

# Microbiota intestinal, obesidad y diabetes

Rodrigo Bibiloni Mathieu Membrez Chieh Jason Chou

Centro de Investigación Nestlé, Lausana, Suiza

## Palabras clave

Microbiota intestinal · Obesidad · Diabetes · Métodos de base molecular

## Resumen

La creciente epidemia de obesidad ya ha dejado de estar restringida sólo a los países desarrollados. En el 2005, la Organización Mundial de la Salud alertó que en todo el mundo había aproximadamente 400 millones de adultos obesos y que aproximadamente 20 millones de niños presentaban sobrepeso. La obesidad es un problema sanitario complejo y de consecuencias graves, como la diabetes de tipo 2 y las enfermedades cardiovasculares y de otro tipo. Se han señalado factores conductuales, genéticos y medioambientales como contributivos del sobrepeso y la obesidad. Datos recientes indican que la población de microorganismos residentes en el intestino, conocida como microbiota intestinal, puede influir sobre la absorción de nutrientes y el almacenamiento de energía. Se ha demostrado que la composición microbiótica difiere tanto entre ratones como entre humanos obesos y magros, lo que deja entrever que la modulación de la composición microbiótica intestinal ofrece una nueva vía para el tratamiento de la obesidad y el sobrepeso. En esta revisión se recuerdan los datos científicos disponibles que respaldan estas especulaciones. También se recopilan en esta revisión los resultados recientes obtenidos en estudios destinados a las contribuciones de la microbiota intestinal a la diabetes.

Copyright © 2009 Nestec Ltd., Vevey/S. Karger AG, Basel

## Introducción

La obesidad es uno de los problemas crónicos de salud más frecuentemente debatidos en el mundo desarrollado y cuya prevalencia ha aumentado significativamente en las dos últimas décadas. En EE.UU., el 60% de los adultos presentan sobrepeso u obesidad [1]. La situación es también frecuente en Europa, especialmente en las mujeres y en los países europeos meridionales y orientales, donde la prevalencia de obesidad ha aumentado del 10 al 40% aproximadamente durante los 10 últimos años [2]. La diabetes, en particular la diabetes de tipo 2, una patología concomitante con la obesidad, prevalece también en los países desarrollados. Según la Federación Internacional de Diabetes, esta enfermedad afecta a más de 246 millones de personas en todo el mundo [3].

La regulación del peso corporal se basa en un cálculo simple, con la ingestión de energía y el gasto de energía en cada lado de la ecuación. No obstante, la eficiencia metabólica individual a menudo varía enormemente, dando lugar a una propensión individual diferente en cuanto a la aparición de obesidad. Se ha comunicado que factores genéticos, ambientales, conductuales y psicosociales desempeñan un papel en la aparición de obesidad. Especialmente con respecto a los factores genéticos, una gran cantidad de investigación se ha centrado en la búsqueda de las causas genéticas de la obesidad. Aunque las diferencias genéticas tienen una importancia indudable, la notable elevación de la prevalencia de obesidad en los últimos años no puede atribuirse solamente a los genes; no deben

## KARGER

Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 2009 Nestec Ltd., Vevey/S. Karger AG, Basel  
0252–8185/09/0671–0039\$26.00/0

Accesible online en:  
www.karger.com/ans

Chieh Jason Chou  
Nestlé Research Center, PO Box 44  
CH–1000 Lausanne (Switzerland)  
Tel. +41 21 785 8658, Fax +41 21 785 8544  
E-Mail chieh-jason.chou@rdls.nestle.com

**Tabla 1.** Análisis de la composición de los tipos principales de la microbiota intestinal con métodos independientes de cultivos

Método	Muestras	Suje- tos n	Clones/ lecturas n	Tipos bacterianos, %					Referencia
				Firmi- cutes	Bacte- roidotes	Proteo- bacterias	Actino- bacterias	Otros tipos/ grupos desconocidos <sup>a</sup>	
Hibridización por transferencia de manchas	Heces	27	6 sondas	30,6	37	0,7	0,7	30	Sghir y cols. [8], 2000
Microscopía por HFIS	Heces	11	13 sondas	52,6	27,7	0,2	16,7	2,8	Harmsen y cols. [9], 2002
HFIS/ flujocitometría	Heces	91	18 sondas	57,1	8,5	0,1	4,4	29,9	Lay y cols. [10], 2005
Bibliotecas de clones ARNr 16S	Heces	1	295	64,8	31	n.c.	n.c.	4,2	Suau y cols. [11], 1999
	Biopsias colónicas	3	110	66,3	26,4	3,6	n.d.	3,7	Hold y cols. [12], 2002
	Heces	3	744	83	11	0,9	2	3,1	Hayashi y cols. [13], 2002
	Heces	6	240	58,7	14,5	26,6	n.d.	n.c.	Hayashi y cols. [14], 2003
	Biopsias y heces	3	13.355	51	48	0,6	0,2	0,2	Eckburg y cols. [4], 2005
	Heces	12	18.348	83,7	8,0	2,0	2,9	3,4	Ley y cols. [15], 2006
	Biopsias colónicas	14	235	52,8	27	6,4	1,3	12,5	Bibiloni y cols. [16], 2006
	Biopsias colónicas	190	15.172	49,2	22,8	21	5,6	1,4	Frank y cols. [17], 2007
Heces	47	3.753	70	n.c.	n.c.	2	n.c.	Kassinen y cols. [18], 2007	
Metagenómica	Heces	8	652.304	4,5	14,3	5,2	2,2	73,8 <sup>b</sup>	Kurokawa y cols., 2007 [19]
Pirosecuenciado 454 de ARNr 16S	Heces	6	12.766	81,2	2,5	1,7	14,6	<0,1	Andersson y cols. [20], 2008

HFIS = Hibridización fluorescente in situ; n.c. = no comunicado; n.d. = no detectado.

<sup>a</sup> Grupos de los que no se dispone de información taxonómica.

<sup>b</sup> La asignación taxonómica se realizó basándose en genes que codifican proteínas y no sólo en genes ARNr 16S. Los genes con los mayores aciertos bajo el umbral BLASTP del 90% fueron asignados como 'sin aciertos'.

dejarse de lado otros factores como las alteraciones conductuales y ambientales. Recientemente, los microbios residentes en el intestino, conocidos en conjunto como microbiota intestinal, han sido identificados como uno de los factores ambientales. Una mayor aproximación a esta población microbiana podría contribuir a conocer su potencial como medio terapéutico para tratar la obesidad.

