



REPORTE CIENTIFICO SOBRE EL COMPLEMENTO ALIMENTICIO “VR6 PROBIOTICO”

Prof Dr Javier Morán

Catedrático de Innovación Alimentaria, Director del Instituto Universitario de Innovación Alimentaria en la UCAM-Universidad Católica de Murcia. Profesor Titular excedente del Instituto Nacional de Salud Pública de México y Profesor Visitante en las Universidades ISalud de Buenos Aires-Argentina, USIL de Lima-Perú e IFFE Business School.

INTRODUCCION

Tanto la piel como el intestino son órganos inmunológicos y neuroendocrinos activos y complejos que están expuestos al entorno exterior con frecuencia y albergan una amplia gama de microbiomas. La piel y el intestino deben funcionar adecuadamente para permitir que los organismos mantengan la homeostasis y sobrevivan. En particular, la piel es el órgano más grande del cuerpo y sirve como una obstrucción defensiva contra lesiones y ataques microbianos. El intestino, por otro lado, consta de billones de comunidades microbianas, siendo reconocido como un órgano virtual estrechamente asociado con la salud y la longevidad del huésped. El microbioma intestinal tiene impactos tanto beneficiosos como adversos en la fisiología normal y la homeostasis de los tejidos intestinales y de la piel¹.

Las tres funciones más esenciales que desempeña el microbioma intestinal desde el nacimiento son la protección, el suministro de actividades metabólicas y el desarrollo y la regulación del sistema inmunitario. Al comienzo de la vida, las comunidades microbianas intestinales tienen un papel en la defensa del huésped contra los organismos patógenos. A lo largo de la vida, brindan servicios metabólicos, como la digestión de la leche materna y otros alimentos. Los miembros del microbioma ayudan en la degradación de toxinas y fármacos y en la biosíntesis de vitaminas. Se considera que el intestino se encuentra en un estado de simbiosis, porque está poblado por un grupo diverso de microorganismos y el huésped tolera estas bacterias comensales y los antígenos benignos asociados. La capacidad del sistema inmunitario para generar tolerancia a los antígenos benignos se construye a través de la ontogenia y la reducción de las respuestas inflamatorias dependientes del microbioma. Sin embargo, cualquier alteración en la diversidad microbiana intestinal (disbiosis) puede

¹ Ellis SR, Nguyen M, Vaughn AR, Notay M, Burney WA, Sandhu S, Sivamani RK. The skin and gut microbiome and its role in common dermatologic conditions. *Microorganisms*. 2019;7(11):550.

Prof Dr Javier Morán

Full Professor and Director at Food innovation Institute at UCAM-Catholic University of Murcia.

jmoran@sat.ucam.edu - www.ucam.edu

umentar la vulnerabilidad del huésped y alterar la tolerancia inmunológica de la mucosa, lo que posteriormente puede influir en la salud de la piel².

Varias afecciones dermatológicas, como el acné, la dermatitis atópica, la psoriasis y la rosácea, están relacionadas con la disbiosis intestinal. Muchos estudios han asociado la salud gastrointestinal con la homeostasis y la alostasis de la piel, y existe evidencia de una interacción bidireccional entre el intestino y la piel. Los miembros del microbioma intestinal pueden influir en las condiciones de la piel a través de su actividad metabólica e impacto inmunológico³.

La dieta y los probióticos tienen un enorme impacto en la composición y las actividades metabólicas del microbioma intestinal, lo que posteriormente afecta la piel. Anteriormente, Polkowska-Pruszyńska et al⁴., 15 han discutido cómo los cambios en las comunidades microbianas intestinales podrían desencadenar una respuesta inmunológica, dando como resultado alergias, acné vulgar, dermatitis atópica, alopecia areata, rosácea, hidradenitis supurativa) y otras enfermedades de la piel. De Pessemier et al⁵., demostraron recientemente una asociación entre los productos dietéticos y la disbiosis de la piel en su investigación.

ECOLOGÍA MICROBIANA DE LA PIEL Y EL INTESTINO

Dado que la composición del microbioma humano varía significativamente entre individuos y contribuye tanto positiva como negativamente a la inmunidad del huésped, es necesaria una amplia comprensión de la ecología microbiana de los humanos. Los humanos adquieren un microbioma materno principalmente del canal de parto y la comunidad microbiana cambia con el tiempo. La piel, los tejidos orales, las vías respiratorias, el intestino y la vagina generalmente albergan cientos de géneros y especies microbianos a diferencia de otros tejidos y órganos⁶.

La piel es el órgano más grande del cuerpo humano y proporciona múltiples nichos para la colonización de diversas comunidades microbianas, como el estrato córneo, los folículos pilosos y las glándulas sebáceas. La piel actúa como el límite entre el entorno externo e interno del cuerpo humano, y el microbioma de la piel es una interfaz que contribuye a la inmunidad humana. Los métodos independientes del cultivo han revelado que la piel humana sana alberga >1.000 especies bacterianas, principalmente dentro de los géneros *Brevibacterium*, *Propionibacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Corynebacterium*, y *Malassezia* es el principal género fúngico. Las comunidades microbianas normales de la piel pueden interactuar con el huésped tanto de forma comensal como parasitaria⁷.

² Malard F, Dore J, Gaugler B, Mohty M. Introduction to host microbiome symbiosis in health and disease. *Mucosal Immunol.* 2020;14(3):547–554.

³ Salem I, Ramser A, Isham N, Ghannoum MA. The gut microbiome as a major regulator of the gut-skin axis. *Front Microbiol.* 2018;9:1459.

⁴ Polkowska-Pruszyńska B, Gerkowicz A, Krasowska D. The gut microbiome alterations in allergic and inflammatory skin diseases – an update. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2019;34(3):455–464.

⁵ De Pessemier B, Grine L, Debaere M, Maes A, Paetzold B, Callewaert C. Gut–skin axis: current knowledge of the interrelationship between microbial dysbiosis and skin conditions. *Microorganisms.* 2021;9(2):353.

⁶ Godoy-Vitorino F. Human microbial ecology and the rising new medicine. *Ann Transl Med.* 2019;7(14):342.

⁷ Cundell AM. Microbial ecology of the human skin. *Microb Ecol.* 2016;76(1):113–120.

Varios estudios han destacado los factores predominantes que contribuyen al ecosistema del microbioma de la piel humana. Varias regiones de la piel con características versátiles, como sitios secos (antebrazo volar, glúteos, palma hipotenar), sitios húmedos (bóveda axilar, fosa antecubital, pliegue inguinal, ombligo) y sitios grasos (glabella, pliegue alar, occipucio, manubrio) difieren entre sí en función de la composición microbiana⁸.

La ecología de los microbios intestinales se ha estudiado ampliamente durante décadas, ya que el tracto gastrointestinal (GI) humano es uno de los sistemas más complejos del cuerpo humano. El sistema gastrointestinal parte de la cavidad oral y termina en el ano después de pasar por el estómago y los intestinos. El tracto gastrointestinal se considera más rico en microbios que cualquier otro órgano del cuerpo humano y tiene la mayor diversidad de microorganismos. Hasta 10^{13} células microbianas, pertenecientes a los tres dominios de la vida (Bacterias, Archaea y Eukarya), y virus, comprenden la comunidad microbiana del tracto GI. La diversidad microbiana en el intestino varía entre los individuos. Según la composición química y el estado físico, el tracto gastrointestinal se puede dividir en distintas secciones. La porción superior del tracto GI, el estómago y el intestino delgado tienen números comparativamente bajos de bacterias (10^3 a 10^4 células en total) debido al bajo pH y al período de transición más corto. El colon es la región más colonizada del tracto GI, donde reside una estimación de 10^{10} a 10^{11} células bacterianas. El intestino puede albergar 1.000 especies bacterianas diferentes pertenecientes a filos como Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Tenericutes, Spirochaetes, Cyanobacteria y Saccharibacteria⁹.

La diversidad fúngica, por el contrario, es relativamente limitada en el intestino humano. La pirosecuenciación ha revelado casi 66 géneros de hongos de 98 individuos humanos; los géneros fúngicos predominantes son *Saccharomyces*, *Candida* y *Cladosporium*. La abundancia de hongos como *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium* y *Cryptococcus* en el intestino puede tener un efecto patógeno en el huésped. Entre Archaea, los géneros predominantes en el intestino humano son *Methanobrevibacter*, *Methanosphaera*, *Nitrososphaera*, *Thermogymnomonas* y termoplasma. Los virus y los fagos, por otro lado, pueden actuar como reservorios de material genético en el intestino y destruir las células microbianas¹⁰.

