos sin convertirlos, en términos legales, en OMG, el término “modificados genéticamente” podría no englobar todas las posibilidades técnicas. Es por ello más aconsejable el uso de un término más ambiguo y a la vez inclusivo como LBP modificado. En cualquier caso, todos los enfoques con LBP modificados, recombinantes, modificados

genéticamente en sentido estricto o no, habrían de ser considerados terapia génica.

Dado que los organismos terapéuticos tienen la capacidad de abandonar el cuerpo del paciente en un estado viable, los LBP modificados tendrán que enfrentarse adicionalmente a una regulación estricta, especialmente en el caso europeo, sobre la liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente (Directiva 2001/18/CE). Desde el punto de vista técnico, la mitigación de riesgo ambiental se enfoca mediante el diseño de microorganismos auxotrofos (473,474), como se discutirá en un punto posterior.

El grueso de los LBP que la industria tiene en mente son, sin embargo, organismos no modificados genéticamente o consorcios de ellos, por lo que no encajarían dentro de la categoría de terapia génica. De hecho, no encajan en ninguna de las categorías de terapias avanzadas existentes actualmente. No pueden considerarse un producto de ingeniería tisular al no estar sus células manipuladas por ingeniería ni estar destinadas a regenerar, restaurar o reemplazar un tejido humano. El procesamiento que sufren los LBP para su producción no es considerado manipulación por ingeniería por el anexo I del Reglamento (CE) 1394/2007, e incluso en el caso en el que los LBP estén destinados a repoblar la microbiota humana, ésta no puede ser considerada un tejido humano. Tampoco pueden considerarse medicamentos de terapia celular somática ya que, de forma similar al caso anterior, las células bacterianas no son células somáticas humanas ni los LBP son manipulados según lo establecido en el anexo I del Reglamento (CE) 1394/2007. Es por todo esto que se cree necesaria la creación de una cuarta subcategoría para los LBP dentro de las terapias avanzadas. Se trataría de un paraguas bajo el cual todas las opiniones coinciden que deberían estar (**FIGURA 2**). A pesar de que desde el punto de vista normativo no es estrictamente necesario generar una categoría regulatoria específica para cada tipo de fármaco, su creación facilitaría los desarrollos de microorganismos como fármacos y causaría un efecto muy beneficioso en la inversión dedicada a la investigación en esta área. Una alternativa a esto sería, del mismo modo que se hizo con los radiofármacos (Directiva 89/343/CEE), emitir un documento legislativo, de tipo Directiva o Reglamento, en el que se adopten disposiciones complementarias a la regulación vigente específicas para los LBP

y/u otras estrategias terapéuticas centradas en la microbiota. Como se dijo anteriormente, en EEUU el FMT para el tratamiento de la infección por *C. difficile* puede ser regulado como un procedimiento médico, considerándose un LBP en todos los demás casos. No obstante, cabe esperar que la inmensa mayoría de los FMT acaben siendo regulados como LBP, situación que de hecho se está dando en EEUU y que parece la más probable en Europa.

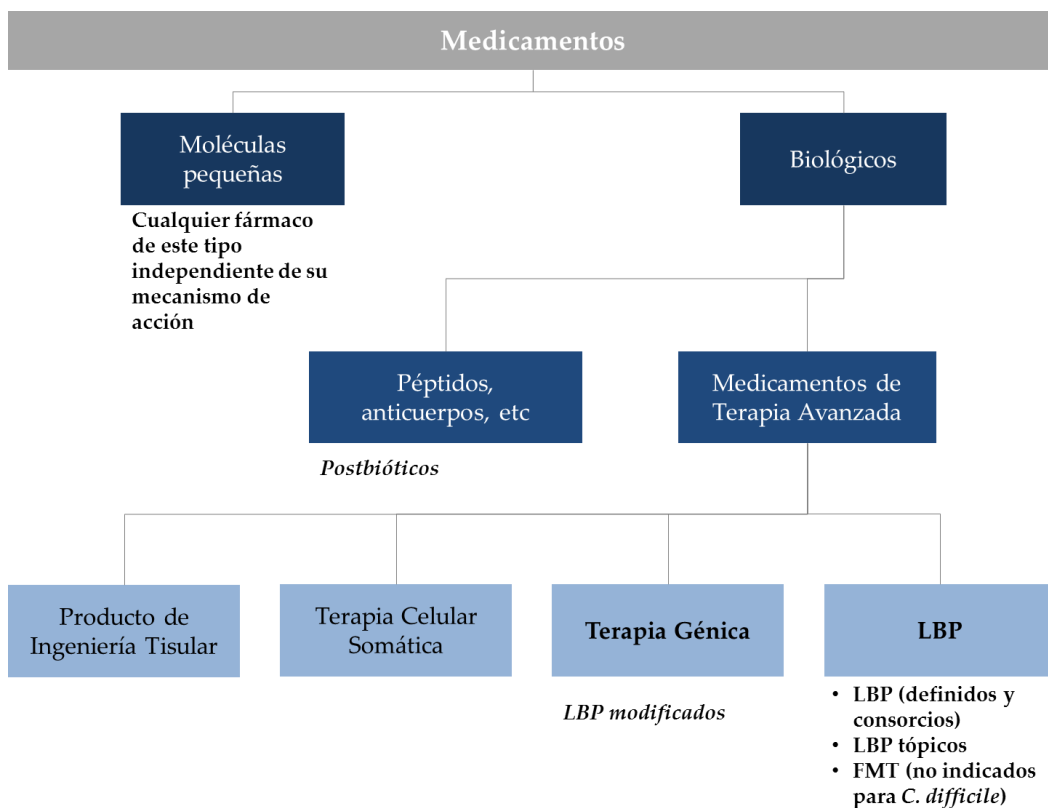


FIGURA 2. Localización de las distintas estrategias terapéuticas a través de la microbiota dentro del marco regulatorio europeo. Se sugiere la creación de la categoría de LBP dentro de los *medicamentos de terapia avanzada*. Las denominaciones *moléculas pequeñas*, al igual que *péptidos*, *anticuerpos* no se corresponden con ninguna categoría regulatoria y se incluyen con fines ilustrativos

Dentro de la industria, particularmente la alimentaria, existen opiniones que defienden que determinados productos a base de microorganismos deberían poder regularse como medicamentos tradicionales a base de plantas y/o que pueda alegarse para ellos un uso médico suficientemente comprobado. Los defensores de esta postura alegan que existen especies microbianas que llevan siendo utilizadas como probióticos desde hace décadas, mucho más de los quince años requeridos por la ley para alegar uso tradicional o suficientemente comprobado. También que en casi todos los casos su perfil de seguridad es conocido y positivo. A pesar de que ese argumento es cierto, no puede ser considerado suficiente para permitir el registro de microorganismos como medicamentos tradicionales a base de plantas o bajo el amparo de un uso médico suficientemente comprobado. En primer lugar, porque los microorganismos distintos de las algas microscópicas no pertenecen al reino vegetal, por lo que no pueden ser considerados plantas. En segundo lugar, porque es muy probable que la gran mayoría de los LBP no cumplan con los requisitos de los productos que pueden acogerse a este procedimiento al no estar destinados a indicaciones apropiadas exclusivamente para medicamentos tradicionales a base de plantas ni tampoco estar destinados y concebidos para su utilización sin el control de un facultativo. Por último, porque la principal característica de un medicamento ha de ser su eficacia, estando su perfil de seguridad relativizado y supeditado a dicha característica. Si bien es cierto que algunos microorganismos tienen una larga historia de eficacia en el tratamiento de determinadas dolencias, estos casos son la excepción. Como se indicó en el apartado de “Introducción”, la mayoría de la evidencia clínica acerca de la eficacia de los microorganismos probióticos es poco sólida desde el punto de vista científico. Además, se sabe que distintas cepas de la misma especie de microorganismo, e incluso la misma cepa en función de diversos factores como el mecanismo de su producción, pueden tener perfiles de eficacia muy dispares. Es por estos mismos motivos por los que el uso médico suficientemente comprobado tampoco es una figura adecuada para los LBP.

El problema se acrecienta cuando se tiene en cuenta que las causas de esta variabilidad en la eficacia son muy desconocidas y que por lo tanto los análisis del producto no podrían, en la mayoría de los casos, reducirse a un sencillo análisis químico de sus componentes, como sí puede ocurrir con los extractos de plantas.

La opinión del HMPC es que para determinados microorganismos sí existe evidencia suficiente como para ser incluidos bajo este paraguas regulatorio. Esta posición se puso de manifiesto en el año 2014, cuando se solicitó información a las partes interesadas para incluir a *S. boulardii* en una monografía o lista. Esta levadura es una de las contadas excepciones en las que podría considerarse que el conocimiento de una cepa microbiana en términos clínicos es suficiente como para incluirla en un procedimiento simplificado. El desarrollo de esta iniciativa es confidencial, pero es evidente que no ha prosperado ni se ha llevado a término.

Independientemente de la terminología científica usada y los aspectos teóricos, los caminos regulatorios de los medicamentos tradicionales a base de plantas o con uso médico suficientemente comprobado son inadecuados para los LBP por dos motivos derivados del hecho de que estos procedimientos son de los llamados simplificados. El primero, que como todo procedimiento simplificado están diseñado para productos muy bien conocidos por los reguladores. Además de no ser este el caso, incluso para los productos con más historia de comercialización, es igual de cierto para la propia industria, sobre todo teniendo en cuenta que la práctica totalidad de los microorganismos que se desarrollarán como LBP serán especies diferentes de las actualmente utilizadas como probióticas, sin ninguna historia de consumo, o incluso especies desconocidas hasta hoy. Por lo tanto, no pueden reducirse los microorganismos aceptables a ninguna lista positiva ya que la mayoría de los integrantes de esa lista pueden ser aún desconocidos. En segundo lugar porque un procedimiento simplificado tiene el objetivo de ser, como su nombre indica, simple. El problema es que en el caso de tecnologías no dominadas, como es el caso de los LBP, esta actitud puede tornarse simplista, comprometiendo incluso la salud de los pacientes. Es por eso que los LBP deben incluirse en una categoría regulatoria, propia o no, que dote a la industria de flexibilidad y garantice la eficacia de los productos y la seguridad de los pacientes.

Un aspecto interrelacionado con la categoría regulatoria de los LBP es su mecanismo o vía de aprobación como fármacos. Como se ha dicho en repetidas ocasiones, los fármacos a base de microorganismos actualmente existentes en los diferentes EM fueron aprobados hace décadas por sus respectivos procedimientos nacionales. No obstante, en el marco normativo actual los microorganismos

podrían tener que aprobarse por una ruta diferente. El procedimiento de autorización centralizado permite al solicitante obtener la autorización de comercialización de un medicamento para todos los EM mediante una sola solicitud ante la EMA, con la revisión única por parte del CHMP y permite la comercialización en todos los EM. Es un procedimiento obligatorio para determinados tipos de fármacos y opcional para otros, aunque es el preferido por los solicitantes por su simplificación. No obstante, en última instancia, la elegibilidad de un medicamento para el mismo es decidida caso por caso por parte de las autoridades.

Siguiendo lo expuesto en el apartado de “Introducción”, los medicamentos que de forma obligatoria han de seguir el procedimiento centralizado son:

- Medicamentos desarrollados por tecnología de ADN recombinante, expresión de proteínas biológicamente activas en procariontes y eucariotes incluidas células de mamífero transformadas, hibridoma y anticuerpos monoclonales
- Medicamentos para uso humano con un principio activo novedoso indicado para SIDA, cáncer, enfermedades neurodegenerativas, diabetes, enfermedades autoinmunes y otras disfunciones inmunes y enfermedades víricas
- Medicamentos huérfanos

Por otra parte, pueden acogerse a este procedimiento los productos que constituyan una innovación significativa desde el punto de vista terapéutico, científico o técnico, o cuya autorización presente un beneficio para los pacientes. A pesar de lo que en muchas ocasiones se dice, no todos los medicamentos biológicos tienen obligatoriamente que someterse al procedimiento centralizado, si bien la mayoría de los existentes hasta ahora sí han tenido que hacerlo. Por no estar especificados en la normativa los LBP son uno de estos casos en los que este procedimiento no es estrictamente necesario para ellos por su mera naturaleza bioquímica o taxonómica o por su método de producción. Este no es el caso de los LBP modificados ya que su desarrollo sí implica tecnología de ADN recombinante.

No obstante, atendiendo a otros criterios, también sería el procedimiento indicado para determinados LBP nativos. Por el área terapéutica en la que se

encuentran, productos que se desarrollaran para combatir o prevenir el SIDA o el cáncer también requerirían la revisión por parte de la EMA. Los medicamentos catalogados como huérfanos como RBX2660 y SER-109 también deben someterse al procedimiento centralizado. El resto de los LBP pueden acogerse al procedimiento por su condición de medicamentos que constituyen una innovación terapéuticamente significativa y, en muchas ocasiones, también por su beneficio para los pacientes. En cualquier caso, y con independencia de su obligatoriedad, el procedimiento centralizado es el más conveniente, y generalmente el elegido, para cualquier fármaco y los LBP no son una excepción.

Por último, y debido tanto a su novedad, a su más que probable limitada historia de uso clínico en el momento de su aprobación y al tipo de condiciones de la salud a la que van dirigidos, es más que probable que la práctica totalidad de los LBP sean considerados medicamentos de uso hospitalario y bajo prescripción médica.

6.3 ASPECTOS PRÁCTICOS DE LOS PROGRAMAS DE DESARROLLO DE FÁRMACOS BASADOS EN LA MICROBIOTA

Los dosieres a presentar a las autoridades tienen como objetivo presentar toda la información relevante a considerar a la hora de autorizar un nuevo fármaco, tanto beneficiosa como no beneficiosa para su aprobación. Como se indicó anteriormente han de estar divididos en tres grandes bloques: pruebas químicas, farmacéuticas y biológicas, pruebas toxicológicas y farmacológicas y documentación clínica. Como fármacos, la información generada en los desarrollos de los LBP y de cualquier otro producto basado en una estrategia terapéutica a través de la microbiota debe ser presentada del mismo modo. En la mayoría de los aspectos los fármacos que actúan a través de la microbiota no serán diferentes del resto de medicamentos en sus consideraciones. Sin embargo en otros casos, y debido tanto a la idiosincrasia como a la novedad de este tipo de enfoques clínicos, podrán ser necesarias determinadas matizaciones relativas a determinados conceptos del desarrollo farmacéutico clásico o al tipo de información a generar, su relevancia y la forma de presentarla. Una vez más los LBP, por su particular naturaleza y complejidad bioquímica, son los que probablemente más consideraciones especiales requieran. A continuación se discuten las matizaciones más importantes que han de ser tenidas en cuenta desde muy temprano en el desarrollo de estos productos, y cuya idoneidad para cada caso individual ha de ser discutida y consensuada con las autoridades. La **TABLA 3** ofrece un resumen de todas las consideraciones especiales para las estrategias terapéuticas a través de la microbiota.

Ámbito	Aspecto o concepto clásico	Problema		Solución o Adaptación	
		Para productos LBP, incluidos FMT	Para otras estrategias terapéuticas a través de la microbiota o desarrollo de fármacos en general	Científico-Técnica	Regulatoria
Calidad	Identidad del principio activo	<ul style="list-style-type: none"> Las guías recomiendan combinar dos técnicas (fenotípicas, metabólicas, bioquímicas, RFLP, PCR), lo que puede ser insuficiente para identificar principios activos tan complejos como microorganismos vivos El nombre de los microorganismos no está regulado por ninguna Farmacopea ni por la OMS La taxonomía microbiana es confusa y puede carecer de relevancia farmacéutica Tanto regulación existente como guías recomiendan el uso de género, especie y subespecie 	No plantea problemas adicionales	<ul style="list-style-type: none"> Basar la identificación en técnicas genómicas a las que se añadan las recomendadas en las guías Considerar la citometría de flujo como adicional dentro de las bioquímicas, fenotípicas o morfológicas 	
	Denominación del principio activo	<ul style="list-style-type: none"> Existen LBP cuya composición no puede ser completamente definida (ej. FMT y algunos consorcios) Contrariamente a lo que ocurre con otros medicamentos, los LBP no pueden ser estériles 	No plantea problemas adicionales	<ul style="list-style-type: none"> Flexibilidad con respecto a la nomenclatura asignada y requerida, respectivamente Puede tenerse que trabajar con nombres diferentes de la nomenclatura preclínica clásica y más cercanos a la identificación genómica Puede considerarse el nombrar por características funcionales en lugar de taxonómicas 	
	Caracterización del producto y esterilidad	<ul style="list-style-type: none"> La potencia está actualmente se equipara con número de células viables medidas como UFC. Se ha demostrado que las células pueden no requerir estar vivas para ejercer su acción y que la dosis así concebida no siempre está asociada a diferentes magnitudes de respuesta Las técnicas estándar de cuantificación actuales tienen un enorme margen de error, muy superior a cualquier otro producto farmacéutico En los casos en los que la potencia sí está relacionada con la viabilidad, la sobreidentificación puede ser necesaria para garantizar una vida útil aceptable desde el punto de vista logístico. El margen de desviación de potencia permitido no excede el 10% para ningún fármaco, lo que es insuficiente para los LBP 	No plantea problemas adicionales	<ul style="list-style-type: none"> En productos con microorganismos la esterilidad se intercambia por la <i>agencia</i> o <i>actinir</i>, aunque garantizar ésta no siempre sea posible (ej. FMT) Hay que poner a punto los mecanismos adecuados para asegurar la ausencia de microorganismos indeseados que puedan interferir con el farmacológico y/o que sean patógenos 	<ul style="list-style-type: none"> No exigir un conocimiento pleno de todos los componentes como criterio fundamental de calidad Exigir únicamente ausencia de una lista positiva de patógenos
	Potencia y dosis	<ul style="list-style-type: none"> En los casos en los que la potencia está relacionada con las UFC, asegurar que los métodos de recuento son los adecuados y con el mínimo margen de error, como citometría de flujo, etc Diseñar medidas de la potencia <i>adicionales</i> a las UFC en todos los casos en base al conocimiento sobre el mecanismo de acción: Número de copias de un gen, de un plásmido que lo contenga Niveles de expresión de ARN, cantidad de proteína de superficie que presente, actividad metabólica, tasa de germinación de esporas, etc Determinar la estabilidad real del producto y sobreidentificar lo mínimo necesario, trabajando con vias útiles del producto ajustadas 	No plantea problemas adicionales	<ul style="list-style-type: none"> En los casos en los que la potencia esté relacionada con las UFC, asegurar que los métodos de recuento son los adecuados y con el mínimo margen de error, como citometría de flujo, etc Diseñar medidas de la potencia <i>adicionales</i> a las UFC en todos los casos en base al conocimiento sobre el mecanismo de acción: Número de copias de un gen, de un plásmido que lo contenga Niveles de expresión de ARN, cantidad de proteína de superficie que presente, actividad metabólica, tasa de germinación de esporas, etc Determinar la estabilidad real del producto y sobreidentificar lo mínimo necesario, trabajando con vias útiles del producto ajustadas 	Flexibilidad en términos de desviaciones máximas en contenido de principio activo aceptables. Del mismo modo que la regla general es 5% y se admite un 10% para radiofármacos, los LBP requerirán márgenes adecuados a sus características

TABLA 3. Resumen de las consideraciones especiales para las estrategias terapéuticas a través de la microbiota

Ámbito	Aspecto o concepto clásico	Problema		Solución o Adaptación	
		Para productos LBP, en ciuidos EMT	Para otras estrategias terapéuticas a través de la microbiota o desarrollo de fármacos en general	Científico-Técnica	Regulatoria
Preclínico	Escala de dosis	<ul style="list-style-type: none"> El hecho de que en muchas ocasiones no haya respuesta dependiente de dosis hace difícil determinar la dosis mínima efectiva tanto en animales como o humanos No existe un mecanismo o criterio para traducir dosis observadas como o efectivas en animales a humanos. De hecho lo observado es que las dosis efectivas suelen ser del mismo orden de magnitud El mismo problema se presenta para las indicaciones pediátricas 	<p>No plantea problemas adicionales, ya que las intervenciones de tipo químico sobre la microbiota si suelen mostrar claros perfiles de dosis-respuesta</p>	<ul style="list-style-type: none"> Desarrollar criterios de toma de decisiones o algoritmos sistemáticos basados en el mecanismo de acción de cada LBP Se propone un criterio para LBP cuyo mecanismo de acción dependa de la cantidad superficial colonizada por el microorganismo Validar biomarcadores <i>surrrogados</i> asociados al tratamiento en investigación para facilitar los estudios de escala de dosis 	<ul style="list-style-type: none"> Incentivar el desarrollo de estos algoritmos requiriendo la justificación acerca de la elección de la potencia o dosis escogidas Exigir especialmente ensayos de escalado de dosis tempranos, en los que este factor se estudie conjuntamente con la seguridad del tratamiento y en los que se validen biomarcadores <i>surrrogados</i> para posteriores etapas del desarrollo clínico
	Modelos animales	<ul style="list-style-type: none"> La microbiota es altamente característica en términos taxonómicos para cada especie No existen modelos animales validados para microbiota, y las diferencias anatómicas, fisiológicas y etológicas pueden hacer que su desarrollo sea particularmente complicado Se trabaja con el estándar, tanto a nivel técnico como de recomendaciones en las guías, de los modelos animales libres de gérmenes y probióticos, cuyo ecosistema microbiano es inexistente o está significativamente alterado 	<p>Los modelos animales relevantes basados en síndicos o cándicos, especialmente con floras <i>humanizadas</i> al menos en términos de funciones eco-fisiológicas</p> <ul style="list-style-type: none"> Tratar con cautela los resultados con animales libres de gérmenes y probióticos más allá de su mero valor en las etapas más tempranas de descubrimiento o en estudios mecanísticos 	<ul style="list-style-type: none"> Depositar la comitanza en los expertos para que seleccionen los modelos más adecuados para cada indicación y estrategia terapéutica No focalizar demasiado la evidencia en animales libres de gérmenes o probióticos ya que los resultados con ellos pueden no ser siempre relevantes 	
Preclínico Clínico	Biomarcadores	<ul style="list-style-type: none"> El principal problema tanto técnico como para la toma de decisiones regulatorias es la ausencia de definición de <i>normalidad</i>. Se tiende a atender demasiado a marcadores de composición de la microbiota, especialmente taxonómicos y especialmente a nivel de filo, lo cual puede no ser significativo Con la posible excepción de IBD10, no existen actualmente biomarcadores ligados a la composición de la microbiota con validación clínica suficiente como para ser correlacionados con el estado de salud o el avance de una enfermedad 	<ul style="list-style-type: none"> Trabajar con objetivos y biomarcadores con la mayor relevancia clínica desde el desarrollo más temprano Trabajar en la validación de biomarcadores <i>surrrogados</i> ligados a los antenores Existen evidencias que indican que los biomarcadores ligados a la función en lugar de a la taxonomía pueden ser más robustos Tener presente los posibles cambios de paradigma, como que pueden existir enfermedades causadas por microorganismos pero que no se rigen por los Postulados de Koch o que la acción terapéutica de un LBP puede no requerir la colonización del cuerpo, actuando simplemente durante su <i>pase transitorio</i> 	<ul style="list-style-type: none"> Con el objetivo de garantizar la seguridad de los pacientes y la efectividad de los tratamientos, se ha de continuar con la política estricta de atender únicamente a objetivos con relevancia clínica No obstante, se ha de incentivar el desarrollo y la validación de biomarcadores <i>surrrogados</i> ligados al mecanismo de acción de LBP 	
	Análisis de muestra	<ul style="list-style-type: none"> Unida a la falta de definición de <i>normalidad</i>, está la falta de estandarización en la toma de muestras, su análisis y el procesamiento de la información Se sabe que todos estos factores afectan a los resultados del análisis de la microbiota 	<p>El aspecto más importante es trabajar hacia la estandarización dentro de la industria, y muy especialmente en ensayos clínicos multi-centro o multi-nacionales, en los que la comparabilidad de los resultados es fundamental</p>	<ul style="list-style-type: none"> Exigir la validación de métodos estandarizados para el análisis de muestras y datos, incluso diseñados para casos o ensayos concretos y de forma individual Colaborar con la academia y la industria en estos esfuerzos de estandarización 	

TABLA 3 (cont. 1). Resumen de las consideraciones especiales para las estrategias terapéuticas a través de la microbiota

Ámbito	Aspecto o concepto clásico	Problema		Solución o Adaptación	
		Para productos LBP, incluidos FMT	Para otras estrategias terapéuticas a través de la microbiota o desarrollo de fármacos en general	Científico-Técnica	Regulatoria
Clínico general	Muestras clínicas	<ul style="list-style-type: none"> En línea con el punto anterior, el tipo de muestra para analizar la misma microbiota es muy determinante del resultado obtenido Las más accesibles o menos invasivas pueden no ser las más representativas o relevantes para la indicación estudiada o para el mecanismo de acción implicado en la terapia 	<ul style="list-style-type: none"> Es de suma importancia utilizar las muestras más relevantes y significativas, incluso aunque requieran una invasividad mayor Importante el diálogo con comités de ética para acordar pruebas que requieran mayor invasividad y que puedan parecer innecesarias con los estándares actuales 	<ul style="list-style-type: none"> En caso de aceptar biomarcadores <i>surrogados</i>, derivados de la microbiota, exigir estandarización y consistencia en los datos obtenidos de las muestras 	
	Representatividad	<ul style="list-style-type: none"> La experiencia ha demostrado que es extraordinariamente difícil encontrar pares comparables con respecto a la composición taxonómica de su microbiota para la realización de ensayos clínicos Se sabe que una enorme cantidad de factores como la dieta o incluso el sueño pueden causar modificaciones en la composición de la microbiota, aunque no se conoce su impacto real en la salud del hospedador Es probable que distintas composiciones de microbiota predefinan las interacciones de ésta con un LBP, la probabilidad de colonización, o la metabolización diferencial de otro tipo de fármacos en el ámbito de la medicina estratificada o personalizada 	<ul style="list-style-type: none"> Una alternativa que se anija más estable y probablemente relevante que la composición taxonómica es la de funciones ecológicas de la microbiota. Esto puede simplificar el reclutamiento y el seguimiento de los efectos sobre la microbiota Será fundamental llevar a cabo los ensayos en las condiciones lo más controladas posible para minimizar variaciones en la microbiota debidas a factores distintos de la intervención farmacológica 	<ul style="list-style-type: none"> Confiar limitadamente en biomarcadores relacionados con la microbiota a no ser que estén debida y ampliamente validados Exigir un control riguroso de las variables que puedan modificar la composición de la microbiota durante el estudio 	
	Excipientes y placebo	<ul style="list-style-type: none"> Es posible que los excipientes que incluya el fármaco tengan un efecto sobre la microbiota, ya que muchos de los más comunes han sido descritos como poseedores de esa capacidad Este mismo problema surge en el placebo, que suele componerse de los excipientes del fármaco sin principio activo, lo que puede ejercer un <i>efecto placebo</i> inusualmente elevado tanto a nivel biomarcadores <i>surrogados</i> como a nivel clínico 	<ul style="list-style-type: none"> Siempre que se utilicen biomarcadores relacionados con la microbiota, independientemente del tipo de terapia, hay que tener en cuenta ese posible efecto modificador en los ensayos <i>in vitro</i>, preclínicos y clínicos La composición del fármaco ha de optimizarse para permitir que el principio activo, sea microbiano o no, actúe de la forma prevista y sin interferencias 	<ul style="list-style-type: none"> Exigir la discusión de esta posibilidad en los desarrollos de fármacos, así como la realización de pruebas <i>in vitro</i> de la capacidad de los ingredientes de ocasionar variaciones en la microbiota, muy especialmente en las ocasiones en las que biomarcadores relacionados con ella se empleen como justificación de la seguridad, la eficacia o el mecanismo de acción 	

TABLA 3 (cont. 2). Resumen de las consideraciones especiales para las estrategias terapéuticas a través de la microbiota

Ambito	Problema		Solución o Adaptación			
	Aspecto o concepto clásico	Para productos LBP, incluidos FMT	Para otras estrategias terapéuticas a través de la microbiota o desarrollo de fármacos en general	Centífico-Técnica		
Farmaco cinética	Absorción y Biodisponibilidad	Los LBP no se absorben, siendo su incapacidad de translocar al torrente sanguíneo una de las principales medidas para evaluar su seguridad	<ul style="list-style-type: none"> • Metabolización por determinados miembros de la microbiota puede variar para muchas moléculas o compuestos • Será importante tener en cuenta este factor en el futuro, cuando se conozca mejor la microbiota, para considerar estratificación o personalización de los tratamientos 	<p>El concepto más similar a los de <i>absorción</i> y <i>biodisponibilidad</i> es la capacidad de <i>adsorción</i> o <i>retención</i> en la localización del cuerpo a la que están destinados</p> <ul style="list-style-type: none"> • No obstante, ha de tenerse en cuenta que la retención o colonización del cuerpo por parte del microorganismo puede no ser necesaria para ejercer su efecto terapéutico, para el que puede ser únicamente necesario su <i>pass transitorio</i>. En estos casos la biodisponibilidad se corresponderá con su capacidad de alcanzar su diana terapéutica, ya sea en el cuerpo del hospedador o en la microbiota • En los casos en los que la colonización sea importante para el mecanismo de acción, la velocidad de colonización puede ser importante 	Regulatoria	
	Distribución	Los LBP no se absorben, siendo su incapacidad de translocar al torrente sanguíneo una de las principales medidas para evaluar su seguridad	No plantea problemas adicionales	<ul style="list-style-type: none"> • El concepto en su lugar debería ser la <i>extensión</i> en la estructura del cuerpo que deban colonizar para ejercer su acción terapéutica, y la evolución de esta extensión a lo largo del tiempo • Este concepto puede tener una relevancia limitada en los casos en los que el agente terapéutico no requiera estar viable o colonizar ninguna superficie corporal • Habrá que medir la distribución <i>in situ</i> en casos donde el mecanismo de acción indique que ésta es importante para el efecto terapéutico, cuanto tiempo tarda en colonizar y durante cuánto tiempo se mantiene 	<ul style="list-style-type: none"> • Contemplar la posibilidad de que conceptos clásicos del desarrollo de fármacos requieran matización al tratar con la microbiota, tal y como ocurre con otros fármacos complejos como muchos biológicos • Asegurar que la distribución o <i>extensión</i> se están cuantificando de forma adecuada y en las áreas relevantes para el mecanismo de acción • En ensayos con fármacos de tipo más convencional, incentivar los estudios centrados en el metabolismo causado por la microbiota de forma conjunta al del hospedador 	
	Biotransformación o metabolización	En la gran mayoría de casos los LBP concebidos hasta ahora no tienen que ser viables para colonizar el cuerpo del hospedador o ejercer su acción durante su <i>pass transitorio</i> por el mismo	Metabolización por determinados miembros de la microbiota puede variar para muchas moléculas o compuestos. Será importante tener en cuenta este factor en el futuro, cuando se conozca mejor el papel de la microbiota en el metabolismo de los medicamentos, para considerar estratificación o personalización de los tratamientos	<p>Puede entenderse como <i>biotransformación</i> el conjunto de cambios metabólico-fisiológicos que sufren los LBP al entrar en contacto con estructuras del hospedador (como receptores del sistema inmune) o con elementos de la microbiota que han de colonizar o a través de la cual han de pasar</p> <p>Estos cambios pueden albergar la clave del mecanismo de la acción terapéutica y deben ser estudiados en detalle antes, durante y después de su periodo de retención en el hospedador con fines comparativos</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Contemplar la posibilidad de que conceptos clásicos del desarrollo de fármacos requieran matización al tratar con la microbiota, tal y como ocurre con otros fármacos complejos como muchos biológicos • En ensayos con fármacos de tipo más convencional, incentivar los estudios centrados en el metabolismo causado por la microbiota de forma conjunta al del hospedador • Incentivar este tipo de experimentos con el objeto de ganar entendimiento acerca del mecanismo de acción así como del perfil de seguridad del LBP 	
Excreción	En general los LBP o sus componentes no se <i>accretan</i> en el sentido fisiológico estricto	Metabolización por determinados miembros de la microbiota puede variar para muchas moléculas o compuestos. Será importante tener en cuenta este factor en el futuro, cuando se conozca mejor el papel de la microbiota en el metabolismo de los medicamentos, para considerar estratificación o personalización de los tratamientos	<ul style="list-style-type: none"> • El concepto más adecuado sería <i>no-retención</i>, <i>no-colonización</i> o <i>expulsión</i>. • Puede referirse tanto a LBP que no requieran colonizar para mediar su efecto terapéutico o para aquellos que sí lo requieran pero que acaben abandonando el cuerpo al cabo del tiempo • En terapias más convencionales será importante determinar el papel directo o indirecto de la microbiota en el metabolismo y excreción de los metabolitos provenientes del fármaco administrado 	<p>Contemplar la posibilidad de que conceptos clásicos del desarrollo de fármacos requieran matización al tratar con la microbiota, tal y como ocurre con otros fármacos complejos como muchos biológicos</p>		

TABLA 3 (cont. 3). Resumen de la consideraciones especiales para las estrategias terapéuticas a través de la microbiota

6.3.1 Identidad y denominación de la sustancia medicamentosa

El nombre de las sustancias medicamentosas o ingredientes activos contenidos en un medicamento es una de sus características descriptivas más básicas. La legislación indica que las sustancias deben denominarse según la terminología ordinaria, por el nombre en el que figuren en una farmacopea europea o de un EM, por la denominación común internacional recomendada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) o, en su defecto, por la denominación científica exacta. También añade que

“los productos que carezcan de denominación común internacional o de denominación científica exacta se designarán mediante referencia a su origen y al modo de obtención, completándose estos datos con cualquier otra observación de utilidad”

En todas las guías para el desarrollo de LBP se coincide en que los organismos deben ser denominados, inequívocamente, por su género, especie, subespecie (si es el caso) y su cepa. Ante la falta de referencias a su respecto por parte de las farmacopeas o de la OMS, este criterio que puede parecer sencillo, esconde dificultades en el momento en que se ahonda mínimamente en los aspectos prácticos de la microbiología.

Los métodos clásicos de clasificación taxonómica de microorganismos se han basado en aspectos fenotípicos, metabólicos y bioquímicos, siguiendo criterios como la capacidad de crecimiento en determinados medios selectivos y/o con determinadas moléculas como única fuente de carbono, en concentraciones diferentes o en ausencia de oxígeno, la posesión de determinadas enzimas, la respuesta de su pared a diferentes tinciones, su capacidad para formar esporas, su morfología al microscopio o su morfología macroscópica al crecer en colonias. Las guías también recogen la recomendación de utilizar para esa identificación, de forma adicional a las anteriores, técnicas de genética molecular como PCR (por las siglas en inglés de “Polymerase Chain Reaction”) específicas o RFLP (por las siglas en inglés de “Restriction Fragment Length Polymorphism”), lo que es muy adecuado ya que añade un grado de certeza en la identificación.

No obstante, la experiencia está demostrando que ni siquiera la combinación de técnicas clásicas con técnicas genéticas es suficiente, en muchas ocasiones, a la hora de identificar inequívocamente un microorganismo. Es aquí donde las técnicas genómicas, de base molecular basadas en la secuenciación genómica masiva aportan una mayor certeza. Todas las guías recomiendan que el genoma(s) del (los) microorganismo(s) que compone(n) la sustancia activa estén completamente secuenciado(s). Además de ayudar a su identificación, esta labor permite realizar análisis adicionales sobre el (los) microorganismo(s) en términos de seguridad y probablemente de eficacia. Para ello tanto su información cromosómica como la contenida en plásmidos, no incluidos en las guías, deberían analizarse.

Cabe destacar la importancia creciente de las técnicas de citometría de flujo, que permiten no sólo la cuantificación de microorganismos sino también su identificación a nivel de cepa y la determinación acerca de su viabilidad. Todos estos métodos, salvo este último, aparecen en las guías como criterios de identificación de los microorganismos que constituyen la sustancia activa del LBP y para constatar su presencia como criterio de calidad.

A pesar de que la combinación de técnicas fenotípicas, morfológicas, bioquímicas, genéticas y genómicas puede otorgar un alto grado de seguridad acerca de la identidad de un microorganismo, la certeza puede no ser completa, al menos al nivel que puede requerirse en el mundo farmacéutico. Como se comentó anteriormente, se sabe que existe una diversidad microbiana enorme, estimada en más de un millón de "tipos" de microorganismos procariotas, de la cual se conoce sólo una pequeña fracción. (475). Es más, a pesar de que se han realizado distintas propuestas (476), no existe una definición oficial o totalmente aceptada acerca del concepto de especie para los microorganismos, y las especies microbianas que hoy se manejan han sido definidas con criterios diferentes según la época de su descubrimiento, de la disciplina de trabajo de su descubridor o el campo de aplicación del microorganismo (clínica, ambiental, industrial). El criterio generalizado es realizar la clasificación como proponen las guías para LBP, en base a análisis fenotípicos y genotípicos, siendo el criterio genotípico determinante el que dos organismos tengan al menos un 70% de identidad de secuencia para ser catalogados como de la misma especie (477,478). La

comprobación del porcentaje de identidad de secuencia se hace por comparación con secuencias depositadas en bases de datos de dominio público, que son ampliamente reconocidas como incompletas (479). Hay expertos que incluso defienden que el concepto de especie no significa nada y que por tanto no debería ser aplicado en el mundo microbiano (480). Para añadir un nivel más de complejidad, dentro de una misma especie microbiana pueden existir subespecies, cepas y biotipos, para cuya definición los criterios no están demasiado claros. Las deficiencias en la clasificación no son de una importancia menor, especialmente cuando se conoce la tremenda diversidad de los microorganismos. Simplemente como ejemplo ilustrativo, Martin Blaser en su libro "Missing microbes" (481), citando el trabajo de Norman Pace en Science en 1997, afirma que según el criterio actual de especie microbiana, el ser humano y el maíz están taxonómicamente más próximos que las bacterias *E. coli* y *Clostridium* (482).

Esta confusión se ha plasmado a lo largo de la historia de la microbiología en reclasificaciones y redenumeraciones de tipos microbianos muy frecuentes, incluso en casos de bacterias cuyo uso es muy común en clínica o alimentación y en tiempos recientes. Es el caso de la unificación en el año 2002 bajo el nombre de *Bifidobacterium longum* de lo que eran tres especies distintas, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* y *Bifidobacterium suis*, (483) y su posterior separación en el año 2008 (484). También de la denominación inicial de *Bifidobacterium bifidum* como *Bacillus bifidus communis*, la clasificación inicial de *H. pylori* como *Campylobacter pyloridis* o las múltiples reasignaciones de especies del género *Lactobacillus*. En este último ejemplo *Lactobacillus bavaricus* pasó a ser *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus cellobiosus* es ahora *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* constituye ahora su propia especie, *Lactobacillus rhamnosus* y *Lactobacillus yamanashiensis* se ha convertido en *Lactobacillus mali*. Es más, existen múltiples casos de cambio de género. Por ejemplo, *Lactobacillus carnis*, *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus maltaromicus* y *Lactobacillus piscícola* pertenecen ahora al género *Carnobacterium*, *Lactobacillus rimae* al género *Atopobium* y *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus kandleri*, *Lactobacillus minor*, *Lactobacillus viridescens* y *Lactobacillus halotolerans* al género *Weissella*. *Lactobacillus xylosus* se clasifica actualmente como *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lactobacillus minutus* y *Lactobacillus fructosus* como *Leuconostoc fructosum* y *Lactobacillus uli* como *Olsenella*

uli (485). Incluso productos aprobados como medicamentos poseen. Un ejemplo ya ha sido citado anteriormente, es Infloran, un medicamento OTC biológico no sustituible por el farmacéutico, que dice contener *Lactobacillus bifidus*, nombre con el que colectivamente se conocía antes de los años 1960 al género *Bifidobacterium*. Por su parte Lacteol indica en su prospecto que contiene *Lactobacillus acidophilus* cepa Lacteol, nombre que más tarde equipara a *Lactobacillus fermentum* y *Lactobacillus delbrueckii*.

La incertidumbre con respecto a la clasificación taxonómica y los volúmenes de información que se generan en el análisis de comunidades microbiológicas complejas han llevado a los investigadores a generalizar el uso del concepto de OTU, que sirve igualmente para designar una especie o cualquier otra categoría taxonómica. A su vez, los criterios para asignar dos lecturas genómicas a una misma OTU son arbitrarios, aunque típicamente se usa el 97% de identidad de secuencia (486).