### Composición de la microbiota intestinal

La complejidad del ecosistema microbiano intestinal ha sido estudiada y revisada extensamente durante estos ultimísimos años. Se dispone de datos sólidos a favor de que en el tubo gastrointestinal (GI) humano están representados cuatro tipos bacterianos: Firmicutes (grampositivos), Bacteroidetes (gramnegativos), Actinobacterias

(grampositivas) y Proteobacterias (gramnegativas) [4, 5]. Los hongos y Archaea pueden ser también residentes, pero comprenden menos del 1% de la población total [6, 7], lo que ilustra que el ecosistema intestinal está dominado claramente por las bacterias, en particular las correspondientes a los tipos Firmicutes y Bacteroidetes (tabla 1).

No obstante, han sido demostradas variaciones individuales en un nivel taxonómico más profundo. Asimismo, las variaciones en las densidades de población y la diversidad de las especies bacterianas en todo el tubo gastrointestinal se asocian tanto a las características anatómicas como a las condiciones ambientales del tubo digestivo. Por ejemplo, la boca y la cavidad oral presentan arquitecturas complejas al contrario que el resto del sistema GI, que es principalmente tubular; la presencia de ácidos biliares en el duodeno o las condiciones ácidas del estómago generan una presión de selección ambiental para

los microorganismos locales. Los números máximos de microorganismos se hallan en el colon humano, donde se han registrado más de  $10^{11}$  microorganismos/g de contenido (peso en fresco) [11]. En contraste, el tubo GI de otros vertebrados posee cantidades de bacterias relativamente extensas (principalmente lactobacilos) en el intestino proximal. En los ratones esto se debe a la adherencia de los lactobacilos sobre la superficie del epitelio no secretor del estómago, permitiendo que las bacterias formen biofilms [21].

### Evaluación de la microbiota intestinal

Gran parte de la información sobre la diversidad del ecosistema intestinal sólo ha podido obtenerse durante la última década con la introducción de los métodos 'independientes de cultivos', que fijan como objetivo las secuencias de nucleótidos de la subunidad ribosómica (ARNr 16S en el caso de bacterias). El empleo de estas metodologías ha revelado una complejidad muy superior de las poblaciones bacterianas a la que se había estimado inicialmente basándose en el cultivo bacteriológico clásico. En un trabajo reciente se da a entender que el número de especies bacterianas contenidas en el tubo GI podría oscilar entre 15.000 y 36.000 [17] en función del método de clasificación. En consecuencia, resulta crucial estudiar la microbiota intestinal desde un punto de vista ecológico: el aislamiento de bacterias en cultivos puros no puede abordar cuestiones referentes a la estructura, la función, la dinámica y la interacción de la comunidad. Además, los trabajos sobre la evaluación de la microbiota intestinal tienen que ser evaluados cuidadosamente basándose en el diseño del estudio y el tamaño de la población, así como en el marco de ventajas y limitaciones de las tecnologías descritas anteriormente (tabla 1).

El uso generalizado del gen ARN ribosómico 16S como biomarcador iniciador para estudiar las poblaciones bacterianas se debe a propiedades intrínsecas de la molécula de ARN: (1) Aparece en todos los microorganismos vivos; (2) posee un elevado grado de constancia funcional; (3) el cambio en su secuencia es un indicador de relación filogenética; (4) puede ser secuenciado directamente utilizando iniciadores dirigidos a regiones conservadas; (5) en las bases de datos públicas se dispone de más de 300.000 secuencias no redundantes.

Los métodos basados en el ARN para estudiar la ecología microbiana pueden dividirse en dos amplios grupos en términos de su grado de resolución: los de alta resolución pueden utilizarse para generar un inventario

de especies dominantes, mientras que los de baja resolución pueden proporcionar información cuantitativa de grupos bacterianos seleccionados dentro de la microbiota dominante o un perfil dinámico de la población microbiana.

Los métodos de configuración, como la reacción de cadena de polimerasas (RCP) acoplada a electroforesis en gel de gradiente desnaturante, han sido muy útiles para comparar poblaciones diferentes. Estas herramientas han sido utilizadas con éxito para monitorizar desplazamientos de comunidades bacterianas, no sólo en el tubo GI de humanos y diversos animales [22–25], sino también en otros diversos entornos, como el ecosistema marino [26] o el ecosistema del suelo. Aunque menos frecuentemente, también se han utilizado el polimorfismo de longitudes de fragmentos de restricción y el polimorfismo de conformación monocatenario. Aunque estos métodos no son cuantitativos, podrían adaptarse para proporcionar resultados cuantitativos por inclusión de un estándar interno de concentración de ADN conocida [27] o una combinación de RCP cuantitativa con electroforesis capilar [28]. No obstante, estos métodos sólo pueden detectar las especies dominantes que constituyen alrededor del 1% de la población bacteriana total.

Los datos cuantitativos de la comunidad bacteriana pueden obtenerse con otros enfoques, como la hibridación de transferencia de manchas, la RCP cuantitativa o en tiempo real, o la hibridación fluorescente in situ. A pesar de su baja sensibilidad, las hibridaciones por transferencia de manchas han proporcionado información cuantitativa exacta sobre grupos bacterianos en muestras humanas utilizando sondas diseñadas específicamente para fijar como objetivo una amplia gama taxonómica [29]. La RCP en tiempo real o cuantitativa ha sido muy útil para la cuantificación de especies subdominantes, es decir, las que aparecen en cantidades reducidas. No obstante, la validación del método podría ser laboriosa: tanto el diseño de las secuencias del iniciador para especies bacterianas, de las que se dispone de información limitada sobre el gen ARNr 16S en las bases de datos, como la optimización de las condiciones reactivas y la correlación con el número de células podrían ser todavía bastante problemáticos. Alternativamente, un método atractivo que no precisa la extracción de ácidos nucleicos y que ha sido utilizado frecuentemente para analizar muestras bacterianas complejas es la hibridación fluorescente in situ en combinación con la microscopía óptica epifluorescente o la flujocitometría. En este caso, las sondas se marcan con un colorante fluorescente y se di-

rigen a los ribosomas dentro de las células. Cada célula hibridizada emitirá luz fluorescente y podría detectarse y recontarse mediante microscopía automatizada o incluso seleccionarse con un flujocitómetro. Un inconveniente de la hibridización fluorescente in situ, lo mismo que de la RCP en tiempo real, es que el desarrollo de las sondas depende en gran medida de las secuencias del gen ARNr 16S depositadas en las bases de datos, por lo que una reevaluación continua de la especificidad y la cobertura de estas sondas es esencial para la finalidad de confirmar y mejorar su fiabilidad.