La comunicación entre el intestino y la piel se produce a través de las actividades de los componentes inmunológicos que están presentes entre el intestino y la piel. La regulación de la interacción del huésped con la microbiota es una función fundamental del sistema inmunitario, por lo que las regiones colonizadas por comensales, como la piel y el tracto gastrointestinal, encierran el volumen sustancial de células inmunitarias en el cuerpo. A través de la actividad dominante en el sistema inmunológico, las comunidades microbianas comensales juegan un papel importante en el aumento de la inmunidad de barrera junto con su propio confinamiento para salvaguardar su nicho ecológico. Reducir el contacto entre los microorganismos y la membrana epitelial intestinal para minimizar las respuestas inflamatorias y la translocación microbiana es crucial para preservar el equilibrio homeostático del huésped. Para lograr esta segregación, se establece una barrera de células epiteliales intestinales, una capa de moco, las células T y la IgA. El cortafuegos de la mucosa limita la translocación de bacterias comensales a los tejidos linfoides, previniendo la inflamación del intestino y la piel. Estos tejidos linfoides generalmente se conocen como tejidos linfoides asociados al intestino (GALT). Los GALT suelen ser tejidos linfoides asociados a la mucosa (MALT) que funcionan como una barrera entre el

⁸ Grice EA, Kong HH, Conlan S, Deming CB, Davis J, Young AC, Bouffard GG, Blakesley RW, Murray PR, Green ED, et al. Topographical and temporal diversity of the human skin microbiome. *Science*. 2009;324(5931):1190–1192.

⁹ Hillman ET, Lu H, Yao T, Nakatsu CH. Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes and Environ*. 2017;32(4):300–313.

¹⁰ Camp JG, Kanther M, Semova I, Rawls JF. Patterns and scales in gastrointestinal microbial ecology. *Gastroenterology*. 2009;136(6):1989–2002.

huésped y el medio ambiente. Los GALT se componen de células microplásticas (células M), que han evolucionado hasta convertirse en fagocitosas y transcitosis (un proceso a través del cual las partículas se transportan a través de la barrera mucosa hacia la lámina propia a través de vías celulares únicas), macromoléculas de la luz intestinal, antígenos particulados y sustancias dañinas o nocivas. bacterias comensales a través del epitelio (figura 3). 60, 61 Junto con las células M, los linfocitos convencionales (células T reguladoras (Treg), células T colaboradoras (células Th), linfocitos T citotóxicos, células B productoras de IgA) y fagocitos profesionales (CD, mastocitos, neutrófilos y macrófagos) y los linfocitos no convencionales, como las células linfoides innatas (ILC) y las células T invariantes asociadas a la mucosa (MAIT), también son constituyentes de los GALT. Además, los estudios indican que la microbiota intestinal está detrás del mecanismo de desarrollo fundamental de los GALT. Las placas de Peyer, las células de las criptas del epitelio intestinal, los folículos linfoides aislados (ILF) del intestino, el apéndice y los ganglios linfáticos mesentéricos (mLN) son los componentes histológicos más comunes de los GALT. La célula inductora de tejido linfóide (LTi) de tipo de célula hematopoyética y su interacción con la colonización microbiana intestinal controlan la formación de órganos linfoides secundarios intestinales¹¹.

Tanto los linfocitos convencionales como los fagocitos profesionales secretan péptidos antimicrobianos (AMP) para el mantenimiento de la homeostasis. Los AMP son compuestos en evolución intrincados producidos por células epiteliales intestinales, células paneth y células inmunológicas en el tracto digestivo). Los AMP, como las defensinas α y β , son secretadas por tipos de células inmunitarias localizadas, a saber, macrófagos, células T, células B y mastocitos (MC). Además, los MC pueden producir la catelicidina AMP y contribuir a la homeostasis del microbioma-tejido en la dermis. Los patógenos o sus componentes pueden unirse directamente a los TLR, los receptores similares a (NOD) (NLR) y los receptores similares a (RIG-I) (RLR) y activar los receptores del complemento de las MC, liberando posteriormente mediadores inflamatorios, que ayudan en la inmunidad antimicrobiana. Mediante la expresión de moléculas coestimuladoras y la secreción de citoquinas inflamatorias, TLR4 provoca respuestas innatas. Un estudio en un modelo de ratón comprobó que los TLR generalmente funcionan como receptores de reconocimiento de patrones (PRR) con la capacidad de reconocer una amplia gama de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), incluidas proteínas, lipoproteínas, lípidos, ácidos nucleicos y glicanos y ayudar al inicio de la inmunidad innata. El desarrollo de ILF ocurre tan pronto como los PRR reconocen los PAMP de las bacterias entéricas y activan las vías de señalización aguas abajo. Se pueden producir varios AMP, como REGIII β y REGIII γ , como resultado del cebado del parche de Peyer por las vías de TLR. Por otro lado, la infección bacteriana entérica puede ocurrir debido a la inhibición de la vía TLR¹².

Como células presentadoras de antígenos, las CD desempeñan un papel importante en la producción de proteínas de uniones estrechas y en la extensión de las dendritas hacia la luz a través de las uniones. A través de la adherencia al C-X3-C Motif Chemokine Receptor 1 (CX3CR1), las CD dan lugar a la formación de dendritas transepiteliales y al suministro de antígenos para el muestreo. Las CD también son capaces de formar dendritas transepiteliales y fagocitar patógenos entéricos invasivos¹³.

Las ILC desempeñan un papel fundamental en la inmunidad, la homeostasis y la inflamación en varios tejidos, incluidos el intestino, los pulmones, la piel, el hígado, el tejido adiposo y los ganglios linfáticos mesentéricos.

¹¹ Canny GO, McCormick BA. Bacteria in the intestine, helpful residents or enemies from within? *Infect Immun*. 2008;76(8):3360–3373.

¹² Lunjani N, Ahearn-Ford S, Dube FS, Hlela C, O'Mahony L. Mechanisms of microbe-immune system dialogue within the skin. *Genes Immun*. 2021;22(5–6):276–288.

¹³ Kawai T, Akira S. The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition. *Int Immunol*. 2009;21(4):317–337.

Las ILC se clasifican en tres grupos según el proceso de desarrollo, la expresión del factor de transcripción y los perfiles de secreción de las interleucinas (IL)-17A, IL-17 F, IL-22 y GM-CSF, a saber, ILC1, ILC2 y ILC3, que son las contrapartes innatas de las células T auxiliares, Th1, Th2 y Th17, respectivamente. Entre los subconjuntos de ILC auxiliares, ILC1 tiene una frecuencia comparativamente baja en el intestino fetal, ya que el microbioma intestinal no está establecido. Esto indica que el desarrollo de ILC1 depende de las bacterias comensales. Las células Th1 y las ILC1 erradican virus, bacterias o protozoos del cuerpo mediante la producción de IFN- γ . Las células Th2 e ILC2, que producen IL-5 e IL-13, respectivamente, están detrás del desarrollo de alergias y ayudan en la eliminación de helmintos. Las células ILC3 y Th17 también contribuyen a la autoinmunidad mediante la secreción de IL-17 e IL-22, respectivamente, que brindan protección contra infecciones fúngicas y bacterianas extracelulares¹⁴.

Mientras tanto, el subgrupo más común de células T que pueden identificar partículas bacterianas son las células T invariantes asociadas a la mucosa (MAIT), también conocidas como células T conservadas evolutivamente. Las células MAIT juegan un papel crucial en la eliminación de infecciones bacterianas del cuerpo, y también se ha informado su papel en la defensa contra infecciones virales. Las células MAIT detectan antígenos a través de la proteína génica relacionada con el complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MR1), una proteína expresada predominantemente por las células B. Cuando las células MAIT entran en contacto con una variedad de bacterias, responden detectando los productos de la vía de biosíntesis de la vitamina B2 a través del reconocimiento del receptor de células T (TCR)¹⁵.