Otra tendencia existente en el sector es la del uso de denominaciones taxonómicas que podrían ser catalogadas como laxas. Los clostridios, que incluyen especies del género *Clostridium* y de otra docena de ellos, son de una enorme importancia en la ecología y por ende en la fisiología de la microbiota intestinal y de hecho algunos son la sustancia activa de medicamentos en investigación. A pesar de la existencia y disponibilidad de métodos moleculares que permitirían su clasificación y de la severidad regulatoria del mundo farmacéutico, algunos desarrollares de LBP manejan en la documentación de sus desarrollos la nomenclatura de las especies propuesta hace más de 20 años (487), y que clasifica estos microorganismos en diecinueve grupos (I-XIX). Por ejemplo Vedanta y Janssen declaran que su VE202 contiene clostridios de los grupos IV y XIVa sin más detalle. Estos dos grupos comprenden casi veinte especies distintas cuya presencia o ausencia no se especifica en los documentos, o al menos en aquellos de dominio público y dirigidos a la comunidad científica.

Por lo tanto, y aunque suponga un caso excepcional en el mundo farmacéutico, la denominación de la sustancia activa tal y como se enfoca científicamente en la actualidad (género, especie, subespecie) puede no ser siempre adecuada, y la denominación *per se* puede suponer un factor poco importante en los LBP. No hay que olvidar que en el campo de la microbiota,

donde un gran porcentaje de los microorganismos son desconocidos, los criterios para la clasificación pueden variar. Es más, como se discutirá en detalle más adelante, es posible que la nomenclatura que se adopte en algunos casos no sea mediante epítetos arbitrarios, sino que responda a funciones ecológicas, fisiológicas o incluso biogeoquímicas llevadas a cabo por el microorganismo mediando el efecto del LBP. Por ejemplo AOBiome centra sus investigaciones en las bacterias nitrificantes de la piel, con atención especial a *Nitrosomonas eutropha*. En un caso distinto al enfoque LBP, pero análogo y también ilustrativo, SYN-010 de Synthetic Biologics es una molécula pequeña dirigida contra el metabolismo metanogénico, si bien la empresa especifica el nombre de la bacteria *Methanobrevibacter smithii* en su literatura por ser una de las más destacadas arqueas con esa capacidad en el intestino. Este fenómeno podría darse a llamar clasificación por “funcionomía” en contraposición a la clasificación por taxonomía.

Dejando la discusión terminológica para la identificación, es importante exigir la puesta a punto de métodos, fruto de la combinación de técnicas bioquímicas, fenotípicas, genéticas y genómicas que permitan identificar inequívocamente las sustancias activas microbianas y localizarlas y cuantificarlas en el producto final (LBP) o en el cuerpo tras su administración. La recomendación de utilizar sólo dos métodos complementarios recogida en la Guía para LBP de la FDA se antoja insuficiente. Declarar además la fuente de origen del microorganismo (ambiental, humano, animal), así como su modo de obtención, puede ser importante y supone cumplir con las instrucciones de la Directiva 2001/83/CE.

Como se detallará más adelante, es igualmente importante poner a punto estos métodos para la identificación y cuantificación fiable de biomarcadores de tipo microbiano relacionados con la seguridad o la eficacia de todos los fármacos que utilicen la microbiota humana como estrategia terapéutica, sean éstos LBP o cualquier otro de los discutidos. No obstante, conviene recordar que toda la discusión realizada acerca de la nomenclatura es aplicable únicamente a los fármacos de tipo LBP o bacteriófagos, ya que cualquier otro tipo de estructura bioquímica farmacológica, desde las moléculas pequeñas a los biológicos, debería

regirse en base a los criterios de nomenclatura propios de los productos de su misma naturaleza bioquímica.

6.3.2 Caracterización y composición del medicamento: la dosis, la potencia y la importancia del mecanismo de acción

La correcta caracterización del medicamento como producto final en términos de composición tanto cualitativa como cuantitativa, y en referencia tanto a su(s) principio(s) activo(s) como al resto de sus componentes es un criterio de calidad muy importante. En este sentido vuelve a tomar gran relevancia todo lo dicho acerca de la necesidad de métodos adecuados para la correcta e inequívoca identificación de las sustancias activas en los productos de tipo LBP o virus. Para el resto de los productos discutidos la situación no es diferente de la de otros de la misma naturaleza química y cuyo mecanismo de acción no sea mediado por la microbiota. Además es importante destacar la enorme importancia de la capacidad de dichos métodos para cuantificar, en las unidades adecuadas la potencia de la sustancia activa dentro del producto.

Es igualmente importante garantizar que sólo los microorganismos que se pretende que estén en el medicamento son los que se encuentran en él. Mientras que en fármacos de tipo molécula pequeña o péptido lo importante es su esterilidad, el equivalente en LBP o FMT es la agenia o axenia, es decir, la ausencia de formas de vida no intencionadas en el producto. Para garantizar esto es igual de importante disponer de los marcadores que permitan la identificación inequívoca del organismo e cuestión y que permitan diferenciarlo de otros no deseados, así como de las técnicas lo suficientemente sensibles como para detectar cantidades muy pequeñas de contaminantes. Esto es especialmente importante en los casos en los que se utilicen como fármacos cepas microbianas taxonómicamente próximas a otras con capacidad toxigénica (*C. difficile* y *E. coli*, por ejemplo). Habrá casos en los que garantizar la ausencia de microorganismos distintos del principio activo no sea posible. Es más, hay algunos productos, como SER-109 de Seres Therapeutics en el que el principio activo no está plenamente definido, ya que el fármaco está compuesto por esporas de cincuenta especies de un conjunto de dos mil *Firmicutes* en la que la única que está siempre presente es *Collinsella aerofaciens*. En el caso del FMT, en principio, no hay una composición de producto definida, dependiendo ésta en gran medida del donante del material fecal. En estos casos el enfoque se centra en garantizar la ausencia de especies,

cepas o metabolitos, como *C. difficile* toxigénico, *E. coli* enterocolítica y sus toxinas, *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Shigella* y sus toxinas, *Campylobacter*, *Yersinia*, *H. pylori*, *Giardia*, *Cryptosporidium*, *S. aureus* meticilin-resistente, *Vibrio* y *Listeria*. En estos casos complejos el enfoque que probablemente adopten las autoridades será el de regular no el producto en sí, sino el proceso de fabricación del mismo. Este es un enfoque que ya se utiliza en otros medicamentos de gran complejidad, como son los biológicos, los biosimilares y los bacteriófagos en sus aplicaciones alimentarias. Los fabricantes de estos productos terapéuticos de composición indefinida deberán diseñar y validar protocolos estandarizados y estrictos para la selección de donantes, recogida y preparación del material, análisis que permitan descartar la presencia de patógenos y otros factores de riesgo, conservación, transporte, aplicación y seguimiento de los pacientes, ya que de eso dependerá la autorización de sus tratamientos.

Tradicionalmente, en los productos con microorganismos en el campo de la alimentación la potencia y la dosis se han tratado como conceptos prácticamente sinónimos y unificados bajo el parámetro de recuento de ufc presentes en el producto. Esta práctica sigue siendo habitual en los ensayos preclínicos y clínicos con LBP de todo tipo, incluyendo los FMT, pero se antoja insuficiente por sí sola para los estándares de los desarrollos farmacéuticos del nivel que estos productos demandan. Una de las ideas más arraigadas en el mundo de la microbiota es que, en general, el factor más importante es la cantidad. Al nivel de la investigación esto se manifiesta en la forma de que la práctica totalidad de los estudios se centran en el análisis de la composición de las categorías taxonómicas dominantes. Por ejemplo, un criterio muy extendido por motivos prácticos es estudiar sólo la composición de la microbiota intestinal por sus taxones bacterianos que suponen al menos un 1% de las lecturas genómicas (488–490). A pesar de los múltiples estudios que destacan la importancia ecofisiológica de otros elementos muchísimo menos abundantes como bacterias menos representadas (141), así como las levaduras (491) o los hongos filamentosos (466), las investigaciones se siguen centrando en las bacterias más abundantes.

Existe una gran demanda en el mundo de los probióticos por productos que contengan mezclas de muchas bacterias en las más altas concentraciones posibles. Típicamente son combinaciones de lactobacilos, bifidobacterias y *S. thermophilus*.

La OMS recomienda una dosis diaria de al menos 10^9 ufc, y los productos comerciales se mueven entre ese límite y el orden de 10^{11} ufc por dosis y por día, muy raramente especificando cómo cada especie bacteriana contribuye a ese recuento. A pesar de la magnitud de esas cifras, es necesario reflexionar acerca de lo que suponen en el conjunto del organismo o de la microbiota intestinal. Aun asumiendo que la totalidad de las bacterias ingeridas en el producto de mayor potencia colonizaran el intestino grueso, ésto supondría una cantidad de células del mismo orden de magnitud del que existe en un solo gramo de heces en el colon (12,144). Si se asume que los probióticos o que los LBP tienen capacidad para ser efectivos en modelar la salud humana, habrá que asumir también que es posible que en algunos casos esa capacidad no venga mediada únicamente por la cantidad de ufc.

La prueba definitiva desde el punto de vista clínico de la relación del efecto terapéutico con la cantidad de producto ingerido son los ensayos de dosis-respuesta. No es posible extraer demasiadas conclusiones acerca de la respuesta a cantidades variables de microorganismos utilizando lo publicado en el sector alimentario con los probióticos como aproximación a lo esperable en los LBP en términos de dosis, ya que estos estudios de dosis-respuesta generalmente no existen (492,493). En los pocos casos en los que estos ensayos se han realizado se han obtenido resultados discordantes. Hay otros en los que se observan determinados efectos dependientes de ella (494,495). Atendiendo a los ensayos conducidos en humanos con LBP también es difícil extraer conclusiones por la escasa disponibilidad de información clínica. Hay que destacar que mucha de la información a este respecto es confidencial de las respectivas empresas.

Uno de los programas más avanzados, el de Oxabact de OxThera que se encuentra ya en fase 3, ha oscilado en potencias de entre 10^7 y 10^9 ufc por dosis, administradas dos veces al día durante periodos de 6 a 10 semanas en distintos ensayos, decantándose finalmente por una dosis de no menos de 10^7 ufc de *O. formigenes* administrada durante 8 a 10 semanas, dos veces al día. La empresa no detalla cómo ha llegado al cálculo de esa dosis ni si ha detectado efecto dosis-respuesta en los distintos ensayos. Por su parte Osel probó en humanos su producto Lactin-V tópico vaginal a tres potencias diferentes, 5×10^8 , 10^9 y 2×10^9 ufc, aplicadas una vez al día durante 5 días consecutivos, seguidas de una aplicación

semanal durante dos semanas, resultando las tres dosis igual de seguras en el ensayo fase 1, en el que no se consideraron objetivos de eficacia (370). Por esa razón en su ensayo subsiguiente (367), de fase 2, la empresa optó por utilizar la concentración más alta antes citada. En ensayos preclínicos con monos (*Macaca nemestrina*), la dosis empleada había sido de 10^8 ufc (496).

Para comprobar la seguridad y algunos biomarcadores preliminares (sustitutos o también llamados “subrogados” por traducción directa del inglés *surrogate endpoints*) de eficacia para su NTCD-M3, Shire realizó dos ensayos. En el primero (497), de fase 1, se administró oralmente a ochenta pacientes diferentes potencias (10^4 , 10^6 o 10^8 esporas) en dosis única, o repartidas en una dosis diaria durante catorce días o en dos dosis diarias durante cinco días. A uno de los grupos se le realizó un pretratamiento con vancomicina durante cinco días, y todos los grupos tuvieron un control por placebo. Ninguno de los individuos que recibió una única dosis del producto, independientemente de la concentración de esporas, poseía la cepa M3 en sus heces en los veintiocho días posteriores a su administración. En los pacientes que recibieron el producto en diez dosis (dos diarias durante cinco días a la máxima concentración, 10^8), la cepa M3 se detectó durante los primeros días tras el fin del tratamiento pero dejó de detectarse nueve días después. En los individuos pretratados con antibióticos, que además recibieron el tratamiento durante catorce días, e independientemente de la concentración recibida, se observó colonización por la cepa en estudio en el 44% de ellos siete y catorce días tras el fin del tratamiento, valor que se redujo al 22% tras un mes y al 0% tras tres meses. En el segundo de los ensayos, de fase 2, y para definir la potencia y dosis óptimas, se utilizaron tres regímenes de administración, todo ellos diarios: 10^4 esporas durante siete días; 10^7 esporas durante siete días o 10^7 esporas durante catorce días. Utilizando la colonización del intestino del paciente, medida a través de la presencia de la sustancia activa en heces, como biomarcador sustituto de eficacia para la prevención de la recurrencia de la diarrea por *C. difficile* se observó que los pacientes recibiendo 10^7 esporas durante siete días eran colonizados en un 86% de los casos, mientras que los que recibían 10^4 esporas durante el mismo tiempo lo eran en un 68% de los casos. En los pacientes a los que se administró la potencia en ufc más alta y durante el mayor periodo de tiempo, 10^7 esporas durante catorce días, esta cifra sólo llegó al 73%, traduciéndose además en una tasa de recurrencia de la diarrea

por *C. difficile* mayor que la observada en régimen de 10^7 esporas durante siete días (497,498).

Fuera de los LBP más sencillos como los anteriores, en los LBP modificados, existen los ejemplos de AG013 de Oragenics, en el que el *L. lactis* expresando el factor trébol humano se administró a una potencia constante de $2,03 \times 10^{11}$ ufc/ml en un colutorio bucal a dosis constantes de 15 ml, marcándose la dosis diaria total como el número de veces al día que el paciente utiliza los 15 ml prescritos (de una a seis veces al día, resultando en dosis diarias efectivas de $2,03 \times 10^{11}$, $6,03 \times 10^{11}$, y $1,23 \times 10^{12}$ ufc, respectivamente). En la publicación de su ensayo fase 1b la empresa reconoce haber usado una dosis ligeramente superior a la empleada en el modelo de hámster y que no se consideró una dosis mínima por lo limitado en el tiempo de la exposición y la seguridad de AG013 observada con anterioridad (499). Con otro LBP modificado de uso tópico, esta vez vaginal, MucoCept de ActoGeniX-Intrexon, fueron utilizados a dosis entre las $9,4 \times 10^9$ y las 10^{11} ufc (500), sin conclusiones acerca de la dosis más efectiva.

En el ámbito del FMT la definición de la potencia se complica al ser su composición también bastante incierta, por lo que suele medirse la dosis en gramos de material trasplantado. Con este criterio OpenBiome realizó un ensayo con diecisiete pacientes a los que administró dos dosis diferentes de su FMT Capsule G3, observando una tasa de eficacia para ambas dosis del 70%. Evidentemente, para el caso de otras estrategias terapéuticas como las moléculas pequeñas, este debate no se da, ya que su potencia es determinable por métodos clásicos independientemente de su diana terapéutica. Por lo tanto, y resultando patente que existen pocos datos, es muy difícil extraer conclusiones acerca de la existencia de efectos potencia o dosis-respuesta en los ensayos en los que componentes de la microbiota, ya sean LBP nativos, modificados o FMT, sean administrados.

La reflexión importante es la consideración de que la potencia, y por tanto la dosis y la dosis diaria, de un LBP, de un LBP modificado o de un FMT puede no residir únicamente en el recuento de ufc, que es la visión reinante hasta el momento. Aunque evidentemente puede resultar un factor fundamental, es necesario considerar factores adicionales a las ufc para describir la potencia del fármaco. Para esto es crucial el conocimiento, al menos en parte, del mecanismo

de acción de la sustancia activa. Es además necesario recordar que, en caso de que los microorganismos administrados tengan la capacidad de colonizar el cuerpo humano, éstos se reproducirán pudiendo alcanzar tamaños poblacionales diferentes a los inicialmente administrados y a los que inicialmente se asentaron en el organismo. Es por este motivo por el que otro aspecto adicional a considerar al medir la potencia del fármaco pueda estar relacionado con su capacidad de división o su tiempo de generación, entre otros. No deja de ser sorprendente, sin embargo, que en la inmensa mayoría de los ensayos en los que se utilizan cantidades conocidas de microorganismos, e independientemente de si pertenecen al sector alimentario o farmacéutico, del área terapéutica, de la parte del organismo a la que estén destinados, o incluso de si se realizan sobre humanos adultos o niños o sobre animales, las dosis escogidas se mueven en el rango de 10^8 - 10^{11} ufc, obteniéndose resultados de seguridad y eficacia similares en todos los casos. Por ejemplo NTCD-M3 de Shire fue administrado en un ensayo preclínico en hámsters en una dosis única de 10^6 esporas, mientras que las dosis totales efectivas empleadas en los ensayos clínicos en humanos subsiguientes fue de entre 7×10^4 y $1,4 \times 10^8$ ufc (501).

Como se describió en el apartado de “Introducción”, existen múltiples estrategias para medicar la microbiota o el cuerpo humano a través de ella. Esto resulta de las múltiples interacciones y vías de comunicación bidireccionales existentes entre los miembros que la componen y el hospedador (ecológicas, físico-estéricas inmunitarias, metabólicas, neuroendocrinas, etc.) y que pueden alcanzar niveles de complejidad muy altos. Es por tanto posible que si el mecanismo de acción de un agente terapéutico es principalmente de tipo físico, la cantidad en gramos o las ufc sean relevantes para mediar su eficacia. Este es por ejemplo el caso esperable en las terapias destinadas a competir ecológicamente con *C. difficile* por invasión masiva, tales como los FMT. De hecho se ha demostrado que uno de los principales predictores del éxito del FMT contra *C. difficile* es la capacidad de los microorganismos del FMT de colonizar el intestino del paciente. En este aspecto el factor temporal, tanto el número de dosis administradas por unidad de tiempo como el tiempo total del tratamiento, también puede ser importante, lo que debería determinar la posología. Este es un caso especial, ya que el terapéutico se aplica sobre un intestino prácticamente desprovisto de microflora por cursos previos de antibióticos, en el que el

recubrimiento físico rápido puede determinar el éxito. Es probablemente la causa del éxito de la terapia FMT Capsule G3 de OpenBiome, en la que tan sólo treinta cápsulas conteniendo muchos miles de millones de ufc cada una son necesarias para mediar el efecto. Esto también se comprobó en uno de los ensayos con NTCD-M3 de Shire, ya que la máxima tasa de colonización por la cepa terapéutica se alcanzó en aquellos pacientes a los que se pretrató con antibióticos para desproveer al intestino de microbiota, facilitando el asentamiento de la cepa M3.

Sin embargo, si el mecanismo de acción no reside en el aspecto meramente físico pueden jugar un papel muy importante otros factores. Sin abandonar la aplicación de diarrea por *C. difficile*, se ha detallado en el mismo caso de NTCD-M3 que la forma óptima de administración era un curso de siete días con dosis diarias de cápsulas de una potencia de 10^7 ufc. El número final de ufc administradas en este régimen es de tan sólo 7×10^7 ufc, muy inferior en número, pero igualmente efectivo, que el enfoque masivo por FMT. La causa de este fenómeno reside con total seguridad en el diferente mecanismo de acción de cada uno, siendo en el caso de NTCD-M3 la exclusión física y metabólica de *C. difficile*. Mientras que en un FMT poco definido como el de OpenBiome, existen múltiples tipos microbianos, en el producto de Shire sólo existe el tipo preciso que mejor compite ecometabólicamente con el agente patógeno, siendo por tanto una terapia mucho más dirigida y optimizada. Sería, por tanto, un error medir la potencia de ambos medicamentos del mismo modo, reduciéndose únicamente a las ufc o a los gramos que pesen las cápsulas que los contienen.

Existen múltiples casos en los que la administración de determinados probióticos ha resultado en la modulación del sistema inmune incluso a nivel sistémico. Teniendo en cuenta que estos ensayos suelen hacerse en población con una microbiota intestinal normal en la que la colonización masiva por un agente exógeno no es sencilla, y además con dosis propias de la industria alimentaria de entre 10^9 y 10^{11} ufc/día, todo lleva a pensar que lo importante no es la cantidad de células sino las cualidades de las mismas. Por ejemplo, es muy probable que las cepas que provocan la estimulación del sistema inmunitario estén expresando en su superficie o secretando al medio determinadas moléculas que son capaces de comunicarse con el hospedador. Por tanto, de forma adicional a las ufc, un

mecanismo de medición de la potencia podría ser la cantidad de esas moléculas en la superficie o sus niveles de expresión a nivel transcriptómico.

Si el mecanismo de acción del LBP es de tipo metabólico, como en el caso del degradador de ácido oxálico *O. formigenes* de OxThera, la capacidad del microorganismo de desarrollar esa actividad de forma constante, duradera y eficaz en el intestino es fundamental. Por lo tanto, otra forma adicional de medir la potencia podría ser, como se indicó anteriormente, medir los niveles de expresión de las enzimas implicadas en ese metabolismo, o incluso también el de moléculas relacionadas con la capacidad de la bacteria de adherirse a la capa mucosa del intestino, donde tiene que residir. Este último punto es también muy claro si se traduce al mundo de los LBP modificados, en los que el metabolismo degradador de fenilalanina o del ciclo de la urea o el producto transgénico elafina, IL-10, o el factor trébol humano tienen que ser expresados de forma continuada y duradera en el tiempo. Adicionalmente para estos productos, se podría determinar el número de copias de los transgenes o de los plásmidos que los contuvieran.

Un aspecto sumamente importante a este respecto es la necesidad de la sustancia activa de estar viva o no. En general, y salvo el caso excepcional de los probióticos fantasma, se asume que todos los LBP, nativos o modificados, median su eficacia únicamente cuando están vivos. Es por tanto necesario tener en cuenta la viabilidad de los microorganismos contenidos en un LBP, modificado o no, a la hora de medir la potencia del fármaco. Aunque la medición del número de células viables por unidad de masa es algo que se realiza de forma rutinaria en el sector alimentario, tanto por motivos de calidad en el caso de los probióticos como de seguridad en el resto de los alimentos, los métodos utilizados de forma más generalizada están basados en diluciones y cultivo. Aunque son baratos, no son rápidos ni, más preocupantemente para el mundo farmacéutico, suficientemente precisos. Es por ello que el uso de técnicas más avanzadas, como la citometría de flujo o las basadas en la PCR en tiempo real, se hacen necesarias. Modificaciones de estas técnicas (502) permiten la determinación única de células vivas, lo que es absolutamente necesario para LBP en los que la viabilidad sea requerida.

La viabilidad de la sustancia activa del producto es el factor más importante para la determinación de su estabilidad. A pesar de que los microorganismos

liofilizados tienen una buena resistencia a lo largo del tiempo, ésta puede no ser suficiente para los estándares farmacéuticos. En el mundo alimentario se considera aceptable, por una parte, que el recuento de células vivas caiga uno o dos órdenes de magnitud tras 12 ó 24 meses y, por otra, realizar una sobredosificación inicial para paliar el efecto de la pérdida de viabilidad. Ninguno de estos dos aspectos sería fácilmente aceptado por las autoridades en el ámbito clínico. Por lo tanto es fundamental establecer todas las medidas necesarias para evitar la pérdida de viabilidad de las sustancias activas y determinar con precisión la dinámica de pérdida de viabilidad de las mismas a lo largo del tiempo, estableciendo los períodos máximos de almacenamiento de estos productos.

Un aspecto especificado en la normativa es el de las desviaciones máximas tolerables del contenido de la sustancia activa en el producto acabado, que son en términos generales del $\pm 5\%$ en el momento de fabricación. Esto es tremendamente complicado en el caso de los LBP por dos motivos. El primero, porque incluso los métodos más fiables de recuento de microorganismos tienen un margen de error muy superior al de los métodos químicos, debido a los órdenes de magnitud manejados en microbiología. Por eso los altos niveles de incertidumbre son una constante. El segundo, porque incluso optimizando los métodos de conservación y reduciendo los tiempos de almacenamiento de los LBP, la sobredosificación puede ser necesaria. Del mismo modo que la normativa contempla márgenes de desviación diferentes y más laxos (del $\pm 10\%$ de contenido de radiactividad) para los radiofármacos, los límites adecuados para los microorganismos deberían establecerse.

Todas estas consideraciones podrían también ser enmarcadas en el contexto de las unidades de actividad biológica de cada sustancia activa citadas en la normativa para la caracterización cuantitativa del medicamento, que especifica que éstas deben ser empleadas en las sustancias que no pueden definirse en términos químicos, como es el caso de los LBP. Desgraciadamente, no existen dichas unidades determinadas por la OMS para estos productos, luego éstas deberán ser acordadas caso por caso con las autoridades.

6.3.3 Ensayos preclínicos: pruebas *in vitro* y en modelos animales

De forma previa a su administración a seres humanos, y sobre todo en el caso de medicamentos novedosos, es necesario realizar pruebas *in vitro* e *in vivo* para evaluar aspectos sobre la seguridad y la eficacia del producto. Esta metodología afecta del mismo modo a todos los fármacos que actúen a través de la microbiota, independientemente de su naturaleza bioquímica, su vía de administración o su mecanismo de acción.

En el caso concreto de los microorganismos, y adicionalmente a los ensayos centrados en la seguridad que se tratarán con detalle en el siguiente punto, en el mundo alimentario éstos se han sometido de forma clásica a pruebas tempranas sobre su resistencia a las duras condiciones del tracto digestivo, principalmente tolerancia al pH ácido del estómago y a las sales biliares. Aunque estos factores son importantes en los alimentos, que ofrecen poca protección al microorganismo frente a condiciones externas, se antoja menos crucial en el campo farmacéutico donde las técnicas de encapsulación permiten liberar el ingrediente en la parte deseada del tracto digestivo.

El aspecto más importante en esta sección es el de los modelos animales, cuyo uso a nivel preclínico es obligatorio, que especifica además la necesidad de ensayar los fármacos en al menos en dos modelos, de los cuales uno debe ser no murino. La relevancia, representatividad y en último término la utilidad de los modelos animales en el desarrollo de fármacos está permanentemente en entredicho, incluso de forma independientemente de las consideraciones éticas. Dado que los ámbitos de aplicación de la microbiota en la salud humana son múltiples, habría que discutir prácticamente cada uno de los modelos animales utilizados en todos ellos. No obstante, independientemente de que algún día se comprendan las relaciones a nivel neuroendocrino a través del eje intestino-cerebro, o de que se revelen conexiones entre la microbiota y el desarrollo o la evolución de enfermedades como el cáncer, las aplicaciones en el corto y medio plazo de la microbiota parece pasar por dos órganos del cuerpo y sus respectivas microbiotas: el intestino y el aparato reproductor femenino.

En primer lugar conviene recordar que, al igual que los agentes que infectan y causan enfermedad a cada especie animal, las microbiotas de cada una, incluso

dentro del grupo de los vertebrados o los mamíferos, son muy características y con diferencias notables. Mientras que en humanos las microbiotas en su conjunto tienden a estar dominadas por *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y actinobacterias, en los ratones este último clado prácticamente no se detecta y son mucho más abundantes las proteobacterias. En el caso del pez cebra, las microbiotas están compuestas casi exclusivamente por proteobacterias y fusobacterias en idénticas cantidades. En *D. melanogaster* se encuentran dominadas por proteobacterias y *Firmicutes* (503–506). Sí cabe destacar que, independientemente de la composición de las microbiotas nativas de cada especie, y debido a la importancia del sistema inmune en las interacciones con las microbiotas así como del metabolismo, los modelos preferidos siempre son los vertebrados al ser más próximos en ambos aspectos al ser humano.

Los modelos animales de microbiotas distintas a la intestinal están poco desarrollados. Por ejemplo para estudios con la microbiota del tracto reproductivo femenino es necesario recurrir a modelos de primates (*Macaca mulatta*, *Macaca nemestrina*), poco usuales fuera de los ensayos con medicamentos para el sistema nervioso central, debido a las limitaciones que ofrecen. La causa principal es que los mamíferos más pequeños, como los ratones, las ratas, los hámsters, los perros y los cobayas tienen un bajo número de lactobacilos vaginales, contrariamente a lo que ocurre en humanos y demás primates. Además los mamíferos distintos de los primates no poseen un ciclo menstrual sino estral, lo que puede interferir con la interpretación de resultados (507).

La microbiota intestinal es la más beneficiada en términos de disponibilidad de modelos animales, siendo el modelo murino el más usado y especialmente el de ratón. Es preferido sobre el de rata por motivos prácticos, logísticos y por el hecho de que las ratas carecen de vesícula biliar, lo que conlleva una secreción constante de bilis que provoca unas condiciones ecológicas determinadas en el tracto intestinal. No obstante existen diferencias anatómicas relevantes entre ratones y humanos, entre otras la estructura del estómago, el tamaño de las microvellosidades del intestino delgado, el gran tamaño relativo del ciego y la ausencia de apéndice en ratones, así como la distribución espacial de las estructuras del sistema inmune asociado a mucosas. También hay razones etológicas, destacando la conducta coprofágica en los ratones. A pesar de que su

microbiota intestinal es ligeramente diferente en términos taxonómicos, puede seguirse considerando comparable (508,509) y también sujeta a cambios por distintas enfermedades (508). Los ratones también son convenientes por el gran control que existe sobre su genética, muy útil para el estudio de interacciones transreino u hologenómicas o para la modelación de enfermedades. Conjuntando estas técnicas con intervenciones de tipo dietético o químico-farmacológico, se logra disponer de excelentes modelos de enfermedad. Otra gran ventaja que poseen los ratones es su larga historia de uso en condiciones libres de gérmenes, con poblaciones microbianas definidas (gnotobióticos), o con composiciones de la microbiota intestinal humanizadas en términos de composición taxonómica (510,511).

Aun así, las ratas son utilizadas como alternativa de forma creciente. Hay modelos libres de gérmenes (508), así como microbiotas humanizadas (512). También se usa el perro dado que aunque su composición taxonómica difiere con respecto a la del hombre, a nivel de género es mucho más próxima en términos de funciones metabólicas (513). Otra opción es el cerdo, de hecho es el modelo más pujante debido a sus enormes similitudes anatómicas, fisiológicas e inmunológicas con el hombre (504,508,514,515).

En su "Guía para el desarrollo de LBP", la FDA recomienda explícitamente el uso de animales libres de gérmenes para los ensayos preclínicos, particularmente para los fármacos cuya administración es oral. Es cierto que el uso de los animales libres de gérmenes es una práctica sumamente extendida en la investigación en el mundo de la microbiota. Los experimentos con ellos han permitido confirmar el papel de la microbiota en la extracción de energía y nutrientes de la dieta (139) y realizar la observación sorprendente sobre la capacidad del trasplante fecal de contagiar la obesidad a través de la microbiota de animales obesos a animales delgados libres de gérmenes (221). Existen estudios similares en los que la microbiota intestinal de humanos obesos es capaz de transferir el sobrepeso a estos animales, mientras que la de sus gemelos no obesos no lo hace (222) y en los que la microbiota intestinal de mujeres en el tercer trimestre de embarazo les induce una mayor adiposidad y resistencia a la insulina que la de mujeres en su primer trimestre de gestación (186). A pesar de su innegable utilidad como modelos para el estudio de interacciones microbiota-

hospedador, el hecho de que los experimentos con animales libres de gérmenes rindan frecuentemente resultados espectaculares hace plantearse su representatividad real como modelo animal a nivel preclínico.

Los animales libres de gérmenes han nacido en un entorno estéril de madres sin microbiota de ningún tipo, cuyas madres y padres a su vez habían sido criados en esas mismas condiciones. Como ya se ha dicho, estos animales sufren alteraciones funcionales a causa de esta condición (324–329). De acuerdo con la teoría holobiótica de la evolución, que afirma que la microbiota es un carácter adaptativo que se transmite de padres a hijos de un modo análogo a los genes, es probable que el hecho de proceder de un linaje mantenido sin microbiota durante generaciones haya causado alteraciones significativas en la fisiología de estos animales, probablemente mediadas por marcadores epigenéticos y de otros tipos. El hecho de que los humanos a los que van dirigidos los productos testados en ellos no sean libres de gérmenes es otro factor que juega en contra del abuso de estos animales como justificación de su seguridad y eficacia en los desarrollos más tardíos o próximos a la clínica.

Existen también otros modelos que surgen a partir de los libres de gérmenes que son los gnotobióticos, animales cuya microbiota tiene una composición definida por los investigadores. Estos modelos son también muy útiles para observar interacciones entre números reducidos y definidos de tipos microorganismos. Como en el caso anterior, su utilidad para el descubrimiento de nuevas estrategias terapéuticas y para el apoyo de su mecanismo de acción es enorme, pero los resultados en términos de seguridad y eficacia han de ser tomados con cautela y no deben suponer argumentos fundamentales en los dossieres científicos de los fármacos de la microbiota, ya que la complejidad de sus ecosistemas microbianos es mucho menor, siendo éstos por ello mucho más fácilmente perturbables.

Independientemente de la infinidad de ventajas e inconvenientes de cada uno de estos modelos, la principal pregunta es cómo de informativos, predictivos o relevantes son los modelos animales para el estudio de la microbiota, cómo han de interpretarse los resultados y cómo se han de traducir éstos a futuras intervenciones en humanos. Dado que los indicadores de seguridad y de eficacia están bastante bien definidos, la discusión se centra en gran parte en cómo se

traducen las potencias y dosis de los medicamentos con microorganismos empleadas en ensayos con animales a futuros ensayos con humanos. Ya se ha adelantado que en la práctica las potencias y las dosis medidas en ufc que se emplean suelen ser muy similares en ambos casos, rondando los 10^8 - 10^{11} ufc para animales de tamaños tan diferentes como un hombre y un ratón, lo que despierta sorpresa en los reguladores, que demandan criterios estandarizados para este proceso de escalado como existen en otros tipos de medicamentos o enfoques terapéuticos (516). Según uno de los criterios más extendidos, el de dosificar en proporción a la superficie corporal del animal, la relación entre un hombre y un ratón debería de ser la de 0,08, es decir, que una dosis de 10^9 en humanos en un ratón debería de traducirse en una dosis de 8×10^7 . Sin embargo, este método es utilizado para medicamentos que se distribuyen por todo el volumen del organismo, caso muy diferente del de los LBP. Es por eso que quizás fuera más conveniente utilizar un factor de conversión centrado en la superficie del intestino de cada uno de ellos, con lo que se obtendría una razón de 0,04 de dividir los 1,41 m² de superficie del intestino de un ratón (517) de laboratorio frente a los 32 m² que tiene un humano (178). Este método reduciría una dosis de 10^9 en ratón a una menor que la obtenida por el método anterior, aunque del mismo orden de magnitud, 4×10^7 ufc. Esta metodología puede aplicarse al intestino de todos los mamíferos y a humanos de diferentes edades. Aunque cualquier método no sea más que una aproximación, sí resulta lógico pensar que animales de tamaños y superficies muy diferentes requieran dosis óptimas diferentes, como ocurre en todos los demás medicamentos y en el caso de los niños. Estas fórmulas asumen, además, que el microorganismo tiene que distribuirse y asentarse por la superficie del intestino para ser efectivo, cosa que, como se ha discutido antes, puede no ser cierta en muchas ocasiones.

Es importante destacar que el clásico paradigma procedente del mundo de los probióticos de que la sobredosis de microorganismos nunca llega a ser deletérea, no puede ser aceptado por las autoridades farmacéuticas, además de haberse demostrado potencialmente falso. A pesar de que en muchos ensayos no se observan relaciones dosis-respuesta, en el caso de NTCD-M3 ocurre, y además, el medicamento administrado en su máxima potencia de ufc y durante el periodo más prolongado llega a tener una eficacia menor que una dosis inferior. Ésto, que en el caso de cualquier otro medicamento no hubiera sido sorprendente y se

hubiera denominado dosis supraóptima o incluso toxicidad, supone una excepción dentro del campo de los microorganismos como fármacos. Una posible explicación a este fenómeno puede ser que el mecanismo de acción de NTCD-M3 resida en una contención ecológica del *C. difficile* toxigénico limitada en el tiempo para dar oportunidad al resto de la microbiota, dañada por los antibióticos, a recuperarse. Dado que es evidente que NTCD-M3 es altamente eficaz colonizando el intestino, es posible que un exceso de colonización por su parte pueda resultar en un impedimento para el resto de la microbiota.

6.3.4 Biomarcadores, seguridad, toxicidad, eficacia clínica e interacciones

Con todo, el principal desafío al que se enfrenta el sector farmacéutico de la microbiota, cualquiera que sea su enfoque, desde moléculas pequeñas hasta el FMT, es el del desconocimiento de lo que debe considerarse normal en términos de composición de la microbiota. Proyectos multimillonarios como el HMP o MetaHIT, además de los múltiples llevados a cabo de forma privada por empresas, tienen como objetivo principal precisamente la definición de la normalidad. Como se ha descrito anteriormente, tan sólo se tienen indicios sobre las especies cuya presencia o márgenes pueden considerarse normales en la microbiota de las principales localizaciones del cuerpo humano. Hasta ahora los resultados son confusos y en muchas ocasiones contradictorios. Por ello, en un intento por poner orden se propusieron los enterotipos. Se trata de agrupaciones de poblaciones microbianas intestinales en función de sus especies más dominantes y otras cuantas “especies clave” que parecían estar positiva y negativamente relacionadas con la dominante de cada enterotipo. Surgieron así los tres enterotipos: el dominado por *Bacteroides*; el dominado por *Prevotella*; y el dominado por *Ruminococcus* (141). Incluso poco después de la aparición de esta clasificación algunos expertos comenzaron a plantearse que los enterotipos podrían ser una clasificación demasiado estricta y comenzaron a hablar de gradientes (518). La clasificación por enterotipos está en desuso, del mismo modo que existen autores que defienden que los grupos de composición de la microbiota vaginal en función de la especie dominante de *Lactobacillus*, explicados en su la sección 5.1.2. de este documento, tampoco son adecuados.

Un factor que puede estar influyendo en la dificultad para hallar respuestas es que la práctica totalidad de los estudios de composición de la microbiota están centrados en el análisis taxonómico. Ya se han discutido los problemas conceptuales y técnicos de la taxonomía de microorganismos, a los que hay que sumar otro que radica en la falta de estandarización y la imperfección de los métodos empleados para el estudio de la microbiota. El estudio de las microbiotas tal y como se entiende hoy, tanto a nivel clínico como ambiental, ha sido posible gracias al desarrollo e implantación de las técnicas moleculares en las que se fundamenta. Como se detalló anteriormente, una gran mayoría de los microorganismos existentes no son cultivables con las técnicas clásicas. Es por ello

que todo este componente de la diversidad microbiana ha pasado inadvertido hasta tiempos recientes. Estas técnicas independientes de cultivo comparten que los fundamentos de ambas radican en la genética, la genómica y la secuenciación. Pueden dividirse en dos grandes grupos: por una parte la metagenómica y por otra la secuenciación del rARN 16S o 18S. En muchas ocasiones, erróneamente, ambas técnicas son denominadas colectivamente metagenómica. Otro elemento común a ambas técnicas es la metodología de preparación de las muestras para su análisis, dado que en ambos casos es necesaria una extracción del material genético de la misma. Evidentemente el protocolo diferirá en función del tipo de muestra, del tipo de análisis a realizar y de la rama del árbol de la vida que se pretenda estudiar. Este punto, poco considerado hasta la fecha, es fundamental, ya que dependiendo del procesamiento de la muestra, sobre todo en el caso de las muestras fecales, los resultados pueden variar notoriamente (F. Codoñer, comunicación personal). Lo más frecuente es que se extraiga únicamente el ADN bacteriano de la muestra, excluyendo tanto el ARN total como el ADN de otros organismos. Para estudios en los que se esté estudiando ADN mitocondrial de eucariotas o ARN el protocolo requiere adaptaciones. Una vez extraído el material genético de interés, la técnica estrictamente llamada metagenómica se fundamenta en la secuenciación al azar de todo el ADN fragmentado como fruto de la extracción. Tras su secuenciación se requiere un análisis bioinformático profundo para ensamblar todos los genomas presentes en la muestra. En el caso de la secuenciación del rADN 16S, el ADN extraído es sometido a una amplificación con cebadores específicos de la región del ADN codificadora del ARN ribosomal 16S (en el caso de procariotas) o 18S (en el caso de eucariotas). Más tarde esos amplicones son secuenciados y analizados bioinformáticamente.