Las microseries de ADN se componen de una superficie cubierta de varias sondas ADN que pueden ser hibridizadas. Aunque se han utilizado históricamente para monitorizar la expresión génica, sólo en épocas recientes se ha propuesto esta tecnología como herramienta de detección cuantitativa de comunidades bacterianas. En 2005, Palmer y cols. [30] publicaron la primera microserie filogenética de oligonucleótidos de ADN, diseñada para proporcionar información cuantitativa sistemática sobre la composición taxonómica de la población microbiana del tubo GI. Este enfoque permitía la detección de especies bacterianas individuales presentes en el 0,1% de una mezcla compleja. Se utilizó un programa informático para pronosticar las condiciones de hibridización, que deben ser las mismas para todas las sondas del conjunto y deben maximizar la especificidad de la hibridización. Una consideración importante es que la hibridización cruzada de especies muy abundantes podría dar resultados falso-positivos, que pueden en ocasiones separarse comparando los resultados de la serie con las bibliotecas de los clones ARNr 16S. Asimismo, las secuencias novedosas no son captadas.

El enfoque considerado como el patrón de oro para obtener instantáneas del ecosistema microbiano consiste, hasta la fecha, en constituir bibliotecas genéticas de bacterias que contengan copias de los genes ARNr 16S de la comunidad. Mediante esta técnica se han elaborado extensos inventarios de las comunidades microbianas humanas del colon, la cavidad oral, el esófago y el estómago. No obstante, este abordaje es costoso y laborioso, especialmente cuando se precisa un gran número de muestras o un gran número de clones para cada una de las muestras. Con la introducción de tecnologías de pirosecuenciado 454 puede obtenerse una información taxonómica de alta fidelidad que permite la investigación simultánea de varias muestras por pasada. Esta potente tecnología puede suministrar información taxonómica apropiada a costes menores por muestra.

## Pronóstico de la funcionalidad de la microbiota intestinal

A pesar del hecho de que la composición específica de la microbiota parece variar considerablemente de un individuo a otro, realiza, no obstante, funciones muy similares en todos ellos. El conjunto de características metabólicas de la microbiota es similar independientemente del conjunto de características de la comunidad bacteriana [31], lo que respalda el concepto de redundancia funcional entre las especies bacterianas. Sin embargo, ¿cuáles son estas funciones? El primer paso importante cuando se estudia un ecosistema es identificar a sus miembros. Esta tarea se ha logrado en gran medida en el ámbito de la microbiota intestinal y existe un consenso internacional sobre cuál es la composición del ecosistema intestinal. El paso siguiente consiste en asociar un papel para cada microorganismo dentro de la comunidad y en relación con el hospedador. No obstante, se trata de una tarea sumamente difícil si se tiene en cuenta que la mayoría de los microbios intestinales no pueden crecer en condiciones de laboratorio. Sin embargo, incluso en un mundo ideal donde todos estos microorganismos pudieran cultivarse, la actividad de uno de los microbios en cultivo no sería necesariamente equivalente a la observada en el contexto de toda la comunidad in situ. Esto sin mencionar la problemática tarea de delinear la función de uno de los tipos de microorganismos en el trasfondo de las interacciones con sus vecinos comunitarios.

Las técnicas de rastreo de isótopos in situ consisten en la incubación de microorganismos con un sustrato estable marcado con isótopo. Sólo aquellos microorganismos que metabolizan el sustrato incorporarán las sustancias marcadas dentro de sus biomasas (incluyendo sus ADN), permitiendo de este modo la conexión entre identidad y función. Mediante esta técnica, Egert y cols. [32] identificaron microorganismos fecales (por ejemplo, *Streptococcus bovis* y *Clostridium perfringens*), participantes en la fermentación de la glucosa, especulando que este abordaje conllevaba un potencial enorme para identificar bacterias implicadas en la fermentación de hidratos de carbono oligoméricos y poliméricos, relevantes en la dieta, en el intestino humano.

Pocos grupos han tratado de explorar la funcionalidad de las comunidades a través de análisis metagenómicos de la microbiota intestinal. Se utilizó el secuenciado aleatorio para reconstruir los genomas de los miembros de todo el ecosistema. A diferencia de las bibliotecas de clones ARNr 16S, en las que sólo se clonaban amplicones correspondientes al gen ARNr 16S, se efectuó la identificación sis-

temática de todo el genoma de la comunidad bacteriana (el microbioma). Se rompe el ADN de la comunidad bacteriana en fragmentos aleatorios y, a continuación, se ensamblan las secuencias de estos fragmentos en la posición correcta buscando las secuencias superpuestas con herramientas bioinformáticas. Es algo así como desmenuzar varios volúmenes de varios libros en piezas pequeñas y luego tratar de deducir el texto. Las secuencias reconstruidas pueden utilizarse seguidamente para pronosticar las funciones biológicas de las bacterias intestinales. Aunque este mero procedimiento no informará sobre qué genes son activos o cómo interactúan las bacterias entre sí, puede proporcionar pistas sobre las funciones que son capaces de desempeñar tales microorganismos. Utilizando este enfoque, Gill y cols. [33] demostraron que nuestros comensales bacterianos poseen un metabolismo enriquecido para la producción y la conversión de energía y el transporte y el metabolismo de hidratos de carbono, con implicaciones importantes para el tratamiento de enfermedades como la obesidad. El proyecto del microbioma humano [34], lanzado como enfoque multicéntrico en Estados Unidos, Europa y Asia, así como el proyecto cooperativo MetaHIT, patrocinado por la Comisión Europea, implican la caracterización de los genomas, el ARNm, la proteína y los productos metabólicos y ampliarán nuestro conocimiento sobre cómo actúa la microbiota como comunidad. Existen ejemplos finos de la fusión entre el progreso tecnológico en el ámbito de la biología integradora y una caracterización molecular más profunda establecida para descifrar las funciones de la microbiota intestinal todavía pendientes de descubrir.