La interrupción de la integridad intestinal y un desequilibrio dentro de las comunidades microbianas pueden tener un impacto significativo en la homeostasis general de la piel. El eje intestino-piel es un término utilizado para la intrincada interacción entre el intestino y la piel. El microbioma intestinal interactúa con la piel en gran medida para controlar la inflamación sistémica y local al interactuar con el sistema inmunitario. Las comunidades microbianas mantienen la integridad de la barrera intestinal principalmente mediante la conversión de polisacáridos complejos no digeribles en vitaminas (específicamente K y B12) y AGCC (específicamente butirato y propionato). Por ejemplo, el butirato disminuye la permeabilidad de la barrera intestinal y mejora la integridad de la barrera epitelial. La capa de moco del intestino actúa como la barrera principal y evita la reubicación microbiana en otros tejidos del huésped. La defensa de la mucosa intestinal la proporcionan las células inmunitarias innatas de GALT que reconocen infecciones no específicas y activan tanto el sistema inmunitario innato como el adaptativo al presentar esos antígenos. Los AMP, los macrófagos y las DC CD103 + CD11b + limitan principalmente la translocación de los microbios patógenos al eliminarlos. Las defensinas actúan contra las bacterias generando poros en sus membranas. Esto da como resultado la muerte celular si se exceden los umbrales apropiados. Las catelicidinas (LL-37 en humanos) ayudan a mantener intacta la barrera epitelial. Si bien su principal mecanismo de acción es romper las membranas bacterianas, también poseen efectos inmunomoduladores. La producción mejorada de proteínas de unión estrecha, así como los efectos postraduccionales, como el reposicionamiento de la unión estrecha, son los principales responsables del mantenimiento de la integridad de la barrera epitelial intestinal. Como resultado, las catelicidinas se emplean predominantemente cuando se rompe la barrera epitelial. La diferenciación de Tregs específicos de bacterias comensales intestinales, células B productoras de IgA y células Th17 son los resultados de la presentación de antígenos comensales por parte de las CD. Las CD establecen la especificidad de las células CD4+ Th17 hacia los microbios comensales como resultado de la presentación del antígeno del

¹⁴ Zheng M, Zhu J. Innate lymphoid cells and intestinal inflammatory disorders. *Int J Mol Sci.* 2022;23(3):1856.

¹⁵ Legoux F, Salou M, Lantz O. MAIT cell development and functions: the microbial connection. *Immunity ScienceDirect.* 2020. October 13;53(4):710–723.

complejo mayor de histocompatibilidad II (MHCII). Las células CD4+ Th17 producen la citocina interleucina 22 (IL-22), que aumenta la secreción de AMP del huésped. La integridad de la barrera intestinal junto con la acción de la mucosidad, las células inmunitarias, la IgA y los péptidos antimicrobianos (AMP) producidos por las células epiteliales impiden la entrada de bacterias intestinales en el torrente sanguíneo y, en última instancia, mantienen la homeostasis de la piel. Especialmente, la IgA secretora controla las respuestas inflamatorias contra los microbios intestinales al disociar espacialmente el tejido del huésped y los microbios intestinales. Los linfocitos específicos de bacterias comensales se acumulan en las placas de Peyer y la lámina propia del intestino, lo que da forma al perfil microbiano intestinal hacia el equilibrio homeostático. La promoción del cambio de clase por Tregs y la producción de IgA contra las bacterias comensales tiene lugar en las placas de Peyer del intestino. Sin embargo, el vínculo entre la salud de la piel y las respuestas inmunológicas causadas por el microbioma intestinal aún no está claro y requiere más investigación¹⁶.

En la primera parte del siglo XX, los dermatólogos Stokes y Pillsbury fueron los primeros en sugerir que el intestino y la piel se comunican con el cerebro. El GABA, la acetilcolina, la dopamina y la serotonina se encuentran entre los neurotransmisores producidos por los microbios intestinales. Estos neurotransmisores pueden modular la función de la piel a través del sistema nervioso y también pueden crear efectos sistémicos al ingresar al torrente sanguíneo a través del epitelio intestinal e incluso efectos negativos, por ejemplo, la dopamina puede inhibir el crecimiento del cabello al estimular la inducción catágena¹⁷.

Los antibióticos, prebióticos, probióticos, estilos de vida, dietas a largo plazo y enfermedades pueden influir en el microbioma intestinal. Además, los cambios en las principales cepas del microbioma intestinal pueden ocurrir a medida que las personas envejecen. La inflamación de la piel también puede resultar de cambios mínimos en una sola especie bacteriana del microbioma intestinal. Estos, a su vez, pueden conducir a enfermedades, por ejemplo, acné, alopecia areata, dermatitis atópica, psoriasis, rosácea e hidradenitis supurativa¹⁸.

Los probióticos son organismos vivos que, cuando se consumen en proporciones suficientes, confieren beneficios para la salud. Se pueden formular, por ejemplo, como alimentos, fármacos y suplementos dietéticos. Los probióticos pueden prevenir la colonización intestinal por parte de patógenos y respaldar las respuestas antiinflamatorias mediante la producción de metabolitos con propiedades antiinflamatorias. Los microbios probióticos más comunes actualmente en uso pertenecen a los géneros *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Saccharomyces* y *Streptococcus*. Se han demostrado varios efectos beneficiosos del consumo de probióticos en muchas afecciones dermatológicas, lo que demuestra la existencia del eje intestino-piel. Por ejemplo, se informó sensibilidad de la piel y restauración significativa de la función de barrera de la piel en individuos después de la administración oral diaria de *Lactobacillus paracasei*. En un estudio realizado en ratones, la adición de *Lactobacillus reuteri* al agua potable dio como resultado una mejora del grosor de la epidermis, un aumento de la foliculogénesis, un pH más bajo de la piel y una mayor producción de células epiteliales productoras de sebo. En consecuencia, los ratones a los que se les suministró el agua suplementada tenían un pelaje más brillante y más grueso que los que no recibieron el probiótico. En otro experimento, la administración de *Lactobacillus johnsonii* en ratones mostró un efecto terapéutico al restaurar el daño de la piel después de la exposición a la radiación UV. También se ha demostrado el papel beneficioso de los probióticos en la prevención de enfermedades dermatológicas. Por ejemplo, la administración de la cepa

¹⁶ Wu HJ, Wu E. The role of gut microbiota in immune homeostasis and autoimmunity. *Gut Microbes*. 2012;3(1):4–14.

¹⁷ Arck P, Handjiski B, Hagen E, Pincus M, Bruenahl C, Bienenstock J, Paus R. Is there a 'gut-brain-skin axis'? *Exp Dermatol*. 2010;19(5):401–405.

¹⁸ Tojo R. Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol*. 2014;20(41):15163.

Nissle de *E. coli* mejoró la salud de la piel en pacientes con acné vulgar. La doxiciclina y los probióticos administrados por vía oral fueron efectivos en un estudio en pacientes que padecían rosácea. En otro estudio, *Lactobacillus sakei* disminuyó la probabilidad de desarrollar dermatitis atópica a lo largo del período posnatal en ratones WIKIM30. Los ratones que recibieron probióticos exhibieron una composición microbiana intestinal alterada junto con lesiones cutáneas mejoradas debido a la inducción de Tregs. El riesgo de desarrollar dermatitis atópica también se encontró considerablemente menor en los niños que tomaron suplementos de probióticos en el período de vida posneonatal¹⁹.

DISBIOSIS INTESTINAL Y ALOPECIA

Estudios recientes indican una asociación entre la disbiosis en el intestino y enfermedades de la piel, como la psoriasis y la dermatitis atópica. Los ratones libres de gérmenes (GF) deficientes en biotina desarrollan alopecia, lo que no ocurre en los ratones convencionales, lo que sugiere que la microbiota desempeña un papel fundamental en el metabolismo de la biotina.

La microbiota intestinal influye en la fisiopatología de los tejidos extraintestinales, incluida la piel. Aquí, demostramos que la disbiosis intestinal, inducida por el tratamiento con ciertos antibióticos, perjudicó la biosíntesis de biotina por parte de la microbiota intestinal. Aunque la reducción de la síntesis de biotina por parte de la microbiota intestinal no fue inmediatamente patógena si la biotina se complementó con fuentes dietéticas, la falta de biotina en la dieta en ratones disbióticos tratados con antibióticos condujo a una deficiencia sistémica de biotina, lo que resultó en el desarrollo de alopecia.

La microbiota intestinal sintetiza y suministra muchas vitaminas esenciales del grupo B, incluida la biotina²⁰. *Bacteroides* spp. sobreexpresan los genes que codifican cuatro enzimas en la ruta de biosíntesis de biotina (COG0132, COG0156, COG0161 y COG0502) mientras que otras bacterias comensales, como la especie *Lactobacillus*, carecen de estos genes de síntesis de biotina y, por lo tanto, no pueden generar biotina. En particular, a pesar de la incapacidad para sintetizar biotina, estas bacterias pueden consumir biotina suministrada por la dieta y/o por otras bacterias como *Bacteroides*. El equilibrio entre las bacterias productoras y consumidoras de biotina controla así la cantidad de biotina luminal disponible para el huésped²¹.