En ambos casos las secuencias obtenidas han de ser cotejadas con bases de datos de genomas completos o de rARN 16S, que en la mayoría de los casos son de acceso libre y de naturaleza colaborativa. A pesar de sus múltiples semejanzas, ambas técnicas ofrecen un tipo de información marcadamente diferente. El gen rADN 16S es la región del ADN procariota repetida múltiples veces en su cromosoma que codifica el ARN ribosomal 16S, un componente de la subunidad pequeña (30S) del ribosoma. Es de gran utilidad en la construcción de filogenias por su baja tasa de evolución, es decir, por su alto grado de conservación (519), lo que permite el uso de cebadores universales que no sólo amplifican el gen

bacteriano y de arqueas, sino también el de cloroplastos y mitocondrias. Desde el punto de vista del análisis de poblaciones microbianas complejas, la secuenciación del rADN 16S amplificado con esos cebadores universales permite únicamente determinar las categorías taxonómicas hasta el nivel de especie presentes en la muestra y que tengan un nivel de analogía suficientemente alto con secuencias de esos genes anotadas en las bases de datos. Por su parte, la metagenómica secuencia no sólo el gen del rARN 16S sino todos los genes presentes, lo que permite inferir las actividades metabólicas presentes en la muestra. Este caso también tiene la limitación de la disponibilidad de referencias lo suficientemente cercanas en bases de datos, lo que en muchas ocasiones genera un alto nivel de incertidumbre. Cabe destacar además que a día de hoy, y a pesar de los grandes avances tanto en genética microbiana como en bioinformática, resulta muy complicado inferir, a partir de datos genómicos, información fiable acerca de rutas metabólicas completas o de posibles colaboraciones metabólicas entre diferentes microorganismos. Ambas técnicas son cuantitativas, es decir, que permiten no sólo conocer la identidad de los microorganismos presentes en una muestra sino también su número. Para esta tarea es además frecuente realizar qPCR con los cebadores del rARN 16S. Para la caracterización taxonómica, como sustituto de la metagenómica, pueden utilizarse “microarrays” de ADN (520).

Por último, cabe destacar que el análisis del ADN en cualquiera de sus formas permite conocer la presencia o el potencial genético de una muestra, pero no permite extraer conclusiones acerca de los metabolismos activos en la misma. Para esto se utiliza una técnica denominada metatranscriptómica, análoga a la metagenómica y en la que el material genético analizado es el ARN en lugar del ADN. Es frecuente realizarla también con “microarrays” de ARN y permite inferir los niveles de expresión génica. Como otras tecnologías ómicas como la proteómica o la metabolómica, no se realiza tan rutinariamente como el análisis del ADN, aunque van ganando importancia en el área.

Puede existir discordancia entre ambas técnicas, incluso en la información que se supone que ambas ofrecen de forma equivalente, como la identidad taxonómica de los microorganismos presentes. Se deben al tipo de análisis bioinformático realizado y a la base de datos empleadas para cotejar la información. Pero además existen factores incluso aparentemente más triviales

que pueden ocasionar un importante sesgo que dificulta la extracción de conclusiones acerca de la composición de la microbiota y su normalidad.

A pesar de ser uno de los pocos aspectos más o menos estandarizados en el estudio de la microbiota, se sabe que la naturaleza de las muestras en las que se analiza la composición de la misma es un factor determinante y que no en todas las ocasiones se está recurriendo a la muestra correcta. Por ejemplo, por sus especiales características anatómicas y fisiológicas, la boca posee una microbiota en la que abundan los biofilms, que además son altísimamente específicos de cada región de la misma. Ya se ha hablado de las diferentes condiciones de presión de oxígeno, flujos de salivación, tensiones mecánicas y tejidos biológicos presentes en una sola cavidad bucal, que determinan poblaciones microbianas también diferentes (521). Sin embargo, y aunque esto está cambiando, la muestra estándar para el estudio de la microbiota de la boca continúa siendo la saliva que, como resulta lógico pensar, es una mezcla de las microbiotas de diferentes localizaciones de la boca. En muchos estudios se ha demostrado la falta de representatividad de la saliva como muestra de la microbiota oral, muy especialmente de los dientes ya que ésta se encuentra enriquecida en microorganismos procedentes de los tejidos blandos como las encías, las caras internas de los carrillos y la lengua (522–525). La evidencia científica demuestra que el muestreo de la microbiota de la boca ha de realizarse en localizaciones específicas, lo que tratándose de áreas de fácil acceso resulta mínimamente invasivo.

A pesar de que se podrían citar ejemplos similares de todas y cada una de las microbiotas del cuerpo, merece especial mención la microbiota intestinal, estudiada ampliamente a través de las heces. Se recurre a ellas porque, como en el caso de la saliva, su recogida no supone invasividad. Sin embargo una vez más la evidencia científica indica que los resultados obtenidos a través de las heces no siempre representan a las poblaciones microbianas asociadas a la mucosa del sistema digestivo. A pesar de que la microbiota residente en el lumen del colon, que es la que se expulsa con las heces, pueda tener una gran importancia en la modelación de la salud del hospedador, existen múltiples evidencias que demuestran que la asociada a la mucosa, que no sale con las heces al estar embebida en biofilms, puede tener una importancia aún mayor al interactuar de

forma más estrecha con el hospedador (526–529). El número de estudios en los que, para estudiarla, la toma de muestras del intestino se realiza por biopsias, cepillos o hisopos también va en aumento.

Incluso con el problema del tipo de muestra solventado, quedan múltiples problemas que llevan a la dificultad en la comparabilidad de resultados obtenidos por diferentes investigadores, lo que lleva, en último término, a una si cabe aún mayor dificultad en el establecimiento de márgenes de normalidad en la composición de la microbiota. Una vez recogidas, las muestras han de ser conservadas hasta su análisis para evitar artefactos como por ejemplo el sobrecrecimiento de determinadas poblaciones menos sensibles a una presión de oxígeno mayor. Los métodos de conservación de las muestras de microbiota de cualquier procedencia son de dos tipos: por congelación rápida o por métodos químicos. Aunque en principio ambas estrategias deberían lograr su objetivo y rendir resultados idénticos, por motivos poco claros el uso de una o de otra pueden arrojar resultados diferentes para una misma muestra. Además existen otros factores adicionales a los citados, como las reacciones de amplificación por PCR, que introducen aún más sesgo en el análisis. Estos fenómenos han sido constatados en distintas investigaciones centradas en la metodología del estudio de la microbiota (530,531).

Todo lo descrito no hace más que sumar más variabilidad a la ya de por sí enorme variabilidad real de las microbiotas. Se ha demostrado en estudios que incluso en una misma persona que el momento del día, la etapa de su vida, su alimentación reciente o el uso de medicación pueden influir en la composición de la microbiota, y no únicamente la intestinal (532–537). A esto se une la inmensa variabilidad interindividual que existe para una misma microbiota entre dos individuos. Este último factor dificulta enormemente, como se reiterará en el punto siguiente, el diseño y la interpretación de los ensayos clínicos que implican de algún modo a la microbiota. Todos estos factores al final desembocan en la imposibilidad de comparar resultados generados en distintas investigaciones. Este hecho está dificultando la extracción de conclusiones acerca de la composición de las microbiotas normales. La falta de referencias y la inseguridad acerca de los biomarcadores que *a priori* se antojan más abundantes e importantes en la microbiota hacen la búsqueda de dianas terapéuticas muy complicada.

Puede ser incluso que el concepto de eubiosis entendido como composición normal y saludable de la microbiota en términos de taxones bacterianos, y por tanto su antónimo disbiosis, no existan. Aunque también puede ser que no siempre se esté atendiendo a la información adecuada contenida en las muestras.

Se ha introducido ya en este trabajo que los perfiles de composición de la microbiota de cualquier localización del cuerpo son mucho más predecibles, homogéneos y estables a lo largo del tiempo si en lugar de analizarlos en términos taxonómicos se analizan en términos de funciones metabólicas (206). El análisis de las funciones ecológicas llevadas a cabo por cada componente del ecosistema microbiológico que es cualquier microbiota en el contexto de su hábitat tiene mucho más sentido biológico y científico que el análisis de las categorías taxonómicas. Esto es especialmente cierto si se tiene en cuenta lo dicho para los criterios de clasificación de microorganismos. El enfoque dominante obliga a los investigadores a hablar en términos taxonómicos de filo. De hecho, anteriormente se ha mencionado que una composición de la microbiota intestinal dominada por el filo *Firmicutes* en lugar de por el filo *Bacteroidetes* está relacionada con la obesidad. También se ha mencionado que la microbiota de la piel, como la del resto de localizaciones del cuerpo humano en mayor o menor medida, está dominada por representantes de los filos *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Bacteroidetes* y *Proteobacteria*. El problema surge cuando se observa que las microbiotas simbiotas de las raíces de *Arabidopsis thaliana* están también claramente dominadas por esos mismos cuatro filos, del mismo modo que la microbiota simbiota de las hojas de esa misma especie vegetal (538) o que incluso la microbiota de la Estación Espacial Internacional (539). Aunque es evidente que en este último caso esas bacterias son procedentes de la microbiota, especialmente de la cutánea, de los astronautas que en ella residen, la conclusión es que caracterizar la composición de categorías taxonómicas de una microbiota puede ser un ejercicio cuyos resultados carezcan de relevancia. Ha de aclararse además que este fenómeno no se debe a un artefacto por la existencia de unos pocos filos bacterianos, ya que actualmente se reconocen oficialmente treinta desde los doce reconocidos en 1987 (540), extraoficialmente cincuenta y las estimaciones hablan de la existencia de más de mil (541). Como resulta evidente, los criterios para la clasificación de los microorganismos son arbitrarios y no fundamentados en el consenso, por lo que resulta arriesgado basarse en ellos para la extracción de

conclusiones científicas. A modo ilustrativo, y sin pretender suponer un argumento con demasiada base científica por las diferencias en la taxonomía de los animales con la de las bacterias, el filo al que los humanos pertenecen es el de Cordados, que comprende a los Craneados (que a su vez comprenden a los Vertebrados y otros animales), a los Tunicados o Urocordados, y a los Lanceolados. Es difícil imaginar estudios ecológicos en los que los animales de un ecosistema sean clasificados a nivel de filo.

Sin embargo la presencia de actividades metabólicas microbianas en un determinado ecosistema se antoja mucho más relevante desde el punto de vista biológico. Se conoce desde hace décadas la importancia de las bacterias nitrificantes en simbiosis con las raíces de las plantas leguminosas, el papel de los microorganismos fotosintéticos en la generación de la atmósfera rica en oxígeno en el planeta Tierra, el de las bacterias capaces de degradar la celulosa asociadas a los protozoos que a su vez están asociados a las termitas (35) o el de las arqueas metanógenas en la generación de gases de efecto invernadero. Este enfoque para el análisis de todas las microbiotas del planeta ha sido el predominante hasta que las técnicas moleculares han posibilitado una mayor certeza en la caracterización de los microorganismos a nivel taxonómico. Da la sensación de que la disponibilidad de herramientas y la enorme cantidad de información que éstas aportan hayan hecho perder el foco en lo más relevante desde el punto de vista biológico y ecológico. De hecho, como anteriormente se ha indicado, algunas empresas con programas de terapias a través de la microbiota en estado avanzado de desarrollo no están prestando tanta atención a la taxonomía. Son los casos de Seres, cuyo SER-009 es un consorcio indefinido de clostridios, de AOBiome, cuyos programas de investigación se centran en las bacterias nitrificantes de la piel si bien se basan en una cepa concreta de *N. eutropha*, o de Synthetic Biologics cuyo SYN-010 está dirigido contra la HMG-CoA en la ruta del mevalonato fundamental en el metabolismo de las arqueas metanógenas. Es más, en la primera publicación en la que se sugería la creación de los enterotipos de microbiota intestinal (141) se adelantaban dos conceptos que con el tiempo han cobrado más importancia que la teoría principal que se enunciaba en el trabajo. Por una parte, la posibilidad de clasificar las microbiotas en base a su función, de hecho en este estudio la coincidencia entre enterotipos taxonómicos y funcionales se mostró muy alta. Por ejemplo la fermentación de hidratos de carbono y

proteínas o la degradación de las glicoproteínas del mucus, y de relacionar esta clasificación con propiedades del hospedador. El propio trabajo afirma que

“la única correlación significativa entre una propiedad del hospedador y un grupo taxonómico fue una negativa entre la edad y la abundancia de un género desconocido de Clostridiales”, y continúa diciendo que “en contraste con la pequeña señal filogenética, encontramos varias correlaciones funcionales significativas con cada una de las propiedades del hospedador estudiadas [...] sugiriendo que los biomarcadores funcionales de tipo metagenómico podrían ser más robustos que los filogenéticos”. Advirtiendo de posibles factores introductores de artefactos en los resultados, prosigue diciendo: “Por ejemplo, la abundancia de 10 grupos ortólogos varía más entre que dentro de la misma nacionalidad [...] aunque en términos generales la composición funcional era marcadamente similar entre nacionalidades [...]. Para el género [sexo del hospedador] encontramos 5 módulos y un grupo ortólogo que se correlacionan significativamente ([...] por ejemplo, módulos de la síntesis de aspartato en varones [...]). Por ejemplo, las enzimas degradadoras de almidón [...] aumentan con la edad (lo que podría ser una reacción a la eficiencia disminuida para la degradación de hidratos de carbono de la dieta en el hospedador (542)) [...]. Del mismo modo, un grupo ortólogo para la subunidad facultativa sigma-24 de la ARN polimerasa, que controla la expresión en la respuesta al estrés y está ligada a la supervivencia en intestino (543), decrece con la edad [...]. Una explicación a esto puede ser la necesidad reducida de respuesta al estrés en el intestino por la disminución de la [capacidad] inmune en el intestino asociada a la edad (inmunosenescencia) (544). Nuestros análisis también identificaron módulos que se correlacionan fuertemente con el índice de masa corporal del hospedador [...], dos de los cuales son complejos ATPasa, apoyando la relación entre la capacidad de la microbiota de captar energía y la obesidad del hospedador (221)”.

Por otra parte, también advierte de algo que se ha tratado con anterioridad, y es que algunos microorganismos con poca abundancia pueden contribuir, de forma individual o colectiva, a funciones de suma importancia en la microbiota. Aunque en el trabajo se apunta que, como es lógico pensar, la mayoría de las

funciones abundantes se encuentran en taxones abundantes, sí se identificaron funciones relevantes a las cuales principalmente contribuían taxones de menor abundancia. En el texto los autores ponen como ejemplo que las *Escherichia*, que suponen alrededor de un 1% en abundancia, son responsables de más del 90% de las secuencias de dos proteínas asociadas con pili bacterianos, relacionados con la colonización del epitelio y la transferencia de material genético y resistencia antibiótica, en uno de los individuos analizados. Sentencian además que “las especies o géneros abundantes no pueden revelar la complejidad funcional de la microbiota intestinal en su conjunto”.

Hay también que reconocer que el conocimiento acerca de las funciones de los genes simplemente por su secuencia nucleotídica y, principalmente, de las del grupo de genes presentes en un metagenoma o en un hologenoma en su conjunto, es limitada. Del mismo modo que en la aproximación filogenética se habla de OTU, en este caso se habla de grupos ortólogos y módulos para los que existe también un grado de incertidumbre en cuanto a su función. A pesar de que se están haciendo grandes avances con el desarrollo de las tecnologías ómicas y de la bioinformática (386), se está en los albores de conocer los detalles de la funcionalidad de los genes en un ecosistema complejo.

Los biomarcadores derivados de las microbiotas más inmediatos están relacionados con su composición taxonómica y/o con las funciones eco-fisiológicas de los microorganismos que las componen. No obstante, el mayor conocimiento del elevadísimo número de interacciones en las que las microbiotas están implicadas y la elucidación de los mecanismos de acción de las diferentes estrategias terapéuticas a través de ellas están llevando a la generación de más indicadores que permiten el diseño de nuevos enfoques farmacológicos y/o la predicción y seguimiento de su eficacia o seguridad. De forma tradicional, y en gran medida por herencia de los ensayos realizados por la industria de los probióticos, los biomarcadores sustitutos para el seguimiento y la estimación del posible éxito del tratamiento con LBP se han centrado en la detección y recuento de los microorganismos en las heces del paciente durante y tras la intervención, y en la búsqueda de cambios en la composición de la microbiota del paciente. Puede decirse que el hallazgo del microorganismo administrado en las deposiciones del paciente durante el periodo en el que se está administrando,

aunque sea totalmente esperable, no debería ser una finalidad. Es cierto que una de las causas por las que esto se hace es por comprobar que, en efecto, el microorganismo logra atravesar todo el tracto digestivo sin morir en el camino, lo cual es acertado. Sin embargo, y partiendo de la base de que la colonización del tracto digestivo y la supervivencia en él son requisitos para mediar el efecto terapéutico, la salida de grandes números de microorganismos activos del mismo podría llegar a interpretarse como un fracaso. Sería el equivalente a una biodisponibilidad muy baja en un medicamento destinado a absorberse a través de la mucosa hacia el torrente sanguíneo. Este argumento gana peso cuando se observa que, en la mayoría de los casos, el microorganismo deja de ser detectable en heces muy poco después del fin del tratamiento. Incluso en casos donde la colonización por parte del microorganismo terapéutico es muy alta, la permanencia de la sustancia activa en el intestino puede considerarse muy corta. En el caso del ensayo antes descrito con NTCD-M3 de Shire, y con el régimen de tratamiento más exitoso en términos de colonización y de resultados clínicos, la cepa administrada dejó de ser detectable tan sólo veinte semanas después de la última dosis (498). Los ensayos para esa misma indicación con FMT arrojan en la mayoría de las ocasiones resultados análogos en los que la microbiota del receptor es muy similar en términos de composición taxonómica inicialmente a la del donante, pero tan sólo dos a tres meses tras el trasplante vuelve a recordar a la original del receptor (545–548), lo cual por otra parte indica el importante papel de la genética y la inmunidad del hospedador en la definición de su propia microbiota.

La falta de colonización y de permanencia en el hospedador han sido argumentos a los que la industria de los probióticos ha tenido que enfrentarse desde sus inicios, y que se repiten en el campo de los LBP. En el caso de tratamientos frente a la infección por *C. difficile*, y visto el perfil de eficacia de estos productos y procedimientos, puede ser que la colonización y permanencia más allá del periodo de infección aguda no sean necesarias. Sin embargo, en el caso de tratamientos con LBP para enfermedades crónicas, la supervivencia del LBP en el paciente sería lo teóricamente deseable. Esto lleva a la consideración de un segundo biomarcador al que la inmensa mayoría de los ensayos con estrategias terapéuticas a través de la microbiota presta mucha atención, que es la capacidad de la intervención de modificar la microbiota del paciente. Mientras

este cambio se logra en las situaciones especiales en las que un tracto digestivo desprovisto de microbiota es repoblado a través de un LBP, en general existen contadas estrategias que realmente logren modificar la microbiota del paciente, al menos en términos taxonómicos. Esto se ha puesto de manifiesto muy recientemente con una revisión sistemática de la capacidad de modificar la microbiota intestinal de todos los ensayos clínicos aleatorizados, doble-ciego, y controlados por placebo realizados con probióticos (549). El estudio concluyó que ningún ensayo con probióticos había sido capaz de modificar significativamente la microbiota intestinal en términos de diversidad-alfa, riqueza o balance, y que sólo uno logró modificar la diversidad beta de la misma. Se ha de insistir en que esta revisión, al igual que todos los ensayos incluidos en ella, únicamente atendió a aspectos estrictamente relacionados con parámetros taxonómicos.

Estos últimos argumentos llevan a una reflexión importante. Dado que algunos probióticos y muchos LBP, sobre todo de tipo FMT, han demostrado ser clínicamente eficaces frente a diversas dolencias, a pesar de no ser capaces de modificar la estructura taxonómica de la microbiota, al menos de forma duradera, el mecanismo de acción de estos productos puede no estar siempre mediado por la colonización y permanencia de los microorganismos en el cuerpo del hospedador. El hecho de que algunos postbióticos microbianos de tipo estructural y algunos probióticos fantasma tengan efectividad pone aún más de manifiesto que la viabilidad y actividad metabólica de los microorganismos puede no ser imprescindible. Es posible, en definitiva, que al menos algunos microorganismos puedan ejercer su acción terapéutica durante su paso transitorio por el cuerpo humano. Esto, que puede suponer un cambio de paradigma en el mundo de la microbiota, no debería de ser extraño desde el punto de vista conceptual, ya que la virtual totalidad de los medicamentos existentes actúan de este mismo modo. Son administrados, ejercen su labor y abandonan el cuerpo. Este punto no pretende justificar la eliminación del estudio de la composición de las microbiotas durante los ensayos con terapias a través de ellas. Es simplemente una reflexión acerca de su utilidad y relevancia como biomarcadores predictivos de la eficacia del tratamiento, al menos con las técnicas, enfoques y conocimientos actuales. Como también se ha discutido, es necesario considerar la posibilidad de que los LBP más definidos o determinados miembros constitutivos de un FMT sí pasen a formar parte de la microbiota del paciente, pero que simplemente lo hagan como

flora ligada a la capa mucosa del intestino, lo que podría llevar a su falta de detección en heces. Por lo tanto, si se desea medir la capacidad de colonización de los microorganismos en todas sus formas posibles, es conveniente realizar, adicionalmente al análisis de heces, una determinación de la presencia del producto en la mucosa intestinal.

En cuanto al escepticismo hacia las terapias a través de la microbiota derivado del hecho de que no sean capaces de colonizarla o de modificarla y, por tanto, sea necesario un tratamiento prolongado o incluso vitalicio para determinadas condiciones crónicas de la salud, hay que recordar que la práctica totalidad de las terapias para enfermedades crónicas también lo son. Por lo tanto, y en concordancia con la visión de las terapias a través de la microbiota como fármacos comunes mantenida a lo largo de todo este trabajo, no parece haber motivos para tal crítica hacia ellas. Como se dijo anteriormente, el mayor conocimiento de las complejas interacciones en las que la microbiota se ve envuelta, así como de los mecanismos subyacentes a las mismas, está permitiendo el uso de nuevos biomarcadores sustitutos o subrogados adicionales a los recién discutidos de recuento del producto en heces o biopsias, o al estudio de los perfiles de composición de la microbiota intervenida. Contrariamente a lo que ocurre con estos biomarcadores, no ligados en modo alguno a consecuencias clínicas, existen otros indicadores cuya determinación puede ser utilizada como predictiva o de seguimiento de la eficacia de un tratamiento a través de la microbiota. En determinadas áreas terapéuticas existen biomarcadores no clínicos plenamente aceptados como sustitutos de objetivos clínicos. Tal es el caso del cáncer, en el que el objetivo último es la extensión de la supervivencia de los pacientes durante un número de años, el cual se infiere o extrapola a partir de biomarcadores sustitutos como la respuesta del tumor al tratamiento, lo que permite agilizar considerablemente los programas de desarrollo y acortar el tiempo que el medicamento tarda en llegar a los pacientes. A pesar de que este enfoque tiene inconvenientes (550), se puede considerar que uno de los mayores retos del sector de la medicación a través de la microbiota es precisamente hallar este tipo de indicadores con el objetivo de diagnosticar o apoyar al diagnóstico de enfermedades en las que la microbiota se vea envuelta, así como de estratificar a la población enferma, predecir el éxito del tratamiento a través de su seguimiento y dar soporte científico a los mecanismos de acción cuya eficacia clínica sea

observada en ensayos con animales y humanos. Esto es algo que ya está ocurriendo en la industria. Por ejemplo, SYN-004 de Synthetic Biologics actúa sobre el metabolismo metanogénico, que produce metano, que difunde a través de la mucosa e inhibe la motilidad intestinal a través de la disminución de los niveles de serotonina en la pared del tracto digestivo (551,552), y que es detectable por aire espirado. Vedanta Biosciences atiende a reacciones específicas en el sistema inmune asociado a mucosas provocados por la administración de su consorcio de diecisiete cepas de clostridios VE202. El candidato SGM-1019 de Second Genome bloquea la interacción entre una proteína liberada por un miembro de la microbiota intestinal y un receptor del epitelio humano, cuyas señales de transducción probablemente sean medibles de algún modo. Estos biomarcadores también pueden ser de tipo químico-metabólico, como los SCFA u otras moléculas pequeñas cuyo potencial farmacológico también se explora actualmente (386). Pueden incluso ser metabolitos hallados en fluidos corporales del hospedador producidos por las microbiotas (133), por él mismo, o fruto del metabolismo acoplado de las microbiotas y el hospedador, como se explicó en el caso de la toxicidad del paracetamol a causa del p-cresol detectable en orina y producido por miembros de la microbiota intestinal (394). En el caso del producto de OxThera destinado al tratamiento de la hiperoxaluria, el biomarcador principal manejado como predictivo de la eficacia del producto a largo plazo es el ácido oxálico en orina, a su vez relacionado con la urolitiasis. En este contexto las tecnologías ómicas complementarias a la secuenciación jugarán un papel fundamental.

Es importante remarcar un argumento planteado a lo largo de los últimos párrafos de forma implícita que es que, con la información de la que se dispone actualmente, cualquier biomarcador relacionado con la composición de la microbiota, ya sea de tipo taxonómico a cualquier nivel, o de tipo funcional, no es ni clínicamente relevante ni puede ser utilizado como sustituto de ningún evento clínicamente relevante. Esta discusión es muy activa en el sector de la alimentación, en la que la industria defiende conceptos como “el efecto bifidogénico”, o lo que es lo mismo, el aumento de la proporción de bifidobacterias en el intestino, como un marcador sustituto de salud intestinal. Frente a esta petición, lo que EFSA responde de forma acertada es que no existen evidencias suficientes como para aceptarlo. Es probable incluso que el día en que

un biomarcador estrictamente microbiano sea reconocido como marcador sustituto de uno clínico haya llegado o esté muy próximo. La francesa Enterome ha desarrollado IBD110 como indicador de la cicatrización mucosa en enfermedad de Crohn y lo ha validado en cuatrocientos pacientes. Hasta ahora la comprobación de este fenómeno relevante en el tratamiento se realizaba por endoscopia como marcador clínico o por la detección de calprotectina, una proteína procedente de los leucocitos humanos, en heces como marcador subrogado. Enterome afirma que IBD110, que se ejecuta por PCR cuantitativa alimentada por datos metagenómicos, es mejor predictor que esta proteína.

Existen en el ámbito de la investigación ejemplos que también apuntan hacia el establecimiento de posibles biomarcadores sustitutos basados en la microbiota. Por ejemplo, Yano y colaboradores (553) encontraron una clara relación entre la presencia en las heces de bacterias esporuladas y la producción de serotonina en el hospedador. La serotonina es un importante mediador de gran cantidad de sistemas incluyendo el digestivo, donde se encuentra el 90% de ella y donde regula procesos como la motilidad. A partir de esta observación, y con las comprobaciones previas necesarias, se podrían inferir resultados clínicos relacionados con la serotonina. No obstante en el futuro cercano, y además de en el caso del tratamiento de la diarrea por *C. difficile* y otros que puedan ser similares, el análisis de la composición de las microbiotas antes, durante y después de las intervenciones terapéuticas, ganará importancia cuando los procedimientos de análisis se estandaricen y se establezcan relaciones firmes entre la composición de una microbiota, medida de forma taxonómica o funcional, y la eubiosis o disbiosis, correspondientes a la normalidad, salud o enfermedad de la microbiota. No obstante, y a propósito de esta última frase, conviene hacer una última reflexión acerca de la relación entre microbiota y enfermedad. Es frecuente encontrar trabajos en los que se intentan establecer relaciones entre la presencia de una determinada especie de microorganismo de la microbiota y una determinada enfermedad o un aspecto positivo para la salud del hospedador. Aunque existen ejemplos como la implicación de *Streptococcus gallolyticus* y *Fusobacterium nucleatum* en el desarrollo de cáncer colorrectal (554), quizás el caso más claro a este respecto es el ya citado *H. pylori*, cuya presencia se ha ligado al desarrollo de cáncer de estómago (164,165) y también a la protección frente a enfermedades del sistema inmunitario como las alergias y el asma (166).

A pesar de que es posible que este tipo de relaciones directas causa-efecto existan, se antoja algo complicado dadas las características de la microbiota, en las que muchas de las funciones ecológicas están repetidas en varios de sus elementos, no pudiendo responsabilizarse a una especie en concreto de un efecto, deletéreo o beneficioso. Esto es particularmente cierto en el caso de las enfermedades que pretenden ligarse a miembros específicos de la microbiota, lo cual supone una aplicación de los postulados de Koch para las enfermedades infecciosas al ámbito de la microbiota. El hecho de que una persona contenga en su microbiota estomacal *H. pylori* no permite afirmar que desarrollará úlceras gástricas y mucho menos cáncer, o al menos no con el mismo nivel de certeza con el que se predice el desarrollo de la enfermedad en un individuo en cuya sangre se detecte el virus de la hepatitis C. Por lo que se sabe hasta ahora, la microbiota juega en la enfermedad un papel más parecido al de una variante genética de riesgo para el desarrollo de una enfermedad que como un agente infeccioso. Este hecho es concordante con la teoría hologenómica de la evolución y la visión de la microbiota como un gigante elemento de material genético extragenómico.

Tanto en la búsqueda de indicadores de la microbiota relacionados con enfermedades como de posibles soluciones terapéuticas es necesario utilizar un enfoque más flexible, que no sólo contemple la posibilidad de la dupla “un microorganismo-una enfermedad” sino la de “una conjunción de factores-una enfermedad”. Esto se pone de manifiesto con el fenómeno de los portadores sanos, individuos que albergan en sus microbiotas normales microorganismos tradicionalmente considerados patógenos sin sufrir ningún síntoma. Es también el caso de las infecciones oportunistas, en las que esos miembros pasan súbitamente de ser comensales, o incluso simbioses, a ser patógenos para el hospedador. En el comportamiento de un microorganismo como patógeno o como inofensivo juegan un papel primordial las características del propio microorganismo, pero también del contexto de la microbiota circundante, del hospedador (genética, sistema inmune) y del ambiente. Es sobradamente conocida la capacidad o tendencia de determinados miembros de las microbiotas de tornarse patógenos en situaciones concretas, como las levaduras del género *Candida* de la piel en caso de inmunosupresión, o el sobrecrecimiento de microorganismos vaginales distintos de los lactobacilos tras un tratamiento con antibióticos. Lo que puede ser aún más importante es la idea de que en muchas

ocasiones, incluso las enfermedades consideradas como infecciosas pueden no serlo en sentido estricto al proceder sus microorganismos causantes procedentes de la propia microbiota del individuo en lugar de del contagio desde otro individuo. Este puede ser el caso de infecciones respiratorias causadas por miembros de la microbiota de las vías aéreas, de las infecciones urinarias causadas por el sobrecrecimiento o la deslocalización de miembros de la microbiota de la uretra o la vejiga, o de las vaginosis bacterianas, infecciones sumamente frecuentes que están en su mayoría causadas por miembros de la microbiota normal de la vagina y no por agentes infecciosos externos.

No obstante, lo más importante para este campo del conocimiento es la posibilidad de que enfermedades no consideradas hasta ahora causadas por microorganismos lo sean, aunque sea de una manera ligeramente diferente a las enfermedades infecciosas. Por ejemplo, si la enfermedad de Crohn está realmente causada por una respuesta inmune excesiva contra miembros de la microbiota intestinal como *S. cerevisiae* (225), esta enfermedad podría considerarse como causada por un microorganismo. La gran diferencia con la definición de enfermedad infecciosa de Koch reside en que la detección de la levadura en el intestino de un individuo no se traduce, ni mucho menos, en sufrir enfermedad de Crohn. Existen casos donde la translocación de la microbiota a áreas que normalmente no ocupan, por ejemplo los canales hepáticos, causa una respuesta inmune que elimina el microorganismo desde el primer momento, pero que si es excesiva o inadecuada puede cronificarse ocasionando una enfermedad con síntomas crónicos aunque el microorganismo ya no esté presente.

Pueden darse también situaciones en las que una sola clase de microorganismo no sea suficiente para ocasionar la enfermedad. Del mismo modo que se conoce desde hace décadas la necesidad del virus de la hepatitis D de coinfectar con el virus de la hepatitis B (555), puede tener que asumirse que la presencia de varios taxones de microorganismos, pertenecientes incluso a diferentes reinos, sea necesaria para causar una enfermedad. Este podría ser el caso de las enfermedades en las que las arqueas metanógenas o las bacterias sulfatorreductoras, microorganismos que establecen redes tróficas altamente interdependientes con otros microbios, estén implicadas (456,490,551,552), o enfermedades no atribuibles a un microorganismo en concreto como es el caso de

muchas vaginosis bacterianas. Estos casos de enfermedades polimicrobianas también suponen una modificación sobre los postulados de Koch.

No hay que olvidar que son los objetivos clínicos de seguridad y eficacia los que prevalecen sobre cualquier biomarcador sustituto. La normativa es totalmente flexible con respecto a los de eficacia, trasladando la decisión acerca del éxito o fracaso clínico de cada terapia a cada caso y ensayo particulares. En concordancia, no es demasiado concreta tampoco en el caso de la seguridad, relativizándola a cada indicación terapéutica y su perfil de eficacia. No obstante la ley establece unas recomendaciones en términos de pruebas de seguridad que pueden ser entendidas como de mínimos, aplicables a todos los fármacos con carácter general. Dentro del rango de terapias a través de la microbiota, una vez más serán los LBP los medicamentos que más matizaciones requieran por sus especiales características. La Directiva 2001/83/CE nombra varios aspectos a comprobar en términos de seguridad a nivel preclínico, y cuya falta de inclusión en el dossier no es conveniente y debe ser justificada.

El primero es la toxicidad por dosis única, con “normalmente [...] al menos dos vías de administración, una idéntica o similar a la prevista para su uso en el hombre y otra que garantice la exposición sistémica a la sustancia” y “con dos o más especies de mamíferos de cepa [sic] conocida”. El objetivo de estos ensayos es, en general, determinar el efecto de una dosis única elevada del fármaco, obtener información de tipo dosis-efecto y estimar la dosis letal del mismo, así como información sobre los efectos de una posible sobredosificación en humanos. Ya se han discutido los aspectos relativos a los modelos animales. Con respecto a las vías de administración, todos los medicamentos susceptibles de absorción, por ejemplo de tipo molécula pequeña, independientemente de que su mecanismo de acción sea sobre la microbiota intestinal, cutánea o cualquier otra, deberían ser administrados por su vía principal y por inyección para comprobar los efectos sistémicos. También se ha tratado el asunto de las dosis y su comparabilidad entre animales y humanos. Para el caso de la toxicidad aguda, probablemente debiera usarse en cualquier modelo animal la dosis máxima contemplada en humanos. No hay descritas sobredosis por administración de microorganismos en la literatura ya que los que no colonizan el cuerpo humano se expulsan, siendo quizás los más semejante a ellas la dosis supraóptima observada en el ensayo con

NTCD-M3 anteriormente descrita. Sí pueden existir sobredosis en los casos en los que el microorganismo administrado produzca alguna sustancia que se pueda absorber o acumular en el organismo, en cuyo caso la sobredosis puede no estar causada únicamente por el número de células inicialmente administradas sino por su crecimiento posterior y/o sus niveles de expresión de la sustancia que la causa. Es por ello que el periodo de seguimiento tras la administración de la dosis única “de catorce días y no inferior a siete días” establecido en la normativa pueda resultar insuficiente para comprobar los efectos de una administración única al medio plazo. Este es al tipo de ensayo al que los medicamentos cuya administración sea prevista por dosis única tienen que someterse.

El segundo es la toxicidad por administración continuada (toxicidad subaguda y crónica). En este caso se habla de ensayos con dos especies de mamíferos, una de las cuales no ha de ser roedor. Tienen el objetivo de poner de manifiesto las alteraciones “funcionales y/o anatomopatológicas subsiguientes a la administración repetida de la sustancia activa [...] y establecer las condiciones de aparición de dichas alteraciones en función de la posología”. Para estas pruebas aplica lo comentado para las anteriores en términos de vías de administración y dosis, que el investigador tiene que justificar. Es en esta justificación en la que deberían aplicarse criterios sistematizados en lugar de arbitrarios, como se discutió en un punto anterior. La Directiva establece la recomendación de realizar dos pruebas; una a corto plazo (dos a cuatro semanas) y otra a largo plazo dependiente de aplicación clínica (normalmente tres a seis meses aunque se deja a discreción del investigador). Por los mismos motivos expuestos en los ensayos de toxicidad por dosis única, y dado además que muchos LBP puedan tener que ser administrados de forma prolongada o incluso vitalicia, es probable que lo más adecuado sea extender más allá de los seis meses los ensayos más duraderos. Las autoridades también requieren que para todos los productos que precisan una administración reiterada, como es el caso en la práctica totalidad de los que contienen microorganismos, se diseñen pruebas que investiguen la posible generación de anticuerpos, dado que la alergenidad es una de las mayores preocupaciones de los reguladores en el ámbito de los fármacos biológicos. Teniendo en cuenta que la mayoría de los LBP interaccionarán con el sistema inmune del hospedador, deberá considerarse el

tipo de anticuerpos que éstos pudieran inducir de forma específica. Mientras que la IgA, propia de las mucosas, pudiera probablemente considerarse una respuesta normal en la mayoría de los casos, la aparición de IgG o IgE contra el agente terapéutico podría estimarse como un riesgo para la seguridad por translocación o alergenicidad, respectivamente.

El tercero es el estudio de la función reproductora. En este caso los aspectos observados que hagan suponer una alteración en la capacidad reproductora masculina o femenina. Esto puede ser importante para los medicamentos que actúen sobre la microbiota pero que sean susceptibles de absorción y, de forma más importante, a los LBP tópicos vaginales, tanto modificados como no, ya que la composición de la microbiota del aparato reproductor femenino ha sido relacionada con la capacidad reproductiva (556).

El cuarto es la toxicidad embrionaria, fetal y perinatal. De forma similar a lo anterior, los ensayos preclínicos con animales en estado de gestación pueden ser necesarios en casos de distribución sistémica del agente y/o en aplicaciones ginecológicas para garantizar la ausencia de toxicidad perinatal causada por una microbiota vaginal extraña.

El quinto y último es el potencial mutágeno y cancerígeno. Además de por agentes químicos, los fármacos de la microbiota de base microbiana pueden producir sustancias potencialmente cancerígenas por su propia naturaleza o metabolismo (aminas biógenas, sustancias irritantes) o fruto de su actividad terapéutica. Esto puede ser especialmente cierto en el caso de LBP modificados en los que, por una parte expresión de moléculas como mediadores del sistema inmune u hormonas pueden causar una desregulación del equilibrio homeostático y por otra, tienen el potencial teórico de transferir material genético tanto a otros microorganismos como al hospedador.

Por su parte, las guías descritas proponen tests concretos centrados en aspectos más específicamente relacionados con los LBP. La fuente de preocupación clásica de las autoridades con respecto a los microorganismos son las resistencias a antibióticos. Tanto en el mundo alimentario como en el farmacéutico se exige que cualquier microorganismo empleado sea sensible a antibióticos, especialmente a los de uso terapéutico. El temor de los reguladores se basa en la introducción de los genes de resistencia en la microbiota que

podieran ser transferidos a microorganismos patógenos. Si bien la resistencia de los microorganismos patógenos a los antibióticos es uno de los mayores problemas sanitarios a nivel global y esta preocupación por parte de las autoridades es legítima, existen dos factores a tener en cuenta en este respecto. En primer lugar, la inmensa mayoría de las bacterias poseen genes relacionados con la resistencia a antibióticos de forma natural. Es más, es muy común que esta resistencia esté dirigida contra múltiples tipos de antibióticos. Esto se ha comprobado tanto en microorganismos aislados de ecosistemas de zonas recónditas del planeta como en microorganismos del intestino de individuos que vivieron cientos de años antes del descubrimiento del posible uso farmacológico de los antibióticos (347). Se debe a la presión selectiva sufrida por las bacterias durante miles de años para resistir los ataques de otros microorganismos, como los hongos, en su hábitat natural. En segundo lugar, la transferencia de genes entre microorganismos no se considera un fenómeno frecuente ni probable. Shire cuantificó *in vitro* la capacidad de *C. difficile* de adquirir fragmentos largos de ADN y expresar la información codificada en ellos (557), situando la frecuencia de este evento en $7,5 \times 10^{-9}$ transconjugantes por donante, es decir, en siete ocasiones de cada mil millones, lo que puede considerarse como una probabilidad reducida. Resulta lógico por lo tanto exigir la total sensibilidad fenotípica a antibióticos, empleando métodos de cultivo para determinarla, pero es virtualmente imposible exigirla a nivel genético. No obstante, sí conviene evitar cepas microbianas cuyos genes relacionados con la resistencia a antibióticos estén situados cerca o dentro de elementos genéticos móviles, mucho más fácilmente transmisibles a otros organismos. A este respecto la “Guía para LBP de la FDA” dispone además que “cuando se haya introducido intencionalmente una resistencia antibiótica en la(s) cepa(s) del producto para la selección o el mantenimiento de modificaciones genéticas, debe discutirse la necesidad de dicho gen y posibles enfoques alternativos”.