### **Papel de la microbiota intestinal en la obesidad**

El incremento de la prevalencia de obesidad durante las últimas décadas es alarmante y no puede ser atribuido únicamente a factores genéticos [35]. La investigación está señalando actualmente a la microbiota intestinal como factor ambiental que afecta a la obesidad. La primera prueba demostrativa del papel de las bacterias intestinales en la regulación del almacenamiento de grasa se evidenció en modelos de experimentación animal. Los ratones libres de gérmenes que nacen y viven en un entorno sin bacterias son más delgados que los ratones que viven en un entorno convencional. Los ratones libres de gérmenes inoculados con la microbiota extraída del ciego de animales convencionales mostraron un aumento del 60% de la grasa corporal total a pesar de una reducción imprevista de la ingestión de alimento [36]. El nivel bajo

de grasa corporal en los ratones libres de gérmenes se debía a la supresión de la lipogénesis de novo hepática y a la inhibición del almacenamiento de triglicéridos en tejidos adiposos blancos. Este último efecto está causado por una producción excesiva del inhibidor de la lipoproteinlipasa Faia (factor adipocítico inducido por el ayuno o ANGP-TL4) en el intestino de ratones carentes de gérmenes. Teniendo en cuenta que la hidrólisis por la lipoproteinlipasa de los triglicéridos circulantes es crucial para la captación de los ácidos grasos por los adipocitos, un incremento del Faia circulante resulta en un bloqueo de la captación de ácidos grasos y el almacenamiento de grasa. El papel primordial del Faia como mediador entre la microbiota intestinal y la regulación del peso corporal fue demostrado por Bäckhed y cols. [37] en animales carentes de los genes implicados en la producción del Faia. Ratones knock-out-Faia libres de gérmenes llegaron a adquirir un estado de obesidad tras el consumo de una dieta rica en grasas, al contrario que los controles de tipo natural libres de gérmenes. Además, los ratones knock-out-Faia mostraron una expresión reducida de PGC-1 $\alpha$  y las enzimas participantes en la oxidación de ácidos grasos, confirmando el papel clave del Faia en esta vía metabólica. En una situación propensa a la obesidad, como el consumo de una dieta rica en grasa y azúcar, de estilo occidental, los animales libres de gérmenes no presentaron obesidad [37]. El fenotipo magro persistente en los ratones libres de gérmenes se asociaba a un incremento de la AMP-cinasa fosforilada en el hígado y la musculatura. La AMP-cinasa es un sensor de energía intracelular que, cuando es fosforilada, ataca a los genes implicados en la oxidación de los ácidos grasos, permitiendo suponer la presencia de un incremento de la combustión de grasas en ratones libres de gérmenes. Es probable que la activación de la AMP-cinasa y los niveles elevados del Faia sean dos mecanismos independientes que induzcan la oxidación de las grasas y la protección de los ratones libres de gérmenes frente a la obesidad inducida por la alimentación. Es incluso más importante reseñar que estos ensayos demuestran las complicadas relaciones existentes entre la microbiota intestinal y la intervención sobre el peso del hospedador.

En ensayos realizados en animales genéticamente obesos (*ob/ob*) se confirmó que la ganancia de peso se asociaba a cambios en la composición de las bacterias intestinales. Estos animales son incapaces de producir leptina y, en consecuencia, llegan a ser hiperfágicos y obesos. Se generó un inventario completo de secuencias de genes ARNr 16S a partir del contenido cecal de animales *ob/ob* y sus hermanos magros (*ob/+*, *+/+*). Tras analizar más de 5.000

secuencias, Ley y cols. [38] hallaron que los ratones obesos presentaban una reducción del 50% de Bacteroidetes y un incremento proporcional de Firmicutes en comparación con sus hermanos de camada magros. La desviación de la composición de la microbiota cecal no guardaba relación con el cambio en la cantidad de bacterias, el parentesco ni el género de los ratones *ob/ob*. También se llegó a una observación similar en humanos: una mayor proporción de Firmicutes y una reducción de Bacteroidetes en las deposiciones de pacientes obesos. Por otra parte, a medida que las personas obesas pierden peso durante un año, la proporción de Firmicutes llega a aproximarse más a la de las personas delgadas. Sin embargo, se desconoce si estas desviaciones en la composición de la microbiota asociadas a la obesidad son una causa o una consecuencia del sobrepeso [15]. Es imprescindible intensificar la investigación para revelar la composición de la microbiota intestinal en personas obesas de diferentes razas, géneros y localizaciones geográficas. Estos datos serán necesarios para establecer un vínculo entre la composición bacteriana y la epidemia mundial de obesidad.

En un intento para comprender las funciones fisiológicas de la microbiota asociada a la obesidad se trasplantaron los contenidos cecales de ratones *ob/ob*, con una proporción elevada de Firmicutes/Bacteroidetes, en ratones libres de gérmenes. Estos animales mostraron un mayor incremento de grasa corporal que los ratones inoculados con los contenidos cecales de un donante magro [39]. En el mismo estudio, una comparación entre la microbiota ‘obesa’ y la microbiota ‘magra’ a nivel del metagenoma demostró que las bacterias procedentes de ratones *ob/ob* contenían genes que codificaban para enzimas especializadas en la descomposición de polisacáridos indigeribles, como glucosidasas  $\alpha$ , galactosidasas  $\alpha$ , galactosidasas  $\beta$ , piruvato formatoliasa y KO0656. Los ratones obesos presentaban ácidos grasos de cadena más corta en su contenido cecal y menos calorías en las deposiciones que los ratones delgados, lo que daba a entender que los animales obesos extraían más energía de la alimentación. No obstante, la contribución cuantitativa del ácido graso de cadena corta a la ingestión total de energía exige una evaluación adicional antes de llegar a la conclusión de que la microbiota intestinal asociada a la obesidad es una causa de la misma.