Se han identificado microorganismos en ratones con alopecia inducida por deficiencia de biotina como un "reductor obligado de biotina" y aunque carezcan de genes de síntesis de biotina y, por lo tanto, no puedan generar biotina, puedan utilizar biotina para su propio crecimiento de manera que el nivel de biotina en suero refleja síntomas de alopecia. Es importante destacar que la suplementación de biotina a través de una ruta sistémica evita la disminución de la biodisponibilidad de biotina inducida por la disbiosis en el intestino y restaura el crecimiento del cabello. Estos resultados demuestran que los niveles fisiológicos de biotina

¹⁹ Azad M, Sarker M, Li T, Yin J. Probiotic species in the modulation of gut microbiota: an overview. *Biomed Res Int.* 2018;2018:9478630.

²⁰ Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, Thangaraju M, Prasad PD, Manicassamy S, Munn DH, Lee JR, Offermanns S, Ganapathy V. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity.* 2014 Jan 16;40(1):128-39.

²¹ Sugahara H, Odamaki T, Fukuda S, Kato T, Xiao JZ, Abe F, Kikuchi J, Ohno H. Probiotic *Bifidobacterium longum* alters gut luminal metabolism through modification of the gut microbial community. *Sci Rep.* 2015 Aug 28;5:13548.

sistémica (y de la piel) están regulados por la microbiota intestinal y la suplementación dietética, y la disbiosis intestinal, así como la desnutrición, pueden alterar la fisiología de la piel²².

Aunque se sabe que la deficiencia de biotina causa pérdida de cabello, el mecanismo preciso responsable de los síntomas alopécicos sigue sin estar claro. Sin embargo, se demostró que la biotina desempeña un papel en la proliferación y diferenciación de queratinocitos en las células HaCaT. Se considera que la alopecia inducida por deficiencia de biotina representa una falla en la retención del cabello causada por una queratinización defectuosa del tallo del cabello, lo que sugiere que el tallo del cabello se rompe con facilidad. De acuerdo con estas observaciones, los resultados de varios estudios indicaron que los folículos pilosos estaban retenidos y proliferaban en fase anágena en ratones con alopecia inducida por deficiencia de biotina²³.

La biotina sirve como cofactor para múltiples carboxilasas, como la metilcrotonil-coenzima A (CoA) carboxilasa, la piruvato carboxilasa, la acetil-CoA carboxilasa y la propionil-CoA carboxilasa. La biotilación de estas enzimas es catalizada por la holocarboxilasa sintetasa. Similar a la alopecia por deficiencia de biotina en humanos, los pacientes con defectos en carboxilasas simples o múltiples también presentan alopecia. La biotina contribuye claramente al metabolismo de aminoácidos y lípidos por varias carboxilasas y, por lo tanto, la deficiencia de biotina produce alteraciones significativas en el perfil metabólico sistémico. Los animales alimentados con una dieta deficiente en biotina mostraron niveles más altos de aminoácidos de cadena ramificada (isoleucina, leucina y valina) que los alimentados con una dieta normal, lo que sugiere que el metabolismo normal de los aminoácidos se ve perturbado por una dieta deficiente en biotina. También se detectó la acumulación de ácidos orgánicos, como el 3-hidroxi-butarato, en ratones deficientes en biotina, situación similar a la reportada en pacientes con deficiencias de carboxilasa. Estos datos implican que la fragilidad del cabello en ratones con deficiencia de biotina probablemente se deba a una falla en el metabolismo normal de los aminoácidos o sus metabolitos intermedios²⁴.

De manera similar a la estrecha relación entre los microbios residentes y el sistema inmunitario en el intestino, la microbiota cutánea residente regula el desarrollo/activación inmunitario en la piel. La perturbación de la microbiota de la piel de manera que la PCoA de la microbiota de la piel es significativamente diferente entre ratones normales y alopécicos. Por lo tanto, todavía es posible que la microbiota disbiótica en la piel se enriquezca con bacterias que consumen biotina en exceso y podría ser suficiente para inducir alopecia independientemente de la disbiosis intestinal²⁵.

En conclusión, se ha demostrado que la microbiota intestinal juega un papel en la patogénesis de la alopecia. La disbiosis intestinal, especialmente el crecimiento excesivo de diversos microorganismos y la subsiguiente deficiencia de biotina son pasos críticos que conducen al desarrollo de la alopecia. La microbiota intestinal y

²² Hayashi A, Mikami Y, Miyamoto K, Kamada N, Sato T, Mizuno S, Naganuma M, Teratani T, Aoki R, Fukuda S, Suda W, Hattori M, Amagai M, Ohyama M, Kanai T. Intestinal Dysbiosis and Biotin Deprivation Induce Alopecia through Overgrowth of *Lactobacillus murinus* in Mice. *Cell Rep*. 2017 Aug 15;20(7):1513-1524.

²³ Zempleni J, Teixeira DC, Kuroishi T, Cordonier EL, Baier S. Biotin requirements for DNA damage prevention. *Mutat Res*. 2012 May 1;733(1-2):58-60.

²⁴ Donti TR, Blackburn PR, Atwal PS. Holocarboxylase synthetase deficiency pre and post newborn screening. *Mol Genet Metab Rep*. 2016 Apr 6;7:40-4.

²⁵ Belkaid Y, Tamoutounour S. The influence of skin microorganisms on cutaneous immunity. *Nat Rev Immunol*. 2016 May 27;16(6):353-66.

su metabolismo son, por lo tanto, objetivos potenciales para el tratamiento de enfermedades de la piel con una fisiología capilar alterada.

VR6 PROBIOTICO

Una línea de investigación que tiene muchas perspectivas prometedoras en el eje intestino-piel son los suplementos dietéticos que promueven la salud del microbioma intestinal, incluidos los probióticos. Esta área de investigación ha sido estudiada masivamente en el pasado debido a los muchos efectos beneficiosos para la salud de los alimentos fermentados. Es probable que estudios adicionales que vinculen los probióticos con la piel proporcionen nuevos conocimientos significativos sobre la importancia de miembros específicos de la comunidad microbiana intestinal en la salud de la piel. La vinculación de estudios sobre probióticos y el seguimiento de productos microbianos específicos desde el intestino hasta la piel podría revelar nueva e interesante información sobre el eje intestino-piel en el futuro.

Se sabe que la pérdida de cabello y la alopecia son trastornos multifactoriales, influenciados por una variedad de condiciones que incluyen la genética, la dieta y el estilo de vida. De hecho, los niveles de diferentes hormonas y vitaminas se han relacionado directamente con el desarrollo de alopecia en individuos humanos. Entre todo este conjunto de compuestos, la biotina es uno de los metabolitos centrales que afectan la salud de la piel, y su deficiencia se asocia con condiciones dermatológicas graves, incluida la caída del cabello.

Proyecto VR6 PROBIOTICO

La pérdida del cabello es una de las mayores preocupaciones cosméticas en nuestra sociedad. Sólo en España, la venta de productos nutricosméticos para el tratamiento de la alopecia ocupa un mercado de más de 57 millones de euros. Además de la predisposición genética, existen otros factores relacionados con la nutrición que determinan el desarrollo de la alopecia. Es por esto que, hasta la fecha, el grueso de productos para alopecia están basados en la suplementación de vitaminas y otras biomoléculas esenciales, así como en extractos naturales de plantas que son capaces de potenciar el crecimiento del cabello bajo determinadas condiciones. Sin embargo, se ha descubierto recientemente un nuevo factor implicado en el desarrollo de alopecia: el microbioma intestinal. De acuerdo con un estudio realizado en un modelo murino, alteraciones en la microbiota pueden desencadenar el desarrollo de alopecia, especialmente cuando se produce la proliferación de bacterias intestinales capaces de degradar biotina en el tracto intestinal. CNCE desarrolló un proyecto que se basa en demostrar esta relación entre microbioma y alopecia en individuos humanos, y en encontrar un nuevo tratamiento innovador para la alopecia basado en la modulación de la microbiota intestinal mediante la administración de cepas probióticas. En este proyecto, se ha generado un producto sin precedentes en el mercado de la nutricosmética a nivel internacional.

El objetivo general de este proyecto fue establecer una línea de productos para el tratamiento de la alopecia basada en microorganismos probióticos. Esto implicó los siguientes objetivos, bajo distintos puntos de vista:

1. Desde el punto de vista técnico, aislamiento y caracterización de microorganismos probióticos capaces de incrementar la disponibilidad de biotina en el tracto intestinal de individuos alopécicos.
2. Desde el punto de vista comercial, obtención del primer producto para alopecia en el mercado nacional e internacional basado en microorganismos probióticos.
3. Desde el punto de vista estratégico, adquisición de un profundo know-how en el establecimiento de productos basados en probióticos, y posicionamiento en el mercado como una empresa altamente innovadora.