En biotecnología microbiana clásica los genes de resistencia a antibióticos son los marcadores más utilizados como criterio de selección. No obstante, debido a sus problemas regulatorios y potencialmente clínicos, esta estrategia no es utilizada normalmente en el desarrollo de microorganismos OMG destinados al tratamiento de seres humanos o animales. Es por eso que la FDA exige que se discuta la necesidad del uso de esos marcadores. Como posible alternativa, por

ejemplo, AG013 posee su gen terapéutico, el que codifica el factor trébol humano, sustituyendo al gen esencial de la timidilato sintasa, responsable de la conversión de dUMP a dTMP. Al estar ausente, convierte totalmente a la bacteria dependiente de una fuente exógena de timina o timidina. Al abandonar el cuerpo humano, el microorganismo muere por un fenómeno conocido como muerte por falta de timina (558–560). Finalmente hay que destacar que la resistencia a antibióticos no es la única cualidad transmisible entre microorganismos. En el momento en el que se emplean OMG hay que asegurar que los transgenes no se transfieren a microorganismos nativos. Como en el caso de Shire nombrado anteriormente, es también importante establecer las medidas necesarias para evitar que cepas no toxigénicas de especies como *C. difficile* o *E. coli* adquieran la capacidad de producir toxinas de sus congéneres toxigénicas (557).

La necesidad de conocer la totalidad de la secuencia genética, tanto del cromosoma de los microorganismos como de sus posibles elementos genéticos extracromosómicos, no tiene únicamente importancia con fines identificativos de la sustancia activa sino, de forma aún más relevante, para determinar de forma preclínica la seguridad del LBP. La secuenciación completa de toda la información genética del microorganismo permite inferir su capacidad de resistir antibióticos, su capacidad de producir toxinas y su capacidad potencial de transferir estos atributos a otros organismos. Tras analizar los escasísimos casos de eventos adversos acaecidos en ensayos con probióticos, que cursan con sepsis en pacientes inmunodeprimidos (361), otra medida demandada por las guías es la determinación de la capacidad de los microorganismos empleados para translocar de la luz del intestino al torrente sanguíneo a través de la mucosa. Para ello pueden diseñarse pruebas moleculares, por ejemplo PCR, para la detección de los microorganismos que constituyen el fármaco en la sangre del animal durante el estudio o durante la autopsia. Una vez más, disponer de las técnicas adecuadas para la identificación inequívoca de los componentes del fármaco se torna crucial.

Un último aspecto relacionado con la seguridad de los fármacos basados en microorganismos vivos es el de los planes de contingencia en caso de sobredosis o sobrecrecimiento del agente terapéutico. Aunque, como se ha discutido, ésta no se antoja un caso frecuente en LBP de tipo FMT o más sencillos, es conveniente disponer de estos planes en caso de urgencia. Dado que las cepas empleadas

serán en la totalidad de los casos sensibles a antibióticos, la estrategia más inmediata para detener un sobrecrecimiento consistirá en la administración de los mismos. Será la labor del desarrollador del fármaco determinar qué terapia antimicrobiana es la óptima para eliminar su agente terapéutico disturbando lo mínimo posible el resto de la microbiota. En casos que no requieran actuaciones de urgencia, el uso de antibióticos debería minimizarse, especialmente en pacientes cuyas microbiotas hayan requerido una intervención. Es por eso que se deben diseñar alternativas de tipo competición ecológica. Éstas pueden basarse, por ejemplo, en la administración de un microorganismo competidor del administrado en primer lugar o en la administración de fuentes de carbono o nitrógeno, cofactores o vitaminas a modo de prebióticos para favorecer el crecimiento de organismos competidores en la microbiota. Puede también pensarse en inhibidores de tipo metabólico específicos de rutas cruciales para el crecimiento del microorganismo del fármaco o incluso en terapias antimicrobianas específicas en forma de bacteriófagos o bacteriocinas. En caso de que la sobredosis ocurra por acumulación de una molécula o metabolito producido por el agente terapéutico, podrá recurrirse a los métodos clásicos de remediación por medio de antídotos o procedimientos médicos.

Cabe destacar como conclusión de este apartado que, por el momento, este concepto de seguridad seguirá siendo concebido como hasta ahora, y contemplado únicamente desde el punto de vista clínico y de la fisiología del hospedador. Sin embargo, a medida que se vayan conociendo los factores o componentes de la microbiota responsables de la salud y del mantenimiento de la homeostasis, probablemente se introduzcan marcadores relacionados con la microbiota. Esto no sólo afectará a los fármacos basados en microorganismos, sino a toda la industria farmacéutica en su conjunto. Como se ejemplifica en el caso de las preocupaciones de la FDA en el caso Xifaxan de Salix, es probable que las autoridades comiencen a demandar a todos los tipos de medicamentos, ya tengan el objetivo de actuar sobre o a través de la microbiota o no, que comprueben sus efectos sobre la misma. Como antes se discutió, por el momento los indicadores centrados en la microbiota no tienen ninguna relevancia clínica ni para aspectos de eficacia ni de seguridad, lo que viene derivado del desconocimiento acerca de lo que es normal. Cuando se manejen más certezas que incertidumbres en este campo, los marcadores de la microbiota podrían ser tan válidos clínicamente

como los de toxicidad hepática o renal. Son también importantes para las autoridades las posibles interacciones de un nuevo medicamento en investigación con otros medicamentos que el paciente pueda requerir. Por el momento lo reflejado en los prospectos de los microorganismos catalogados como fármacos en España es únicamente la interacción con antibióticos o antifúngicos, dependiendo de si el medicamento contiene bacterias o levaduras, respectivamente. Es probable que la lista de medicamentos que pueden interactuar con los LBP se engrose a medida que se amplíe el conocimiento sobre ellos. Sin embargo, por lo también discutido con anterioridad, la mayor revolución en este sentido vendrá con toda seguridad del enfoque opuesto, es decir, de entender cómo una gran cantidad de fármacos son modificados por la microbiota humana. En otras palabras, de cómo afecta la microbiota a la farmacocinética de los medicamentos.

6.3.5 Pruebas clínicas: representatividad y relevancia

Como en cualquier desarrollo de un nuevo fármaco, las principales características que han de tener sus ensayos en humanos son la representatividad y relevancia clínicas. Esto es, si cabe, más crucial en el caso de los fármacos de la microbiota. Se ha discutido ampliamente que la incertidumbre acerca de lo que debe considerarse normal o eubiótico en términos de composición, taxonómica o funcional, de la microbiota es la mayor limitación en este campo. Sin ese punto de apoyo resulta imposible también definir, en base a marcadores de la microbiota, lo que se considera enfermo o disbiótico, así como los parámetros que definen una mejoría o un empeoramiento. Es por eso por lo que también se ha insistido en la importancia de centrar los objetivos primarios de los ensayos clínicos de estos desarrollos exclusivamente en aspectos con innegable relevancia clínica, manteniendo los relacionados con la microbiota como objetivos secundarios o exploratorios. No obstante, y dado que las estrategias terapéuticas a través de la microbiota deberán centrarse de algún modo en ella, a continuación se incluyen algunas conclusiones extraídas de aspectos discutidos anteriormente.

La falta de definición de normalidad viene determinada, en gran parte, por la enorme variabilidad interindividual en las microbiotas observada en los análisis. Esto añade un nivel más de complejidad al diseño de los ensayos clínicos al convertir en un desafío el establecimiento de pares comparables para comprobar la superioridad o falta de inferioridad de un tratamiento frente a otro, o incluso el efecto del placebo. La enorme cantidad de factores modificadores de la microbiota a nivel intraindividual, incluso en el corto plazo, como la toma de medicaciones y la dieta, pero también los hábitos de vida, de higiene e incluso las horas de sueño, amenazan con convertir los criterios de inclusión y exclusión de los ensayos en listados demasiado largos y restrictivos, dificultando el reclutamiento. Por el mismo motivo las tasas de abandono de los ensayos clínicos amenazan con ser altas, al resultar las excursiones potencialmente frecuentes. Además de realizar ensayos clínicos en condiciones más controladas, el no fundamentar excesivamente el éxito o fracaso de los mismos en marcadores relativamente volátiles como la composición taxonómica de la microbiota, y centrarse en su lugar en objetivos meramente clínicos o en otros emergentes de la

microbiota pero orientados a las funciones metabólicas, pueden ser soluciones para mitigar el impacto de este factor.

La selección adecuada de las muestras a estudiar para asegurar su representatividad será también crucial, así como contar con la comprensión de los comités de ética acerca de la necesidad de realizar pruebas invasivas que permitan un análisis más preciso de las microbiotas. Como también se ha discutido, la metodología de análisis de esas muestras, desde el método de conservación de las mismas hasta la base de datos genómicos empleada, puede jugar un papel distorsionador de los resultados. Es por ello fundamental la consistencia metodológica en el procesamiento y estudio de las muestras, especialmente en los estudios multicentro y multinacionales.

Algo de lo que no se ha hablado en profundidad es el posible efecto de componentes del fármaco distintos de la sustancia activa sobre los resultados de los ensayos preclínicos y clínicos. Además de las sustancias activas, los fármacos de cualquier tipo pueden contener una larga lista de excipientes que cumplen distintas funciones en el producto desde tecnológicas hasta organolépticas. De entre ellos algunos, como determinados aglutinantes y diluyentes, los conservantes y antioxidantes, los edulcorantes y los agentes quelantes pueden tener una relevancia inesperada en las terapias a través de la microbiota. Aunque resulta difícil imaginarlos en LBP, una gran cantidad de otros tipos de medicamentos los llevan en su composición. La preocupación de las autoridades con respecto a los excipientes puede surgir del efecto que éstos puedan tener sobre la microbiota del individuo y, sobre todo, cómo pueden interferir en los resultados de seguridad y eficacia mediados a través de la microbiota. Por ejemplo, se ha descrito la capacidad de antioxidantes en la modificación de la microbiota intestinal a través de una alteración de la relación entre *Firmicutes* y *Bacteroidetes* por la inhibición marcada del crecimiento de ciertos clostridios y *Bacteroides* y la inhibición menos marcada de bifidobacterias y lactobacilos (561,562). La capacidad microbicida de los conservantes se ha estudiado como factor modulador de la microbiota, detectándose que puede aumentar el riesgo de obesidad a través de ella (215,563,564). Se ha sugerido la relación entre los edulcorantes artificiales y modificaciones de la microbiota frecuentes en pacientes con diabetes (565). Incluso ingredientes considerados menos relevantes, como las

celulosas y almidones, son químicamente similares a los prebióticos y pueden favorecer el crecimiento de determinados componentes de la microbiota con respecto a otros (566–568). En cualquier caso, la solución para evitar una interpretación incorrecta de los cambios en la microbiota como efectos terapéuticos reside en utilizar estos indicadores con cautela y centrarse exclusivamente en medidas clínicas. Por ello se sugiere la sustitución total de los ingredientes distintos del principio activo por materiales totalmente inertes, tanto en el medicamento como en el placebo. Es una solución tecnológica y económicamente poco factible. También incluir en cada ensayo clínico un brazo en el que a los pacientes se les administren productos de esas características, lo que es aún menos factible económicamente. Por ello la única solución a este problema es la de determinar, por separado y de forma previa a los ensayos clínicos o incluso preclínicos, el potencial de todos los componentes del fármaco al mecanismo de acción o a la posible modificación de la microbiota. Algunos expertos sugieren la realización de ensayos *in vitro* para cuantificar estos efectos y su observación en los ensayos con animales.

Una vez más, se puede considerar que el mayor impacto que el conocimiento de estos fenómenos tendrá en la industria farmacéutica será en el incipiente campo de la medicina estratificada o personalizada, dado que no resulta difícil imaginar que en poco tiempo la población de enfermos o de candidatos a unirse a ensayos clínicos se estratifique o seleccione en base a determinadas características de su microbiota como órgano metabolizador de medicamentos.

6.3.6 Conceptos de farmacodinámica y farmacocinética aplicados

Tanto en ensayos preclínicos como clínicos existen una serie de conceptos clásicos empleados para definir diferentes propiedades de los fármacos y/o de su interacción con el cuerpo humano al ser administrados, y que son de gran importancia para permitir a las autoridades y al personal clínico entender cómo se comportan éstos a nivel químico en el organismo. Se trata de la farmacodinámica y la farmacocinética. Dadas las especiales características de las estrategias terapéuticas a través de la microbiota es muy probable que muchos de estos parámetros necesiten revisión o matización. Por otra parte, y quizás de forma más relevante para la industria farmacéutica en su conjunto, el conocimiento acerca del papel crucial que la microbiota tiene en el metabolismo de los fármacos pueda llevar al replanteamiento del modo en el que esos parámetros se midan y expresan en términos generales, independientemente de que su diana terapéutica se encuentre o no en la microbiota.

Con respecto a la farmacodinámica, la Directiva 2001/83/CE la define como “el estudio de las variaciones provocadas por el medicamento en las funciones de los sistemas fisiológicos”, es decir, cómo afecta el medicamento al cuerpo humano. Los estudios farmacodinámicos tienen dos vertientes: por un lado el análisis de los cambios ocasionados en el cuerpo que conducen a la acción terapéutica y por otro, los que pueden conducir a efectos adversos. Ambos aspectos se han discutido extensamente con anterioridad. Dado que los estudios farmacodinámicos son bioquímicos en lugar de clínicos cabe destacar, una vez más, la importancia de seleccionar adecuadamente los biomarcadores empleados para determinar la eficacia y la seguridad de una forma biológica que sea relevante a nivel clínico.

Como también se ha dicho, el estudio de las microbiotas, de su relación con el organismo del hospedador y de su implicación en la salud y enfermedad está en sus comienzos. Por lo tanto, y del mismo modo que en los ensayos con humanos se destacó la relevancia de los objetivos clínicos por encima de aquellos centrados en la microbiota, en los estudios farmacodinámicos la atención habrá de centrarse en las estructuras y funciones del hospedador. A pesar de que muchos consideran la microbiota como un órgano más (149), a día de hoy no es

considerado como tal por la comunidad científica ni médica. Es por eso que los estudios farmacodinámicos sólo tendrán relevancia en las estructuras clásicamente consideradas humanas como el hígado, los riñones, el cerebro o el corazón. No obstante, como también se ha detallado, existen pruebas que demuestran que las autoridades y los médicos empiezan a preocuparse por los efectos de las distintas medicaciones sobre la microbiota. No es, por tanto, descabellado pensar que en un futuro cercano la microbiota, por su estructura taxonómica, funcional u otra por descubrir, suponga un biomarcador más dentro de los estudios farmacodinámicos para comprender mejor la seguridad y eficacia de los fármacos, ya actúen estos a través de la microbiota o no.

En el campo estrictamente perteneciente a los fármacos a base de microorganismos LBP sencillos o de tipo FMT, se ha hablado también acerca de los mecanismos de acción que median su eficacia. Por lo tanto, además de lo antes discutido en esta sección, es importante destacar que muy probablemente los biomarcadores más relevantes para estos fármacos serán de tipo fisiológico gastrointestinal o endocrino. Buenos ejemplos serían las concentraciones de serotonina en sangre (553), la dinámica de los neurotransmisores en el nervio vago (333), los patrones de citoquinas, interleuquinas y otros mediadores producidos por los linfocitos (569) o los patrones y niveles de expresión de determinados genes marcadores en el hígado (570,571). Sólo en el momento en que las características de la microbiota se ligan a la seguridad o la eficacia de las intervenciones los biomarcadores directamente asociados a ella gozarán de plena relevancia.

Con respecto a la farmacocinética, un concepto complementario al anterior, conviene recordar que es la disciplina científica que estudia los “procesos que sufre el producto en el organismo” y “comprende el estudio de la absorción [velocidad y magnitud], la distribución, la biotransformación y la excreción de la sustancia”. Este campo se centra exclusivamente en los cambios que el cuerpo induce en los medicamentos desde que los recibe hasta que los expulsa. Sin embargo, y a la luz de todos los argumentos mostrados a lo largo de este trabajo, puede ser necesario realizar la distinción entre los cambios introducidos en las sustancias medicamentosas por el metabolismo del hospedador y por el de la microbiota. La visión actual se basa en considerar ambos metabolismos como una

unidad, lo cual es acertado. Sin embargo, las técnicas de análisis permiten discernir entre ambas aportaciones, lo que puede proporcionar información más detallada acerca del metabolismo de los fármacos y mejorar la comprensión acerca de sus perfiles de seguridad y eficacia.

Se sabe que la microbiota está implicada en el metabolismo de una gran cantidad de elementos, desde los alimentos a los medicamentos, pasando incluso por sustancias endógenas del ser humano, como es el caso de las sales biliares y la bilirrubina producidas por el hígado. La diversidad y riqueza metabólicas de la microbiota contribuyen de forma importante al metabolismo de los xenobióticos, como la inmensa mayoría de los fármacos. Se han adelantado ejemplos en los que se ha descubierto la implicación de metabolismos microbianos en las propiedades farmacológicas de determinados medicamentos. Por ejemplo, en el caso de la digoxina, determinadas bacterias intestinales, por ejemplo *E. lenta*, son capaces de metabolizarla a una forma inactiva (390,391), alterando su perfil de eficacia. Se ha nombrado además el caso de Symberix, que está desarrollando inhibidores selectivos de la beta-glucuronidasa bacteriana como terapia adjunta a la quimioterapia contra el cáncer, dado que esa enzima logra reactivar el irinotecan en el intestino causando toxicidad y diarreas severas (399), o en el caso del paracetamol, la microbiota producido p-cresol que afecta a su metabolización en el hígado de forma indirecta a través de un metabolito (394). La metabolización de los medicamentos por parte de la microbiota no siempre es deletérea, ya que también se sabe que es crucial para la generación de las formas farmacológicamente activas de otras sustancias como la sulfasalazina, la sulfipirazona y el sulindac (572,573). Todas esas casuísticas o, lo que es más probable, combinaciones de ellas, pueden jugar un papel importante en las características de distintos tipos de medicamentos, independientemente de su vía de administración o de que su diana terapéutica se encuentre relacionada con la microbiota o no. Por otra parte, es interesante reflexionar acerca de la relevancia del concepto de farmacocinética para las nuevas clases de medicamentos planteadas a raíz de la microbiota, como son los LBP. A continuación se discutirá cómo aplican los distintos conceptos que componen la farmacocinética tanto a las estrategias farmacológicas a través de la microbiota de cualquier tipo como al sector farmacéutico en su conjunto a la luz de la consideración de la microbiota como agente metabolizador complementario al hospedador.

Considerando en primer lugar la metabolización. Como se ha descrito anteriormente, las transformaciones de la estructura química de los medicamentos por parte de los metabolismos microbiano y humano conllevan la modificación de sus características farmacodinámicas y farmacocinéticas. En caso de que esos medicamentos estén compuestos por microorganismos vivos, la aplicabilidad de este concepto no es fácil, como se verá a continuación. La asunción general con los LBP es que los microorganismos que los componen requieren estar vivos para mediar su mecanismo de acción, por lo que no deberían de ser metabolizados. En la práctica, este concepto debería aplicarse precisamente a la medida en la cual los microorganismos terapéuticos resisten o no la metabolización por parte del cuerpo humano, es decir, la digestión por parte de la lisozima de la saliva, el pH del estómago, las proteasas, lipasas y otras enzimas pancreáticas y las sales biliares del hígado. Sin embargo sí puede entenderse hasta cierto punto como biotransformación la respuesta de los microorganismos resultante de su interacción con el cuerpo del hospedador a través del cual pasen transitoriamente o en el que se instalen y reproduzcan, por ejemplo en el intestino, la cavidad oral o la vagina. Estos cambios pueden ocurrir tras su interacción con el sistema inmune, con miembros de la microbiota o pueden estar causados por su encuentro con condiciones físico-químicas específicas (temperatura o valor de pH, por ejemplo). Por lo tanto, deberían considerarse tanto las mediciones específicas de los patrones de expresión génica, proteica o de actividades metabólicas de los microorganismos. Este hecho ha de ser considerado sobre todo en los LBP modificados que tengan que expresar metabolitos o rutas metabólicas completas, y en los microorganismos que se administren en forma de esporas y que hayan de germinar para mediar su acción farmacológica. En el caso de que el microorganismo tenga que ser digerido por el hospedador para, por ejemplo, liberar moléculas terapéuticas contenidas en su interior, el concepto de metabolización sería más similar al aplicado a los medicamentos tradicionales, como también lo sería en los casos en los que los microorganismos administrados secretaran moléculas activas responsables de la eficacia que deban ser o sean susceptibles de ser modificadas químicamente por el hospedador y/o por otros miembros de la microbiota. La conclusión es que cualquier fármaco de tipo tradicional cuya diana se encuentre en la microbiota se

regiría en términos de biotransformación, como cualquier otro desarrollado hasta ahora.

Si se considera la absorción hay que recordar que en farmacocinética se define este proceso como el paso del medicamento al torrente sanguíneo, lo cual depende de la ruta de administración (oral, tópica, inyección, intranasal) y de las características biológicas y fisicoquímicas del fármaco (tamaño molecular, polaridad, ionización, entre otras). En el caso de fármacos de tipo molécula pequeña, la metabolización por parte de la microbiota puede afectar a su estructura química (tamaño, carga eléctrica, hidrofobicidad), lo que puede modificar su facilidad para ser absorbidos por parte de los epitelios correspondientes. En principio los microorganismos completos tampoco pueden ni deben ser absorbidos por la piel ni por el epitelio intestinal, ya que no deben encontrarse en el torrente sanguíneo. Sin embargo, los metabolitos producidos por ellos, desde SCFA hasta moléculas más complejas, pasando por vitaminas, sí pueden requerir ser absorbidas por el organismo para mediar su eficacia. Por tanto en estos casos debería estudiarse de forma conjunta el comportamiento de éstas junto al perfil de biotransformación, supervivencia, distribución y excreción de sus organismos productores.

Lo que puede entenderse como absorción de los microorganismos terapéuticos es su retención, o adsorción, por parte del cuerpo humano, es decir, de su capacidad para colonizar el organismo y sobrevivir en él. Como se ha descrito, en pruebas realizadas con LBP como NTCD-M3, una de las principales mediciones realizadas en los ensayos clínicos es la del número de ufc en las heces del paciente durante el tratamiento y semanas después del mismo. Hasta ahora este parámetro se está utilizando como medida de la capacidad del microorganismo de sobrevivir a su paso por el sistema digestivo, es decir, como una prueba directa de que permanece al menos unas horas en el intestino y como prueba indirecta de que algunas células son capaces de colonizarlo. Si bien este dato, especialmente en el tiempo posterior al fin del tratamiento, puede ser una medida de la excreción, es muy recomendable realizar mediciones directas de la permanencia de los microorganismos administrados. Aunque existen alternativas en fase de desarrollo, lo más común es que estas técnicas impliquen cierto grado de invasividad en las indicaciones gastrointestinales. En el caso de

microorganismos de uso tópico vaginal las mediciones, que son poco invasivas, sí se realizan de modo directo y de forma rutinaria.

Como también se ha discutido, y simplemente para remarcar el argumento, es probable que al menos algunos microorganismos terapéuticos ejerzan su labor curativa por el simple hecho de pasar transitoriamente por el cuerpo humano, interaccionando con él temporalmente y abandonando el organismo. Por lo tanto, se tratarían de fármacos que no se absorben, como también es el caso de la rifaximina, un antibiótico de tipo molécula pequeña que se emplea en indicaciones gastrointestinales y vaginales precisamente por su característica de no ser absorbida. Existen además medidas que se pueden realizar en los propios microorganismos, como la expresión de pili o moléculas de adhesión, que permiten inferir *a priori* o *a posteriori* su capacidad de permanencia en el cuerpo.

En cuanto a la distribución (llegada, disposición y permanencia del fármaco en los diferentes tejidos del organismo), hay que destacar que este concepto se utiliza con carácter general a las sustancias que se absorben. Es por tanto directamente aplicable a moléculas pequeñas cuya diana terapéutica sea la microbiota o a metabolitos producidos por microorganismos terapéuticos, de forma natural o por una intervención terapéutica sobre ellos y que se absorban. En el caso de los microbios como productos farmacéuticos, por el contrario, no es directamente aplicable. En este caso, la distribución de los LBP podrá considerarse como la cantidad de superficie que el microorganismo es capaz de ocupar, en qué áreas o nichos ecológicos concretos, durante cuánto tiempo y en qué condiciones. Supone añadir los componentes espacial y temporal al concepto de absorción. Por ejemplo, en el caso de un LBP de aplicación vaginal, correspondería con la región concreta del tracto reproductor femenino que el microorganismo ocupa y durante cuánto tiempo tras su aplicación, comprobando que ambos son adecuados para su acción terapéutica.

Al ser los microorganismos estructuras vivas y dinámicas lo más probable es que su población sufra cambios cuantitativos y cualitativos a lo largo de ese tiempo de permanencia. Sería por lo tanto conveniente realizar mediciones periódicas para comprobar si el microorganismo terapéutico es capaz de crecer hasta el punto de desplazar a la flora adyacente, y en qué condiciones metabólicas se encuentra en cada momento.

Finalmente han de considerarse los procesos por los cuales los fármacos son eliminados del organismo, bien inalterados o bien modificados, a través de distintas vías como las heces, la orina, la bilis o el aire espirado. Todas las sustancias administradas al organismo acaban abandonándolo, generalmente siendo modificadas tras su metabolización por parte del hígado o los riñones. Esto es lo que le ocurrirá a los metabolitos producidos por microorganismos, de forma natural o forzada por una actuación terapéutica, o a otras moléculas pequeñas farmacológicas cuya diana estuviera o no en la microbiota. Como ya se ha discutido, los microorganismos vivos no son en general metabolizados aunque sí eventualmente expulsados a través de las heces, de la saliva, de las secreciones vaginales o de la leche materna. En el caso de un LBP gastrointestinal la concentración de microorganismos terapéuticos hallados en las heces, en relación a los presentes en la región precisa del intestino que se pretende colonizar con ellos, sería la medida adecuada. Del mismo modo, para un LBP cuya misión es ocupar la superficie de los dientes para evitar la caries, su excreción correspondería con su tasa de abandono de la cavidad oral por la saliva más la de abandono del intestino por las heces.

Es importante destacar que la expulsión por las heces no es la única forma que el cuerpo humano tiene para disminuir las concentraciones de un microorganismo concreto. Las reacciones inmunitarias, especialmente las de tipo celular, dirigidas contra él pueden causar que la determinación de su eliminación únicamente a través de las heces sea una infraestimación de la tasa real. Puede estimarse la contribución de este tipo de fenómenos de forma más o menos directa mediante la medición de IgA específica o mediante la determinación de exosomas con antígenos del microorganismo en sangre. Se trata de un concepto que une el porcentaje de la dosis de un fármaco que logra alcanzar su diana terapéutica y la velocidad a la cual lo hace. Esta cuantificación es muy difícil de determinar y por ello se considera equivalente a los niveles alcanzados en la circulación sistémica. Por tanto, en la práctica, se equipara al porcentaje de la dosis de fármaco administrada que se detecta en plasma. Como en el resto de los casos, su aplicación a la farmacocinética de moléculas pequeñas o de metabolitos producidos por bacterias que tengan su diana terapéutica fuera de su punto de administración o colonización es muy directa, pero no lo es tanto para los LBP.

En el caso de los microorganismos que alcanzan su diana terapéutica colonizando una región del cuerpo, se correspondería con la velocidad a la que lo hacen. Tras lo detallado acerca de los ensayos clínicos de la industria, especialmente en el caso de NTCD-M3 y los FMT, la velocidad de colonización debería ser entendida tanto como el tiempo tras cada administración en el que empiezan a detectarse microorganismos asentados en el cuerpo del hospedador, como el tiempo durante el cual hay que administrar dosis del microorganismo para lograr su asentamiento. Por el contrario de lo que ocurría en los casos de absorción y distribución, en el cálculo de la biodisponibilidad el factor temporal es crucial, por lo que debería poder medirse de forma rápida, continuada y lo menos invasiva posible. Es por eso que idealmente debería poderse inferir el grado de colonización del microorganismo de alguna manera más o menos indirecta, mediante el uso de marcadores de tipo metabólico o inmunológico en la sangre o la orina. Éstos también podrían ser empleados en las determinaciones de los parámetros de absorción y distribución de forma auxiliar, aunque en esos casos es sumamente importante comprobar de forma fehaciente la presencia y la localización de los microorganismos. Una vez más se está asumiendo, para simplificar la discusión, que el efecto terapéutico de los microorganismos medicinales viene determinado por su colonización, lo cual, como se ha discutido, no es siempre así. Esto significa que, tanto para la determinación de este parámetro como de todos los demás, deberían poderse establecer relaciones con la eficacia de microorganismos que no requieran colonizar para mediar su beneficio, con relevancia como marcadores sustitutos de objetivos clínicos concretos.

El segundo componente del concepto de biodisponibilidad es la fracción del fármaco administrado que acaba alcanzando su diana, es decir, siendo absorbido o retenido en el cuerpo en el caso de que así se requiera para alcanzarla. En el caso de moléculas pequeñas, ya sean administradas de forma exógena o producidas por microorganismos o miembros de la microbiota de forma natural o tras una intervención farmacológica y que tengan que alcanzar dianas en una parte del cuerpo distinta de en la que sus microorganismos productores se aplican y/o colonizan, esta fracción sería la que se registra, a un tiempo determinado, en la sangre frente a la no absorbida. Hay que destacar que en muchas ocasiones las dianas terapéuticas de los microorganismos medicamentosos pueden hallarse en su mismo punto de administración y/o colonización, con lo que la concentración

sanguínea de sus moléculas efectoras no sería relevante a no ser que se considerara un marcador para la estimación de su concentración en la diana terapéutica. El caso de los microorganismos vivos requiere, como de costumbre, matizaciones.

En el caso de los LBP el concepto de biodisponibilidad puede estar mucho más ligado a los de absorción y excreción que en el resto de medicamentos, dado que para los microorganismos excreción y expulsión son virtualmente sinónimos. Por otra parte, en los microorganismos que no requieran ni siquiera colonizar el cuerpo humano, ejerciendo su acción farmacológica durante su paso transitorio por el mismo, el concepto de biodisponibilidad debería definirse por su capacidad de alcanzar su diana terapéutica. Por ejemplo, habría que considerar su facilidad para penetrar biofilms microbianos o una capa mucosa en la vagina o el intestino para interactuar con un receptor del hospedador. Además los LBP plantean el problema adicional del crecimiento que éstos pueden experimentar incluso durante su tiempo de paso por el organismo. Otro desafío para este cálculo es que las técnicas de cuantificación de microorganismos tienen un gran margen de error, lo que podría resultar en que la falta de expulsión y por tanto permanencia de decenas de millones de células o esporas pasara inadvertida, a pesar de que pudieran ser suficientes para desarrollar la acción terapéutica, llevando a situaciones de falsos negativos.

Por lo tanto, en el caso de los LBP el concepto de biodisponibilidad se aproxima mucho, tanto desde el punto de vista teórico como práctico, al de absorción o colonización.

VII – LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

VII-LIMITACIONES Y FUTURAS LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

Probablemente la mayor limitación con la que se ha tenido que enfrentar el presente estudio es la confidencialidad. Por un lado, y dado el marcado espíritu aplicado y traslacional del estudio, uno de los principales materiales de trabajo ha sido información proveniente de empresas biofarmacéuticas operando en el sector de las terapias a través de la microbiota. Este tipo de compañías son muy celosas de la privacidad de sus desarrollos por motivos de patentabilidad y de mantenimiento de su ventaja competitiva frente a otros actores. En algunos casos incluso la naturaleza del tratamiento siendo investigado no es de dominio público. Por otro, existen iniciativas en el ámbito regulatorio por parte de autoridades e instituciones a los cuales se tuvo acceso, pero cuyos promotores solicitaron que no fueran incluidos de forma explícita.

Otra gran fuente de limitaciones para la extracción de conclusiones plenamente relevantes fue la tantas veces resaltada incertidumbre alrededor del conocimiento científico en materia de microbiota.

Una vez establecido el marco de toma de decisiones esbozado en este trabajo, y con el objetivo de que termine considerándose un referente en el sector, una gran parte de su mejora y refinamiento está supeditada al seguimiento de los avances en cada uno de los elementos que lo componen. Será importante seguir los movimientos de cada uno de los actores citados en este trabajo, de los progresos de aquéllos identificados pero no citados y de cuantos pudieran surgir en esta industria. Los aspectos relacionados con las inversiones realizadas por grandes empresas farmacéuticas y con los resultados clínicos de cada uno de los enfoques propuestos serán de vital importancia.

En el ámbito regulatorio será necesario vigilar cuantos eventos de aprobación de nuevos fármacos de la microbiota puedan ocurrir, así como la emisión de guías o documentos legislativos por parte de autoridades e instituciones y las decisiones normativas en los campos adyacentes al farmacéutico, como son el alimentario y el de los productos sanitarios.

En cuanto a los aspectos más técnicos, será también sumamente importante realizar un seguimiento de los avances que se publiquen, con especial atención a los relativos a los mecanismos de la comunicación hombre-microbiota y a los de carácter tecnológico que contribuyan a una mayor armonización de los criterios de estudio. Será también necesaria la validación y discusión de estos resultados con los principales actores del sector, tales como grupos de interés como el PRI, la EMA y la FDA, para lo cual los contactos se iniciaron de forma previa a la compleción del estudio.

VIII - CONCLUSIONES

VIII – CONCLUSIONES

- 1) La disciplina científica que estudia las microbiotas humanas ya ha aportado suficientes evidencias para afirmar que la microbiota juega un papel en la fisiología del ser humano, tanto en sus estados de salud y de enfermedad, como muy probablemente en su evolución como especie. Como consecuencia la visión que tenemos de los microorganismos está cambiando.
- 2) Estamos todavía en los albores del estudio de las microbiotas humanas. Conviene ser cautos y transmitir que la complejidad de los datos obtenidos no permite conocer todavía los mecanismos exactos por los que la microbiota media sus efectos. Como consecuencia, aún no sabemos cuál debe ser la composición de una microbiota considerada normal o en estado de eubiosis.
- 3) Las posibles aplicaciones terapéuticas del conocimiento de la microbiota han despertado un gran interés, lo que se ha traducido en un notable aumento de la producción científica en estas temáticas, así como en importantes inversiones, tanto a nivel público como privado
- 4) Hay un gran número de dianas y estrategias terapéuticas potenciales, todas ellas relacionadas con la microbiota y su interacción con el hospedador. Cada una tiene particularidades propias desde el punto de vista regulatorio. Las que por su novedad plantean más atención y estudio son aquellas que usan microorganismos vivos como agentes terapéuticos.
- 5) Existe una gran confusión a nivel regulatorio en lo relativo a los productos producidos con microorganismos. Ha quedado demostrado que aquellos productos basados en microorganismos cuyo objetivo sea el de curar, mitigar, tratar o prevenir una enfermedad han de ser siempre clasificados como medicamentos (LBP).
- 6) Dentro de la normativa farmacéutica europea es nuestra opinión que los LBP encajan mejor dentro de la categoría de medicamentos de terapia avanzada, a su vez perteneciente a la categoría de medicamentos

biológicos. En el caso de que los microorganismos del producto estén modificados, deberían ser considerados como terapia génica dentro de la categoría de terapias avanzadas.

- 7) Por el contrario, en el caso de productos en los que los microorganismos sean nativos, su inclusión en cualquier subcategoría dentro de la de terapias avanzadas no es clara y sería conveniente crear una cuarta subcategoría específica dentro de la de medicamentos de terapia avanzada. En cualquier caso, la atención de los reguladores se deberá centrar en el proceso de fabricación más que en el propio producto, como ya ocurre con otros fármacos complejos.
- 8) Una gran cantidad de aspectos prácticos del desarrollo de fármacos a través de la microbiota, especialmente si éstos son de naturaleza microbiana, deberán ser sometidos a revisión o matización. Se incluye en este listado conceptos clásicos como potencia, identidad, escalado de dosis, farmacocinética y farmacodinámica.
- 9) Uno de los aspectos más importantes a considerar en los desarrollos de terapias farmacológicas a través de la microbiota es el de sus biomarcadores relacionados. A pesar de que los indicadores principales de seguridad y eficacia de los nuevos fármacos deberán continuar siendo estrictamente clínicos, será necesario aplicar la validación de otro tipo de medidas relacionadas con la microbiota o con su actividad para la plena caracterización y comprensión mecanística de estas terapias. Para lograr este objetivo será fundamental trabajar en la estandarización de las metodologías y criterios de análisis.
- 10) En este tipo de desarrollos farmacéuticos será especialmente necesario el diálogo temprano con las autoridades, que por otra parte se han mostrado muy interesadas y abiertas al mismo, tanto en Europa como en EEUU.

IX - REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX – REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Gould S. Planet of the Bacteria. Washington Post. 1996; Disponible en: <https://www.washingtonpost.com/archive/1996/11/13/planet-of-the-bacteria/6fb60f1d-e6fe-471e-8a0f-4cfa9373772c/>
2. Woolfson A. Origins of life: An improbable journey. *Nature*. 2015 Apr 30; 520 (7549): 617–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/520617a>
3. Williams TA, Foster PG, Cox CJ, Embley TM. An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature*. 2013 Dec 12; 504 (7479): 231–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12779>
4. Spang A, Saw JH, Jorgensen SL, Zaremba-Niedzwiedzka K, Martijn J, Lind AE, et al. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature*. 2015 May 14; 521 (7551): 173–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature14447>
5. Embley TM, Martin W. Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature*. 2006 Mar 30; 440 (7084): 623–30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature04546>
6. Thrash JC, Boyd A, Huggett MJ, Grote J, Carini P, Yoder RJ, et al. Phylogenomic evidence for a common ancestor of mitochondria and the SAR11 clade. *Sci Rep*. 2011 Jun 14; 1: 13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/srep00013>
7. Butterfield NJ, Knoll AH, Swett K. A bangiophyte red alga from the Proterozoic of arctic Canada. *Sci*. 1990 Oct 5; 250 (4977): 104–7. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/content/250/4977/104.abstract>
8. Scola B La, Audic S, Robert C, Jungang L, de Lamballerie X, Drancourt M, et al. A giant virus in amoebae. *Science*. 2003 Mar 28; 299 (5615): 2033. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/299/5615/2033.abstract>
9. Legendre M, Bartoli J, Shmakova L, Jeudy S, Labadie K, Adrait A, et al. Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *Proc Natl Acad Sci*. 2014 Mar 18; 111 (11): 4274–9. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/111/11/4274.abstract>
10. Koonin E V, Dolja V V. Virus world as an evolutionary network of viruses and capsidless selfish elements. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2014 Jun 1; 78 (2): 278–303. Disponible en: <http://mmbr.asm.org/content/78/2/278.abstract>
11. Bergh O, BOrsheim KY, Bratbak G, Heldal M. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*. 1989 Aug 10; 340 (6233): 467–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/340467a0>

12. Bushman F. Composition and dynamics of the human virome. In 2013. p. 1–20. Disponible en: http://www.genome.gov/Multimedia/Slides/HumanMicrobiomeScience2013/09_Bushman.pdf \npapers3://publication/uuid/451D0DA0-2881-4933-94DD-E100D8136451
13. Wommack KE, Williamson K, Helton R, Bench S, Winget D. Methods for the isolation of viruses from environmental samples. In: Clokie MJ, Kropinski A, editors. *Bacteriophages SE - 1*. Humana Press; 2009. p. 3–14. (Methods in Molecular Biology™; vol. 501). Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-164-6_1
14. Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 9; 95 (12): 6578–83. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC33863/>
15. Biello D. The origin of oxygen in earth's atmosphere. *Sci Am*. 2009; 4–7. Disponible en: <http://www.scientificamerican.com/article/origin-of-oxygen-in-atmosphere/>
16. Cao P, Zhang L-M, Shen J-P, Zheng Y-M, Di HJ, He J-Z. Distribution and diversity of archaeal communities in selected Chinese soils. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012 Apr 1; 80(1): 146–58. Disponible en: <http://femsec.oxfordjournals.org/content/80/1/146.abstract>
17. Church MJ, DeLong EF, Ducklow HW, Karner MB, Preston CM, Karl DM. Abundance and distribution of planktonic Archaea and Bacteria in the waters west of the Antarctic Peninsula. *Limnol Oceanogr*. 2003; 48 (5): 1893–902.
18. Ward DM, Weller R, Bateson MM. 16S rRNA sequences reveal numerous uncultured microorganisms in a natural community. *Nature*. 1990 May 3; 345 (6270): 63–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/345063a0>
19. Pedrós-Alió C, Pedros-Alio C. Marine microbial diversity: can it be determined? *Trends Microbiol*. 2006; 14 (6): 257–63. Disponible en: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Retrieve&dopt=AbstractPlus&list_uids=9028882458321034420related:tBz7PsIITX0J
20. Suau A, Bonnet R, Sutren M, Godon J-J, Gibson GR, Collins MD, et al. Direct analysis of genes encoding 16S rRNA from complex communities reveals many novel molecular species within the human gut. *Appl Environ Microbiol*. 1999 Nov 12; 65 (11): 4799–807. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91647/>
21. Socransky SS, Gibbons RJ, Dale AC, Bortnick L, Rosenthal E, Macdonald JB. The microbiota of the gingival crevice area of man—I. *Arch Oral Biol*. 1963; 8 (3): 275–80. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003996963900190>
22. Aas JA, Paster BJ, Stokes LN, Olsen I, Dewhirst FE. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J Clin Microbiol*. 2005 Nov 10; 43 (11): 5721–32. Disponible en:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1287824/>
23. Zhou X, Bent SJ, Schneider MG, Davis CC, Islam MR, Forney LJ. Characterization of vaginal microbial communities in adult healthy women using cultivation-independent methods. *Microbiology*. 2004 Aug 1 [cited 2015 Nov 15]; 150(Pt 8): 2565–73. Disponible en: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/view.action?itemId=http%3A%2F%2Fsgm.metastore.ingenta.com%2Fcontent%2Fjournal%2Fmicro%2F10.1099%2Fmic.0.26905-0&view=&itemType=http%3A%2F%2Fpub2web.metastore.ingenta.com%2Fns%2FArticle>
 24. Staley JT, Konopka A. Measurement of in situ activities of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu Rev Microbiol*. 1985 Oct 1; 39 (1): 321–46. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.39.100185.001541>
 25. Limardo AJ, Worden AZ. Exclusive networks in the sea. *Nature*. 2015; 6–7.
 26. Amin SA, Hmelo LR, van Tol HM, Durham BP, Carlson LT, Heal KR, et al. Interaction and signalling between a cosmopolitan phytoplankton and associated bacteria. *Nature*. 2015; 522 (7554): 98–101. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature14488>
 27. Berendsen RL, Pieterse CMJ, Bakker PAHM. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends Plant Sci*. 2015 Nov 15; 17 (8): 478–86. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2012.04.001>
 28. Bulgarelli D, Schlaeppi K, Spaepen S, van Themaat EVL, Schulze-Lefert P. Structure and functions of the bacterial microbiota of plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2013 Apr 29; 64 (1): 807–38. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-arplant-050312-120106>
 29. Hentschel U, Usher KM, Taylor MW. Marine sponges as microbial fermenters. *FEMS Microbiol Ecol*. 2006; 55 (2): 167–77. Disponible en: <http://femsec.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1111/j.1574-6941.2005.00046.x>
 30. Zhang R, Hou A. Host-microbe interactions in *Caenorhabditis elegans*. *ISRN Microbiol*. 2013; 2013: 356451. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3747393&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 31. Lee W-J, Hase K. Gut microbiota-generated metabolites in animal health and disease. *Nat Chem Biol*. 2014; 10(6): 416–24. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24838170>
 32. Cabreiro F, Gems D. Worms need microbes too: microbiota, health and aging in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Mol Med*. 2013; 5 (9): 1300–10. Disponible en: <http://embomolmed.embopress.org/cgi/doi/10.1002/emmm.201100972>
 33. Zanni E, Laudenzi C, Schifano E, Palleschi C, Perozzi G, Uccelletti D DC. Impact of a complex food microbiota on energy metabolism in the model organism *Caenorhabditis elegans*. *Biomed Res Int*. 2015; 2015.