Más recientemente, Turnbaugh y cols. [40] demostraron que la alimentación de ratones anteriormente libres de gérmenes, o ratones convencionales, con una dieta rica en grasas y azúcar, de estilo occidental, inducía un aumento de la proporción cecal Firmicutes/Bacteroidetes, similar a la de los ratones *ob/ob*. No obstante, al contrario

que el modelo *ob/ob*, la elevación de Firmicutes se debió al florecimiento de sólo un elemento bacteriano, concretamente *Mollicutes*. Es interesante destacar que la microbiota cecal inducida por la alimentación de estilo occidental mostraba también más propiedades obesógenas que la microbiota generada por una dieta de control cuando era inoculada en ratones libres de gérmenes. A la inversa, la modificación de la ingestión calórica por la restricción de hidratos de carbono en la alimentación de estilo occidental reveló una disminución de *Mollicutes*. El análisis metagenómico reveló que la microbiota de la ‘dieta occidental’ más rica en *Mollicutes* estaba enriquecida en genes implicados en el metabolismo de la fructosa y la manosa y en vías de fosfotransferasa. Estas vías son cruciales para que bacterias importen y fermenten azúcares simples y glicanos del hospedador. La producción de ácidos grasos de cadena corta como consecuencia de la fermentación de hidratos de carbono por las bacterias intestinales podría proporcionar una energía adicional que contribuiría subsiguientemente a la acumulación de grasa corporal en los ratones.

### Bacterias y diabetes

Los datos enumerados anteriormente indican que la microbiota intestinal contribuye al metabolismo energético y al desarrollo de obesidad en el hospedador. Teniendo en cuenta que la obesidad es uno de los principales factores de riesgo con respecto a la aparición de diabetes de tipo 2, varios grupos han especulado con la idea de que la microbiota intestinal podría ejercer un impacto sobre la diabetes más allá de la manipulación del peso. De hecho, está perfectamente descrita la contribución de microorganismos a las complicaciones diabéticas. En la úlcera del pie diabético, un proceso vinculado a la neuropatía diabética y a las complicaciones microvasculares que afectan a un gran número de pacientes diabéticos, las infecciones bacterianas contribuyen al deficiente proceso de curación de heridas [ver revisión en 41]. Además, una de las complicaciones GI más corrientes de la diabetes mellitus son los episodios crónicos de diarrea acuosa. Se ha comprobado que el sobrecrecimiento bacteriano debido a la reducción de la motilidad gastrointestinal relacionada con la neuropatía diabética es la causa de esta complicación intestinal y que el tratamiento con antibióticos mejoraba los síntomas clínicos [42]. En otro ejemplo, tanto la diabetes de tipo 1 como la diabetes de tipo 2 conllevan un mayor riesgo de aparición de periodontitis [43–46]. La periodontitis está causada por infecciones provo-

cadras por bacterias gramnegativas que se fijan en el borde gingival del tejido del hospedador [47]. En un estudio de seguimiento realizado durante dos décadas en 9.296 pacientes se demostró que la enfermedad periodontal basal es un pronosticador clínico de la incidencia de diabetes de tipo 2, lo que proporciona un respaldo epidemiológico a la asociación de ambas enfermedades [48]. Recientemente, en un estudio se demostró que ratas Zucker *fa/fa* con periodontitis y alimentadas con una dieta rica en grasas presentaban un inicio más grave y precoz de resistencia a la insulina que sus contrapartes sin periodontitis [49]. Dado que la inflamación crónica es un denominador común de la diabetes y la periodontitis [ver revisión en 50], la infección bacteriana local podría estar implicada en el desarrollo de la resistencia a la insulina. En apoyo de esta hipótesis, un informe clínico reveló que el tratamiento periodontal y el empleo de antibióticos mejoraba el control de la glucemia en un paciente diabético [51]. En otro estudio, el tratamiento con antibióticos en las bolsas periodontales, una vez por semana durante cuatro semanas, redujo significativamente los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  y HbA1C en 12 pacientes diabéticos de tipo 2 [52]. En conjunto, estos datos indican que la infección bacteriana local contribuye a los síntomas sistémicos de diabetes.

### **La microbiota intestinal contribuye a la homeostasis de la glucosa**

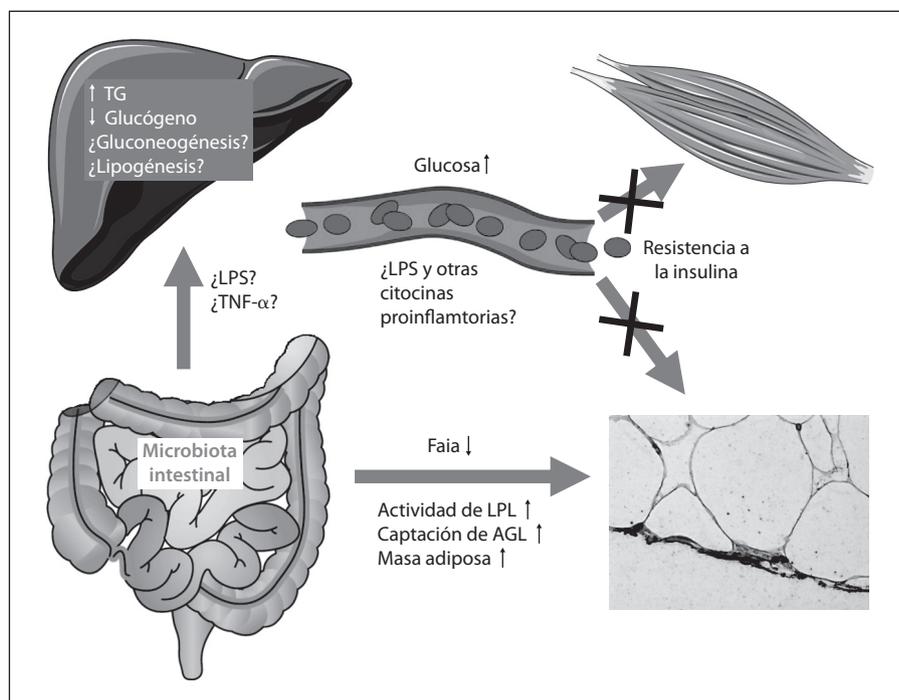
La resistencia a la insulina es una patología concomitante con la obesidad y se correlaciona con inflamación crónica de baja intensidad [53]. Basándonos en datos recientes sobre el impacto que ejerce la microbiota intestinal sobre la obesidad, otros autores y nosotros mismos hemos preconizado que la microbiota intestinal podría contribuir al inicio de la resistencia a la insulina y al estado inflamatorio del hospedador. Indagamos esta hipótesis tratando a ratones *ob/ob* con antibióticos de amplio espectro, norfloxacin y ampicilina, introducidos en su agua para beber [54]. El tratamiento antibiótico eliminó casi por completo la población bacteriana intestinal. Al final del tratamiento de dos semanas, los niveles de glucemia en ayunas se normalizaron y la tolerancia a la glucosa oral mejoró notablemente en los animales tratados, a pesar de que persistía la obesidad de estos animales. Una reducción significativa del lipopolisacárido (LPS) y el TNF- $\alpha$  circulantes indicaba que la inflamación de baja intensidad se había reducido. Un incremento del almacenamiento de glucógeno hepático en situación postpran-

dial y una reducción de los triglicéridos hepáticos en ayunas realizó adicionalmente el beneficio reductor de la población de bacterias intestinales en los ratones *ob/ob*.