El objetivo técnico general de este proyecto fue aislar, seleccionar y caracterizar una o varias cepas probióticas con capacidad de mejorar la disponibilidad de biotina en el tracto intestinal de sujetos alopécicos. Para ello, se plantearon los siguientes objetivos técnicos específicos:

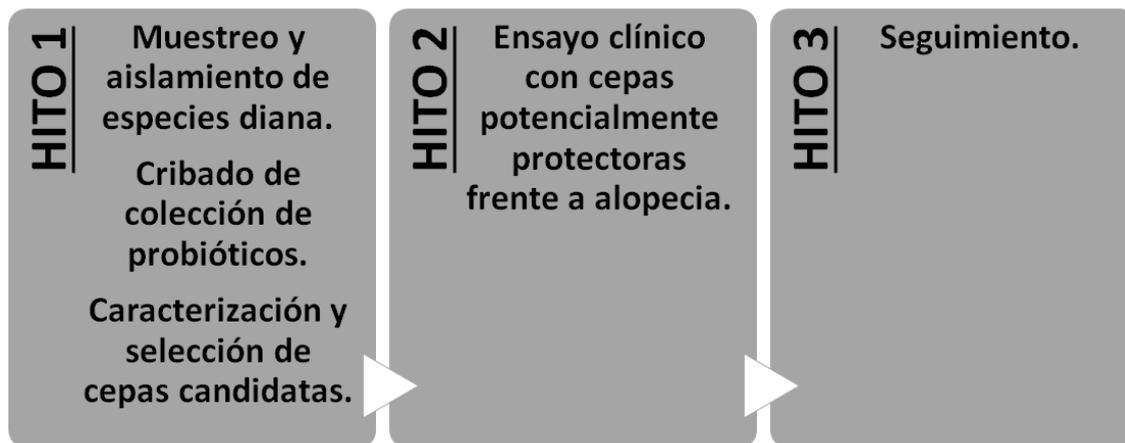
- a. Diseño y puesta a punto de un método de detección de microorganismos del tracto intestinal con capacidad de degradación de biotina. Aislamiento e identificación de dichos microorganismos.
- b. Selección de una cepa o cepas probióticas capaces de inhibir o limitar la proliferación de los microorganismos degradadores de biotina en el tracto intestinal.
- c. Validación de la mejora en la disponibilidad de biotina en sujetos alopécicos a los que se les suministra la cepa o cepas probióticas, en comparación con sujetos sometidos a un tratamiento placebo.

De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, los probióticos son microorganismos vivos, que administrados de manera adecuada, confieren un beneficio para la salud del consumidor. La gran mayoría de probióticos son bacterias de los géneros *Lactobacillus* o *Bifidobacterium*, si bien también es ampliamente conocida la actividad probiótica de algunas cepas de levadura. Tradicionalmente, el uso de probióticos se ha limitado a tratar problemas relacionados con la microbiota intestinal (diarrea, corrección de alteraciones tras la toma de antibióticos, etc.), pero cada vez son más las implicaciones de los microorganismos que colonizan nuestro intestino en otro tipo de trastornos o enfermedades, como la obesidad, la diabetes o la depresión, entre otros.

La relación entre microorganismos probióticos y alopecia es un tema de interés creciente, ya que recientemente se ha descrito el efecto potenciador de la alopecia de especies bacterianas presentes en el tubo digestivo de animales modelo. Dichas especies son capaces de eliminar biotina, y por tanto reducir la absorción de ésta en el intestino. La biotina es un compuesto muy relevante en la alopecia, ya que se le atribuyen propiedades promotoras de crecimiento del cabello y una influencia positiva en la nutrición del mismo. La idea fundamental de este proyecto se basa en limitar la proliferación de especies microbianas degradadoras de biotina presentes en el tracto digestivo de individuos alopécicos, mediante la administración de una cepa o cepas probióticas capaces de inhibir el crecimiento de éstas.

Por tanto, el producto que se ha generado a partir del presente proyecto tiene una base radicalmente distinta a la del resto de productos disponibles en el mercado a fecha de hoy. Por primera vez, el producto está basado en un microorganismo probiótico vivo, con capacidad de modular la composición microbiana del tracto intestinal de los individuos que lo consuman, para mejorar la disponibilidad de biotina en el mismo. En otras palabras, el producto generado es el primero y único basado en el denominado microbiome engineering, mediante el suministro de cepas probióticas vivas.

Seguidamente se representa esquemáticamente la estrategia de I+D para la obtención del nuevo producto para el tratamiento de la alopecia basado en microorganismos probióticos. Cada uno de los hitos del proyecto se encuentra explicado en el siguiente apartado de la memoria.



A continuación se describen en detalle los distintos hitos del proyecto, así como las tareas realizadas en cada hito y su cronograma:

HITO 1: MUESTREO Y AISLAMIENTO DE ESPECIES DIANA, CRIBADO DE COLECCIÓN DE PROBIÓTICOS Y CARACTERIZACIÓN Y SELECCIÓN DE CEPAS CANDIDATAS.

Hito 1A. Muestreo de microbioma intestinal de diez sujetos alopécicos y aislamiento en medio de cultivo ad hoc de cepas degradadoras de biotina.

El objetivo de este hito fue identificar qué especies bacterianas son capaces de degradar biotina en el intestino humano. Esto abre una línea de innovación muy relevante, ya que hasta la fecha, sólo se ha realizado un estudio similar en ratones. Estableciendo como hipótesis que dichas especies degradadoras disminuyen la absorción de biotina en el intestino humano, este hito tratará de definir las especies “diana”, a inhibir con uno o varios microorganismos probióticos, que se ensayarán en los siguientes hitos.

Tareas:

- 1.1. Puesta a punto de un medio de cultivo definido que contenga biotina como fuente de carbono principal.
- 1.2. Siembra en el medio anterior de muestras de heces obtenidas de 10 sujetos alopécicos.
- 1.3. Selección de hasta 50 cepas con capacidad de degradación de biotina.
- 1.4. Identificación taxonómica de las cepas seleccionadas mediante métodos moleculares.
- 1.5. Crioconservación de las cepas seleccionadas.

Cronograma estimado: 2 meses.

Hito 1B. Cribado de una colección de cepas probióticas para seleccionar aquéllas con efecto inhibitorio frente a uno de los aislados del hito anterior.

El objetivo de este hito fue seleccionar microorganismos probióticos capaces de inhibir el crecimiento de la cepa con mayor capacidad de degradación de biotina, de acuerdo con el hito anterior. Las cepas probióticas con efecto inhibitorio serán seleccionadas para continuar con el hito siguiente.

Tareas:

2.1. Establecimiento de cultivos de 100 cepas probióticas en un medio de cultivo definido.

2.2. Realización de ensayos in vitro, con las 100 cepas probióticas, y selección de aquellas capaces de inhibir a la cepa con mayor capacidad de degradación de biotina seleccionada en el hito anterior. Todos los ensayos se realizarán por triplicado, incluyendo controles positivos y negativos.

2.3. Selección de hasta 10 cepas probióticas con actividad inhibitoria.

Cronograma estimado: 4 meses.

Hito 1C. Evaluación de la capacidad inhibitoria de las cepas seleccionadas en el hito anterior sobre otras especies degradadoras de biotina.

Este hito trata de realizar un segundo cribado de las cepas candidatas seleccionadas en el hito anterior, con el fin de seleccionar la cepa o cepas que sean capaces de inhibir no sólo a la especie con mayor capacidad de degradación de biotina, sino también a una selección de otras especies identificadas en el Hito 1A.

Tareas:

3.1. Realización de ensayos in vitro, con las cepas seleccionadas en el hito anterior, para testar su efecto inhibitorio contra el resto de especies degradadoras (un máximo de 5) identificadas en el Hito 1A. Todos los ensayos se realizarán por triplicado, incluyendo controles positivos y negativos.

3.2. Selección de las cepas probióticas con un espectro de inhibición más amplio.

3.3. Estudio de vida útil y estabilidad de las cepas seleccionadas.

Cronograma estimado: 3 meses.

Hito 2. Ensayos clínicos con cepas potencialmente protectoras frente a alopecia.

En este hito final se testaron las cepas seleccionadas en el hito anterior en individuos voluntarios, para estudiar su efecto frente a alopecia en combinación con las cápsulas VR6 comercializadas actualmente. Como hipótesis, la administración de la cepa o cepas probióticas junto a las cápsulas tendrá un efecto potenciador de estas últimas, aminorando la degradación de biotina en el intestino de los individuos tratados.