34. Ley RE, Hamady M, Lozupone C, Turnbaugh PJ, Ramey RR, Bircher JS, et al. Evolution of mammals and their gut microbes. *Science*. 2008 Jun 20; 320(5883): 1647–51. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/content/320/5883/1647.abstract>
35. O'Brien RW, Slaytor M. Role of microorganisms in interstitial lung disease. *Aust J Bioi Sci.* 1982; 35 (5): 239–62. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22145357>
36. Poinar GO. Description of an early Cretaceous termite (Isoptera: Kalotermitidae) and its associated intestinal protozoa, with comments on their co-evolution. *Parasit Vectors*. 2009; 2 (1): 12. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2669471&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
37. Engel P, Martinson VG, Moran N a. Functional diversity within the simple gut microbiota of the honey bee. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;
38. Urbanczyk H, Ast JC, Dunlap P V. Phylogeny, genomics, and symbiosis of *Photobacterium*. *FEMS Microbiol Rev*. 2011; 35 (2): 324–42. Disponible en: <http://femsre.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1111/j.1574-6976.2010.00250.x>
39. Xue Z, Zhang W, Wang L, Hou R, Zhang M, Fei L, et al. The bamboo-eating giant panda harbors a carnivore-like gut microbiota , with excessive seasonal variations. *MBio*. 2015; 6 (3): 1–12.
40. Zhu L, Wu Q, Dai J, Zhang S, Wei F. Evidence of cellulose metabolism by the giant panda gut microbiome. *Proc Natl Acad Sci*. 2011; 108 (43): 17714–9. Disponible en: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1017956108>
41. Brucker RM, Bordenstein SR. The hologenomic basis of speciation: gut bacteria cause hybrid lethality in the genus *Nasonia*. *Science* (80-). 2013; 341 (6146): 667–9. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1240659>
42. Chandler JA, Turelli M. Comment on “The hologenomic basis of speciation: Gut bacteria cause hybrid lethality in the genus *Nasonia*.” *Science* (80-). 2014; 345 (6200): 1011–1011. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1251997>
43. Sharon G, Segal D, Ringo JM, Hefetz A, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Commensal bacteria play a role in mating preference of *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci* . 2010 Nov 16; 107 (46): 20051–6. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/107/46/20051.abstract>
44. Wang J, Kalyan S, Steck N, Turner LM, Harr B, Künzel S, et al. Analysis of intestinal microbiota in hybrid house mice reveals evolutionary divergence in a vertebrate hologenome. *Nat Commun*. 2015; 6: 6440. Disponible en: http://www.nature.com/ncomms/2015/150304/ncomms7440/full/ncomms7440.html?WT.ec_id=NCOMMS-20150311
45. Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature*. 2012 Sep 13; 489

- (7415): 231–41. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature11551>
46. Tung J, Barreiro LB, Burns MB, Grenier J-C, Lynch J, Grieneisen LE, et al. Social networks predict gut microbiome composition in wild baboons. *Elife*. 2015; 4: 1–18. Disponible en: <http://elifesciences.org/lookup/doi/10.7554/eLife.05224>
47. Lister AM. The impact of Quaternary Ice Ages on mammalian evolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2004; 359 (1442): 221–41.
48. Pagani M, Zachos JC, Freeman KH, Tipple B, Bohaty S. Marked decline in atmospheric Carbon Dioxide concentrations during the Paleogene. *Science* (80-). 2005 Jul 22; 309 (5734): 600–3. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/content/309/5734/600.abstract>
49. Huang Y, Street-Perrott FA, Metcalfe SE, Brenner M, Moreland M, Freeman KH. Climate change as the dominant control on glacial-interglacial variations in C3 and C4 plant abundance. *Science*. 2001 Aug 31; 293 (5535): 1647–51. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/content/293/5535/1647.abstract>
50. Chapman HW. Comparative physiology of the vertebrate digestive system, 2ª ed. *Can Vet J*. 1997 Sep; 38 (9): 576–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1576761/>
51. Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E. Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol Rev*. 2008; 32 (5): 723–35. Disponible en: <http://femsre.oxfordjournals.org/content/32/5/723>
52. Sagan L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol*. 1967 Mar [cited 2015 Feb 7]; 14 (3): 225–IN6. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022519367900793>
53. van der Giezen M, Tovar J, Clark CG. Mitochondrion-derived organelles in protists and fungi. *Int Rev Cytol*. 2005 Jan [cited 2015 Nov 3]; 244: 175–225. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S007476960544005X>
54. van der Giezen M. Hydrogenosomes and mitosomes: conservation and evolution of functions. *J Eukaryot Microbiol*. 2009 May 1; 56 (3): 221–31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1550-7408.2009.00407.x>
55. Brillouet J-M, Romieu C, Schoefs B, Solymosi K, Cheynier V, Fulcrand H, et al. The tannosome is an organelle forming condensed tannins in the chlorophyllous organs of Tracheophyta. *Ann Bot* . 2013 Oct 1; 112 (6): 1003–14. Disponible en: <http://aob.oxfordjournals.org/content/112/6/1003.abstract>
56. Cox CJ, Foster PG, Hirt RP, Harris SR, Embley TM. The archaeobacterial origin of eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 23; 105 (51): 20356–61. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2629343/>
57. Lane N, Martin W. The energetics of genome complexity. *Nature*. 2010 Oct

- 21; 467 (7318): 929–34. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09486>
58. McNerney JO, Martin WF, Koonin E V, Allen JF, Galperin MY, Lane N, et al. Planctomycetes and eukaryotes: a case of analogy not homology. *Bioessays*. 2011 Nov 22; 33 (11): 810–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3795523/>
59. Lane N. Mitonuclear match: optimizing fitness and fertility over generations drives ageing within generations. *Bioessays*. 2011; 33 (11).
60. Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hansmann S, Hasegawa M, Kowallik K V. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature*. 1998 May 14; 393 (6681): 162–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/30234>
61. Lane N. Biodiversity: On the origin of bar codes. *Nature*. 2009; 462 (November): 272–4.
62. Allen JF. The function of genomes in bioenergetic organelles. *Philos Trans R Soc B Biol Sci*. 2003 Jan 29; 358 (1429): 19–38. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1693096/>
63. Allen JF, Puthiyaveetil S, Ström J, Allen CA. Energy transduction anchors genes in organelles. *BioEssays*. 2005 Apr 1; 27 (4): 426–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/bies.20194>
64. Uzman A. *Molecular biology of the cell* (4. ed.): Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P. *Biochem Mol Biol Educ*. 2003 Jul 1; 31 (4): 212–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/bmb.2003.494031049999>
65. Linnane A, Ozawa T, Marzuki S, Tanaka M. Mitochondrial DNA mutations as an important contributor to ageing and degenerative diseases. *Lancet*. 2015 Nov 15; 333 (8639): 642–5. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(89\)92145-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(89)92145-4)
66. Blier PU, Dufresne F, Burton RS. Natural selection and the evolution of mtDNA-encoded peptides: evidence for intergenomic co-adaptation. *Trends Genet*. 2015 Nov 15; 17 (7): 400–6. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525\(01\)02338-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9525(01)02338-1)
67. Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G, Bhattacharya D. A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol*. 2004 May 1; 21 (5): 809–18. Disponible en: <http://mbe.oxfordjournals.org/content/21/5/809.abstract>
68. Nakayama T, Archibald JM. Evolving a photosynthetic organelle. *BMC Biol*. 2012; 10(1): 35–7.
69. Yoon HS, Nakayama T, Reyes-Prieto A, Andersen RA, Boo SM, Ishida K, et al. A single origin of the photosynthetic organelle in different *Paulinella* lineages. *BMC Evol Biol*. 2009 May 13; 9: 98. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2685391/>
70. Lane N. The problem with mixing mitochondria. *Cell*. 2015 Nov 15; 151 (2):

- 246–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.028>
71. Hoekstra RF. Evolutionary origin and consequences of uniparental mitochondrial inheritance. *Hum Reprod.* 2000; 15 Suppl 2: 102–11.
72. Cummins JM, Wakayama T, Yanagimachi R. Fate of microinjected sperm components in the mouse oocyte and embryo. *Zygote.* 1997; 5 (4): 301–8.
73. Sharpley MS, Marciniak C, Eckel-Mahan K, McManus M, Crimi M, Waymire K, et al. Heteroplasmy of mouse mtDNA is genetically unstable and results in altered behavior and cognition. *Cell.* 2012 Oct 12; 151 (2): 333–43. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4175720/>
74. Gershoni M, Templeton AR, Mishmar D. Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation. *BioEssays.* 2009 Jun 1; 31 (6): 642–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/bies.200800139>
75. Bailleul B, Berne N, Murik O, Petroustos D, Prihoda J, Tanaka A, et al. Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO₂ assimilation in diatoms. *Nature.* 2015 Aug 20; 524 (7565): 366–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature14599>
76. Payne BAI, Wilson IJ, Yu-Wai-Man P, Coxhead J, Deehan D, Horvath R, et al. Universal heteroplasmy of human mitochondrial DNA. *Hum Mol Genet.* 2013 Jan 15; 22 (2): 384–90. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3526165/>
77. Taylor RW, Turnbull DM. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet.* 2005 May; 6 (5): 389–402. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1762815/>
78. Wallace DC. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *Environ Mol Mutagen.* 2010 Jun 1; 51 (5): 440–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/em.20586>
79. Schon EA, DiMauro S, Hirano M. Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet.* 2012 Dec; 13 (12): 878–90. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3959762/>
80. Keogh M, Chinnery PF. Hereditary mtDNA heteroplasmy: A baseline for aging? *Cell Metab.* 2015 Nov 15; 18 (4): 463–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2013.09.015>
81. Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, Poole JC, Brandon MC, Mishmar D, et al. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.* 2007 Jan 18; 35 (Database issue):D823–8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1781213/>
82. McFall-Ngai M, Hadfield MG, Bosch TCG, Carey H V, Domazet-Lošo T, Douglas AE, et al. Animals in a bacterial world, a new imperative for the life sciences. *Proc Natl Acad Sci .* 2013 Feb 26; 110(9): 3229–36. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/110/9/3229.abstract>
83. Reyes A, Semenkovich NP, Whiteson K, Rohwer F, Gordon JI. Going viral:

- next-generation sequencing applied to phage populations in the human gut. *Nat Rev Micro*. 2012 Sep; 10(9): 607–17. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2853>
84. Fancello L, Raoult D, Desnues C. Computational tools for viral metagenomics and their application in clinical research. *Virology*. 2012 Dec 20 [cited 2015 Jul 15]; 434 (2): 162–74. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0042682212004667>
 85. Feldman LT. A planet of viruses. *J Clin Invest*. 2011 Nov 1; 121 (11): 4208. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3204852/>
 86. Magiorkinis G, Blanco-Melo D, Belshaw R. The decline of human endogenous retroviruses: extinction and survival. *Retrovirology*. 2015 Feb 2; 12: 8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4335370/>
 87. Blomberg J, Uzameckis D, Jern P. Evolutionary aspects of Human Endogenous Retroviral Sequences (HERVs) and disease. In: Sverdlov ED, editor. *Retroviruses and primate genome evolution*. Landes Bioscience; 2005.
 88. Blond J-L, Besème F, Duret L, Bouton O, Bedin F, Perron H, et al. Molecular characterization and placental expression of HERV-W, a new Human Endogenous Retrovirus family. *J Virol*. 1999 Feb 15; 73 (2): 1175–85. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC103938/>
 89. Jern P, Coffin JM. Effects of retroviruses on host genome function. *Annu Rev Genet*. 2008 Nov 4; 42 (1): 709–32. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.genet.42.110807.091501>
 90. Stoye JP. The pathogenic potential of endogenous retroviruses: a sceptical view. *Trends Microbiol*. 2015 Nov 15; 7 (11): 430. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X\(99\)01616-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0966-842X(99)01616-9)
 91. Mi S, Lee X, Li X, Veldman GM, Finnerty H, Racie L, et al. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. *Nature*. 2000 Feb 17; 403 (6771): 785–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/35001608>
 92. Wildschutte JH, Williams ZH, Montesion M, Subramanian RP, Kidd JM, Coffin JM. Discovery of unfixed endogenous retrovirus insertions in diverse human populations. *Proc Natl Acad Sci* . 2016 Mar 21; Disponible en: <http://www.pnas.org/content/early/2016/03/16/1602336113.abstract>
 93. Chuong EB, Elde NC, Feschotte C. Regulatory evolution of innate immunity through co-option of endogenous retroviruses. *Science* (80-). 2016 Mar 3; 351 (6277): 1083–7. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/351/6277/1083.abstract>
 94. Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001; 409 (6822): 860–921. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237011>

95. Cases O, Seif I, Grimsby J, Gaspar P, Chen K, Pournin S, et al. Aggressive behavior and altered amounts of brain serotonin and norepinephrine in mice lacking MAOA. *Science*. 1995 Jun 23; 268 (5218): 1763–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2844866/>
96. Brunner HG, Nelen MR, van Zandvoort P, Abeling NG, van Gennip AH, Wolters EC, et al. X-linked borderline mental retardation with prominent behavioral disturbance: phenotype, genetic localization, and evidence for disturbed monoamine metabolism. *Am J Hum Genet*. 1993 Jun; 52 (6): 1032–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1682278/>
97. Brunner HG, Nelen M, Breakefield XO, Ropers HH, van Oost BA. Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Sci*. 1993 Oct 22; 262 (5133): 578–80. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/content/262/5133/578.abstract>
98. Deckert J, Catalano M, Sygailo Y V, Bosi M, Okladnova O, Di Bella D, et al. Excess of high activity Monoamine Oxidase A gene promoter alleles in female patients with panic disorder. *Hum Mol Genet*. 1999 Apr 1; 8 (4): 621–4. Disponible en: <http://hmg.oxfordjournals.org/content/8/4/621.abstract>
99. Salzberg SL, White O, Peterson J, Eisen JA. Microbial Genes in the Human Genome: Lateral Transfer or Gene Loss? *Sci*. 2001 Jun 8; 292 (5523): 1903–6. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/content/292/5523/1903.abstract>
100. Huerta-Cepas J, Dopazo H, Dopazo J, Gabaldón T. The human phylome. *Genome Biol*. 2007; 8 (6):R109.
101. Iyer LM, Aravind L, Coon SL, Klein DC, Koonin E V. Evolution of cell–cell signaling in animals: did late horizontal gene transfer from bacteria have a role? *Trends Genet*. 2004; 20(7): 292–9. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168952504001337>
102. Lyte M. Microbial endocrinology: Host-microbiota neuroendocrine interactions influencing brain and behavior. *Gut Microbes*. 2014; 5 (3): 381–9. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4153777&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
103. Nikoh N, McCutcheon JP, Kudo T, Miyagishima S, Moran NA, Nakabachi A. Bacterial genes in the aphid genome: absence of functional gene transfer from *Buchnera* to its host. *Copenhaver GP*, editor. *PLoS Genet*. 2010 Feb 26; 6 (2):e1000827. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2829048/>
104. Hotopp JCD, Clark ME, Oliveira DCSG, Foster JM, Fischer P, Torres MCM, et al. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes. *Science* (80-). 2007 Sep 21; 317 (5845): 1753–6. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/content/317/5845/1753.abstract>
105. Fenn K, Conlon C, Jones M, Quail MA, Holroyd NE, Parkhill J, et al.

- Phylogenetic relationships of the *Wolbachia* of nematodes and arthropods. Pearce EJ, editor. *PLoS Pathog.* 2006 Oct 13; 2 (10):e94. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1599763/>
106. Robinson KM, Sieber KB, Dunning Hotopp JC. A review of bacteria-animal lateral gene transfer may inform our understanding of diseases like cancer. *PLoS Genet.* 2013; 9 (10): 1–6.
 107. Werren JH. Biology of *Wolbachia*. *Annu Rev Entomol.* 1997; 42 (124): 587–609.
 108. Stouthamer R, Breeuwer JAJ, Hurst GDD. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol.* 1999 Oct 1; 53 (1): 71–102. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.71>
 109. Acuña R, Padilla BE, Flórez-Ramos CP, Rubio JD, Herrera JC, Benavides P, et al. Adaptive horizontal transfer of a bacterial gene to an invasive insect pest of coffee. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012; 109 (11): 4197–202. Disponible en: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3306691&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 110. Ceja-Navarro J a., Vega FE, Karaoz U, Hao Z, Jenkins S, Lim HC, et al. Gut microbiota mediate caffeine detoxification in the primary insect pest of coffee. *Nat Commun.* 2015; 6 (May): 7618. Disponible en: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ncomms8618>
 111. Danchin EGJ, Rosso M-N, Vieira P, de Almeida-Engler J, Coutinho PM, Henrissat B, et al. Multiple lateral gene transfers and duplications have promoted plant parasitism ability in nematodes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; 107 (41): 17651–6.
 112. Husnik F, Nikoh N, Koga R, Ross L, Duncan RP, Fujie M, et al. Horizontal gene transfer from diverse bacteria to an insect genome enables a tripartite nested mealybug symbiosis. *Cell.* 2015 Nov 16; 153 (7): 1567–78. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2013.05.040>
 113. Nakashima K, Yamada L, Satou Y, Azuma J, Satoh N. The evolutionary origin of animal cellulose synthase. *Dev Genes Evol.* 2004; 214 (2): 81–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00427-003-0379-8>
 114. Kondrashov FA, Koonin E V, Morgunov IG, Finogenova T V, Kondrashova MN. Evolution of glyoxylate cycle enzymes in Metazoa: evidence of multiple horizontal transfer events and pseudogene formation. *Biol Direct.* 2006 Jan 23 [cited 2015 Oct 30]; 1 (1): 31. Disponible en: <http://www.biology-direct.com/content/1/1/31>
 115. Graham LA, Loughheed SC, Ewart KV, Davies PL. Lateral transfer of a lectin-like antifreeze protein gene in fishes. *PLoS One.* 2008 Jul 9; 3 (7):e2616. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371%2Fjournal.pone.0002616>
 116. Riley DR, Sieber KB, Robinson KM, White JR, Ganesan A, Nourbakhsh S, et

- al. Bacteria-human somatic cell lateral gene transfer is enriched in cancer samples. Eisen JA, editor. *PLoS Comput Biol*. 2013 Jun 20; 9 (6):e1003107. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3688693/>
117. Hecht MM, Nitz N, Araujo PF, Sousa AO, de Cássia Rosa A, Gomes DA, et al. Inheritance of DNA transferred from American trypanosomes to human hosts. Fleischer RC, editor. *PLoS One*. 2010 Feb 12; 5 (2):e9181. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2820539/>
118. Teixeira ARL, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in Chagas disease: a review . Vol. 101, *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* . scielo ; 2006. p. 463–91.
119. Hehemann J-H, Correc G, Barbeyron T, Helbert W, Czjzek M, Michel G. Transfer of carbohydrate-active enzymes from marine bacteria to Japanese gut microbiota. *Nature*. 2010; 464 (7290): 908–12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20376150>
120. Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, Oshima K, Toh H, Toyoda A, et al. Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res An Int J Rapid Publ Reports Genes Genomes*. 2007 Oct 3; 14 (4): 169–81. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2533590/>
121. Fukuda S, Saito H, Nakaji S, Yamada M, Ebine N, Tsushima E, et al. Pattern of dietary fiber intake among the Japanese general population. *Eur J Clin Nutr*. 2006 Aug 2; 61 (1): 99–103. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.ejcn.1602505>
122. Cantarel BL, Coutinho PM, Rancurel C, Bernard T, Lombard V, Henrissat B. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics. *Nucleic Acids Res*. 2009 Jan 5; 37 (Database issue):D233–8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2686590/>
123. Martens EC, Koropatkin NM, Smith TJ, Gordon JI. Complex glycan catabolism by the human gut microbiota: the Bacteroidetes sus-like paradigm. *J Biol Chem*. 2009 Sep 11; 284 (37): 24673–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2757170/>
124. Xu J, Bjursell MK, Himrod J, Deng S, Carmichael LK, Chiang HC, et al. A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis. *Science* (80-). 2003 Mar 28; 299 (5615): 2074–6. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/299/5615/2074.abstract>
125. Ley RE, Lozupone CA, Hamady M, Knight R, Gordon JI. Worlds within worlds: evolution of the vertebrate gut microbiota. *Nat Rev Microbiol*. 2008 Oct; 6 (10): 776–88. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2664199/>
126. Prentice T. Health, history and hard choices: Funding dilemmas Funding dilemmas in a fast in a fast-changing world. In: *Health and Philantropy: Leveraging change*. 2006. p. 26. Disponible en:

- http://www.who.int/global_health_histories/seminars/presentation07.pdf
127. Wegman ME. Infant Mortality in the 20th Century, Dramatic but Uneven Progress. *J Nutr* . 2001 Feb 1; 131 (2): 401S–408S. Disponible en: <http://jn.nutrition.org/content/131/2/401S.short>
 128. Best M, Neuhauser D. Ignaz Semmelweis and the birth of infection control. *Qual Saf Health Care*. 2004 Jun; 13 (3): 233–4. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1743827/>
 129. World Health Organization. Life expectancy. 2015. Disponible en: http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/life_tables/situation_trends/en/
 130. World Health Organization. Under-five mortality. 2015. Disponible en: http://www.who.int/gho/child_health/mortality/mortality_under_five_text/en/
 131. UNICEF/WHO. Diarrhoea: why children are still dying and what can be done. 2009. 68 p. Disponible en: http://www.who.int/maternal_child_adolescent/documents/9789241598415/en/
 132. Attar N. Microbiome: Transgenerational missing taxa. *Nat Rev Micro*. 2016 Mar; 14 (3): 132–3. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2016.11>
 133. Wikoff WR, Anfora AT, Liu J, Schultz PG, Lesley SA, Peters EC, et al. Metabolomics analysis reveals large effects of gut microflora on mammalian blood metabolites. *Proc Natl Acad Sci* . 2009 Feb 20; Disponible en: <http://www.pnas.org/content/early/2009/02/19/0812874106.abstract>
 134. Kumar H, Lund R, Laiho A, Lundelin K, Ley RE, Isolauri E, et al. Gut microbiota as an epigenetic regulator: pilot study based on whole-genome methylation analysis. *MBio*. 2014 Dec 31; 5 (6). Disponible en: <http://mbio.asm.org/content/5/6/e02113-14.abstract>
 135. Shenderov BA. Gut indigenous microbiota and epigenetics. *Microb Ecol Health Dis*. 2012 Mar 28; 23: 10.3402/mehd.v23i0.17195. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3744659/>
 136. Paul B, Barnes S, Demark-Wahnefried W, Morrow C, Salvador C, Skibola C, et al. Influences of diet and the gut microbiome on epigenetic modulation in cancer and other diseases. *Clin Epigenetics*. 2015; 7 (1): 1–11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13148-015-0144-7>
 137. Gosalbez L. Probiotics at the food-pharma interphase: strategies for product innovation and differentiation. 2014;
 138. Olle B. Medicines from microbiota. *Nat Biotech*. 2013 Apr; 31 (4): 309–15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2548>
 139. Bäckhed F, Ding H, Wang T, Hooper L V, Koh GY, Nagy A, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci United States Am* . 2004 Nov 2; 101 (44): 15718–23. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/101/44/15718.abstract>

140. Garber K. Drugging the gut microbiome. *Nat Biotech.* 2015 Mar; 33 (3): 228–31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3161>
141. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature.* 2011 May 12; 473 (7346): 174–80. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature09944>
142. Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, Fraser-Liggett C, Knight R, Gordon JI. The human microbiome project: exploring the microbial part of ourselves in a changing world. *Nature.* 2007 Oct 18; 449 (7164): 804–10. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3709439/>
143. Bianconi E, Piovesan A, Facchin F, Beraudi A, Casadei R, Frabetti F, et al. An estimation of the number of cells in the human body. *Ann Hum Biol.* 2013 Nov 1; 40(6): 463–71. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3109/03014460.2013.807878>
144. Sender R, Fuchs S, Milo R. Are we really vastly Outnumbered? Revisiting the ratio of bacterial to host cells in humans. *Cell.* 2016 Jun 4; 164 (3): 337–40. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.013>
145. Karlsson F, Tremaroli V, Nielsen J, Bäckhed F. Assessing the human gut microbiota in metabolic diseases. *Diabetes.* 2013 Sep 24; 62 (10): 3341–9. Disponible en: <http://diabetes.diabetesjournals.org/content/62/10/3341.abstract>
146. Million M, Angelakis E, Paul M, Armougom F, Leibovici L, Raoult D. Comparative meta-analysis of the effect of *Lactobacillus* species on weight gain in humans and animals. *Microb Pathog.* 2012 Aug; 53 (2): 100–8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401012001106>
147. Molina DK, DiMaio VJM. Normal Organ Weights in Men: Part II—The Brain, Lungs, Liver, Spleen, and Kidneys. *Am J Forensic Med Pathol.* 2012; 33 (4). Disponible en: http://journals.lww.com/amjforensicmedicine/Fulltext/2012/12000/Normal_Organ_Weights_in_Men__Part_II_The_Brain,.22.aspx
148. Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell.* 2015 Nov 16; 124 (4): 837–48. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.017>
149. O’Hara AM, Shanahan F. The gut flora as a forgotten organ. *EMBO Rep.* 2006 Jul 1; 7 (7): 688–93. Disponible en: <http://embor.embopress.org/content/7/7/688.abstract>
150. Baquero F, Nombela C. The microbiome as a human organ. *Clin Microbiol Infect.* 2015 Nov 16; 18: 2–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x>
151. van de Wijkert JHHM, Borgdorff H, Verhelst R, Crucitti T, Francis S, Verstraelen H, et al. The vaginal microbiota: what have we learned after a decade of molecular characterization? *PLoS One.* 2014 Aug 22; 9 (8): e105998. Disponible en:

- <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0105998>
152. Martin DH. The microbiota of the vagina and its influence on women's health and disease. *Am J Med Sci*. 2012 Jan; 343 (1): 2–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3248621/>
 153. Segal LN, Blaser MJ. A brave new world: the lung microbiota in an era of change. *Ann Am Thorac Soc*. 2014 Jan 20; 11 (Suppl 1):S21–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3972973/>
 154. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature*. 2010 Mar 4; 464 (7285): 59–65. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3779803/>
 155. Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science*. 2006 Jun 2; 312 (5778): 1355–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3027896/>
 156. Bik EM, Long CD, Armitage GC, Loomer P, Emerson J, Mongodin EF, et al. Bacterial diversity in the oral cavity of ten healthy individuals. *ISME J*. 2010 Aug 25; 4 (8): 962–74. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2941673/>
 157. Komori R, Sato T, Takano-Yamamoto T, Takahashi N. Microbial composition of dental plaque microflora on first molars with orthodontic bands and brackets, and the acidogenic potential of these bacteria. *J Oral Biosci*. 2016 Jun 5; 54 (2): 107–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2012.01.009>
 158. Faveri M, Feres M, Shibli JA, Hayacibara RF, Hayacibara MM, de Figueiredo LC. Microbiota of the Dorsum of the Tongue After Plaque Accumulation: An Experimental Study in Humans. *J Periodontol*. 2006 Aug 18; 77 (9): 1539–46. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1902/jop.2006.050366>
 159. Yilmaz Ö. The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. *Microbiology*. 2008 Oct; 154 (Pt 10): 2897–903. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2639765/>
 160. Ruby J, Barbeau J. The buccale puzzle: The symbiotic nature of endogenous infections of the oral cavity. *Can J Infect Dis*. 2002; 13 (1): 34–41. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2094851/>
 161. Bahrani-Mougeot FK, Paster BJ, Coleman S, Ashar J, Barbuto S, Lockhart PB. Diverse and novel oral bacterial species in blood following dental procedures. *J Clin Microbiol*. 2008 Jun 23; 46 (6): 2129–32. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2446827/>
 162. Lockhart PB, Brennan MT, Sasser HC, Fox PC, Paster BJ, Bahrani-Mougeot FK. Bacteremia associated with tooth brushing and dental extraction. *Circulation*. 2008 Jun 17; 117 (24): 3118–25. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2746717/>

163. Segal LN, Alekseyenko A V, Clemente JC, Kulkarni R, Wu B, Chen H, et al. Enrichment of lung microbiome with supraglottic taxa is associated with increased pulmonary inflammation. *Microbiome*. 2013 Jul 1; 1: 19. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3971609/>
164. Kusters JG, van Vliet AHM, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev*. 2006 Jul; 19 (3): 449–90. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1539101/>
165. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. *Clin Microbiol Rev*. 2010 Oct; 23 (4): 713–39. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2952980/>
166. Amedei A, Codolo G, Del Prete G, de Bernard M, D'Elios MM. The effect of *Helicobacter pylori* on asthma and allergy. *J Asthma Allergy*. 2010 Sep 29; 3: 139–47. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3047919/>
167. Hung IFN, Wong BCY. Assessing the risks and benefits of treating *Helicobacter pylori* infection. *Therap Adv Gastroenterol*. 2009 May; 2 (3): 141–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3002520/>
168. Kazor CE, Mitchell PM, Lee AM, Stokes LN, Loesche WJ, Dewhirst FE, et al. Diversity of bacterial populations on the tongue dorsa of patients with halitosis and healthy patients. *J Clin Microbiol*. 2003 Feb 5; 41 (2): 558–63. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC149706/>
169. Delgado S, Cabrera-Rubio R, Mira A, Suárez A, Mayo B. Microbiological survey of the human gastric ecosystem using culturing and pyrosequencing methods. *Microb Ecol*. 2013; 65 (3): 763–72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00248-013-0192-5>
170. Engstrand L, Lindberg M. *Helicobacter pylori* and the gastric microbiota. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*. 2016 Jun 6; 27 (1): 39–45. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bpg.2013.03.016>
171. Zilberstein B, Quintanilha AG, Santos MAA, Pajecki D, Moura EG, Alves PRA, et al. Digestive tract microbiota in healthy volunteers . Vol. 62, *Clinics . scielo* ; 2007. p. 47–54.
172. Vesper BJ, Jawdi A, Altman KW, III GKH, Radosevich LT and JA. The effect of proton pump inhibitors on the human microbiota. Vol. 10, *Current Drug Metabolism*. 2009. p. 84–9. Disponible en: <http://www.eurekaselect.com/node/68401/article>
173. Sanduleanu S, Jonkers D, De Bruine A, Hameeteman W, Stockbrügger RW. Non-*Helicobacter pylori* bacterial flora during acid-suppressive therapy: differential findings in gastric juice and gastric mucosa. *Aliment Pharmacol Ther*. 2001 Mar 6; 15 (3): 379–88. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2036.2001.00888.x>
174. Bik EM, Eckburg PB, Gill SR, Nelson KE, Purdom EA, Francois F, et al.

- Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 17; 103 (3): 732–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1334644/>
175. Tan MP, Kaparakis M, Galic M, Pedersen J, Pearse M, Wijburg OLC, et al. Chronic *Helicobacter pylori* infection does not significantly alter the microbiota of the murine stomach. *Appl Environ Microbiol*. 2007 Feb 1; 73 (3): 1010–3. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1800740/>
 176. Khosravi Y, Dieye Y, Poh BH, Ng CG, Loke MF, Goh KL, et al. Culturable bacterial microbiota of the stomach of *Helicobacter pylori* positive and negative gastric disease patients. *Sci World J*. 2014 Jul 3; 2014: 610421. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4106172/>
 177. Nardone G, Compare D. The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United Eur Gastroenterol J*. 2015 Jun 27; 3 (3): 255–60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4480535/>
 178. Helander HF, Fändriks L. Surface area of the digestive tract – revisited. *Scand J Gastroenterol*. 2014; 49 (6): 681–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3109/00365521.2014.898326>
 179. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *Lancet*. 2016 Jun 6; 361 (9356): 512–9. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12489-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12489-0)
 180. Jiménez E, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Olivares M, Xaus J, et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? *Res Microbiol*. 2008; 159 (3): 187–93. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923250808000028>
 181. Gosalbes MJ, Llop S, Vallès Y, Moya A, Ballester F, Francino MP. Meconium microbiota types dominated by lactic acid or enteric bacteria are differentially associated with maternal eczema and respiratory problems in infants. *Clin Exp Allergy*. 2013; 43 (2): 198–211. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1111/cea.12063>
 182. Jiménez E, Fernández L, Marín ML, Martín R, Odriozola JM, Nuño-Palop C, et al. Isolation of commensal bacteria from umbilical cord blood of healthy neonates born by Cesarean section. *Curr Microbiol*. 2005; 51 (4): 270–4. Disponible en: <http://link.springer.com/10.1007/s00284-005-0020-3>
 183. Funkhouser LJ, Bordenstein SR. Mom knows best: the universality of maternal microbial transmission. *PLoS Biol*. 2013; 11 (8): e1001631. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pbio.1001631>
 184. Cao B, Stout MJ, Lee I, Mysorekar IU. Placental microbiome and its role in preterm birth. *Neoreviews*. 2014; 15 (12): 537–45.
 185. Collado MC, Cernada M, Bäumler C, Vento M, Pérez-Martínez G. Microbial ecology and host-microbiota interactions during early life stages. *Gut Microbes*. 2012 Jul 1; 3 (4): 352–65. Disponible en:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3463493/>
186. Koren O, Goodrich JK, Cullender TC, Spor A, Laitinen K, Bäckhed HK, et al. Host remodeling of the gut microbiome and metabolic changes during pregnancy. *Cell*. 2012 Aug 3; 150(3): 470–80. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3505857/>
 187. Gohir W, Whelan FJ, Surette MG, Moore C, Schertzer JD, Sloboda DM. Pregnancy-related changes in the maternal gut microbiota are dependent upon the mother's periconceptual diet. *Gut Microbes*. 2015; 6 (5): 310–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1080/19490976.2015.1086056>
 188. Biasucci G, Benenati B, Morelli L, Bessi E, Boehm G. Cesarean delivery may affect the early biodiversity of intestinal bacteria. *J Nutr*. 2008 Sep 1; 138 (9): 1796S–1800S. Disponible en: <http://jn.nutrition.org/content/138/9/1796S.abstract>
 189. Dominguez-Bello MG, De Jesus-Laboy KM, Shen N, Cox LM, Amir A, Gonzalez A, et al. Partial restoration of the microbiota of cesarean-born infants via vaginal microbial transfer. *Nat Med*. 2016 Mar; 22 (3): 250–3. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.4039>
 190. 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. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2900693/>
 191. Neu J, Rushing J. Cesarean versus Vaginal Delivery: Long term infant outcomes and the Hygiene Hypothesis. *Clin Perinatol*. 2011 Jun; 38 (2): 321–31. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3110651/>
 192. Mueller NT, Bakacs E, Combellick J, Grigoryan Z, Dominguez-Bello MG. The infant microbiome development: mom matters. *Trends Mol Med*. 2015 Feb 11; 21 (2): 109–17. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4464665/>
 193. Molloy J, Allen K, Collier F, Tang MLK, Ward AC, Vuillermin P. The potential link between gut microbiota and IgE-mediated food allergy in early life. *Int J Environ Res Public Health*. 2013 Dec 16; 10(12): 7235–56. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3881164/>
 194. Martín R, Heilig HG, Zoetendal EG, Jiménez E, Fernández L, Smidt H, et al. Cultivation-independent assessment of the bacterial diversity of breast milk among healthy women. *Res Microbiol*. 2007 Jan; 158 (1): 31–7. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250806002476>
 195. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr*. 2016 Jun 6; 143 (6): 754–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpeds.2003.09.028>
 196. Solís G, de los Reyes-Gavilan CG, Fernández N, Margolles A, Gueimonde

- M. Establishment and development of lactic acid bacteria and bifidobacteria microbiota in breast-milk and the infant gut. *Anaerobe*. 2010 Jun; 16 (3): 307–10. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996410000235>
197. Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: natural, functional, and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr*. 2000 Jul 1; 20(1): 699–722. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.nutr.20.1.699>
198. Musilova S, Rada V, Vlkova E, Bunesova V. Beneficial effects of human milk oligosaccharides on gut microbiota. *Benef Microbes*. 2014 Jun 9; 5 (3): 273–83. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3920/BM2013.0080>
199. Chichlowski M, German JB, Lebrilla CB, Mills DA. The influence of milk oligosaccharides on microbiota of infants: opportunities for formulas. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2011 Feb 28; 2 (1): 331–51. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133743>
200. Marcobal A, Sonnenburg JL. Human milk oligosaccharide consumption by intestinal microbiota. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Jul; 18 (0 4): 12–5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3671919/>
201. 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. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3063592/>
202. Fallani M, Young D, Scott J, Norin E, Amarri S, Adam R, et al. Intestinal microbiota of 6-week-old infants across Europe: geographic influence beyond delivery mode, breast-feeding, and antibiotics. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010; 51 (1). Disponible en: http://journals.lww.com/jpgn/Fulltext/2010/07000/Intestinal_Microbiota_of_6_week_old_Infants_Across.15.aspx
203. Rodríguez JM, Murphy K, Stanton C, Ross RP, Kober OI, Juge N, et al. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb Ecol Health Dis*. 2015 Feb 2; 26: 10.3402/mehd.v26.26050. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4315782/>
204. Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*. 2007 Jun 26; 5 (7):e177. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pbio.0050177>
205. Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Aug 21; 104 (34): 13780–5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1959459/>
206. The Human Microbiome Project Consortium. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature*. 2012 Jun 14; 486 (7402): 207–14. Disponible en:

- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3564958/>
207. Martinez I, Muller CE, Walter J. Long-term temporal analysis of the human fecal microbiota revealed a stable core of dominant bacterial species. *PLoS One*. 2013 Jul 16; 8 (7):e69621. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0069621>
 208. Faith JJ, Guruge JL, Charbonneau M, Subramanian S, Seedorf H, Goodman AL, et al. The long-term stability of the human gut microbiota. *Science* (80-). 2013 Jul 4; 341 (6141). Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/341/6141/1237439.abstract>
 209. Donaldson GP, Lee SM, Mazmanian SK. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat Rev Micro*. 2016 Jan; 14 (1): 20–32. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3552>
 210. Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT, Allison C, Segal I, Vorster HH, et al. Alternative pathways for hydrogen disposal during fermentation in the human colon. *Gut*. 1990 Jun; 31 (6): 679–83. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1378495/>
 211. Canani RB, Costanzo M Di, Leone L, Pedata M, Meli R, Calignano A. Potential beneficial effects of butyrate in intestinal and extraintestinal diseases. *World J Gastroenterol*. 2011 Mar 28; 17 (12): 1519–28. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3070119/>
 212. Mariat D, Firmesse O, Levenez F, Guimarães VD, Sokol H, Doré J, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes ratio of the human microbiota changes with age. *BMC Microbiol*. 2009 Jun 9; 9: 123. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2702274/>
 213. Zwielehner J, Liszt K, Handschur M, Lassl C, Lapin A, Haslberger AG. Combined PCR-DGGE fingerprinting and quantitative-PCR indicates shifts in fecal population sizes and diversity of Bacteroides, bifidobacteria and Clostridium cluster IV in institutionalized elderly. *Exp Gerontol*. 2009 Jun; 44 (6–7): 440–6. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0531556509000795>
 214. Panda S, El khader I, Casellas F, López Vivancos J, García Cors M, Santiago A, et al. Short-term effect of antibiotics on human gut microbiota. Cotter PD, editor. *PLoS One*. 2014 Apr 18; 9 (4):e95476. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3991704/>
 215. Conlon MA, Bird AR. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients*. 2015 Jan 24; 7 (1): 17–44. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4303825/>
 216. Thaiss CA, Zeevi D, Levy M, Zilberman-Schapira G, Suez J, Tengeler AC, et al. Transkingdom control of microbiota diurnal oscillations promotes metabolic homeostasis. *Cell*. 2014; 159 (3): 514–29. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867414012367>
 217. Muto CA. Asymptomatic *Clostridium difficile* colonization: is this the tip of another iceberg? *Clin Infect Dis*. 2007 Oct 15; 45 (8): 999–1000. Disponible

- en: <http://cid.oxfordjournals.org/content/45/8/999.short>
218. Cornely OA, Miller MA, Louie TJ, Crook DW, Gorbach SL. Treatment of first recurrence of *Clostridium difficile* infection: fidaxomicin versus vancomycin. *Clin Infect Dis*. 2012 Aug 1; 55 (suppl 2):S154–61. Disponible en: http://cid.oxfordjournals.org/content/55/suppl_2/S154.abstract
 219. Pérez-Cobas AE, Artacho A, Ott SJ, Moya A, Gosalbes MJ, Latorre A. Structural and functional changes in the gut microbiota associated to *Clostridium difficile* infection. *Front Microbiol*. 2014 Jul 4; 5: 335. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4163665/>
 220. Eglow R, Pothoulakis C, Itzkowitz S, Israel EJ, O'Keane CJ, Gong D, et al. Diminished *Clostridium difficile* toxin A sensitivity in newborn rabbit ileum is associated with decreased toxin A receptor. *J Clin Invest*. 1992 Sep; 90(3): 822–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC329936/>
 221. Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, Magrini V, Mardis ER, Gordon JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. 2006 Dec 21; 444 (7122): 1027–131. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature05414>
 222. Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Cheng J, Duncan AE, Kau AL, et al. Cultured gut microbiota from twins discordant for obesity modulate adiposity and metabolic phenotypes in mice. *Science*. 2013 Sep 6; 341 (6150): 10.1126/science.1241214. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3829625/>
 223. Moreno-Indias I, Cardona F, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Impact of the gut microbiota on the development of obesity and type 2 diabetes mellitus. *Front Microbiol*. 2014 Apr 29; 5: 190. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4010744/>
 224. Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI. Microbial ecology: Human gut microbes associated with obesity. *Nature*. 2006 Dec 21; 444 (7122): 1022–3. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/4441022a>
 225. Seibold F. ASCA: genetic marker, predictor of disease, or marker of a response to an environmental antigen? *Gut*. 2005 Sep; 54 (9): 1212–3. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1774663/>
 226. Rowan FE, Docherty NG, Coffey JC, O'Connell PR. Sulphate-reducing bacteria and hydrogen sulphide in the aetiology of ulcerative colitis. *Br J Surg*. 2009 Feb 1; 96 (2): 151–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/bjs.6454>
 227. Gagnière J, Raisch J, Veziat J, Barnich N, Bonnet R, Buc E, et al. Gut microbiota imbalance and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2016 Jan 14; 22 (2): 501–18. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4716055/>
 228. West CE, Jenmalm MC, Prescott SL. The gut microbiota and its role in the development of allergic disease: a wider perspective. *Clin Exp Allergy*.