La contribución del LPS, un componente de la membrana externa de bacterias gramnegativas en la diabetes de tipo 2 y la obesidad, fue revisada por Wellen y Hotamisligil [53]. En ratones, el LPS circulante muestra una pauta diurna con incremento en el ciclo de oscuridad y reducción en el ciclo de iluminación. Además, el tratamiento con una dieta rica en grasas incrementó la proporción de bacterias gramnegativas en el intestino así como los niveles de endotoxina circulantes. Cuando se infundía LPS crónicamente en ratones, causaba obesidad leve y resistencia a la insulina hepática [55]. En otro estudio, Cani y cols. [56] trataron con ampicilina y neomicina a ratones obesos (*ob/ob*) o ratones C57BL/6J alimentados con una dieta rica en grasas. Esta combinación antibiótica alteraba espectacularmente la composición de la microbiota intestinal con resultado de una reducción de la endotoxemia y una mejora de la tolerancia a la glucosa en ambos modelos animales. Estas observaciones son coherentes con nuestros resultados previos según los cuales la recuperación de la sensibilidad a la insulina se asociaba a una reducción de la situación inflamatoria, respaldando la idea de que la modulación de la microbiota intestinal alivia la inflamación de baja intensidad e intensifica la sensibilidad a la insulina en ratones. Aunque se ha demostrado que un tratamiento antibiótico a corto plazo mejora la diabetes en ratones, los beneficios a largo plazo y los efectos secundarios de este enfoque siguen pendientes de aclaración.

### **Factores alimentarios**

Los probióticos se definen como 'suplemento alimentario microbiano viable que influye beneficiosamente sobre el hospedador a través de sus efectos en el tubo intestinal'. Las bifidobacterias y los lactobacilos son tradicionalmente los probióticos más corrientemente utilizados en las intervenciones nutricionales. Se ha comprobado que las intervenciones con probióticos alivian la intolerancia a la lactosa, incrementan la inmunidad en lactantes y reducen el riesgo de diarrea inducida por rotavirus [ver revisión en 57]. Asimismo, se ha observado que el aporte complementario de probióticos mejora los síntomas de diabetes en modelos de animales afectados de diabetes de tipo 1 o tipo 2. La ingestión de *Lactobacillus casei* retrasó el inicio de diabetes en ratones diabéticos no obesos así como en ratones con diabetes inducida por aloxa-



**Fig. 1.** Ilustración esquemática de los impactos que ejerce la microbiota intestinal sobre el tratamiento del peso y la diabetes.

no [58, 59]. Análogamente al aloxano, el tratamiento con estreptozotocina (STZ) en ratas y ratones induce una diabetes dependiente de la insulina debido a la toxicidad de las células  $\beta$  pancreáticas relacionada con el fármaco. El pronóstico de la diabetes por inyección neonatal de STZ puede mitigarse alimentando a las ratas con pienso al que se ha incorporado *Lactobacillus rhamnosus* [60]. Además, la administración de Dahi, un producto lácteo fermentado indio que contiene *Lactobacillus acidophilus* (NCDC14) y *L. casei* (NCDC19), en ratas tratadas con STZ mejoró la tolerancia a la glucosa y redujo los colesterolos LDL y VLDL totales así como los niveles de triglicéridos [61]. En un modelo animal de diabetes de tipo 2 con ratones KK-Ay, en los que una mutación en el gen Ay causa obesidad y resistencia a la insulina, la administración por vía oral de *L. casei* redujo significativamente los niveles plasmáticos de glucosa e insulina, así como el peso corporal, a pesar de una ingestión similar de alimentos [62]. En un modelo animal de diabetes no genética, el inicio de la resistencia a la insulina inducido por una alimentación rica en fructosa también se retrasó por el tratamiento con Dahi [63].

Los prebióticos se definen como 'componentes alimentarios no digeribles que influyen beneficiosamente sobre el hospedador por estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de una sola bacteria o un número

limitado de bacterias en el colon' [ver revisión en 57]. La fibra alimentaria es un ejemplo de este tipo de componente. Se ha supuesto que el consumo de polisacáridos indigeribles podría reducir el riesgo de diabetes, probablemente a través de las propiedades físicas y las proporciones de ácidos grasos de cadena corta producidos por fermentación colónica de las fibras [64]. También se ha demostrado que el consumo de prebióticos mejora la diabetes inducida por dietas ricas en grasas en los ratones. Cani y cols. [65] observaron que, en este modelo animal, el aporte complementario de oligofruktosa mejoraba la tolerancia a la glucosa y reducía los niveles plasmáticos de las citocinas proinflamatorias, IL-6 e IL-1 $\alpha$ . Cabe destacar por su interés que la dieta rica en grasas modulaba la composición de la microbiota cecal; en particular, reducía la población bifidobacteriana. La adición de oligofruktosa, pero no de celulosa, incrementaba los recuentos bifidobacterianos de un modo similar al de los animales de control [65]. La correlación negativa entre el número de bifidobacterias intestinales y la resistencia a la insulina suscita la pregunta de cuál sería el impacto de las bifidobacterias en la diabetes. Se precisan más estudios para aclarar si un incremento de la población intestinal de bifidobacterias es o no una estrategia terapéutica para la diabetes.

Aparte de las fibras no digeribles, otros componentes alimentarios también podrían influir sobre la composición y la funcionalidad de la microbiota intestinal. Los ácidos clorógenos, presentes en infusiones de café y en el té, son conocidos por su extensa metabolización por la microbiota intestinal [66]. Taguri y cols. [67] demostraron que el polifenol del té epigallocatequina-3-galato posee actividades antimicrobianas a través de la inhibición del crecimiento de numerosas bacterias implicadas en toxoinfecciones alimentarias in vitro. Sigue pendiente de aclaración si las actividades antimicrobianas del epigallocatequina-3-galato se extienden a la microbiota intestinal comensal, en cuyo caso el consumo crónico de alimentos que contengan tales compuestos podría alterar la composición o la funcionalidad de las poblaciones bacterianas intestinales.