Tareas:

2.1. Diseño de un ensayo clínico randomizado controlado, aleatorizado y doble ciego para evaluar el efecto de las cepas probióticas seleccionadas en el hito anterior. En colaboración con la Universidad Católica de Murcia, se seleccionarán los voluntarios en base a criterios de edad, sexo, estado de salud general y desarrollo de la alopecia. El diseño del ensayo será randomizado aleatorizado para evitar sesgos estadísticos. En estos ensayos, se administrará cada una de las cepas seleccionadas en el hito anterior, y se comparará estudiando la evolución de estos sujetos en relación con los parámetros de alopecia y biotina en sangre con comparación con aquéllos sometidos a un tratamiento placebo.

2.2. Realización del ensayo, y seguimiento de los pacientes.

2.3. Análisis bioestadístico de resultados.

Cronograma estimado: 9 meses.

Hito 3. Metagenómica y seguimiento para la implementación del producto final.

En este hito, se realizará un seguimiento suplementario de los ensayos clínicos en los voluntarios participantes en el ensayo clínico. Esto permitirá detectar problemas de colonización intestinal del probiótico y, en su caso, anticipar las medidas necesarias para mejorar la administración del mismo.

Tareas:

- 3.1. Toma de muestras (de heces) mensual durante el ensayo clínico (6 meses).
- 3.2. Aislamiento de DNA total a partir de las muestras.
- 3.3. Estudio metagenómico de las comunidades microbianas asociadas, y análisis bioinformático de resultados.
- 3.4. Análisis bioestadístico e interpretación de resultados.

Tiempo de ejecución: 9 meses desde el final del hito anterior.

En resumen, el proyecto se encuentra estructurado en 3 hitos técnicos, con una duración total de 27 meses desde el inicio del proyecto.

4.b) Identificación de las entidades participantes en cada una de las etapas del proyecto (tareas/subtareas) y su relación con las entidades subcontratadas

Las tareas relacionadas con el aislamiento de cepas degradadoras de biotina, así como la selección de cepas probióticas (Hito 1) serán realizadas por la empresa subcontratada Darwin Bioprospecting Excellence, SL (en adelante, DARWIN). Los ensayos en humanos (Hito 2) serán realizados por la empresa subcontratada San Antonio Technologies, SL (en adelante, SAT), en colaboración con CNCE y con la Universidad Católica de Murcia (en adelante, UCAM). Durante los ensayos clínicos y con posterioridad a los mismos, DARWIN realizará el seguimiento metagenómico de las muestras intestinales de los individuos (Hito 3), y definirá los mejores parámetros de aplicación del producto en colaboración con CNCE.

4.c) Identificar las posibles tareas y/o fases críticas del proyecto

Las fases críticas del proyecto se centran en el hito 1 (selección de cepas probióticas con capacidad de inhibición de bacterias degradadoras de biotina) y 2 (ensayos en humanos). El hecho de cribar una colección de hasta 100 cepas probióticas en el hito 1, minimiza las posibilidades de no encontrar ninguna cepa con capacidad inhibitoria. Sin embargo, como plan de contingencia, podría ampliarse el cribado a una colección de microorganismos más amplia.

Por otra parte, existe la posibilidad de que los resultados observados in vitro no se transfieran en su totalidad en los ensayos en humanos, ya que el ecosistema microbiano en el tracto digestivo es, obviamente, extremadamente complejo, e imposible de mimetizar in vitro. Sin embargo, cabe destacar que este es el punto crítico de la gran mayoría de proyectos de I+D en los que se testa el efecto de microorganismos probióticos de uso animal o humano.

Este es el primer proyecto que trata de utilizar microorganismos probióticos para el tratamiento de la alopecia. A pesar de que el efecto de los probióticos es bien conocido a día de hoy en cuestiones relacionadas con el tránsito intestinal, la recuperación de la microbiota normal después de un tratamiento con antibióticos, o la activación del sistema inmune, no existe ningún estudio en humanos que relacione probióticos y protección frente a alopecia. Dicha relación sí se ha demostrado en un estudio reciente en ratones, en el que se observa que la disbiosis (alteración de la microbiota normal) producida por antibióticos puede desencadenar la aparición de alopecia. Más concretamente, se relaciona la proliferación de la bacteria intestinal *Lactobacillus murinus*, capaz de degradar biotina, con la aparición de alopecia en este modelo murino.

El reto tecnológico del presente proyecto consistió en (1) demostrar la relación microbioma-alopecia en humanos por primera vez a nivel internacional, y (2) encontrar cepas probióticas capaces de controlar la proliferación de bacterias degradadoras de biotina en el tracto intestinal, con el fin de mejorar la disponibilidad de biotina y por tanto disminuir la pérdida de cabello.

De entre las tecnologías que se aplicaron durante la ejecución del proyecto, destacan:

- Cultivo mejorado en medio de cultivo: se tratará de aislar el máximo número posible de bacterias intestinales capaces de degradar biotina, para lo cual se utilizarán medios de cultivo específicos, y condiciones de incubación que imiten el tracto intestinal (anaerobiosis/microaerofilia, 37 °C, etc.).
- Screening microbiano de alto rendimiento: se cribará una colección de 100 cepas probióticas para seleccionar aquélla o aquéllas capaces de inhibir el crecimiento de bacterias intestinales degradadoras de biotina. Para ello, se realizarán múltiples ensayos de confrontación en condiciones que, de nuevo, se asimilen al tracto digestivo humano.
- Secuenciación metagenómica: durante los ensayos clínicos, se realizará un seguimiento de la microbiota intestinal de los individuos voluntarios mediante secuenciación masiva de las comunidades microbianas presentes en sus heces, con el fin de comprobar la presencia de la cepa probiótica y detectar posibles cambios en la composición de dichas comunidades por efecto del probiótico.

Si bien las tecnologías anteriores son ampliamente utilizadas por empresas de los sectores biomédico y farmacéutico, son muy pocos los estudios que aplican estas técnicas para el abordaje de problemas cosméticos.

Desarrollo de VR6 PROBIOTICO

La microbiota intestinal se ha propuesto recientemente como un impulsor adicional del inicio de la alopecia, dado el posible papel de las bacterias intestinales en la biodisponibilidad de la biotina en el intestino humano. El trabajo de Hayashi y colaboradores publicado en 2017²⁶ demostró por primera vez el efecto de la disbiosis intestinal en el desarrollo de la alopecia en un modelo murino. Brevemente, la disbiosis intestinal inducida por antibióticos condujo a la aparición de alopecia en ratones con una dieta deficiente en biotina. *Lactobacillus murinus* se detectó como una de las especies demasiado grandes en ratones disbióticos y, curiosamente, esta especie demostró consumir y reducir los niveles de biotina intestinal, comprometiendo así su disponibilidad para el huésped.

De acuerdo con estas observaciones, el estudio de VR6 PROBIOTICO apuntó a un nuevo enfoque: caracterizar la capacidad de una colección de cepas de *Lactobacillus* procedentes de muestras intestinales humanas para consumir biotina, y seleccionar aquellas cepas con niveles muy reducidos de consumo de biotina como probióticos candidatos para mejorar la disponibilidad de biotina en el intestino humano (Figura 1).

²⁶ Hayashi, Atsushi et al. Intestinal Dysbiosis and Biotin Deprivation Induce Alopecia through Overgrowth of *Lactobacillus murinus* in Mice. *Cell Reports* , Volume 20 , Issue 7 , 1513 – 1524.

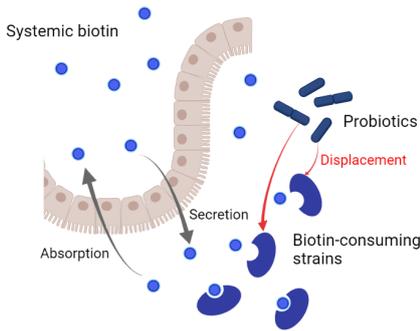
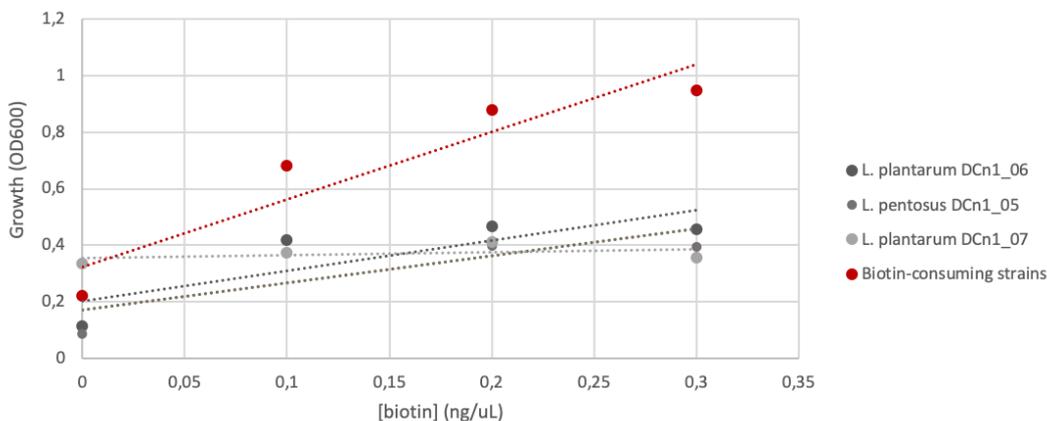


Figura 1. Papel potencial de los probióticos seleccionados en este proyecto sobre la homeostasis de la biotina en el intestino humano.