- 2015; 45 (1): 43–53. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/cea.12332>
229. Fujimura KE, Lynch S V. Microbiota in allergy and asthma and the emerging relationship with the gut microbiome. *Cell Host Microbe*. 2015 May 13; 17 (5): 592–602. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4443817/>
230. Candela M, Rampelli S, Turrone S, Severgnini M, Consolandi C, De Bellis G, et al. Unbalance of intestinal microbiota in atopic children. *BMC Microbiol*. 2012; 12 (1): 1–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-95>
231. Hui AW-H, Lau H-W, Chan TH-T, Tsui SK-W. The human microbiota: a new direction in the investigation of thoracic diseases. *J Thorac Dis*. 2013 Aug 29; 5 (Suppl 2):S127–31. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3747530/>
232. Li L, Somerset S. The clinical significance of the gut microbiota in cystic fibrosis and the potential for dietary therapies. *Clin Nutr*. 2014 Aug; 33 (4): 571–80. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261561414000946>
233. Solt I, Cohavy O. The great obstetrical syndromes and the human microbiome—A new frontier. *Rambam Maimonides Med J*. 2012 Apr 30; 3 (2):e0009. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3678810/>
234. Panda S, Das A, Singh AS, Pala S. Vaginal pH: A marker for menopause. *J Midlife Health*. 2014; 5 (1): 34–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3955044/>
235. Klebanoff SJ, Hillier SL, Eschenbach DA, Waltersdorff AM. Control of the microbial flora of the vagina by H2O2-generating lactobacilli. *J Infect Dis*. 1991 Jul 1; 164 (1): 94–100. Disponible en: <http://jid.oxfordjournals.org/content/164/1/94.abstract>
236. Aagaard K, Riehle K, Ma J, Segata N, Mistretta T-A, Coarfa C, et al. A metagenomic approach to characterization of the vaginal microbiome signature in pregnancy. *PLoS One*. 2012 Jun 13; 7 (6):e36466. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0036466>
237. Petricevic L, Domig KJ, Nierscher FJ, Krondorfer I, Janitschek C, Kneifel W, et al. Characterisation of the oral, vaginal and rectal *Lactobacillus* flora in healthy pregnant and postmenopausal women. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2016 Jun 5; 160(1): 93–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejogrb.2011.10.002>
238. Romero R, Hassan SS, Gajer P, Tarca AL, Fadrosh DW, Nikita L, et al. The composition and stability of the vaginal microbiota of normal pregnant women is different from that of non-pregnant women. *Microbiome*. 2014 Feb 3; 2: 4. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3916806/>
239. DiGiulio DB, Callahan BJ, McMurdie PJ, Costello EK, Lyell DJ,

- Robaczewska A, et al. Temporal and spatial variation of the human microbiota during pregnancy. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015 Sep 1; 112 (35): 11060–5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4568272/>
240. Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014 May 21; 6 (237): 237ra65-237ra65. Disponible en: <http://stm.sciencemag.org/content/6/237/237ra65.abstract>
241. Ness RB, Hillier S, Richter HE, Soper DE, Stamm C, Bass DC, et al. Can known risk factors explain racial differences in the occurrence of bacterial vaginosis? *J Natl Med Assoc*. 2003 Mar; 95 (3): 201–12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2594421/>
242. Marchaim D, Lemanek L, Bheemreddy S, Kaye KS, Sobel JD. Fluconazole-resistant *Candida albicans* vulvovaginitis. *Obstet Gynecol*. 2012; 120(6). Disponible en: http://journals.lww.com/greenjournal/Fulltext/2012/12000/Fluconazole_Resistant_Candida_albicans.22.aspx
243. Morris M, Nicoll A, Simms I, Wilson J, Catchpole M. Bacterial vaginosis: a public health review. *BJOG An Int J Obstet Gynaecol*. 2001 May 1; 108 (5): 439–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1471-0528.2001.00124.x>
244. Shipitsyna E, Roos A, Datcu R, Hallen A, Fredlund H, Jensen JS, et al. Composition of the vaginal microbiota in women of reproductive age - sensitive and specific molecular diagnosis of bacterial vaginosis is possible? *PLoS One*. 2013 Apr 9; 8 (4):e60670. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0060670>
245. Macklaim JM, Fernandes AD, Di Bella JM, Hammond J-A, Reid G, Gloor GB. Comparative meta-RNA-seq of the vaginal microbiota and differential expression by *Lactobacillus iners* in health and dysbiosis. *Microbiome*. 2013 Apr 12; 1: 12. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3971606/>
246. Jespers V, Menten J, Smet H, Poradosú S, Abdellati S, Verhelst R, et al. Quantification of bacterial species of the vaginal microbiome in different groups of women, using nucleic acid amplification tests. *BMC Microbiol*. 2012; 12 (1): 1–10. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-12-83>
247. Pepin J, Deslandes S, Giroux G, Sobela F, Khonde N, Diakite S, et al. The complex vaginal flora of West African women with bacterial vaginosis. *PLoS One*. 2011 Sep 20; 6 (9):e25082. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0025082>
248. Brubaker L, Wolfe AJ. The new world of the urinary microbiota in women. *Am J Obstet Gynecol*. 2016 Jun 5; 213 (5): 644–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajog.2015.05.032>
249. Dong Q, Nelson DE, Toh E, Diao L, Gao X, Fortenberry JD, et al. The microbial communities in male first catch urine are highly similar to those

- in paired urethral swab specimens. *PLoS One*. 2011 May 13; 6 (5):e19709. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0019709>
250. Stamm WE, Counts GW, Running KR, Fihn S, Turck M, Holmes KK. Diagnosis of coliform infection in acutely dysuric women. *N Engl J Med*. 1982 Aug 19; 307 (8): 463–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198208193070802>
251. Hooton TM, Roberts PL, Cox ME, Stapleton AE. Voided midstream urine culture and acute cystitis in premenopausal women. *N Engl J Med*. 2013 Nov 13; 369 (20): 1883–91. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1302186>
252. Maskell RM. The natural history of urinary tract infection in women. *Med Hypotheses*. 2016 Jun 5; 74 (5): 802–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2009.12.011>
253. Beyene G, Tsegaye W. Bacterial uropathogens in urinary tract infection and antibiotic susceptibility pattern in Jimma University specialized hospital, Southwest Ethiopia. *Ethiop J Health Sci*. 2011 Jul; 21 (2): 141–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3275859/>
254. Singhal A, Sharma R, Jain M, Vyas L. Hospital and community isolates of uropathogens and their antibiotic sensitivity pattern from a tertiary care hospital in North West India. *Ann Med Health Sci Res*. 2014; 4 (1): 51–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3952297/>
255. Whiteside SA, Razvi H, Dave S, Reid G, Burton JP. The microbiome of the urinary tract - a role beyond infection. *Nat Rev Urol*. 2015 Feb; 12 (2): 81–90. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrur.2014.361>
256. Lewis DA, Brown R, Williams J, White P, Jacobson SK, Marchesi JR, et al. The human urinary microbiome; bacterial DNA in voided urine of asymptomatic adults. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013 Aug 15; 3: 41. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3744036/>
257. Nelson DE, Dong Q, Van Der Pol B, Toh E, Fan B, Katz BP, et al. Bacterial communities of the coronal sulcus and distal urethra of adolescent males. *PLoS One*. 2012 May 11; 7 (5):e36298. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0036298>
258. Wolfe AJ, Toh E, Shibata N, Rong R, Kenton K, FitzGerald M, et al. Evidence of uncultivated bacteria in the adult female bladder. *J Clin Microbiol*. 2012 Apr 16; 50(4): 1376–83. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3318548/>
259. Nienhouse V, Gao X, Dong Q, Nelson DE, Toh E, McKinley K, et al. Interplay between bladder microbiota and urinary antimicrobial peptides: mechanisms for human urinary tract infection risk and symptom severity. *PLoS One*. 2014 Dec 8; 9 (12):e114185. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0114185>
260. Fouts DE, Pieper R, Szpakowski S, Pohl H, Knoblauch S, Suh M-J, et al. Integrated next-generation sequencing of 16S rDNA and metaproteomics

- differentiate the healthy urine microbiome from asymptomatic bacteriuria in neuropathic bladder associated with spinal cord injury. *J Transl Med.* 2012 Aug 28; 10: 174. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3511201/>
261. Stamm WE, Norrby SR. Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *J Infect Dis.* 2001 Mar 1; 183 (Supplement 1):S1–4. Disponible en: http://jid.oxfordjournals.org/content/183/Supplement_1/S1.short
262. Foxman B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect Dis Clin North Am.* 2014 Mar; 28 (1): 1–13. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0891552013000743>
263. Foxman B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat Rev Urol.* 2010 Dec; 7 (12): 653–60. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrurol.2010.190>
264. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015 May 8; 13 (5): 269–84. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4457377/>
265. Nosseir SB, Lind LR, Winkler HA. Recurrent uncomplicated urinary tract infections in women: a review. *J Women's Heal.* 2011 Dec 2; 21 (3): 347–54. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1089/jwh.2011.3056>
266. Kirjavainen P V, Pautler S, Baroja ML, Anukam K, Crowley K, Carter K, et al. Abnormal immunological profile and vaginal microbiota in women prone to urinary tract infections. *Clin Vaccine Immunol.* 2009 Jan 1; 16 (1): 29–36. Disponible en: <http://cvi.asm.org/content/16/1/29.abstract>
267. Horwitz D, McCue T, Mapes AC, Ajami NJ, Petrosino JF, Ramig RF, et al. Decreased microbiota diversity associated with urinary tract infection in a trial of bacterial interference. *J Infect.* 2016 Jun 5; 71 (3): 358–67. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinf.2015.05.014>
268. Leider M, Tanenbaum D. Letters to the Editor. *J Invest Dermatol.* 1969 Apr; 52 (4): 313–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/jid.1969.50>
269. Decréau RA, Marson CM, Smith KE, Behan JM. Production of malodorous steroids from androsta-5,16-dienes and androsta-4,16-dienes by *Corynebacteria* and other human axillary bacteria. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Dec [cited 2015 Nov 16]; 87 (4–5): 327–36. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960076003004187>
270. Emter R, Natsch A. The sequential action of a dipeptidase and a β -lyase is required for the release of the human body odorant 3-methyl-3-sulfanylhexasan-1-ol from a secreted Cys-Gly-(S) conjugate by *Corynebacteria*. *J Biol Chem.* 2008 Jul 25; 283 (30): 20645–52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3258934/>
271. Natsch A, Gfeller H, Gygax P, Schmid J, Acuna G. A specific bacterial aminoacylase cleaves odorant precursors secreted in the human axilla. *J Biol Chem.* 2003 Feb 21; 278 (8): 5718–27. Disponible en:

- <http://www.jbc.org/content/278/8/5718.abstract>
272. Hulcr J, Latimer AM, Henley JB, Rountree NR, Fierer N, Lucky A, et al. A jungle in there: bacteria in belly buttons are highly diverse, but predictable. Moreau CS, editor. *PLoS One*. 2012 Nov 7; 7 (11):e47712. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3492386/>
273. Grice EA, Segre JA. The skin microbiome. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Apr; 9 (4): 244–53. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3535073/>
274. Baviera G, Leoni MC, Capra L, Cipriani F, Longo G, Maiello N, et al. Microbiota in healthy skin and in atopic eczema. *Biomed Res Int*. 2014; 2014: 1–6. Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/bmri/2014/436921/>
275. Chen YE, Tsao H. The skin microbiome: current perspectives and future challenges. *J Am Acad Dermatol*. 2013 Jul 13; 69 (1): 143–155.e3. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3686918/>
276. Gao Z, Perez-Perez GI, Chen Y, Blaser MJ. Quantitation of major human cutaneous bacterial and fungal populations. *J Clin Microbiol*. 2010 Oct 11; 48 (10): 3575–81. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2953113/>
277. Shuster S. The ecology of the human skin. *Proc R Soc Med*. 1965 Aug; 58 (8): 653. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1898857/>
278. Roth RR, James WD. Microbial Ecology of the Skin. *Annu Rev Microbiol*. 1988 Oct 1; 42 (1): 441–64. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.mi.42.100188.002301>
279. Peleg AY, Hogan DA, Mylonakis E. Medically important bacterial–fungal interactions. *Nat Rev Micro*. 2010 Mar 29; 8 (5): 340–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2313>
280. Chiller K, Selkin BA, Murakawa GJ. Skin microflora and bacterial infections of the skin. *J Investig Dermatol Symp Proc*. 2001 Dec; 6 (3): 170–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.00043.x>
281. Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*. 2009 May 29; 324 (5931): 1190–2. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2805064/>
282. Gao Z, Tseng C, Pei Z, Blaser MJ. Molecular analysis of human forearm superficial skin bacterial biota. *Proc Natl Acad Sci*. 2007 Feb 20; 104 (8): 2927–32. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/104/8/2927.abstract>
283. Costello EK, Lauber CL, Hamady M, Fierer N, Gordon JL, Knight R. Bacterial community variation in human body habitats across space and time. *Science*. 2009 Dec 18; 326 (5960): 1694–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3602444/>

284. Leeming JP, Holland KT, Cunliffe WJ. The microbial ecology of pilosebaceous units isolated from human skin. *J Gen Microbiol.* 1984; 130(4): 803–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6234376>
285. Capone KA, Dowd SE, Stamatias GN, Nikolovski J. Diversity of the human skin microbiome early in life. *J Invest Dermatol.* 2011 Oct 23; 131 (10): 2026–32. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3182836/>
286. Fierer N, Hamady M, Lauber CL, Knight R. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Nov 18; 105 (46): 17994–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2584711/>
287. Giacomoni PU, Mammone T, Teri M. Gender-linked differences in human skin. *J Dermatol Sci.* 2015 Nov 16; 55 (3): 144–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdermsci.2009.06.001>
288. Marples R. Sex, constancy, and skin bacteria. *Arch Dermatol Res.* 1982; 272 (3–4): 317–20. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/BF00509062>
289. Marples RR, Downing DT, Kligman AM. Control of free fatty acids in human surface lipids by *Corynebacterium acnes*. *J Invest Dermatol.* 1971 Feb; 56 (2): 127–31. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/1523-1747.ep12260695>
290. Cogen AL, Yamasaki K, Sanchez KM, Dorschner RA, Lai Y, MacLeod DT, et al. Selective antimicrobial action is provided by phenol-soluble modulins derived from *Staphylococcus epidermidis*, a normal resident of the skin. *J Invest Dermatol.* 2010 Jan; 130(1): 192–200. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2796468/>
291. Cordain L, Lindeberg S, Hurtado M, Hill K, Eaton S, Brand-Miller J. Acne vulgaris: A disease of western civilization. *Arch Dermatol.* 2002 Dec 1; 138 (12): 1584–90. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.138.12.1584>
292. Dessinioti C, Katsambas AD. The role of *Propionibacterium acnes* in acne pathogenesis: facts and controversies. *Clin Dermatol.* 2010 Jan [cited 2015 Nov 17]; 28 (1): 2–7. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0738081X09000583>
293. Numata S, Akamatsu H, Akaza N, Yagami A, Nakata S, Matsunaga K. Analysis of facial skin-resident microbiota in Japanese acne patients. *Dermatology.* 2014; 228 (1): 86–92. Disponible en: <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000356777>
294. Bek-Thomsen M, Lomholt HB, Kilian M. Acne is not associated with yet-uncultured bacteria. *J Clin Microbiol.* 2008 Oct 20; 46 (10): 3355–60. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2566126/>
295. Hanifin J, Rogge J. Staphylococcal infections in patients with atopic dermatitis. *Arch Dermatol.* 1977 Oct 1; 113 (10): 1383–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1001/archderm.1977.01640100061009>

296. Leyden JJ, Marples RR, Kligman AM. Staphylococcus aureus in the lesions of atopic dermatitis. *Br J Dermatol.* 1974 May 1; 90(5): 525. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2133.1974.tb06447.x>
297. Kong HH, Oh J, Deming C, Conlan S, Grice EA, Beatson MA, et al. Temporal shifts in the skin microbiome associated with disease flares and treatment in children with atopic dermatitis. *Genome Res.* 2012 May 23; 22(5): 850–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3337431/>
298. Gleeson K, Maxwell SL, Eggli DF. Quantitative aspiration during sleep in normal subjects. *Chest.* 1997 May; 111 (5): 1266–72. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0012369215469594>
299. Pasteur L. Expériences relatives aux générations dites spontanées. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences D: Sciences Naturelles.* 1860. 303-307 p.
300. Hilty M, Burke C, Pedro H, Cardenas P, Bush A, Bossley C, et al. Disordered microbial communities in asthmatic airways. *PLoS One.* 2010 Jan 5; 5 (1):e8578. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0008578>
301. Dickson RP, Huffnagle GB. The lung microbiome: new principles for respiratory bacteriology in health and disease. Goldman WE, editor. *PLoS Pathog.* 2015 Jul 9; 11 (7):e1004923. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4497592/>
302. Ingenito EP, Solway J, McFadden ER, Pichurko B, Bowman HF, Michaels D, et al. Indirect assessment of mucosal surface temperatures in the airways: theory and tests. *J Appl Physiol.* 1987 Nov 1; 63 (5): 2075–83. Disponible en: <http://jap.physiology.org/content/63/5/2075.abstract>
303. Wu H, Kuzmenko A, Wan S, Schaffer L, Weiss A, Fisher JH, et al. Surfactant proteins A and D inhibit the growth of Gram-negative bacteria by increasing membrane permeability. *J Clin Invest.* 2003 May 15; 111 (10): 1589–602. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC155045/>
304. Lighthart B. Mini-review of the concentration variations found in the alfresco atmospheric bacterial populations. *Aerobiologia (Bologna).* 2000; 16 (1): 7–16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1023/A:1007694618888>
305. Morris A, Beck JM, Schloss PD, Campbell TB, Crothers K, Curtis JL, et al. Comparison of the respiratory microbiome in healthy nonsmokers and smokers. *Am J Respir Crit Care Med.* 2013 May 15; 187 (10): 1067–75. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3734620/>
306. Bassis CM, Erb-Downward JR, Dickson RP, Freeman CM, Schmidt TM, Young VB, et al. Analysis of the upper respiratory tract microbiotas as the source of the lung and gastric microbiotas in healthy individuals. *MBio.* 2015 May 1; 6 (2). Disponible en: <http://mbio.asm.org/content/6/2/e00037-15.abstract>

307. Venkataraman A, Bassis CM, Beck JM, Young VB, Curtis JL, Huffnagle GB, et al. Application of a neutral community model to assess structuring of the human lung microbiome. *MBio*. 2015 Feb 27; 6 (1). Disponible en: <http://mbio.asm.org/content/6/1/e02284-14.abstract>
308. Yi H, Yong D, Lee K, Cho Y-J, Chun J. Profiling bacterial community in upper respiratory tracts. *BMC Infect Dis*. 2014 Nov 13; 14: 583. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4236460/>
309. Biesbroek G, Tsvitivadze E, Sanders EAM, Montijn R, Veenhoven RH, Keijser BJF, et al. Early respiratory microbiota composition determines bacterial succession patterns and respiratory health in children. *Am J Respir Crit Care Med*. 2014 Oct 20; 190(11): 1283–92. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1164/rccm.201407-1240OC>
310. Kane M, Case LK, Kopaskie K, Kozlova A, MacDermid C, Chervonsky A V, et al. Successful transmission of a retrovirus depends on the commensal microbiota. *Science*. 2011 Oct 14; 334 (6053): 245–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3519937/>
311. Bosch AATM, Biesbroek G, Trzcinski K, Sanders EAM, Bogaert D. Viral and bacterial interactions in the upper respiratory tract. *PLoS Pathog*. 2013 Jan 10; 9 (1):e1003057. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.ppat.1003057>
312. de Steenhuijsen Piters WAA, Huijskens EGW, Wyllie AL, Biesbroek G, van den Bergh MR, Veenhoven RH, et al. Dysbiosis of upper respiratory tract microbiota in elderly pneumonia patients. *ISME J*. 2016 Jan; 10(1): 97–108. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ismej.2015.99>
313. Vos T, Barber RM, Bell B, Bertozzi-Villa A, Biryukov S, Bolliger I, et al. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990–2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2016 Jun 6; 386 (9995): 743–800. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)60692-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(15)60692-4)
314. Huffnagle GB. The microbiota and allergies/asthma. Madhani HD, editor. *PLoS Pathog*. 2010 May 27; 6 (5):e1000549. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2877736/>
315. Marri PR, Stern DA, Wright AL, Billheimer D, Martinez FD. Asthma-associated differences in microbial composition of induced sputum. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Feb 23; 131 (2): 343–6. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4403876/>
316. Decramer M, Janssens W, Miravittles M. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet*. 2016 Jun 6; 379 (9823): 1341–51. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60968-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60968-9)
317. Kumar V, Abbas A, Aster J. *Pathological basis of disease*. 8th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2009. 683–688 p.
318. Sze MA, Dimitriu PA, Hayashi S, Elliott WM, McDonough JE, Gosselink J

- V, et al. The lung tissue microbiome in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012 May 15; 185 (10): 1073–80. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3359894/>
319. Coburn B, Wang PW, Diaz Caballero J, Clark ST, Brahma V, Donaldson S, et al. Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis. *Sci Rep*. 2015 May 14; 5: 10241. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4431465/>
320. Surette MG. The cystic fibrosis lung microbiome. *Ann Am Thorac Soc*. 2014 Jan 1; 11 (Supplement 1):S61–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1513/AnnalsATS.201306-159MG>
321. Gordon JL, Hooper LV, McNevin MS, Wong M, Bry L. Epithelial cell growth and differentiation. III. Promoting diversity in the intestine: conversations between the microflora, epithelium, and diffuse GALT. *Am J Physiol - Gastrointest Liver Physiol*. 1997 Sep 1; 273 (3):G565–70. Disponible en: <http://ajpgi.physiology.org/content/273/3/G565.abstract>
322. Rawls JF, Samuel BS, Gordon JL. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Mar 30; 101 (13): 4596–601. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC384792/>
323. Lee YK, Mazmanian SK. Has the microbiota played a critical role in the evolution of the adaptive immune system? *Science* (80-). 2010; 330. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1195568>
324. Deplancke B, Gaskins HR. Microbial modulation of innate defense: goblet cells and the intestinal mucus layer. *Am J Clin Nutr* . 2001 Jun 1; 73 (6): 1131S–1141S. Disponible en: <http://ajcn.nutrition.org/content/73/6/1131S.abstract>
325. Smith K, McCoy KD, Macpherson AJ. Use of axenic animals in studying the adaptation of mammals to their commensal intestinal microbiota. *Semin Immunol*. 2007; 19 (2): 59–69. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1044532306001199>
326. Mazmanian SK, Liu CH, Tzianabos AO, Kasper DL. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*. 2016 Jun 7; 122 (1): 107–18. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.007>
327. Strauch UG, Obermeier F, Grunwald N, Gürster S, Dunger N, Schultz M, et al. Influence of intestinal bacteria on induction of regulatory T cells: lessons from a transfer model of colitis. *Gut*. 2005 Nov 8; 54 (11): 1546–52. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1774752/>
328. Ivanov II, Frutos RDL, Manel N, Yoshinaga K, Rifkin DB, Sartor RB, et al. Specific microbiota direct the differentiation of IL-17-producing T-helper cells in the mucosa of the small intestine. *Cell Host Microbe*. 2008; 4 (4): 337–49.
329. Pabst O. New concepts in the generation and functions of IgA. *Nat Rev*

- Immunol. 2012 Dec; 12 (12): 821–32. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1038/nri3322>
330. Neufeld KM, Kang N, Bienenstock J, Foster JA. Reduced anxiety-like behavior and central neurochemical change in germ-free mice. *Neurogastroenterol Motil.* 2011; 23 (3): 255–e119. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2982.2010.01620.x>
331. Borre YE, O’Keefe GW, Clarke G, Stanton C, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota and neurodevelopmental windows: implications for brain disorders. *Trends Mol Med.* 2016 Jun 7; 20(9): 509–18. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2014.05.002>
332. Rooks MG, Garrett WS. Gut microbiota, metabolites and host immunity. *Nat Rev Immunol.* 2016 Jun; 16 (6): 341–52. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1038/nri.2016.42>
333. Carabotti M, Scirocco A, Maselli MA, Severi C. The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems. *Ann Gastroenterol Q Publ Hell Soc Gastroenterol.* 2015 Sep 5; 28 (2): 203–9. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4367209/>
334. Mayer EA, Tillisch K, Gupta A. Gut/brain axis and the microbiota. *J Clin Invest.* 2015; 125 (3): 926–38. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1172/JCI76304>
335. Sudo N, Chida Y, Aiba Y, Sonoda J, Oyama N, Yu X-N, et al. Postnatal microbial colonization programs the hypothalamic–pituitary–adrenal system for stress response in mice. *J Physiol.* 2004 Jul 1; 558 (Pt 1): 263–75. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1664925/>
336. Bravo JA, Forsythe P, Chew M V, Escaravage E, Savignac HM, Dinan TG, et al. Ingestion of *Lactobacillus* strain regulates emotional behavior and central GABA receptor expression in a mouse via the vagus nerve. *Proc Natl Acad Sci.* 2011 Sep 20; 108 (38): 16050–5. Disponible en:
<http://www.pnas.org/content/108/38/16050.abstract>
337. Xu F, Yan S, Li F, Cai M, Chai W, Wu M, et al. Prevalence of childhood atopic dermatitis: an urban and rural community-based study in Shanghai, China. Amre D, editor. *PLoS One.* 2012 May 1; 7 (5):e36174. Disponible en:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3341360/>
338. Pelucchi C, Galeone C, Bach J-F, La Vecchia C, Chatenoud L. Pet exposure and risk of atopic dermatitis at the pediatric age: A meta-analysis of birth cohort studies. *J Allergy Clin Immunol.* 2016 Jun 7; 132 (3): 616–622.e7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.009>
339. Dom S, Droste JHJ, Sariachvili MA, Hagedorens MM, Oostveen E, Bridts CH, et al. Pre- and post-natal exposure to antibiotics and the development of eczema, recurrent wheezing and atopic sensitization in children up to the age of 4 years. *Clin Exp Allergy.* 2010; 40(9): 1378–87. Disponible en:
<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2222.2010.03538.x>

340. Weber AS, Haidinger G. The prevalence of atopic dermatitis in children is influenced by their parents' education: results of two cross-sectional studies conducted in Upper Austria. *Pediatr Allergy Immunol.* 2010; 21 (7): 1028–35. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1399-3038.2010.01030.x>
341. Hesselmar B, Hicke-Roberts A, Wennergren G. Allergy in children in hand versus machine dishwashing. *Pediatrics.* 2015; 135 (3):e590–7. Disponible en: <http://pediatrics.aappublications.org/cgi/doi/10.1542/peds.2014-2968>
342. Toh MC, Allen-Vercoe E. The human gut microbiota with reference to autism spectrum disorder: considering the whole as more than a sum of its parts. *Microb Ecol Health Dis.* 2015 Jan 28; 26: 10.3402/mehd.v26.26309. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4310852/>
343. Son JS, Zheng LJ, Rowehl LM, Tian X, Zhang Y, Zhu W, et al. Comparison of fecal microbiota in children with Autism Spectrum Disorders and neurotypical siblings in the Simons Simplex Collection. *PLoS One.* 2015 Oct 1; 10(10):e0137725. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0137725>
344. Dash S, Clarke G, Berk M, Jacka FN. The gut microbiome and diet in psychiatry: focus on depression. *Curr Opin Psychiatry.* 2015; 28 (1). Disponible en: http://journals.lww.com/psychiatry/Fulltext/2015/01000/The_gut_microbiome_and_diet_in_psy psychiatry___focus.2.aspx
345. Sonnenburg J, Sonnenburg E. *The good gut: Taking control of your weight, your mood and your long-term health.* First edit. New York, NY: Penguin Press; 2015. 301 p.
346. Adler CJ, Dobney K, Weyrich LS, Kaidonis J, Walker AW, Haak W, et al. Sequencing ancient calcified dental plaque shows changes in oral microbiota with dietary shifts of the Neolithic and Industrial revolutions. *Nat Genet.* 2013 Apr; 45 (4): 450–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2536>
347. Santiago-Rodriguez TM, Fornaciari G, Luciani S, Dowd SE, Toranzos GA, Marota I, et al. Gut microbiome of an 11th Century A.D. pre-Columbian Andean mummy. *PLoS One.* 2015; 10(9):e0138135. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0138135>
348. Schnorr SL. The diverse microbiome of the hunter-gatherer. *Nature.* 2015 Feb 26; 518 (7540):S14–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/518S14a>
349. Clemente JC, Pehrsson EC, Blaser MJ, Sandhu K, Gao Z, Wang B, et al. The microbiome of uncontacted Amerindians. *Sci Adv.* 2015 Apr 17; 1 (3). Disponible en: <http://advances.sciencemag.org/content/1/3/e1500183.abstract>
350. Martínez I, Stegen JC, Maldonado-Gómez MX, Eren AM, Siba PM, Greenhill AR, et al. The gut microbiota of rural Papua New Guineans: composition, diversity patterns, and ecological processes. *Cell Rep.* 2015 Nov 16; 11 (4): 527–38. Disponible en:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.049>
351. Boethius A. Something rotten in Scandinavia: The world's earliest evidence of fermentation. *J Archaeol Sci*. 2016 Feb; 66: 169–80. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305440316000170>
 352. Metchnikoff E. *The prolongation of life: optimistic studies*. First edit. London: Heinemann; 1907.
 353. Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol*. 1998 Feb 17; 39 (3): 237–8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160597001360>
 354. Roberfroid M. Prebiotics: the concept revisited. *J Nutr*. 2007 Mar 1; 137 (3): 830S–837S. Disponible en: <http://jn.nutrition.org/content/137/3/830S.abstract>
 355. Koch R. *Die Aetiologie der Tuberkulose*. Mittheilungen aus dem Kaiserlichen Gesundheitssamte. First edit. 1884. 1-88 p.
 356. Aminov RI. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Front Microbiol*. 2010; 1 (DEC): 1–7.
 357. Abraham E, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940; 146 (837).
 358. European Centre for Disease Prevention and Control/European Medicines Agency Joint Working Group. *The bacterial challenge: time to react*. 2009.
 359. Laxminarayan R, Malani A. *Extending the cure: Policy responses to the growing threat of antibiotic resistance*. Washington DC; 2007.
 360. World Health Organization. *The top 10 causes of death*. 2014. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>
 361. Bongaerts GPA, Severijnen RSVM. A reassessment of the PROPATRIA study and its implications for probiotic therapy. *Nat Biotech*. 2016 Jan; 34 (1): 55–63. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3436>
 362. Li J, Sung CYJ, Lee N, Ni Y, Pihlajamäki J, Panagiotou G, et al. Probiotics modulated gut microbiota suppresses hepatocellular carcinoma growth in mice. *Proc Natl Acad Sci*. 2016 Mar 1; 113 (9):E1306–15. Disponible en: <http://www.pnas.org/content/113/9/E1306.abstract>
 363. Woo TDH, Oka K, Takahashi M, Hojo F, Osaki T, Hanawa T, et al. Inhibition of the cytotoxic effect of *Clostridium difficile* in vitro by *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588 strain. *J Med Microbiol*. 2011; 60(11): 1617–25. Disponible en: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/jmm.0.033423-0>
 364. Hayashi A, Sato T, Kamada N, Mikami Y, Matsuoka K, Hisamatsu T, et al. A single strain of *Clostridium butyricum* induces intestinal IL-10-producing macrophages to suppress acute experimental colitis in mice. *Cell Host Microbe*. 2016 Jun 6; 13 (6): 711–22. Disponible en:

- <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2013.05.013>
365. Kanai T, Mikami Y, Hayashi A. A breakthrough in probiotics: *Clostridium butyricum* regulates gut homeostasis and anti-inflammatory response in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol*. 2015; 50(9): 928–39. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1007/s00535-015-1084-x>
366. Isa K, Oka K, Beauchamp N, Sato M, Wada K, Ohtani K, et al. Safety assessment of the *Clostridium butyricum* MIYAIRI 588® probiotic strain including evaluation of antimicrobial sensitivity and presence of *Clostridium* toxin genes in vitro and teratogenicity in vivo. *Hum Exp Toxicol*. 2015 Oct 5; Disponible en: <http://het.sagepub.com/content/early/2015/09/23/0960327115607372.abstract>
367. Hemmerling A, Harrison W, Schroeder A, Park J, Korn A, Shiboski S, et al. Phase 2a study assessing colonization efficiency, safety, and acceptability of *Lactobacillus crispatus* CTV-05 in women with bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis*. 2010; 37 (12). Disponible en: http://journals.lww.com/stdjournal/Fulltext/2010/12000/Phase_2a_Study_Assessing_Colonization_Efficiency.3.aspx
368. Stapleton AE, Au-Yeung M, Hooton TM, Fredricks DN, Roberts PL, Czaja CA, et al. Randomized, placebo-controlled phase 2 trial of a *Lactobacillus crispatus* probiotic given intravaginally for prevention of recurrent urinary tract infection. *Clin Infect Dis An Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2011 May 15; 52 (10): 1212–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3079401/>
369. Czaja CA, Stapleton AE, Yarova-Yarovaya Y, Stamm WE. Phase I trial of a *Lactobacillus crispatus* vaginal suppository for prevention of recurrent urinary tract infection in women. *Infect Dis Obstet Gynecol*. 2007 Nov 26; 2007: 35387. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2216064/>
370. Hemmerling A, Harrison W, Schroeder A, Park J, Korn A, Shiboski S, et al. Phase 1 dose-ranging safety trial of *Lactobacillus crispatus* CTV-05 (LACTIN-V) for the prevention of bacterial vaginosis. *Sex Transm Dis*. 2009 Sep; 36 (9): 564–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2758081/>
371. Kelly C, Alm EJ. How to regulate faecal transplants. : 5–6.
372. Zhang F, Luo W, Shi Y, Fan Z, Ji G. Should We Standardize the 1,700-Year-Old Fecal Microbiota Transplantation? *Am J Gastroenterol*. 2012 Nov; 107 (11): 1755. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2012.251>
373. Borody TJ, Warren EF, Leis SM, Surace R, Ashman O, Siarakas S. Bacteriotherapy Using Fecal Flora: Toying With Human Motions. *J Clin Gastroenterol*. 2004; 38 (6). Disponible en: http://journals.lww.com/jcge/Fulltext/2004/07000/Bacteriotherapy_Using_Fecal_Flora__Toying_With.3.aspx
374. Pouden WD, Hibbs JW. The development of calves raised without