Aunque la microbiota intestinal forma parte integral del cuerpo humano, sus funciones e interacciones con el hospedador siguen sin conocerse a ciencia cierta. En este artículo hemos revisado los resultados experimentales más recientes que describen el posible papel de bacterias intestinales en la obesidad y la diabetes de tipo 2 (fig. 1).

Estos datos pueden haber mostrado únicamente la punta del iceberg del amplio impacto que ejerce la microbiota intestinal sobre la salud. Con la introducción de métodos independientes de cultivos para evaluar la microbiota intestinal, pueden revelarse relaciones más complejas entre la fisiología humana y los trillones de bacterias residentes en el intestino. Nuestro reto en el futuro próximo será el de traducir los resultados venideros en herramientas y estrategias capaces de mejorar enfermedades crónicas como la obesidad y la diabetes de tipo 2. Para cumplir con este objetivo tenemos que responder a las preguntas siguientes: ¿Es la modulación de la composición de la microbiota intestinal una estrategia útil para tratar a pacientes con estas enfermedades? y, en caso afirmativo, ¿cómo serían las características de una supuesta microbiota intestinal ‘ideal’? ¿Puede ser transformado este conjunto de características por medio de intervenciones nutricionales o farmacéuticas? Es de esperar que las respuestas a estas preguntas pudieran contribuir a mejorar la calidad de vida de centenares de millones de pacientes obesos y diabéticos en todo el mundo.

## Bibliografía

- Ogden CL, Carroll MD, Curtin LR, et al: Prevalence of overweight and obesity in the United States, 1999–2004. *JAMA* 2006;295:1549–1555.
- Berghofer A, Pischon T, Reinhold T, et al: Obesity prevalence from a European perspective: a systematic review. *BMC Public Health* 2008;8:200.
- www.idf.org.
- Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al: Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635–1638.
- Tannock GW: The intestinal microflora; in Fuller R, Perdigon G (eds): *Gut Flora. Nutrition, Immunity and Health*. Oxford, Blackwell Press, 2003, pp 1–23.
- Miller TL, Wolin MJ: Stability of *Methanobrevibacter smithii* populations in the microbial flora excreted from the human large bowel. *Appl Environ Microbiol* 1983;45:317–318.
- Simon GL, Gorbach SL: Intestinal flora in health and disease. *Gastroenterology* 1984;86:174–193.
- Sghir A, Gramet G, Suau A, et al: Quantification of bacterial groups within human fecal flora by oligonucleotide probe hybridization. *Appl Environ Microbiol* 2000;66:2263–2266.
- Harmsen HJ, Raangs GC, He T, et al: Extensive set of 16S rRNA-based probes for detection of bacteria in human feces. *Appl Environ Microbiol* 2002;68:2982–2990.
- Lay C, Rigottier-Gois L, Holmstrom K, et al: Colonic microbiota signatures across five northern European countries. *Appl Environ Microbiol* 2005;71:4153–4155.
- Suau A, Bonnet R, Sutren M, 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;65:4799–4807.
- Hold G, Pryde S, Russel V, et al: Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. *FEMS Microbiol Ecol* 2002;39:33–39.
- Hayashi H, Sakamoto M, Benno Y: Phylogenetic analysis of the human gut microbiota using 16S rDNA clone libraries and strictly anaerobic culture-based methods. *Microbiol Immunol* 2002;46:535–548.
- Hayashi H, Sakamoto M, Kitahara M, Benno Y: Molecular analysis of fecal microbiota in elderly individuals using 16S rDNA library and T-RFLP. *Microbiol Immunol* 2003;47:557–570.
- Ley RE, Turnbaugh PJ, Klein S, Gordon JI: Microbial ecology: human gut microbes associated with obesity. *Nature* 2006;444:1022–1023.
- Bibiloni R, Mangold M, Madsen KL, et al: The bacteriology of biopsies differs between newly diagnosed, untreated, Crohn’s disease and ulcerative colitis patients. *J Med Microbiol* 2006;55:1141–1149.
- Frank DN, St Amand AL, Feldman RA, et al: Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:13780–13785.
- Kassinen A, Krogius-Kurikka L, Makivuokko H, et al: The fecal microbiota of irritable bowel syndrome patients differs significantly from that of healthy subjects. *Gastroenterology* 2007;133:24–33.
- Kurokawa K, Itoh T, Kuwahara T, et al: Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res* 2007;14:169–181.
- Andersson AF, Lindberg M, Jakobsson H, et al: Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE* 2008;3:e2836.
- Sherman LA, Savage DC: Lipoteichoic acids in *Lactobacillus* strains that colonize the mouse gastric epithelium. *Appl Environ Microbiol* 1986;52:302–304.
- Guan LL, Hagen KE, Tannock GW, et al: Detection and identification of *Lactobacillus* species in crops of broilers of different ages by using PCR-denaturing gradient gel electrophoresis and amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:6750–6757.