Para evaluar el grado de consumo de biotina entre los lactobacilos intestinales, se aisló, cultivó e identificó una colección de más de 100 cepas de *Lactobacillus* a partir de muestras de heces de donantes voluntarios. Los cultivos se realizaron en medio MRS y la identificación molecular se llevó a cabo mediante secuenciación de ARNr 16S²⁷.

El consumo de biotina se cuantificó para cada cepa en medio MRS basal (sin biotina), complementado con concentraciones crecientes de biotina. De acuerdo con este conjunto de medios, las cepas capaces de consumir biotina aumentan su crecimiento cuando hay niveles más altos de biotina presentes en el medio. Por el contrario, las cepas con muy poco (o nulo) consumo no aumentan significativamente el crecimiento bacteriano. Después de la selección de la capacidad de consumo de biotina de la colección de cepas, se seleccionaron tres cepas debido a su tasa de consumo de biotina muy limitada (Figura 2):

- Lactiplantibacillus plantarum* DCn_07 (CECT 30102)
- Lactiplantibacillus plantarum* DCn_06 (CECT 30103)
- Lactiplantibacillus pentosus* DCn1_05 (CECT 30104)



²⁷ Matsuki T, Watanabe K, Fujimoto J, Takada T, Tanaka R. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. Appl Environ Microbiol. 2004 Dec;70(12):7220-8.

Figura 2. Las cepas probióticas DCn1_05, DCn1_06 y DCn1_07 (escala de grises) no pueden consumir biotina, a diferencia de otras cepas de lactobacilos intestinales (rojo).

Además de la incapacidad de estas cepas para absorber biotina, se comprobaron experimentalmente aspectos adicionales que aseguran su potencial probiótico:

- Su tasa de crecimiento es comparable a la de las cepas que consumen biotina de lactobacilos, por lo que su suplementación en el intestino humano como probióticos puede desplazar a las comunidades que consumen biotina y conducir a una biodisponibilidad mejorada de biotina .
- Su resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal humano es excelente (>90%), es decir, pueden sobrevivir al tránsito por los diferentes fluidos estomacales e intestinales y permanecer viables en el intestino humano para realizar su actividad.
- Según el análisis completo del genoma, carecen de cualquier resistencia antibiótica y factores de virulencia, y son genéticamente estables, lo que garantiza su bioseguridad.

Se llevó a cabo un ensayo clínico aleatorizado, controlado con placebo, doble ciego con dos grupos de estudio (probiótico y placebo) en el Centro Dermatológico Estético de Alicante. La duración de la intervención fue de 16 semanas.

El objetivo principal de este ensayo clínico fue analizar el efecto de un suplemento dietético a base de probióticos sobre la densidad del cabello en sujetos con alopecia androgénica cuando se tomó durante 16 semanas, en comparación con un grupo de sujetos que tomaron placebo. Los objetivos secundarios de este ensayo clínico fueron comparar, entre el grupo que tomó el probiótico y el grupo que tomó el placebo, los siguientes parámetros: el número de cabellos relevantes, la longitud y grosor del cabello, el número de cabellos en fase anágena y en la fase telógena, el número de unidades foliculares, el nivel de sebo en el cuero cabelludo. Otro objetivo secundario fue evaluar la seguridad del producto en estudio.

Se incluyeron en el estudio 115 individuos, hombres y mujeres, con edades entre 18 y 65 años. Los hombres tenían alopecia androgénica masculina grado I-II-III en la escala de Norwood y las mujeres tenían alopecia androgénica femenina grado I-II en la escala de Ladwing.

La población de estudio no cumplió con ninguno de los siguientes criterios de exclusión: presencia de enfermedades autoinmunes, mujeres embarazadas o en edad fértil que no utilicen un método anticonceptivo eficaz, mujeres lactantes y en tratamiento por hipertensión arterial.

Los productos bajo investigación fueron: 1) una combinación de bacterias probióticas, *Lactobacillus plantarum* DCn1-06-DWN, *Lactobacillus plantarum* DCn1-05-DWN y *Lactobacillus plantarum* DCn1-07-DWN y 2) un placebo a base de maltodextrina. Ambos productos se tomaron una vez al día durante 16 semanas.

Los participantes en este estudio fueron asignados al azar 1:1 a uno de dos grupos de tratamiento: probióticos y placebo; siguiendo una lista de números aleatorios generados por un software estadístico. Se trata de un estudio doble ciego en el que se pretendía minimizar la subjetividad de los participantes y de los investigadores. Para ello se realizó un adecuado enmascaramiento de los productos investigados utilizando un placebo con idénticas características organolépticas al producto probiótico. Además, los productos no podían distinguirse por las características del embalaje ya que todos los embalajes eran iguales.

En este estudio se prohibió durante su desarrollo el consumo de fármacos para la alopecia, laxantes y antibióticos, constituyendo dicho consumo un criterio de retirada. Además, se prohibió la toma de complementos alimenticios para la alopecia por suponer un sesgo a la hora de interpretar los resultados del estudio.

La principal variable de eficacia fue la medida del aumento de la densidad del cabello: aumento del número de cabellos por centímetro cuadrado. Para ello se utilizó el equipo FotoFinder Tricoescala pro.

Este equipo permite realizar un análisis capilar completo, ya que cuantifica adicionalmente 4 parámetros que se han considerado como variables secundarias para este estudio: número de cabellos relevantes por cm², longitud del cabello, grosor del cabello y número de unidades foliculares. Cada uno de estos parámetros se cuantifica a través de una serie de mediciones.

Longitud del cabello: Porcentaje de cabello anágeno y telógeno, número de cabello anágeno y telógeno, densidad de cabello anágeno/cm² y cabello telógeno, longitud media (mm).

Grosor del pelo: Porcentaje de pelos terminales y pelos vellosos, número de pelos terminales y pelos vellosos, densidad de pelos terminales/cm² y pelos plumosos/cm² y grosor medio (mm).

Número de unidades foliculares: Unidades foliculares con 1, 2, 3, 4 o más cabellos y densidad unitaria por cm².

Otras variables secundarias fueron el Tricograma manual (proporción de cabello en fase anágena, catágena y telógena), la cantidad de sebo en el cuero cabelludo, utilizando Sebumeter®, y fotografías comparativas del cuero cabelludo.

Además, se registraron los datos sociodemográficos de la población de estudio y los eventos adversos para evaluar la seguridad del producto en investigación.

Por último, se tomaron muestras de heces para análisis metagenómico.

Todas las variables se midieron al comienzo del estudio antes de comenzar a tomar los productos en investigación y al final del estudio, 16 semanas después de tomar los productos.

Se analizaron los datos de los 136 participantes que completaron con éxito el estudio. 67 fueron aleatorizados al grupo de probióticos y 69 al grupo de placebo.

El estudio incluyó a 61 hombres (28 en el grupo probiótico y 33 en el grupo placebo) y 73 mujeres (39 en el grupo probiótico y 34 en el grupo placebo), con una edad media de $38,8 \pm 11,0$ años ($38,2 \pm 11,3$ años en el grupo probiótico y $39,4 \pm 10,8$ años en el grupo placebo) y un peso medio de $74,9 \pm 17,2$ Kg en el grupo probiótico y $71,2 \pm 13,8$ Kg en el grupo placebo.