- protozoa and certain other characteristic rumen microorganisms. *J Dairy Sci.* 2016 Jun 6; 33 (9): 639–44. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(50\)91948-5](http://dx.doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(50)91948-5)
375. Eiseman B, Silen W, Bascom G, Kauvar A. Fecal enema as an adjunct in the enterocolitis. *Surgery.* 1958; 44: 854–9.
376. Gough E, Shaikh H, Manges AR. Systematic review of intestinal microbiota transplantation (fecal bacteriotherapy) for recurrent *Clostridium difficile* infection. *Clin Infect Dis.* 2011 Nov 15; 53 (10): 994–1002. Disponible en: <http://cid.oxfordjournals.org/content/53/10/994.abstract>
377. de Vos WM. Fame and future of faecal transplantations – developing next-generation therapies with synthetic microbiomes. *Microb Biotechnol.* 2013 Jul 1; 6 (4): 316–25. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/1751-7915.12047>
378. Borody TJ, Brandt LJ, Paramsothy S. Therapeutic faecal microbiota transplantation: current status and future developments. *Curr Opin Gastroenterol.* 2014 Jan 6; 30(1): 97–105. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3868025/>
379. van Nood E, Vrieze A, Nieuwdorp M, Fuentes S, Zoetendal EG, de Vos WM, et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. *N Engl J Med.* 2013 Jan 16; 368 (5): 407–15. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1205037>
380. Kassam Z, Lee CH, Yuan Y, Hunt RH. Fecal Microbiota Transplantation for *Clostridium difficile* infection: systematic review and meta-analysis. *Am J Gastroenterol.* 2013 Apr; 108 (4): 500–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2013.59>
381. Alang N, Kelly CR. Weight gain after Fecal Microbiota Transplantation. *Open Forum Infect Dis.* 2015 Jan 1; 2 (1): ofv004. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4438885/>
382. Orenstein R, Dubberke E, Hardi R, Ray A, Mullane K, Pardi DS, et al. Safety and durability of RBX2660 (Microbiota Suspension) for recurrent *Clostridium difficile* infection: results of the PUNCH CD study. *Clin Infect Dis.* 2016 Mar 1; 62 (5): 596–602. Disponible en: <http://cid.oxfordjournals.org/content/62/5/596.abstract>
383. OpenBiome. Our treatments. Disponible en: <http://www.openbiome.org/safety/>
384. Khanna S, Pardi DS, Kelly CR, Kraft CS, Dhere T, Henn MR, et al. A novel microbiome therapeutic increases gut microbial diversity and prevents recurrent *Clostridium difficile* infection. *J Infect Dis.* 2016 Feb 8; Disponible en: <http://jid.oxfordjournals.org/content/early/2016/02/04/infdis.jiv766.abstract>
385. Muthigi A, George AK, Brancato SJ, Agarwal PK. Novel immunotherapeutic approaches to the treatment of urothelial carcinoma. *Ther Adv Urol.* 2016 Jun 9; 8 (3): 203–14. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4872187/>

386. Donia MS, Fischbach MA. Small molecules from the human microbiota. *Science*. 2015 Jul 24; 349 (6246): 1254766. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4641445/>
387. Motta J-P, Bermúdez-Humarán LG, Deraison C, Martin L, Rolland C, Rousset P, et al. Food-grade bacteria expressing elafin protect against inflammation and restore colon homeostasis. *Sci Transl Med*. 2012 Oct 31; 4 (158): 158ra144-158ra144. Disponible en: <http://stm.sciencemag.org/content/4/158/158ra144.abstract>
388. Bikard D, Euler CW, Jiang W, Nussenzweig PM, Goldberg GW, Duportet X, et al. Exploiting CRISPR-Cas nucleases to produce sequence-specific antimicrobials. *Nat Biotech*. 2014 Nov; 32 (11): 1146–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3043>
389. Citorik RJ, Mimee M, Lu TK. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nat Biotech*. 2014 Nov; 32 (11): 1141–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3011>
390. Haiser HJ, Gootenberg DB, Chatman K, Sirasani G, Balskus EP, Turnbaugh PJ. Predicting and manipulating cardiac drug inactivation by the human gut bacterium *eggerthella lenta*. *Science* (80-). 2013; 341 (6143): 295–8. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/341/6143/295>
391. John L, G. RD, Jr. BVP, Doris T-E, Ranjan SJ. Inactivation of Digoxin by the Gut Flora: Reversal by Antibiotic Therapy. *N Engl J Med*. 1981; 305 (14): 789–94. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM198110013051403>
392. Wilson ID. Drugs, bugs, and personalized medicine: Pharmacometabonomics enters the ring. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 25; 106 (34): 14187–8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2732874/>
393. Nicholson JK, Holmes E, Wilson ID. Gut microorganisms, mammalian metabolism and personalized health care. *Nat Rev Micro*. 2005 May; 3 (5): 431–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1152>
394. Clayton TA, Baker D, Lindon JC, Everett JR, Nicholson JK. Pharmacometabonomic identification of a significant host-microbiome metabolic interaction affecting human drug metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 25; 106 (34): 14728–33. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2731842/>
395. Tanaka E, Yamazaki K, Misawa S. Update: the clinical importance of acetaminophen hepatotoxicity in non-alcoholic and alcoholic subjects. *J Clin Pharm Ther*. 2000; 25 (5): 325–32. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2710.2000.00301.x>
396. Thompson DC, Perera K, Fisher R, Brendel K. Cresol isomers: comparison of toxic potency in rat liver slices. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1994; 125 (1): 51–8. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X84710489>
397. Thompson DC, Perera K, London R. Quinone methide formation from para

- isomers of methylphenol (Cresol), ethylphenol, and isopropylphenol: relationship to toxicity. *Chem Res Toxicol*. 1995; 8 (1): 55–60. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1021/tx00043a007>
398. LoGuidice A, Wallace BD, Bendel L, Redinbo MR, Boelsterli UA. Pharmacologic targeting of bacterial β -glucuronidase alleviates Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drug-induced enteropathy in mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2012 May 16; 341 (2): 447–54. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3336811/>
399. Wallace BD, Wang H, Lane KT, Scott JE, Orans J, Koo JS, et al. Alleviating cancer drug toxicity by inhibiting a bacterial enzyme. *Science*. 2010 Nov 5; 330(6005): 831–5. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3110694/>
400. Tribunal de Justicia de la Unión Europea. Asunto C-109/12: «Procedimiento prejudicial — Aproximación de las legislaciones — Productos sanitarios — Directiva 93/42/CEE — Medicamentos para uso humano — Directiva 2001/83/CE — Derecho de la autoridad nacional competente de clasificar como medicamento. 2013.
401. Starling S. French cranberry medical device status stripped. *Nutraingredients*. 2014. Disponible en: <http://www.nutraingredients.com/Regulation-Policy/French-cranberry-medical-device-status-stripped>
402. Menayang A. ProbioTech's citizen petition calls for probiotic suppository to be included in supplement definition. *Nutraingredients*. 2016. Disponible en: <http://www.nutraingredients-usa.com/Regulation/ProbioTech-wants-probiotic-suppository-to-be-counted-as-supplement>
403. Carvajal R. The next wave for probiotics?. *FDA Law Blog*. 2016. Disponible en: http://www.fdalawblog.net/fda_law_blog_hyman_phelps/2016/04/the-next-wave-for-probiotics.html
404. Reglamento (CE) 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y los requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan proce. Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2002-80201>
405. Reglamento (CE) 1924/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 20 de diciembre de 2006 relativo a las declaraciones nutricionales y de propiedades saludables en los alimentos. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1924:20100302:es:PDF>
406. Reglamento (UE) 1047/2012 de la Comisión, de 8 de noviembre de 2012, por el que se modifica el Reglamento (CE) no 1924/2006 en lo relativo a la lista de declaraciones nutricionales. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2012/310/L00036-00037.pdf>

407. (NDA) EFSA-P on DPN and A. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to plant sterols and plant stanols and maintenance of normal blood cholesterol concentrations (ID 549, 550, 567, 713, 1234, 1235, 1466, 1634, 1984, 2909, 3140), and maintenance of normal pr. EFSA J. 2010; 8 (10)(1813): 1–22. Disponible en:
http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/1813.pdf
408. (NDA) EFSA-P on DPN and A. Danacol® and blood cholesterol Scientific substantiation of a health claim related to a low fat fermented milk product (Danacol®) enriched with plant sterols/stanols and lowering/reducing blood cholesterol and reduced risk of (coronary) heart disease purs. EFSA J. 2009;(1177): 1–12.
409. EU Register of nutrition and health claims made on foods. [cited 2016 Jun 20]. Disponible en:
<http://ec.europa.eu/nuhclaims/?event=search&CFID=1612909&CFTOKEN=bbc4f0f8d384c5e6-0BB19250-E57C-DA34-BBC40E31B108CF12&jsessionid=93128888d2e944a8e69f26605f1d16115266TR>
410. (NDA) EFSA-P on DPN and A. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to polyphenols in olive and protection of LDL particles from oxidative damage (ID 1333, 1638, 1639, 1696, 2865), maintenance of normal blood HDL-cholesterol concentrations (ID 1639), mainte. EFSA J. 2011; 9 (4)(2033): 1–25. Disponible en:
<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2033.pdf>
411. (NDA) EFSA-P on DPN and A. Scientific Opinion on the modification of the authorisation of a health claim related to cocoa flavanols and maintenance of normal endotheliumdependent vasodilation pursuant to Article 13 (5) of Regulation (EC) No 1924/2006 following a request in accordanc. EFSA J. 2014; 12 (5)(3654): 1–13. Disponible en:
http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/3654.pdf
412. (NDA) EFSA-P on DPN and A. Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to live yoghurt cultures and improved lactose digestion (ID 1143, 2976) pursuant to Article 13 (1) of Regulation (EC) No 1924/2006. EFSA J. 2006; 8 (10)(1763): 1–18. Disponible en:
http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/1763.pdf
413. Food Safety Authority of Ireland. Probiotic Health Claims. 2015. Disponible en: https://www.fsai.ie/faqs/probiotic_health_claims.html
414. Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 6 de noviembre de 2001, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano. Disponible en:
<https://www.boe.es/doue/2001/311/L00067-00128.pdf>
415. Directiva 93/42/CEE, de 11 de junio de 1993, relativa a productos sanitarios.

- Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1993L0042:20071011:en:PDF>
416. Propuesta de Reglamento del Parlamento Europeo y del Consejo sobre los productos sanitarios y por el que se modifican la Directiva 2001/83/CE, el Reglamento (CE) nº 178/2002 y el Reglamento (CE) nº 1223/2009. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=celex:52012PC0542>
 417. NTC Pharma corporate website. Disponible en: <http://www.ntcpharma.com/>
 418. Orden del Ministerio de Sanidad y Consumo 2800/2004, de 30 de julio, por la que se modifica el contenido del anexo de la Orden de 17 de septiembre de 1982, que desarrolla el Real Decreto 2730/1981, sobre el Registro de Especialidades Farmacéuticas Publici. Disponible en: <http://www.boe.es/boe/dias/2004/08/19/pdfs/A29348-29349.pdf>
 419. Real Decreto 1591/2009, de 16 de octubre, por el que se regulan los productos sanitarios. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/legislacion/espana/productosSanitarios/docs/Directiva_93-42-CEE/rcl_2009_2105.pdf
 420. Jasper A. An Innovative Path - Oral Eubiotic Certified As A Medical Device. Newswire Today. 2010. Disponible en: <http://www.newswiretoday.com/news/65853/An-Innovative-Path-Oral-Eubiotic-Certified-As-A-Medical-Device/>
 421. Conclusiones del Abogado General, Sr. Henrik Saugmandsgaard Oe, presentadas con fecha 18 de febrero de 2016, en el Asunto C-19/15, Verband Sozialer Wettbewerb e.V, contra Innova Vital GmbH, seguido ante el Tribunal de Justicia de la Unión Europea. Disponible en: <http://curia.europa.eu/juris/fiche.jsf;jsessionid=9ea7d0f130d5b7a7341ae692486989,b09a318d617388.e34KaxiLc3eQc40LaxqMbN4OcheSe0?id=C%3B19%3B15%3BRP%3B1%3BP%3B1%3BC2015%2F0019%2FP&pro=&lgrec=en&nat=or&oqp=&dates=&lg=&language=en&jur=C%2CT%2CF&cit=none%252CC>
 422. Reglamento (CE) 258/97 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de enero de 1997, sobre nuevos alimentos y nuevos ingredientes alimentarios. Disponible en: http://www.magrama.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/biotecnologia/reglamento_258_97_tcm7-2289.pdf
 423. European Commission. Legislation regarding Novel Food. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/safety/novel_food/legislation/index_en.htm
 424. European Food Safety Authority - Panel on Dietetic Products Nutrition and Allergies (NDA). Statement on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 4: suitability of taxonomic units notified to EFSA until March 2016. EFSA J. 2016; 14 (7): 37.
 425. European Food Safety Authority - Panel on Dietetic Products Nutrition and

- Allergies (NDA). Scientific Opinion on the safety of “heat-treated milk products fermented with *Bacteroides xylanisolvens* DSM 23964” as a novel food. EFSA J. 2015; 13 (1)(3956): 1–18.
426. Harrison-Dunn A. Restoring “natural exposure”: Firm seeks approval for novel food bacterium. Nutraingredients. 2016. Disponible en: <http://www.nutraingredients.com/Regulation-Policy/Restoring-natural-exposure-Firm-seeks-approval-for-novel-food-bacterium>
427. European Commission. Food Authorisations. [cited 2016 Jun 20]. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/safety/novel_food/authorisations/index_en.htm
428. Sharper A. New EU Regulation to speed up approval of Novel Foods. Campden BRI. 2015. Disponible en: <https://www.campdenbri.co.uk/blogs/eu-regulation-novel-foods.php>
429. Harrison-Dunn A. Novel regulation - same old delays? Stakeholders express novel food process concerns. Nutraingredients. 2016. Disponible en: <http://www.nutraingredients.com/Regulation-Policy/Novel-regulation-same-old-delays-Stakeholders-express-novel-food-process-concerns>
430. Directiva 90/385/CEE del Consejo, de 20 de junio de 1990, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros sobre los productos sanitarios implantables activos. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/PDF/?uri=CELEX:31990L0385&from=EN>
431. Directiva 98/79/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 27 de octubre de 1998, sobre productos sanitarios para diagnóstico in vitro.. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1998L0079:20090807:es:PDF>
432. Reglamento (CE) 726/2004 por el que se establecen procedimientos comunitarios para la autorización y el control de los medicamentos de uso humano y veterinario y por el que se crea la Agencia Europea de Medicamentos. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/HTML/?uri=URISERV:l22149&from=ES>
433. Reglamento (CE) 141/2000 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de diciembre de 1999 sobre medicamentos huérfanos. Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32000R0141&from=ES>
434. Reglamento (CE) 1901/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo de 12 de diciembre de 2006 sobre medicamentos para uso pediátrico y por el que se modifican el Reglamento (CEE) no 1768/92, la Directiva 2001/20/CE, la Directiva 2001/83/CE y el Reglamento (CE). Disponible en: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2006R1901:20070126:ES:PDF>
435. Reglamento (CE) 1394/2007 del Parlamento Europeo y del Consejo de 13 de noviembre de 2007 sobre medicamentos de terapia avanzada y por el que

- se modifican la Directiva 2001/83/CE y el Reglamento (CE) no 726/2004. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/reg_2007_1394/reg_2007_1394_es.pdf
436. Directiva 2004/24/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 por la que se modifica, en lo que se refiere a los medicamentos tradicionales a base de plantas, la Directiva 2001/83/CE por la que se establece un código comunitario sobre m. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2004_24/dir_2004_24_es.pdf
437. Reglamento (UE) 536/2014 del Parlamento Europeo y del Consejo de 16 de abril de 2014 sobre los ensayos clínicos de medicamentos de uso humano, y por el que se deroga la Directiva 2001/20/CE. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2014/158/L00001-00076.pdf>
438. European Commission. Authorisation procedures for medicinal products. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/authorisation-procedures_en.htm
439. Directiva 2004/27/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 31 de marzo de 2004 que modifica la Directiva 2001/83/CE por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos de uso humano. Disponible en: <https://www.boe.es/doue/2004/136/L00034-00057.pdf>
440. European Commission. Draft Guideline concerning the optional scope of the centralised procedure in accordance with Article 3 (2)(b) of Regulation (EC) No 726/2004. 2005. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/files/pharmacos/docs/doc2005/12-05/optional_scope_publ_21_12_05_en.pdf
441. Directiva 2009/120/CE de la Comisión de 14 de septiembre de 2009 que modifica la Directiva 2001/83/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, por la que se establece un código comunitario sobre medicamentos para uso humano, en lo que se refiere a los medica. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/files/eudralex/vol-1/dir_2009_120/dir_2009_120_es.pdf
442. European Commission. Herbal Medicinal Products. [cited 2016 Jun 20]. Disponible en: http://ec.europa.eu/health/human-use/herbal-medicines/index_en.htm
443. European Medicines Agency. Herbal Medicines for human use. [cited 2016 Jun 20]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages%2Fmedicines%2Flanding%2Fherbal_medicines_search_landing_page.jsp&mid=&searchkwByEnter=false&alreadyLoaded=true&isNewQuery=true&startLetter=View+all&keyword=Enter+keywords&searchType=Latin+name+of+the+genus
444. European Medicines Agency. Call for scientific data for use in HMPC assessment work on *Saccharomyces cerevisiae*/*Saccharomyces boulardii*. 2014; Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Herbal_-_Call_for_data/2014/02/WC500161222.pdf

445. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Early Clinical Trials with Live Biotherapeutic Products: Chemistry, Manufacturing, and Control Information. 2012. Disponible en:
<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/Guidance-ComplianceRegulatoryInformation/Guidances/General/UCM292704.pdf>
446. Food and Drug Administration. Federal Food, Drug, and Cosmetic Act (FD&C Act). Disponible en:
<http://www.fda.gov/regulatoryinformation/legislation/federalfooddrugandcosmeticactfdact/>
447. Food and Drug Administration. Guidance for Clinical Investigators, Sponsors, and IRBs Investigational New Drug Applications (INDs) – Determining Whether Human Research Studies Can Be Conducted Without an IND. 2013. Disponible en:
<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM229175.pdf>
448. Food and Drug Administration. Guidance for Industry Enforcement Policy Regarding Investigational New Drug Requirements for Use of Fecal Microbiota for Transplantation to Treat Clostridium difficile Infection Not Responsive to Standard Therapies. 2013. Disponible en:
<http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidance>
449. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Enforcement Policy Regarding Investigational New Drug Requirements for Use of Fecal Microbiota for Transplantation To Treat Clostridium difficile Infection Not Responsive to Standard Therapies; Availability. Fed Regist. 2014; 79 (38): 10814–5.
450. Food and Drug Administration. Enforcement Policy Regarding Investigational New Drug Requirements for Use of Fecal Microbiota for Transplantation to Treat Clostridium difficile Infection Not Responsive to Standard Therapies. 2016. p. 1–4. Disponible en:
http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/Vaccines/UCM488223.pdf?source=govdelivery&utm_medium=email&utm_source=govdelivery
451. Brennan Z. Fecal transplants to treat C. difficile: FDA seeks comment on what IND requirements to waive. Regulatory Affairs Professional Society. 2016. Disponible en: <http://raps.org/Regulatory-Focus/News/2016/02/29/24428/Fecal-Transplants-to-Treat-C-difficile-FDA-Seeks-Comment-on-What-IND-Requirements-to-Waive/>
452. Summary Minutes of the Gastrointestinal Drugs Advisory Committee of the Food and Drug Administration, approved on January 16 2012. Disponible en:
<http://www.fda.gov/downloads/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMaterials/Drugs/GastrointestinalDrugsAdvisoryCommittee/UCM288707.pdf>

453. Adams RJ, Heazlewood SP, Gilshenan KS, O'Brien M, McGuckin MA, Florin THJ. IgG antibodies against common gut bacteria are more diagnostic for Crohn's Disease than IgG against mannan or flagellin. *Am J Gastroenterol*. 2008 Feb; 103 (2): 386–96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1572-0241.2007.01577.x>
454. Sartor RB, Mazmanian SK. Intestinal microbes in Inflammatory Bowel Diseases. *Am J Gastroenterol Suppl*. 2012 Jul; 1 (1): 15–21. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ajgsup.2012.4>
455. Eckburg PB, Relman DA. The role of microbes in Crohn's Disease. *Clin Infect Dis*. 2007 Jan 15; 44 (2): 256–62. Disponible en: <http://cid.oxfordjournals.org/content/44/2/256.abstract>
456. Pitcher M, Beatty E, Cummings J. The contribution of sulphate reducing bacteria and 5-aminosalicylic acid to faecal sulphide in patients with ulcerative colitis. *Gut*. 2000 Jan; 46 (1): 64–72. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1727787/>
457. Xu Q, Lagenaur L, Liu X, Liu Y, Yu R, Wells K, et al. Development of a live topical microbicide for women. *Retrovirology*. 2006 Dec 21; 3 (Suppl 1):S37–S37. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1716946/>
458. Macielag MJ. Chemical properties of antimicrobials and their uniqueness. In: Dougherty JT, Pucci JM, editors. *Antibiotic Discovery and Development*. Boston, MA: Springer US; 2012. p. 793–820. Disponible en: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-1400-1_24
459. European Medicines Agency. Scientific recommendation on classification of advanced therapy medicinal products. 2015. p. 1. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2015/03/WC500183708.pdf
460. Potera C. Phage Renaissance: new hope against antibiotic resistance. *Environ Health Perspect*. 2013 Feb 1; 121 (2):a48–53. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3569700/>
461. Jassim SAA, Limoges RG. Natural solution to antibiotic resistance: bacteriophages "The Living Drugs." *World J Microbiol Biotechnol*. 2014 Apr 30; 30(8): 2153–70. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4072922/>
462. Parracho HMRT, Burrowes BH, Enright MC, McConville ML, Harper DR. The role of regulated clinical trials in the development of bacteriophage therapeutics. *J Mol Genet Med*. 2012 Apr 23; 6: 279–86. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3410379/>
463. Keen EC. Phage therapy: concept to cure. *Front Microbiol*. 2012 Jul 19; 3: 238. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3400130/>
464. Cebra JJ. Influences of microbiota on intestinal immune system development. *Am J Clin Nutr*. 1999; 69 (5): 1046–51.

465. Elinav E, Nowarski R, Thaiss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer*. 2013; 13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc3611>
466. Underhill DM, Iliiev ID. The mycobiota: interactions between commensal fungi and the host immune system. *Nat Rev Immunol*. 2014 Jun; 14 (6): 405–16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4332855/>
467. Schiffer C, Lalanne AI, Cassard L, Mancardi DA, Malbec O, Bruhns P, et al. A strain of *Lactobacillus casei* inhibits the effector phase of immune inflammation. *J Immunol*. 2011; 187. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1002415>
468. Kau AL, Ahern PP, Griffin NW, Goodman AL, Gordon JI. Human nutrition, the gut microbiome and the immune system. *Nature*. 2011; 474. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature10213>
469. Geuking MB, Köller Y, Rupp S, McCoy KD. The interplay between the gut microbiota and the immune system. *Gut Microbes*. 2014; 5 (3): 411–8.
470. Oliveira VA, Vicente MA, Fietto LG, de Miranda Castro I, Coutrim MX, Schüller D, et al. Biochemical and molecular characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains obtained from sugar-cane juice fermentations and their impact in cachaça production. *Appl Environ Microbiol*. 2008 Feb 1; 74 (3): 693–701. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/74/3/693.abstract>
471. Doerflinger SY, Throop AL, Herbst-Kralovetz MM. Vaginal microbiota alter the innate immune and barrier properties of the human vaginal epithelia in a species-specific manner. *J Infect Dis*. 2014 Jan 7; Disponible en: <http://jid.oxfordjournals.org/content/early/2014/01/07/infdis.jiu004.abstract>
472. European Medicines Agency. Summaries of scientific recommendations on classification of advanced-therapy medicinal products. [cited 2016 Jun 20]. Disponible en: http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/regulation/general/general_content_000301.jsp
473. Baban CK, Cronin M, O'Hanlon D, O'Sullivan GC, Tangney M. Bacteria as vectors for gene therapy of cancer. *Bioeng Bugs*. 2010 Jun 11; 1 (6): 385–94. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3056088/>
474. Palfy R, Gardlik R, Hodosy J, Behuliak M, Resko P, Radvansky J, et al. Bacteria in gene therapy: bactofection versus alternative gene therapy. *Gene Ther*. 2005 Sep 15; 13 (2): 101–5. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.gt.3302635>
475. Rosselló-Mora R, Amann R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev*. 2001 Jan 1; 25 (1): 39–67. Disponible en: <http://femsre.oxfordjournals.org/content/25/1/39.abstract>

476. Ward DM. A natural species concept for prokaryotes. *Curr Opin Microbiol.* 1998; 1 (3): 271–7. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527498800295>
477. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, et al. Report of the ad hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int J Syst Evol Microbiol.* 1987; 37 (4): 463–4. Disponible en: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-37-4-463>
478. Staley JT. The bacterial species dilemma and the genomic–phylogenetic species concept. *Philos Trans R Soc B Biol Sci.* 2006 Nov 29; 361 (1475): 1899–909. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1857736/>
479. Teeling H, Glöckner FO. Current opportunities and challenges in microbial metagenome analysis—a bioinformatic perspective. *Brief Bioinform.* 2012 Nov 8; 13 (6): 728–42. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3504927/>
480. Hollricher K. “Species don’t really mean anything in the bacterial world.” *LabTimes.* 2007; 5: 22–4. Disponible en: http://www.labtimes.org/labtimes/issues/lt2007/lt05/lt_2007_05_22_25.pdf
481. Blaser MJ. *Missing microbes.* First edit. New York, NY: Picador; 2015. 275 p.
482. Pace NR. A molecular view of microbial diversity and the Biosphere. *Science* (80-). 1997; 276 (5313): 734–40. Disponible en: <http://science.sciencemag.org/content/276/5313/734>
483. Sakata S, Kitahara M, Sakamoto M, Hayashi H, Fukuyama M, Benno Y. Unification of *Bifidobacterium infantis* and *Bifidobacterium suis* as *Bifidobacterium longum*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002; 52 (6): 1945–51. Disponible en: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/00207713-52-6-1945>
484. Mattarelli P, Bonaparte C, Pot B, Biavati B. Proposal to reclassify the three biotypes of *Bifidobacterium longum* as three subspecies: *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* subsp. nov., *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* comb. nov. and *Bifidobacterium longum* subsp. *suis* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2008; 58 (4): 767–72. Disponible en: <http://ijs.microbiologyresearch.org/content/journal/ijsem/10.1099/ij.0.65319-0>
485. Bernardeau M, Guguen M, Vernoux JP. Beneficial lactobacilli in food and feed: long-term use, biodiversity and proposals for specific and realistic safety assessments. *FEMS Microbiol Rev.* 2006; 30(4): 487–513. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2006.00020.x>
486. Ling Z, Liu X, Luo Y, Yuan L, Nelson KE, Wang Y, et al. Pyrosequencing

- analysis of the human microbiota of healthy Chinese undergraduates. *BMC Genomics*. 2013; 14 (1): 1–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-390>
487. Collins MD, Lawson PA, Willems A, Cordoba JJ, Fernandez-Garayzabal J, Garcia P, et al. The phylogeny of the genus *Clostridium*: proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int J Syst Bacteriol*. 1994 Oct; 44 (4): 812–26.
488. Jarvis-Bardy J, Leong LEX, Marri S, Smith RJ, Choo JM, Smith-Vaughan HC, et al. Deriving accurate microbiota profiles from human samples with low bacterial content through post-sequencing processing of Illumina MiSeq data. *Microbiome*. 2015; 3 (1): 1–11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s40168-015-0083-8>
489. Zhang X, Shen D, Fang Z, Jie Z, Qiu X, Zhang C, et al. Human gut microbiota changes reveal the progression of glucose intolerance. *PLoS One*. 2013; 8 (8): 1–11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0071108>
490. Berry D, Kuzyk O, Rauch I, Heider S, Schwab C, Hainzl E, et al. Intestinal microbiota signatures associated with inflammation history in mice experiencing recurring colitis. *Front Microbiol*. 2015 Dec 15; 6: 1408. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4678223/>
491. Ianiro G, Bruno G, Lopetuso L, Beghella FB, Laterza L, D'Aversa F, et al. Role of yeasts in healthy and impaired gut microbiota: the gut mycome. *Curr Pharm Des*. 2014; 20(28): 4565–9.
492. Verna EC, Lucak S. Use of probiotics in gastrointestinal disorders: what to recommend? *Therap Adv Gastroenterol*. 2010 Sep; 3 (5): 307–19. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3002586/>
493. Rowland I, Capurso L, Collins K, Cummings J, Delzenne N, Goulet O, et al. Current level of consensus on probiotic science: Report of an expert meeting-London, 23 November 2009. *Gut Microbes*. 2010 Mar 3; 1 (6): 436–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3056112/>
494. Donnet-Hughes A, Rochat F, Serrant P, Aeschlimann JM, Schiffrin EJ. Modulation of nonspecific mechanisms of defense by lactic acid bacteria: effective dose. *J Dairy Sci*. 1999; 82 (5): 863–9. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002203029975304X>
495. Gao XW, Mubasher M, Fang CY, Reifer C, Miller LE. Dose-response efficacy of a proprietary probiotic formula of *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus casei* LBC80R for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile*-associated diarrhea prophylaxis in adult patients. *Am J Gastroenterol*. 2010 Jul; 105 (7): 1636–41.
496. Patton DL, Cosgrove Sweeney YT, Antonio MAD, Rabe LK, Hillier SL. *Lactobacillus crispatus* capsules: single-use safety study in the *Macaca nemestrina* model. *Sex Transm Dis*. 2003; 30(7). Disponible en: http://journals.lww.com/stdjournal/Fulltext/2003/07000/Lactobacillus_crisp

- atus_Capsules__Single_Use.7.aspx
497. Villano SA, Seiberling M, Tatarowicz W, Monnot-Chase E, Gerding DN. Evaluation of an oral suspension of VP20621, spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3, in healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Oct 1; 56 (10): 5224–9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3457387/>
 498. Gerding D, Meyer T, Lee C, Al E. Administration of spores of nontoxigenic *Clostridium difficile* strain M3 for prevention of recurrent *C. difficile* infection: A randomized clinical trial. *JAMA*. 2015 May 5; 313 (17): 1719–27. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.2015.3725>
 499. Limaye SA, Haddad RI, Cilli F, Sonis ST, Colevas AD, Brennan MT, et al. Phase 1b, multicenter, single blinded, placebo-controlled, sequential dose escalation study to assess the safety and tolerability of topically applied AG013 in subjects with locally advanced head and neck cancer receiving induction chemotherapy. *Cancer*. 2013; 119 (24): 4268–76. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/cncr.28365>
 500. Lagenaur LA, Swedek I, Lee PP, Parks TP. Robust vaginal colonization of macaques with a novel vaginally disintegrating tablet containing a Live Biotherapeutic Product to prevent HIV infection in women. *PLoS One*. 2015; 10(4): 1–17. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0122730>
 501. Nagaro KJ, Phillips ST, Cheknis AK, Sambol SP, Zukowski WE, Johnson S, et al. Nontoxigenic *Clostridium difficile* protects hamsters against challenge with historic and epidemic strains of toxigenic BI/NAP1/027 *C. difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Nov 22; 57 (11): 5266–70. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3811292/>
 502. Barbau-Piednoir E, Mahillon J, Pillyser J, Coucke W, Roosens NH, Botteldoorn N. Evaluation of viability-qPCR detection system on viable and dead *Salmonella* serovar Enteritidis. *J Microbiol Methods*. 2014; 103: 131–7. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701214001572>
 503. Brinkman BM, Hildebrand F, Kubica M, Goosens D, Del Favero J, Declercq W, et al. Caspase deficiency alters the murine gut microbiome. *Cell Death Dis*. 2011 Oct 20; 2 (10):e220. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3219086/>
 504. Zhang Q, Widmer G, Tzipori S. A pig model of the human gastrointestinal tract. *Gut Microbes*. 2013 May 1; 4 (3): 193–200. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3669164/>
 505. Roeselers G, Mittge EK, Stephens WZ, Parichy DM, Cavanaugh CM, Guillemin K, et al. Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *ISME J*. 2011 Oct 7; 5 (10): 1595–608. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3176511/>
 506. Chandler JA, Morgan Lang J, Bhatnagar S, Eisen JA, Kopp A. Bacterial

- communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system. Malik HS, editor. *PLoS Genet*. 2011 Sep 22; 7 (9):e1002272. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3178584/>
507. Rush CM, Hafner LM, Timms P. Genetic modification of a vaginal strain of *Lactobacillus fermentum* and its maintenance within the reproductive tract after intravaginal administration. *J Med Microbiol*. 1994; 41 (4): 272–8. Disponible en: <http://jmm.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-41-4-272>
508. Nguyen TLA, Vieira-Silva S, Liston A, Raes J. How informative is the mouse for human gut microbiota research? *Dis Model Mech*. 2015; 8 (1): 1–16. Disponible en: <http://dmm.biologists.org/content/8/1/1>
509. Xiao L, Feng Q, Liang S, Sonne SB, Xia Z, Qiu X, et al. A catalog of the mouse gut metagenome. *Nat Biotech*. 2015 Oct; 33 (10): 1103–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.3353>
510. Williams SCP. Gnotobiotics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Feb 4; 111 (5): 1661. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3918800/>
511. Collins J, Auchtung JM, Schaefer L, Eaton KA, Britton RA. Humanized microbiota mice as a model of recurrent *Clostridium difficile* disease. *Microbiome*. 2015 Aug 20; 3: 35. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4546040/>
512. Wos-Oxley ML, Bleich A, Oxley APA, Kahl S, Janus LM, Smoczek A, et al. Comparative evaluation of establishing a human gut microbial community within rodent models. *Gut Microbes*. 2012 May 1; 3 (3): 234–49. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3427216/>
513. Swanson KS, Dowd SE, Suchodolski JS, Middelbos IS, Vester BM, Barry KA, et al. Phylogenetic and gene-centric metagenomics of the canine intestinal microbiome reveals similarities with humans and mice. *ISME J*. 2011 Apr 21; 5 (4): 639–49. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3105739/>
514. Litten-Brown JC, Corson AM, Clarke L. Porcine models for the metabolic syndrome, digestive and bone disorders: a general overview. *animal*. 2010; 4 (6): 899–920. Disponible en: http://journals.cambridge.org/article_S1751731110000200
515. Heinritz SN, Mosenthin R, Weiss E. Use of pigs as a potential model for research into dietary modulation of the human gut microbiota. *Nutr Res Rev*. 2013; 26 (2): 191–209. Disponible en: http://journals.cambridge.org/article_S0954422413000152
516. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008 Mar 1; 22 (3): 659–61. Disponible en: <http://www.fasebj.org/content/22/3/659.abstract>

517. Casteleyn C, Rekecki A, Van der Aa A, Simoens P, Van den Broeck W. Surface area assessment of the murine intestinal tract as a prerequisite for oral dose translation from mouse to man. *Lab Anim* . 2010 Jul 1; 44 (3): 176–83. Disponible en: <http://lan.sagepub.com/content/44/3/176.abstract>
518. Jeffery IB, Claesson MJ, O'Toole PW, Shanahan F. Categorization of the gut microbiota: enterotypes or gradients? *Nat Rev Micro*. 2012 Sep; 10(9): 591–2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro2859>
519. Woese CR, Fox GE, Zablén L, Uchida T, Bonen L, Pechman K, et al. Conservation of primary structure in 16S ribosomal RNA. *Nature*. 1975 Mar; 254 (5495): 83–6.
520. Fraher MH, O'Toole PW, Quigley EMM. Techniques used to characterize the gut microbiota: a guide for the clinician. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2012 Jun; 9 (6): 312–22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2012.44>
521. Dewhirst FE, Chen T, Izard J, Paster BJ, Tanner ACR, Yu W-H, et al. The Human oral microbiome. *J Bacteriol*. 2010 Oct 1; 192 (19): 5002–17. Disponible en: <http://jb.asm.org/content/192/19/5002.abstract>
522. Mager DL, Haffajee AD, Devlin PM, Norris CM, Posner MR, Goodson JM. The salivary microbiota as a diagnostic indicator of oral cancer: A descriptive, non-randomized study of cancer-free and oral squamous cell carcinoma subjects. *J Transl Med*. 2005; 3 (1): 1–8. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1479-5876-3-27>
523. Eger T, Zöller L, Müller H-P, Hoffmann S, Lobinsky D. Potential diagnostic value of sampling oral mucosal surfaces for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young adults*. *Eur J Oral Sci*. 1996; 104 (2): 112–7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0722.1996.tb00054.x>
524. Müller H-P, Zöller L, Eger T, Hoffmann S, Lobinsky D. Natural distribution of oral *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in young men with minimal periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1996; 31 (6): 373–80. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.1996.tb00506.x>
525. van Winkelhoff AJ, van der Velden U, Winkel EG, DE Graaff J. Black-pigmented *Bacteroides* and motile organisms on oral mucosal surfaces in individuals with and without periodontal breakdown. *J Periodontal Res*. 1986; 21 (4): 434–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0765.1986.tb01477.x>
526. Zoetendal EG, von Wright A, Vilpponen-Salmela T, Ben-Amor K, Akkermans ADL, de Vos WM. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. *Appl Environ Microbiol*. 2002 Jul 1; 68 (7): 3401–7. Disponible en: <http://aem.asm.org/content/68/7/3401.abstract>
527. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* (80-). 2005; 308

- (5728): 1635–8. Disponible en:
<http://science.sciencemag.org/content/308/5728/1635>
528. Van den Abbeele P, Van de Wiele T, Verstraete W, Possemiers S. The host selects mucosal and luminal associations of coevolved gut microorganisms: a novel concept. *FEMS Microbiol Rev*. 2011 Jul 1; 35 (4): 681–704. Disponible en: <http://femsre.oxfordjournals.org/content/35/4/681.abstract>
529. Chen W, Liu F, Ling Z, Tong X, Xiang C. Human intestinal lumen and mucosa-associated microbiota in patients with colorectal cancer. Moschetta A, editor. *PLoS One*. 2012 Jun 28; 7 (6):e39743. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3386193/>
530. Yu G, Fadrosch D, Goedert JJ, Ravel J, Goldstein AM. Nested PCR biases in interpreting microbial community structure in 16S rRNA gene sequence datasets. *PLoS One*. 2015; 10(7): 1–12. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0132253>
531. Thomas V, Clark J, Doré J. Fecal microbiota analysis: an overview of sample collection methods and sequencing strategies. *Future Microbiol*. 2015 Sep 1; 10(9): 1485–504. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.2217/fmb.15.87>
532. David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature*. 2014 Jan 23; 505 (7484): 559–63. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature12820>
533. Ma BW, Bokulich NA, Castillo PA, Kananurak A, Underwood MA, Mills DA, et al. Routine habitat change: a source of unrecognized transient alteration of intestinal microbiota in laboratory mice. *PLoS One*. 2012; 7 (10): 1–11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371%2Fjournal.pone.0047416>
534. Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology*. 2010; 156 (11): 3216–23. Disponible en: <http://mic.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/mic.0.040618-0>
535. Lazarevic V, Whiteson K, Hernandez D, François P, Schrenzel J. Study of inter- and intra-individual variations in the salivary microbiota. *BMC Genomics*. 2010; 11 (1): 1–11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-11-523>
536. Hisada T, Endoh K, Kuriki K. Inter- and intra-individual variations in seasonal and daily stabilities of the human gut microbiota in Japanese. *Arch Microbiol*. 2015 Jun 12; 197 (7): 919–34. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4536265/>
537. Graf D, Di Cagno R, Fåk F, Flint HJ, Nyman M, Saarela M, et al. Contribution of diet to the composition of the human gut microbiota. *Microb Ecol Health Dis*. 2015 Feb 4; 26: 10.3402/mehd.v26.26164.

- Disponibile en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4318938/>
538. Bai Y, Müller DB, Srinivas G, Garrido-Oter R, Potthoff E, Rott M, et al. Functional overlap of the Arabidopsis leaf and root microbiota. *Nature*. 2015 Dec 17; 528 (7582): 364–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature16192>
539. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*. 2010; 7. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.f.303>
540. Rappé MS, and Stephen J. Giovannoni. The uncultured microbial majority. *Annu Rev Microbiol*. 2003; 57 (1): 369–94. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090759>
541. Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glockner FO, Ludwig W, Schleifer K-H, et al. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Micro*. 2014 Sep; 12 (9): 635–45. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro3330>
542. Woodmansey EJ. Intestinal bacteria and ageing. *J Appl Microbiol*. 2007; 102 (5): 1178–86. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03400.x>
543. Kovacicova G, Skorupski K. The alternative Sigma Factor $\sigma(E)$ plays an important role in intestinal survival and virulence in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*. 2002 Oct 14; 70(10): 5355–62. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC128310/>
544. Fujihashi K, Kiyono H. Mucosal immunosenescence: new developments and vaccines to control infectious diseases. *Trends Immunol*. 2016 Jun 12; 30(7): 334–43. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2009.04.004>
545. Seekatz AM, Aas J, Gessert CE, Rubin TA, Saman DM, Bakken JS, et al. Recovery of the gut microbiome following Fecal Microbiota Transplantation. *MBio*. 2014 Jul 1; 5 (3). Disponible en: <http://mbio.asm.org/content/5/3/e00893-14.abstract>
546. Vermeire S, Joossens M, Verbeke K, Hildebrand F, Machiels K, Van den Broeck K, et al. Sa1922 pilot study on the safety and efficacy of Faecal Microbiota Transplantation in refractory Crohn's Disease. *Gastroenterology*. 2016 Jun 12; 142 (5):S-360. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085\(12\)61356-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0016-5085(12)61356-0)
547. Angelberger S, Reinisch W, Makristathis A, Lichtenberger C, Dejaco C, Papay P, et al. Temporal bacterial community dynamics vary among Ulcerative Colitis patients after Fecal Microbiota Transplantation. *Am J Gastroenterol*. 2013 Oct; 108 (10): 1620–30. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ajg.2013.257>
548. Hamilton MJ, Weingarden AR, Unno T, Khoruts A, Sadowsky MJ. High-throughput DNA sequence analysis reveals stable engraftment of gut microbiota following transplantation of previously frozen fecal bacteria.