- 23 Konstantinov SR, Awati A, Smidt H, et al: Specific response of a novel and abundant *Lactobacillus amylovorus*-like phylotype to dietary prebiotics in the guts of weaning piglets. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:3821–3830.
- 24 Snart J, Bibiloni R, Grayson T, et al: Supplementation of the diet with high-viscosity beta-glucan results in enrichment for lactobacilli in the rat cecum. *Appl Environ Microbiol* 2006;72:1925–1931.
- 25 Zoetendal EG, Akkermans AD, de Vos WM: Temperature gradient gel electrophoresis analysis of 16S rRNA from human fecal samples reveals stable and host-specific communities of active bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1998;64:3854–3859.
- 26 Muyzer G, Smalla K: Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek* 1998;73:127–141.
- 27 Tannock GW, Munro K, Bibiloni R, et al: Impact of consumption of oligosaccharide-containing biscuits on the fecal microbiota of humans. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:2129–2136.
- 28 Lim EL, Tomita AV, Thilly WG, Polz MF: Combination of competitive quantitative PCR and constant-denaturant capillary electrophoresis for high-resolution detection and enumeration of microbial cells. *Appl Environ Microbiol* 2001;67:3897–3903.
- 29 Seksik P, Rigottier-Gois L, Gramet G, et al: Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* 2003;52:237–242.
- 30 Palmer C, Bik EM, Eisen MB, et al: Rapid quantitative profiling of complex microbial populations. *Nucleic Acids Res* 2006;34:e5.
- 31 Tannock GW: New perceptions of the gut microbiota: implications for future research. *Gastroenterol Clin North Am* 2005;34:361–382, vii.
- 32 Egert M, de Graaf AA, Maathuis A, et al: Identification of glucose-fermenting bacteria present in an in vitro model of the human intestine by RNA-stable isotope probing. *FEMS Microbiol Ecol* 2007;60:126–135.
- 33 Gill SR, Pop M, Deboy RT, et al: Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312:1355–1359.
- 34 Turnbaugh PJ, Ley RE, Hamady M, et al: The human microbiome project. *Nature* 2007;449:804–810.
- 35 Hill JO: Understanding and addressing the epidemic of obesity: an energy balance perspective. *Endocr Rev* 2006;27:750–761.
- 36 Backhed F, Ding H, Wang T, et al: The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:15718–15723.
- 37 Bäckhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, Gordon JI: Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:979–984.
- 38 Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, et al: Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:11070–11075.
- 39 Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al: An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 2006;444:1027–1031.
- 40 Turnbaugh PJ, Backhed F, Fulton L, Gordon JI: Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome. *Cell Host Microbe* 2008;3:213–223.
- 41 Gary SR, Woo KY: The biology of chronic foot ulcers in persons with diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2008;24(suppl 1):S25–S30.
- 42 Beebe DK, Walley E: Diabetic diarrhea. An underdiagnosed complication? *Postgrad Med* 1992;91:179–186.
- 43 Emrich LJ, Shlossman M, Genco RJ: Periodontal disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *J Periodontol* 1991;62:123–131.
- 44 Loe H: Periodontal disease. The sixth complication of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 1993;16:329–334.
- 45 Nelson RG, Shlossman M, Budding LM, et al: Periodontal disease and NIDDM in Pima Indians. *Diabetes Care* 1990;13:836–840.
- 46 Taylor GW, Burt BA, Becker MP, et al: Non-insulin dependent diabetes mellitus and alveolar bone loss progression over 2 years. *J Periodontol* 1998;69:76–83.
- 47 Amano A: Molecular interaction of *Porphyromonas gingivalis* with host cells: implication for the microbial pathogenesis of periodontal disease. *J Periodontol* 2003;74:90–96.
- 48 Demmer RT, Jacobs DR Jr, Desvarieux M: Periodontal disease and incident type 2 diabetes: results from the First National Health and Nutrition Examination Survey and its epidemiologic follow-up study. *Diabetes Care* 2008;31:1373–1379.
- 49 Watanabe K, Petro BJ, Shlmon AE, Unterman TG: Effect of periodontitis on insulin resistance and the onset of type 2 diabetes mellitus in Zucker diabetic fatty rats. *J Periodontol* 2008;79:1208–1216.
- 50 Mealey BL, Rose LF: Diabetes mellitus and inflammatory periodontal diseases. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2008;15:135–141.
- 51 Schulze A, Schonauer M, Busse M: Sudden improvement of insulin sensitivity related to an endodontic treatment. *J Periodontol* 2007;78:2380–2384.
- 52 Iwamoto Y, Nishimura F, Nakagawa M, et al: The effect of antimicrobial periodontal treatment on circulating tumor necrosis factor-alpha and glycated hemoglobin level in patients with type 2 diabetes. *J Periodontol* 2001;72:774–778.
- 53 Wellen KE, Hotamisligil GS: Inflammation, stress, and diabetes. *J Clin Invest* 2005;115:1111–1119.
- 54 Membrez M, Blancher F, Jaquet M, et al: Gut microbiota modulation with norfloxacin and ampicillin enhances glucose tolerance in mice. *FASEB J* 2008;22:2416–2426.
- 55 Cani PD, Amar J, Iglesias MA, et al: Metabolic endotoxemia initiates obesity and insulin resistance. *Diabetes* 2007;56:1761–1772.
- 56 Cani PD, Bibiloni R, Knauf C, et al: Changes in gut microbiota control metabolic endotoxemia-induced inflammation in high-fat diet-induced obesity and diabetes in mice. *Diabetes* 2008;57:1470–1481.
- 57 Roberfroid MB: Prebiotics and probiotics: are they functional foods? *Am J Clin Nutr* 2000;71:1682S–1687S.
- 58 Matsuzaki T, Nagata Y, Kado S, et al: Prevention of onset in an insulin-dependent diabetes mellitus model, NOD mice, by oral feeding of *Lactobacillus casei*. *APMIS* 1997;105:643–649.
- 59 Matsuzaki T, Nagata Y, Kado S, et al: Effect of oral administration of *Lactobacillus casei* on alloxan-induced diabetes in mice. *APMIS* 1997;105:637–642.
- 60 Tabuchi M, Ozaki M, Tamura A, et al: Antidiabetic effect of *Lactobacillus GG* in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003;67:1421–1424.
- 61 Yadav H, Jain S, Sinha PR: Oral administration of Dahi containing probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* delayed the progression of streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Dairy Res* 2008;75:189–195.
- 62 Matsuzaki T, Yamazaki R, Hashimoto S, Yokokura T: Antidiabetic effects of an oral administration of *Lactobacillus casei* in a non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM) model using KK-Ay mice. *Endocr J* 1997;44:357–365.
- 63 Yadav H, Jain S, Sinha PR: Antidiabetic effect of probiotic Dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in high fructose fed rats. *Nutrition* 2007;23:62–68.
- 64 Weickert MO, Pfeiffer AF: Metabolic effects of dietary fiber consumption and prevention of diabetes. *J Nutr* 2008;138:439–442.
- 65 Cani PD, Neyrinck AM, Fava F, et al: Selective increases of bifidobacteria in gut microflora improve high-fat-diet-induced diabetes in mice through a mechanism associated with endotoxaemia. *Diabetologia* 2007;50:2374–2383.
- 66 Couteau D, McCartney AL, Gibson GR, et al: Isolation and characterization of human colonic bacteria able to hydrolyse chlorogenic acid. *J Appl Microbiol* 2001;90:873–881.
- 67 Taguri T, Tanaka T, Kouno I: Antibacterial spectrum of plant polyphenols and extracts depending upon hydroxyphenyl structure. *Biol Pharm Bull* 2006;29:2226–2235.