Las principales conclusiones fueron:

1. En la muestra de los individuos estudiados se observó que el número de cabellos en fase telógena (fase de caída) se redujo significativamente tras 16 semanas de tratamiento con el probiótico en estudio. Este resultado podría indicar que el tratamiento con el probiótico tendría cierto un efecto positivo en la etapa de caída del cabello, durante su ciclo de vida. Además, el grosor del cabello se redujo significativamente en el grupo tratado con placebo en comparación con el probiótico significando que el tratamiento con el probiótico realiza un efecto de ralentización de la disminución del grosor del cabello evitando que el cabello se debilite rápidamente como paso previo a su caída.
2. El tratamiento con el probiótico en estudio durante 16 semanas en los individuos de 37,5 años o menos produjo un efecto significativo de disminución tanto del número de cabellos vellosos como de la densidad de cabellos vellosos, en comparación con el grupo placebo. Esto demuestra que, en este

- subgrupo de edad, el tratamiento con el probiótico disminuye el número de cabellos que se van a caer o recambiar en los próximos meses.
3. El tratamiento con el probiótico en estudio durante 16 semanas en los individuos de 37,5 años o menos evita la disminución del grosor del cabello y, por tanto, su debilitamiento.
 4. Los individuos de edad superior a 37,5 años mostraron un incremento significativo tanto en el conteo de cabellos como en su densidad tras 16 semanas de ingesta del probiótico en estudio. Aunque la evolución de estos parámetros en comparación con el placebo no fue significativa, por lo que se podría decir que el tratamiento con el probiótico muestra una tendencia hacia un efecto de mejora de los parámetros generales de la alopecia. Esta conclusión se refuerza al constatar que los resultados de conteo y densidad de cabellos relevantes muestran las mismas tendencias en los individuos tratados con el probiótico.
 5. La ingesta del probiótico en estudio durante 16 semanas por parte de los individuos de edad superior a 37,5 años produjo una tendencia hacia el incremento del porcentaje, número y densidad de cabellos terminales.
 6. El subgrupo formado por todos los hombres participantes en el estudio experimentó un incremento significativo de la longitud del cabello, así como de los parámetros que caracterizan al grosor del cabello (porcentaje, número y densidad de cabellos vellosos), al tomar el probiótico en estudio durante 16 semanas.
 7. El efecto positivo del tratamiento durante 16 semanas con el probiótico en estudio, en individuos con alopecia androgénica, se observó principalmente en hombres de edad inferior o igual a 37,5 años.
 8. El tratamiento durante 16 semanas con el probiótico en estudio es seguro.

Tomamos el punto de corte en 37,5 años fundamentalmente porque de acuerdo con los datos de mercado, es la media de edad de los consumidores de la línea VR6 Definitive Hair y porque un metaanálisis²⁸ informó de anomalías hormonales y metabólicas en hombres con alopecia androgenética (AGA) de aparición temprana (alrededor de los 35 años). Los resultados de este metaanálisis mostraron la presencia de perfiles glucémicos y lipídicos ligeramente peores en hombres con AGA de inicio temprano, con una fuerte asociación entre AGA de inicio temprano y síndrome metabólico o enfermedad cardiovascular.

Las personas que participaron en el estudio no experimentaron ningún evento adverso relacionado con los productos en investigación.

Se controló la composición del microbioma intestinal en todos los voluntarios antes y después de los tratamientos con placebo y probióticos. Para ello, se llevó a cabo una secuenciación de alto rendimiento del gen 16S rRNA en una plataforma Illumina MiSeq siguiendo las directrices estándar del Human Microbiome Project (HMP).

Los voluntarios que tomaron el tratamiento con probióticos mostraron una abundancia significativamente mayor de *Lactobacillus* en su intestino en comparación con el grupo de placebo (valor $p < 0,05$ en la prueba de Wilcoxon) al final del tratamiento (Figura 3).

²⁸ Cannarella R, La Vignera S, Condorelli RA, Calogero AE. Glycolipid and Hormonal Profiles in Young Men with Early-Onset Androgenetic Alopecia: A meta-analysis. Sci Rep. 2017 Aug 10;7(1):7801.

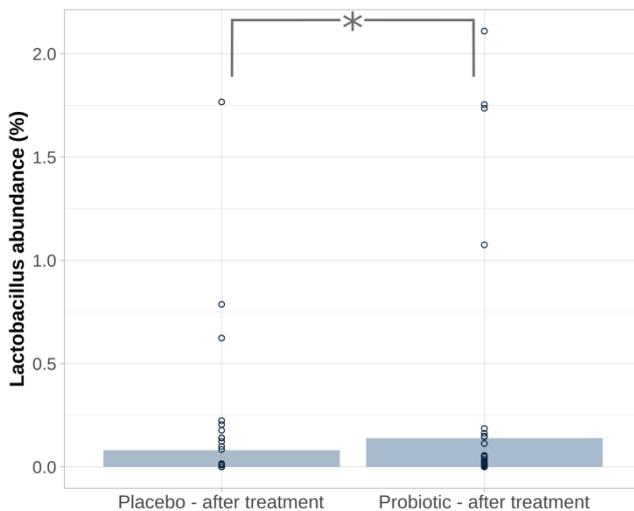


Figura 3. La abundancia de *Lactobacillus* aumenta significativamente después del tratamiento con probióticos (valor de $p < 0,05$ en la prueba de Wilcoxon). No se encontraron diferencias significativas entre el grupo placebo y el probiótico antes del tratamiento.

La implementación de probióticos fue notablemente heterogénea, como se deduce de la variabilidad en la abundancia de *Lactobacillus* dentro de este grupo de participantes. Por esa razón, se realizaron análisis bioestadísticos que intentaban combinar la información del microbioma con las variables clínicas en dos subgrupos de voluntarios dentro de cada grupo de probiótico o placebo: los que mostraban una buena respuesta al tratamiento y los que no mostraban respuesta o empeoraban las variables clínicas. Dada la identidad taxonómica de los probióticos, la mayoría de los análisis se centraron en comparar la abundancia de *Lactobacillus* entre los dos grupos, para lo cual se aplicaron las pruebas estadísticas DESeq2.

Los aspectos más destacados de nuestros análisis (resumidos en la Figura 4) son los siguientes:

- Los voluntarios que tomaron el tratamiento con placebo no mostraron diferencias significativas en cuanto a la abundancia de *Lactobacillus* en su intestino, independientemente de la evolución de cualquiera de las variables clínicas.
- Por el contrario, los participantes del grupo de probióticos que mostraron una buena respuesta en varias variables clínicas tuvieron un aumento significativo en la abundancia de *Lactobacillus* en su microbioma intestinal .
- En particular, los participantes que tuvieron una buena respuesta al tratamiento con probióticos en términos de número de cabellos telógenos y densidad de cabellos telógenos mostraron un aumento estadísticamente significativo (valor de p ajustado $< 0,05$) en el contenido intestinal de *Lactobacillus* . Este comportamiento no se detectó en el grupo placebo, ni en el grupo probiótico antes del tratamiento.
- Además, también se observó una tendencia (p -valor $< 0,05$) hacia una mayor abundancia de este género en aquellos participantes que realizaron el tratamiento con probióticos y mostraron una buena respuesta en términos de número total y densidad de cabellos . Este comportamiento no se detectó en el grupo placebo, ni en el grupo probiótico antes del tratamiento.

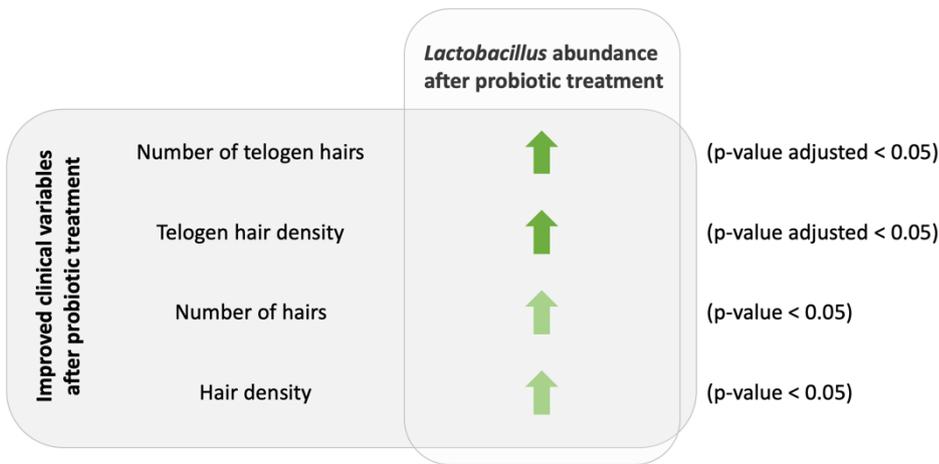


Figura 4. Los datos del microbioma respaldan una mayor abundancia de *Lactobacillus* en voluntarios que recibieron tratamiento con probióticos y mostraron una buena respuesta en una selección de variables clínicas. Estos resultados no se detectaron en el grupo placebo, ni en el grupo placebo antes del tratamiento.

En conjunto, estos resultados señalan la relevancia de una buena implementación de probióticos en términos de una mejor respuesta en varias variantes clínicas.