- Gut Microbes. 2013 Mar 1; 4 (2): 125–35. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3595072/>
549. Kristensen NB, Bryrup T, Allin KH, Nielsen T, Hansen TH, Pedersen O. Alterations in fecal microbiota composition by probiotic supplementation in healthy adults: a systematic review of randomized controlled trials. *Genome Med.* 2016; 8 (1): 1–11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1186/s13073-016-0300-5>
550. Kim C, Prasad V. Cancer drugs approved on the basis of a surrogate end point and subsequent overall survival: An analysis of 5 years of us Food and Drug Administration approvals. *JAMA Intern Med.* 2015 Dec 1; 175 (12): 1992–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1001/jamainternmed.2015.5868>
551. Ghoshal UC, Srivastava D, Verma A, Misra A. Slow transit constipation associated with excess methane production and its improvement following rifaximin therapy: a case report. *J Neurogastroenterol Motil.* 2011 Apr 27; 17 (2): 185–8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3093012/>
552. Pimentel M, Gunsalus RP, Rao SSC, Zhang H. Methanogens in human health and disease. *Am J Gastroenterol Suppl.* 2012 Jul; 1 (1): 28–33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/ajgsup.2012.6>
553. 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; 161 (2): 264–76. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867415002482>
554. Sobhani I, Amiot A, Le Baleur Y, Levy M, Auriault M-L, Van Nhieu JT, et al. Microbial dysbiosis and colon carcinogenesis: could colon cancer be considered a bacteria-related disease? *Therap Adv Gastroenterol.* 2013 May; 6 (3): 215–29. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3625019/>
555. Abbas Z, Afzal R. Life cycle and pathogenesis of hepatitis D virus: A review. *World J Hepatol.* 2013 Dec 27; 5 (12): 666–75. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3879688/>
556. Haahr T, Jensen JS, Thomsen L, Duus L, Rygaard K, Humaidan P. Abnormal vaginal microbiota may be associated with poor reproductive outcomes: a prospective study in IVF patients. *Hum Reprod.* 2016 Apr 1; 31 (4): 795–803. Disponible en: <http://humrep.oxfordjournals.org/content/31/4/795.abstract>
557. Brouwer MSM, Roberts AP, Hussain H, Williams RJ, Allan E, Mullany P. Horizontal gene transfer converts non-toxigenic *Clostridium difficile* strains into toxin producers. *Nat Commun.* 2013 Oct 17; 4: 2601. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3826655/>
558. Hanin A, Culligan EP, Casey PG, Bahey-El-Din M, Hill C, Gahan CGM. Two-tiered biological containment strategy for *Lactococcus lactis*-based

- vaccine or immunotherapy vectors. *Hum Vaccin Immunother.* 2014 Feb 1; 10(2): 333–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4185911/>
559. Caluwaerts S, Vandenbroucke K, Steidler L, Neiryneck S, Vanhoenacker P, Corveleyn S, et al. AG013, a mouth rinse formulation of *Lactococcus lactis* secreting human Trefoil Factor 1, provides a safe and efficacious therapeutic tool for treating oral mucositis. *Oral Oncol.* 2010; 46 (7): 564–70. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S136883751000148X>
560. Ahmad SI, Kirk SH, Eisenstark A. Thymine metabolism and thymineless death in prokaryotes and eukaryotes. *Annu Rev Microbiol.* 1998; 52 (1): 591–625. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.52.1.591>
561. Lee HC, Jenner AM, Low CS, Lee YK. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. *Res Microbiol.* 2006; 157 (9): 876–84. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0923250806001525>
562. Cardona F, Andrés-Lacueva C, Tulipani S, Tinahones FJ, Queipo-Ortuño MI. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. *J Nutr Biochem.* 2013; 24 (8): 1415–22. Disponible en: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0955286313000946>
563. Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE, et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature.* 2015 Mar 5; 519 (7541): 92–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature14232>
564. Phillips ML. Gut reaction: environmental effects on the human microbiota. *Environ Health Perspect.* 2009 May; 117 (5): A198–205. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2685866/>
565. Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature.* 2014 Oct 9; 514 (7521): 181–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/nature13793>
566. Chassard C, Delmas E, Robert C, Bernalier-Donadille A. The cellulose-degrading microbial community of the human gut varies according to the presence or absence of methanogens. *FEMS Microbiol Ecol.* 2010; 74 (1): 205–13. Disponible en: <http://femsec.oxfordjournals.org/content/74/1/205>
567. Flint HJ, Scott KP, Duncan SH, Louis P, Forano E. Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. *Gut Microbes.* 2012 Jul 1; 3 (4): 289–306. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3463488/>
568. Lyte M, Chapel A, Lyte JM, Ai Y, Proctor A, Jane J-L, et al. Resistant starch alters the microbiota-gut brain axis: implications for dietary modulation of behavior. *PLoS One.* 2016; 11 (1): 1–22. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0146406>
569. Round JL, Mazmanian SK. The gut microbiome shapes intestinal immune

- responses during health and disease. *Nat Rev Immunol*. 2009 May; 9 (5): 313–23. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4095778/>
570. Björkholm B, Bok CM, Lundin A, Rafter J, Hibberd ML, Pettersson S. Intestinal microbiota regulate xenobiotic metabolism in the liver. Bereswill S, editor. *PLoS One*. 2009 Sep 9; 4 (9):e6958. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2734986/>
571. Liu H-X, Rocha CS, Dandekar S, Yvonne Wan Y-J. Functional analysis of the relationship between intestinal microbiota and the expression of hepatic genes and pathways during the course of liver regeneration. *J Hepatol*. 2016 Jun 14; 64 (3): 641–50. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhep.2015.09.022>
572. Strong HA, Renwick AG, George CF, Liu YF, Hill MJ. The reduction of sulphinpyrazone and sulindac by intestinal bacteria. *Xenobiotica*. 1987; 17 (6): 685–96. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.3109/00498258709043976>
573. Strong HA, Warner NJ, Renwick AG, George CF. Sulindac metabolism: The importance of an intact colon. *Clin Pharmacol Ther*. 1985; 38 (4): 387–93. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/clpt.1985.192>

X - ANEXOS

ANEXO I: Impacto generado

Como se ha dicho, uno de los principales objetivos de este trabajo, enmarcado dentro del Programa de Doctorado Industrial, era el de dotarlo de la máxima visibilidad para lograr un impacto tanto a nivel industrial como regulatorio. A continuación se listan las acciones e hitos que han contribuido a la consecución de este objetivo.

- Hecho relevante (noviembre de 2014). El doctorando fue seleccionado para formar parte del Consejo de Administración y del Comité de Dirección del PRI, organización internacional centrada en los aspectos regulatorios de los microorganismos farmacológicos.
- Publicación (abril de 2015): Gosálbez, L. & Ramón, D. (2015) Probiotics in transition: Novel strategies. Trends in Biotechnology 33, 195-196.
- Contribución científica (junio de 2015). El doctorando dirigió y condujo un *webinar* titulado "Key regulatory issues for the development of pharmabiotics in Europe".
- Contribución a congreso internacional (octubre de 2015). El doctorando fue invitado a presentar parte de sus resultados en la "Pharmabiotic Conference" en París (Francia) en una sesión titulada "Regulatory status for pharmabiotics in Europe". También formó parte de la mesa redonda de expertos en aspectos regulatorios del mismo evento.
- Contribución a congreso nacional (noviembre de 2015). "Fourth International Conference and Exhibition on Probiotics, Functional and Baby Foods" en Valencia (España) en una sesión titulada "Regulatory status for pharmabiotics in Europe".
- Hecho relevante (febrero de 2016). El doctorando fue seleccionado para impartir una sesión sobre "*Microbiota, probióticos y obesidad: investigación básica y clínica*" del "Máster en obesidad y sus comorbilidades: prevención, diagnóstico y tratamiento integral" de la Universidad Rey Juan Carlos de Madrid.
- Hecho relevante (junio de 2016). El doctorando dirigió el Trabajo de Fin de Máster de un alumno del programa antes citado, titulado

"Utilización de probióticos y prebióticos en el tratamiento de la obesidad".

- Hecho relevante (junio de 2016). Selección del doctorando para formar parte del Comité Científico y Organizador de la conferencia "Microbiota Global 2017" en París (Francia).
- Actualmente dos publicaciones en fase de preparación.
- También en fase de preparación se encuentra un dossier científico sobre un desarrollo farmacéutico con un LBP oral en la indicación de psoriasis leve a moderada, para su presentación ante la EMA y la FDA.

ANEXO II: Listado completo de compañías estudiadas

Compañía	
ActoGeniX	MicroBiome Therapeutics
Alma Biotherapeutics	Miomics Bio-therapeutics
Amabiotics	MucoVax
Amrita Therapeutics	OmniBiome Therapeutics
AOBiome	OpenBiome
AssemblyBio	Optibiotix
Avaxia Biologics	Orion Integrated Biosciences
AvidBiotics	Osel
BioSpherex	ProdermIQ
C3 Jian Inc	Prokarium
Calico	Rebiotix
CIPAC Therapeutics	RespheraBio
Clinical Microbiomics	Ritter Pharmaceuticals
Dermala	Second Genome
Eligo Bioscience	Seres Health
EnBiotix	Symbiotix Biotherapies
EnteroLogics	Synlogic Therapeutics
Enterome Bioscience	Synthetic Biologics
EpiBiome	uBiome
Epiva Therapeutics	Vedanta Biosciences
Evelo Biosciences	Viropharma
Evolve Biosystems	Vithera
ExeGi	WholeBiome
GT Biologics	Xycrobe
Human Longevity	
Interfaceme	
Intralaytix	
IsoThrive	
Kallyope	
MaaT	
Metabiomics	
Metanome (Diversigen)	
Microbiome	

ANEXO III: Listado de microorganismos QPS (Presunción Cualificada de Seguridad). **Verificación de ausencia de toxicidad requerida

Reino	Género	Especie
Bacterias*	<i>Bifidobacterium</i>	<i>adolescentis</i>
		<i>animalis</i>
		<i>bifidum</i>
		<i>breve</i>
		<i>longum</i>
	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>
		<i>amylolyticus</i>
		<i>amylovorus</i>
		<i>alimentarius</i>
		<i>aviaries</i>
		<i>brevis</i>
		<i>buchneri</i>
		<i>casei</i>
		<i>cellobiosus</i>
		<i>collinoides</i>
		<i>coryniformis</i>
		<i>crispatus</i>
		<i>curvatus</i>
		<i>delbrueckii</i>
		<i>diolivorans†</i>
		<i>farciminis</i>
		<i>fermentum</i>

		<i>gallinarum</i>
		<i>gasseri</i>
		<i>helveticus</i>
		<i>hilgardii</i>
		<i>johnsonii</i>
		<i>kefiranofaciens</i>
		<i>kefiri</i>
		<i>mucosae</i>
		<i>panis</i>
		<i>paracasei</i>
		<i>paraplantarum</i>
		<i>pentosus</i>
		<i>plantarum</i>
		<i>pontis</i>
		<i>reuteri</i>
		<i>rhamnosus</i>
		<i>sakei</i>
		<i>salivarius</i>
		<i>sanfranciscensis</i>
	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>
	<i>Leuconostoc</i>	<i>citreum</i>
		<i>lactis</i>
		<i>mesenteroides</i>
		<i>pseudomesenteroides</i>

	<i>Oenococcus</i>	<i>oeni</i>
	<i>Pasteuria</i>	<i>nishizawae</i>
	<i>Pediococcus</i>	<i>acidilactici</i>
		<i>dextrinicus</i>
		<i>parvulus†</i>
		<i>pentosaceus</i>
	<i>Propionibacterium</i>	<i>acidipropionici</i>
		<i>freudenreichii</i>
	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>
	<i>Bacillus**</i>	<i>amyloliquefaciens</i>
		<i>atrophaeus</i>
		<i>clausii</i>
		<i>coagulans</i>
		<i>flexus†</i>
		<i>fusiformis</i>
		<i>lentus = Paenibacillus</i>
		<i>lentus</i>
		<i>licheniformis</i>
		<i>megaterium</i>
		<i>mojavensis</i>
		<i>pumilus</i>
		<i>subtilis</i>
	<i>vallismorti</i>	
	<i>Carnobacterium</i>	<i>divergens†</i>

	<i>Geobacillus</i> **	<i>stearothermophilus</i>
Hongos (levaduras)	<i>Debaryomyces</i>	<i>hansenii</i>
	<i>Hanseniaspora</i>	<i>uvarum</i>
	<i>Kluyveromyces</i>	<i>lactis</i>
		<i>marxianus</i>
	<i>Saccharomyces</i>	<i>boyanus</i>
		<i>cerevisiae</i> (includes <i>S. boulardii</i>)
		<i>pastorianus</i>
	<i>Schizosaccharomyces</i>	<i>pombe</i>
<i>Xanthophyllomyces</i>	<i>dendrorhous</i>	

*Sólo hay bacterias Gram positivas entre las listadas para procesos no meramente tecnológicos (como producción de enzimas, vitaminas o gomas). **Se requiere verificación de ausencia de actividad toxigénica para su empleo. *** Las bacterias *Corynebacterium glutamicum*, *Microbacterium imperiale*, *Gluconobacter oxydans* y *Xanthomonas campestris* y las levaduras *Candida cylindracea*†, *Komagataella pastoris*, *Lindnera jahnii*, *Ogataea angusta* y *Wickerhamomyces anomalus* se permiten con fines productivos de aminoácidos, vitaminas o gomas. † Microorganismos incluidos en el listado QPS entre diciembre de 2014 y junio de 2016.

ANEXO IV: Puntos 2, 3 y 4 del Anexo I de la Directiva 2001/83/CE. Transcripción de su contenido. Algunos fragmentos que se indicarán, se omitirán por corresponder a medicamentos no relacionados con los LBP o por su naturaleza meramente legal-administrativa.

“PRUEBAS QUÍMICAS, FARMACÉUTICAS Y BIOLÓGICAS DE LOS MEDICAMENTOS

[...]

A. Composición cualitativa y cuantitativa de los componentes

[...]

1. Composición cualitativa

1.1. Se entenderá por «composición cualitativa» de todos los componentes del medicamento, la designación o descripción:

- de la sustancia o sustancias activas,
- del componente o componentes del excipiente, cualquiera que sea su naturaleza o la cantidad utilizada, incluyendo los colorantes, conservantes, adyuvantes, estabilizadores, espesantes, emulsionantes, correctores del sabor, aromatizantes, etc.,
- de los componentes de la cobertura exterior de los medicamentos (cápsulas, cápsulas de gelatina, supositorios, etc.) que vayan a ser ingeridos o administrados al paciente de otra forma.

[...]

2. [...] se entenderá por «terminología usual» que debe ser empleada para la designación de los componentes del medicamento:

- cuando se trate de productos que figuren en la Farmacopea europea o, en su defecto, en la farmacopea nacional de cada Estado miembro, la denominación principal recogida en el encabezamiento de la correspondiente monografía con referencia a la farmacopea de que se trate;
- para los restantes productos, la denominación común internacional recomendada por la Organización Mundial de la Salud, que podrá ir acompañada de otra denominación común o, en su defecto, de la denominación científica exacta; los productos

que carezcan de denominación común internacional o de denominación científica exacta se designarán mediante referencia a su origen y al modo de obtención, completándose estos datos con cualquier otra observación de utilidad, si ello fuere necesario;

[...]

3. Composición cuantitativa

3.1. Para proporcionar la «composición cuantitativa» de todas las sustancias activas del medicamento, será preciso, según la forma farmacéutica, especificar la masa o el número de unidades de actividad biológica, bien sea por dosis o por unidad de masa o de volumen, de cada sustancia activa.

Las unidades de actividad biológica se emplearán en las sustancias que no pueden definirse en términos químicos. Cuando la Organización Mundial de la Salud haya definido una unidad de actividad biológica, es ésta la que deberá usarse. En los casos en los que no se haya definido una unidad internacional, las unidades de actividad biológica se expresarán de forma que proporcionen información inequívoca sobre la actividad de la sustancia.

Siempre que sea posible, se indicará la actividad biológica por unidad de masa.

[...]

4. Desarrollo farmacéutico

4.1. Se explicará la elección de la composición, los componentes y el recipiente, así como la función prevista de los excipientes en el producto acabado. Esta explicación se justificará con datos científicos relativos al desarrollo galénico. Deberá indicarse la sobredosificación en la fabricación y se dará una justificación de ello.

[...]

F. Pruebas de control del producto final

[...]

1.2. Identificación y dosificación de la sustancia o sustancias activas

La identificación y la dosificación de la sustancia o sustancias activas se efectuarán bien sobre una muestra media representativa del lote de

fabricación, bien sobre un determinado número de unidades analizadas aisladamente.

Salvo debida justificación, la desviación máxima tolerable del contenido de sustancia activa en el producto acabado no podrá ser superior a $\pm 5\%$ en el momento de fabricación.

Basándose en las pruebas de estabilidad, el fabricante deberá proponer y justificar límites de tolerancia máximos aceptables del contenido de principio activo en el producto acabado, válidos hasta la fecha de caducidad propuesta para el producto.

En ciertos casos excepcionales de mezclas particularmente complejas, en las que la determinación de las sustancias activas, muy numerosas o presentes sólo en pequeñas proporciones, requiera investigaciones igualmente complejas y difícilmente aplicables a cada lote de fabricación, podrá omitirse la determinación de una o varias sustancias activas en el producto acabado, con la condición expresa de que estas determinaciones se efectúen en fases intermedias del proceso de fabricación. Esta excepción no podrá extenderse a la caracterización de dichas sustancias. Esta técnica simplificada deberá completarse con un método de evaluación cuantitativa que permita a las autoridades competentes comprobar la adecuación a la fórmula del medicamento, después de que éste haya sido comercializado.

Si los métodos fisicoquímicos no bastan para proporcionar suficiente información sobre la calidad del producto, será obligatoria una prueba biológica *in vitro* o *in vivo*. Siempre que sea posible, en esta prueba deberán emplearse materiales de referencia y un análisis estadístico que permita calcular los límites de confianza. Cuando estas pruebas no puedan realizarse sobre el producto acabado, será admisible que se lleven a cabo en una fase intermedia, en un momento lo más avanzado posible del proceso de fabricación.

Cuando de los datos suministrados conforme a lo dispuesto en la sección B se desprenda que en la fabricación del medicamento se utiliza una sobredosis importante de una sustancia activa, la descripción de los métodos de control del producto acabado deberá incluir, en su caso, el estudio químico y, si fuera necesario, el estudio

toxicofarmacológico de la alteración sufrida por esta sustancia, con caracterización, dosificación o ambas cosas, si ha lugar, de los productos de degradación.

[...]

1.4. Pruebas de seguridad

1. Independientemente de las pruebas toxicofarmacológicas presentadas con la solicitud de autorización de comercialización, deberán figurar en el expediente analítico los pormenores de las pruebas de seguridad, por ejemplo, de esterilidad, endotoxinas bacterianas, pirógenos y tolerancia local en animales, en todos aquellos casos en que dichas pruebas deban efectuarse periódicamente para comprobar la calidad del producto.

2. Para todos los controles de medicamentos biológicos, tales como medicamentos inmunológicos o medicamentos derivados de la sangre o el plasma humanos, que no estén especificados en la Farmacopea europea o, en su defecto, en la farmacopea de un Estado miembro, servirán como directrices los procedimientos y los criterios de admisibilidad publicados como recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (Requisitos para sustancias biológicas).

3. En el caso de radiofármacos, se describirá la pureza radionucleídica, la pureza radioquímica y la actividad específica. Para el contenido de radiactividad, la desviación del valor indicado en la etiqueta no deberá ser superior a $\pm 10\%$.

[...]

G. Pruebas de estabilidad

[...]

Deberán describirse las investigaciones que hayan permitido determinar el período de validez, las condiciones recomendadas para la conservación y las especificaciones al final del período de validez que propone el solicitante.

[...]

Cuando, en el caso de medicamentos biológicos, [...] no puedan realizarse pruebas de estabilidad sobre el producto acabado, será admisible efectuar, en una fase intermedia de la producción, lo más avanzada posible dentro del

proceso de fabricación, pruebas indicadoras de la estabilidad. Además, debe haber una evaluación de la estabilidad del producto acabado, utilizando otras pruebas secundarias.

[...]

PRUEBAS TOXICOLÓGICAS Y FARMACOLÓGICAS

I. Introducción

1. Los datos y documentos que se adjunten a la solicitud de autorización conforme a lo dispuesto en la letra i) del apartado 3 del artículo 8 se presentarán con arreglo a las siguientes indicaciones.

[...]

Las pruebas toxicológicas y farmacológicas deberán poner de manifiesto:

a) la toxicidad potencial del producto y los efectos peligrosos o no deseables que pudieran producirse en seres humanos en las condiciones de uso propuestas, valorándose estos efectos en función del proceso patológico de que se trate;

b) sus propiedades farmacológicas, en relación a la posología y la actividad farmacológica con el uso indicado en seres humanos. Todos los resultados deberán ser fiables y de aplicación general. En la medida en que sea conveniente, se utilizarán procedimientos matemáticos y estadísticos para la elaboración de los métodos experimentales y la valoración de los resultados.

Además, será necesario informar a los clínicos sobre el potencial terapéutico del producto.

2. Cuando se trate de medicamentos de uso tópico, deberá estudiarse la resorción, teniendo también en cuenta la posible aplicación del producto sobre piel lesionada y la absorción a través de otras superficies pertinentes. Sólo si se comprueba que la absorción sistémica en estas condiciones es despreciable podrán omitirse las pruebas de toxicidad por administración reiterada por vía general y de toxicidad fetal, así como el estudio de la función reproductora.

Sin embargo, si las pruebas clínicas demuestran la existencia de resorción, deberán practicarse pruebas de toxicidad en animales incluyendo, cuando sea necesario, pruebas de toxicidad fetal.

En todos los casos, las pruebas de tolerancia local después de una administración reiterada deberán realizarse con especial cuidado e incluir exámenes histológicos. Deberán también investigarse las posibilidades de sensibilización, así como el posible poder cancerígeno en los casos a los que se refiere la sección E del capítulo II de la presente parte.

3. En el caso de medicamentos biológicos [...] puede ser necesario adaptar los requisitos de la presente parte para algunos productos determinados; por esta razón, el solicitante deberá justificar el programa de las pruebas.

Al fijar el programa de las pruebas, deberán tenerse en cuenta los siguientes puntos:

- todas las pruebas que requieran la administración reiterada del producto se diseñarán de modo que tengan en consideración la posible inducción de anticuerpos e interferencia por parte de éstos;
- deberá preverse un estudio de la función reproductora, de la toxicidad embrionaria, fetal y perinatal, del potencial mutágeno así como del potencial carcinógeno. Cuando los efectos sean atribuibles a componentes distintos de la sustancia o sustancias activas, el estudio podrá sustituirse por la validación de la eliminación de aquéllos.

[...]

5. Se deberá investigar la toxicología y la farmacocinética de un excipiente que se utilice por primera vez en el ámbito farmacéutico.

6. Cuando se dé la posibilidad de una degradación significativa durante el almacenamiento del medicamento, deberá tomarse en consideración la toxicología de los productos de la degradación.

II. REALIZACIÓN DE LAS PRUEBAS

A. Toxicidad

1. Toxicidad por dosis única

Una prueba de toxicidad aguda es un estudio cualitativo y cuantitativo de los fenómenos tóxicos que pueden derivarse de una administración única de la sustancia o sustancias activas contenidas en las proporciones y en el estado fisicoquímico en que están presentes en el producto en su presentación efectiva.

La prueba de toxicidad aguda deberá efectuarse con dos o más especies de mamíferos de cepa [sic] conocida, excepto cuando se pueda justificar la utilización de una sola especie. Normalmente, deberán utilizarse al menos dos vías de administración, una idéntica o similar a la prevista para su uso en el hombre y otra que garantice la exposición sistémica a la sustancia.

Dicho estudio deberá abarcar a los signos observados, incluyendo las reacciones locales. El período de observación de los animales de experimentación será determinado por el experto de manera que sea suficiente para demostrar el daño o la recuperación de los tejidos o los órganos; dicho período será generalmente de catorce días y no inferior a siete días, pero sin exponer a los animales a sufrimientos prolongados. Deberá realizarse la autopsia de los animales que mueran durante el período de observación, así como de los animales supervivientes al final del período. Deberá preverse el examen histopatológico de todos los órganos que muestren modificaciones macroscópicas en la autopsia. Se procurará obtener la máxima información a partir de los animales utilizados en el estudio.

Los ensayos de toxicidad por administración única deberán efectuarse de manera que se pongan de manifiesto los signos de toxicidad aguda y que se determinen las condiciones de la muerte en la medida de lo posible. Deberá efectuarse la evaluación cuantitativa de la dosis letal aproximada en las especies adecuadas y deberán obtenerse informaciones sobre la relación dosis-efecto; sin embargo, no se exigirá un alto nivel de precisión.

Estos estudios podrán dar indicaciones sobre los efectos probables de una sobredosificación aguda en el hombre y serán útiles para el diseño de los estudios de toxicidad por administración repetida en las especies animales adecuadas.

En caso de asociación de sustancias activas, el estudio deberá efectuarse de forma que se compruebe si hay o no aumento de la toxicidad o aparición de efectos tóxicos nuevos.

2. Toxicidad por administración continuada (toxicidad «subaguda» y «crónica»)

Las pruebas de toxicidad por administración continuada tendrán por objeto revelar las alteraciones funcionales y/o anatómo-patológicas subsiguientes a la administración repetida de la sustancia activa o de la asociación de sustancias activas y establecer las condiciones de aparición de dichas alteraciones en función de la posología.

De forma general, será conveniente realizar dos pruebas: una a corto plazo, de una duración de dos a cuatro semanas, y otra a largo plazo, cuya duración dependerá de las condiciones de aplicación clínica. Esta última prueba tendrá por objeto establecer los límites de inocuidad experimental del producto examinado y su duración habitual será de tres a seis meses.

Para los medicamentos que en el uso clínico se administren en dosis únicas, se realizará una sola prueba con una duración de dos a cuatro semanas.

Sin embargo, si, teniendo en cuenta la duración previsible de empleo en el hombre, el investigador responsable juzga conveniente llevar a cabo experimentos de duración superior o inferior a las anteriormente indicadas, deberá justificar debidamente dicha conveniencia.

El investigador deberá además justificar las dosis que elija.

Las pruebas de toxicidad por administración reiterada deberán realizarse con dos especies de mamíferos, una de las cuales no deberá pertenecer al orden de los roedores, y la elección de la vía o vías de administración deberá hacerse teniendo en cuenta las previstas en el uso terapéutico y las posibilidades de absorción sistémica. Deberá indicarse claramente la forma y frecuencia de administración.

Convendrá elegir la dosis máxima de manera que con ella se hagan aparecer los efectos nocivos, ya que de este modo las dosis menores permitirán fijar el margen de tolerancia del producto en el animal.

[...]

La valoración de los efectos tóxicos se basará en la observación del comportamiento, del crecimiento, de la fórmula sanguínea y de las pruebas funcionales, en especial de aquellas relativas a los órganos excretorios, así como en los informes de la autopsia y en los correspondientes exámenes histológicos. La elección y amplitud de

cada grupo de pruebas dependerá de la especie animal utilizada y del estado de los conocimientos científicos.

[...]

B. Estudio de la función reproductora

Si los resultados de otros experimentos efectuados manifiestan elementos que hagan suponer la existencia de efectos nocivos para la prole o alteraciones de la fertilidad masculina o femenina, deberá controlarse de manera adecuada la función reproductora.

C. Toxicidad embrionaria, fetal y perinatal

Este estudio consistirá en el examen de los fenómenos tóxicos y, especialmente, los efectos teratógenos observados en el producto de la concepción cuando el medicamento analizado haya sido administrado a la hembra en el curso de la gestación.

[...]

La no realización de estas pruebas, bien sea porque se trate de medicamentos que normalmente no usan las mujeres en edad fértil, o por cualquier otra razón, deberá justificarse de forma adecuada.

Los estudios de toxicidad embrionaria y fetal se realizarán normalmente con dos especies de mamíferos, una de las cuales deberá no ser un roedor. Los estudios peri y posnatales se llevarán a cabo con al menos una especie. Cuando se sepa que el metabolismo de un medicamento en una determinada especie es similar al del hombre, es deseable incluir esa especie. También es deseable que una de las especies sea la misma que la de los estudios de toxicidad por administración continuada.

Los detalles del experimento (número de animales, cantidades administradas, momento de administración y criterios para la valoración de los resultados) dependerán del estado de los conocimientos científicos en el momento en que se presente la solicitud y del nivel de significación estadística que deban alcanzar los resultados.

D. Potencial mutágeno

El estudio del potencial mutágeno tendrá por objeto revelar los cambios ocasionados por una sustancia en el material genético de individuos o de células que tengan por efecto hacer diferentes a los sucesores, de manera

permanente y hereditaria, de sus predecesores. Dicho estudio será obligatorio para cualquier sustancia nueva.

El número y los tipos de resultados, así como los criterios de evaluación, se determinarán teniendo en cuenta el estado de los conocimientos científicos en el momento de presentarse la solicitud.

E. Potencial cancerígeno

[...]

F. Farmacodinámica

Se entiende por farmacodinámica el estudio de las variaciones provocadas por el medicamento en las funciones de los sistemas fisiológicos, tanto si son normales como si son modificadas experimentalmente.

Este estudio deberá efectuarse siguiendo dos planteamientos distintos.

En primer lugar, se describirán de manera adecuada las acciones en que se basan las aplicaciones terapéuticas recomendadas, expresando los resultados de forma cuantitativa (curvas dosis-efecto, tiempo-efecto u otras) y, en la medida de lo posible, comparándolos con los de un producto cuya actividad se conozca. En el caso de que se presente un producto que posea un coeficiente terapéutico superior, deberá demostrarse la diferencia con ayuda de límites de confianza.

Por otra parte, el investigador suministrará una caracterización farmacológica general del producto con especial referencia a la posibilidad de reacciones adversas. En general, deberán examinarse las principales funciones de los sistemas fisiológicos, y este examen deberá ser tanto más profundo cuanto más se aproximen las dosis que puedan provocar reacciones adversas a aquellos que determinan las acciones principales para las que se prescribe el producto.

[...]

G. Farmacocinética

Se entiende por farmacocinética el conjunto de procesos que sufre el producto en el organismo. La farmacocinética comprende el estudio de la absorción, la distribución, la biotransformación y la excreción de la sustancia.

El estudio de estas distintas fases se puede llevar a cabo con métodos físicos, químicos o biológicos, y por la observación de la actividad farmacodinámica real del producto.

Los datos referentes a la distribución y eliminación (es decir, la biotransformación y la excreción) serán necesarios en todos los casos en que dichos datos resulten indispensables para determinar las dosis administrables a seres humanos, así como en los productos quimioterapéuticos (antibióticos, etc.) y en las sustancias cuyo uso se base en efectos no farmacodinámicos (por ejemplo, numerosos agentes de diagnóstico, etc.).

Para las sustancias farmacológicamente activas, es necesario el estudio farmacocinético.

[...]

I. Uso médico suficientemente comprobado

A efectos de demostrar, con arreglo al inciso ii) de la letra a) del apartado 1 del artículo 10, que los componentes de un medicamento tienen un uso suficientemente comprobado, con un nivel aceptable de seguridad, se utilizarán las siguientes reglas específicas:

- a) Los factores que se deberán tener en cuenta para demostrar que el uso médico de los componentes de un medicamento está suficientemente comprobado serán: el tiempo durante el cual se haya utilizado una sustancia, los aspectos cuantitativos y el grado de interés científico del uso de dicha sustancia (reflejado en la literatura científica publicada) y la coherencia de las evaluaciones científicas. Por tanto, pueden ser necesarios periodos de tiempo diferentes a fin de establecer el uso médico suficientemente comprobado de las diferentes sustancias. En todo caso, el período de tiempo necesario para establecer que un componente de un medicamento tiene un uso médico suficientemente comprobado no podrá ser inferior a diez años, contados a partir de la primera aplicación sistemática y documentada de esa sustancia utilizada como medicamento en el interior de la Comunidad.
- b) La documentación presentada por el solicitante deberá abarcar todos los aspectos de la evaluación de la seguridad e incluir o hacer

referencia a un estudio bibliográfico pertinente, que tenga en cuenta los estudios previos y posteriores a la comercialización y la literatura científica publicada relativa a la experimentación en forma de estudios epidemiológicos y, en particular, de estudios epidemiológicos comparativos. Deberán comunicarse todos los documentos existentes, tanto favorables como desfavorables.

c) Se prestará atención particular a los datos que falten y se justificará por que puede afirmarse la existencia de un nivel aceptable de seguridad, pese a la ausencia de determinados estudios.

d) El informe de los expertos deberá explicar la pertinencia de todos los datos presentados relativos a un producto diferente de aquél que será comercializado. Se deberá apreciar si el producto examinado puede considerarse similar al producto al que se concederá la autorización de comercialización a pesar de las diferencias existentes.

e) La experiencia posterior a la comercialización de otros productos que contengan los mismos componentes revestirá particular importancia y los solicitantes deberán insistir especialmente en este aspecto.

DOCUMENTACIÓN CLÍNICA

Los datos y documentos que deberán adjuntarse a la solicitud de autorización, según lo dispuesto en la letra i) del apartado 3 del artículo 8 y en el apartado 1 del artículo 10, se presentarán de conformidad con lo dispuesto a continuación.

Por ensayo clínico se entenderá todo estudio sistemático de medicamentos en sujetos humanos, en voluntarios sanos o enfermos, cuyo fin sea descubrir o verificar los efectos y/o determinar cualquier reacción adversa a los productos que se investigan, y/o estudiar su absorción, distribución, metabolismo y excreción para determinar la eficacia y seguridad de los medicamentos.

La valoración de la solicitud de autorización de comercialización se basará en los ensayos clínicos, incluidos los ensayos farmacológicos clínicos, destinados a determinar la eficacia y la seguridad del producto en sus condiciones normales de uso, tomando en consideración sus indicaciones

terapéuticas en seres humanos. Las ventajas terapéuticas deberán superar los riesgos potenciales.

[...]

D. Farmacología clínica

1. Farmacodinámica

Deberá demostrarse la acción farmacodinámica correlacionada con la eficacia, incluyendo:

- la relación dosis-respuesta y su curso temporal,
- la justificación de la posología y las condiciones de administración,
- cuando sea posible, el modo de acción.

Se describirá la acción farmacodinámica no relacionada con la eficacia.

La demostración de efectos farmacodinámicos en seres humanos no bastará por sí misma para establecer conclusiones en cuanto a un posible efecto terapéutico.

2. Farmacocinética

Se describirán las siguientes características farmacocinéticas:

- absorción (velocidad y magnitud),
- distribución,
- metabolismo,
- excreción.

Deberán describirse los aspectos significativos desde el punto de vista clínico, incluyendo la implicación de los datos cinéticos para el régimen de dosificación, especialmente para los pacientes de riesgo, y las diferencias entre el hombre y las especies animales utilizadas en los estudios preclínicos.

3. Interacciones

Cuando el medicamento vaya a administrarse, de forma habitual, simultáneamente con otros medicamentos, deberán proporcionarse datos sobre los ensayos que se hayan efectuado de administración conjunta, para descubrir posibles modificaciones de la acción farmacológica.

Si existen interacciones farmacodinámicas o farmacocinéticas entre la sustancia y otros medicamentos o sustancias tales como el alcohol, la cafeína, el tabaco o la nicotina, cuya ingestión simultánea resulta

probable, o si dichas interacciones resultan verosímiles, éstas deberán describirse y comentarse, especialmente desde el punto de vista de la importancia clínica y de la relación con la declaración de las interacciones médicas en el resumen de las características del producto que debe presentarse con arreglo al punto 5.6 del artículo 11.

E. Biodisponibilidad/bioequivalencia

Deberá realizarse una evaluación de la biodisponibilidad siempre que sea necesario, por ejemplo cuando la dosis terapéutica sea cercana a la dosis tóxica o cuando las pruebas anteriores hayan revelado anomalías que puedan estar relacionadas con propiedades farmacodinámicas, como la absorción variable.

Además, deberá evaluarse la biodisponibilidad cuando sea necesario para demostrar la bioequivalencia de los medicamentos a los que se refiere la letra a) del apartado 1 del artículo 10.

F. Eficacia y seguridad clínicas

1. En general, los ensayos clínicos se efectuarán bajo la forma de ensayos clínicos controlados, aleatorizados siempre que sea posible; cualquier otro diseño deberá justificarse. El tratamiento asignado al grupo control variará según los casos y dependerá también de consideraciones éticas. En este sentido, en ocasiones puede resultar más conveniente comparar la eficacia de un nuevo medicamento con el efecto de un medicamento conocido, cuyo valor terapéutico esté bien establecido, y no con el efecto de un placebo.

En la medida de lo posible, y muy especialmente cuando el parámetro de evaluación es de apreciación subjetiva, se tomarán medidas para evitar un sesgo, incluyendo métodos de aleatorización y métodos ciegos (de doble ciego).

[...]

En el caso de vacunas vivas atenuadas, los ensayos clínicos se diseñarán de modo que revelen la posibilidad de transmisión del agente inmunizante de un sujeto vacunado a otro no vacunado. Cuando sea posible la transmisión, deberá estudiarse la estabilidad genotípica y fenotípica del agente inmunizante.

Los estudios de control para vacunas y alergenos incluirán pruebas inmunológicas adecuadas y, en su caso, la determinación de anticuerpos.

[...]

G. Documentación para las solicitudes de autorización en circunstancias excepcionales

[...]

I. Uso médico suficientemente comprobado

A efectos de demostrar, con arreglo al inciso ii) de la letra a) del apartado 1 del artículo 10, que los componentes de un medicamento tienen un uso suficientemente comprobado, con una eficacia reconocida, se utilizarán las siguientes reglas específicas:

a) Los factores que se deberán tener en cuenta para demostrar que el uso médico de los componentes de un medicamento está suficientemente comprobado serán: el tiempo durante el cual se haya utilizado una sustancia, los aspectos cuantitativos y el grado de interés científico del uso de dicha sustancia (reflejado en la literatura científica publicada) y la coherencia de las evaluaciones científicas. Por tanto, pueden ser necesarios periodos de tiempo diferentes a fin de establecer el uso médico suficientemente comprobado de las diferentes sustancias. En todo caso, el período de tiempo necesario para establecer que un componente de un medicamento tiene un uso médico suficientemente comprobado no podrá ser inferior a diez años, contados a partir de la primera aplicación sistemática y documentada de esa sustancia utilizada como medicamento en el interior de la Comunidad.

b) La documentación presentada por el solicitante deberá abarcar todos los aspectos de la eficacia e incluir o hacer referencia a un estudio bibliográfico pertinente, que tenga en cuenta los estudios previos y posteriores a la comercialización y la literatura científica publicada relativa a la experimentación en forma de estudios epidemiológicos y, en particular, de estudios epidemiológicos comparativos. Deberán comunicarse todos los documentos existentes, tanto favorables como desfavorables.

c) Se prestará atención particular a los datos que falten y se justificará por que puede defenderse la eficacia del producto, pese a la ausencia de determinados estudios.

- d) El informe de los expertos deberá explicar la pertinencia de todos los datos presentados relativos a un producto diferente de aquél que será comercializado. Se deberá apreciar si el producto examinado puede considerarse similar al producto al que se concederá la autorización de comercialización a pesar de las diferencias existentes.
- e) La experiencia posterior a la comercialización de otros productos que contengan los mismos componentes revestirá particular importancia y los solicitantes deberán insistir especialmente en este aspecto”.

