

Proyecto Final

Análisis Filogenético y Potencial Terapéutico de Cepas de Lactobacillus en la Salud Vaginal: Enfoque en el Gen gyrB

<https://github.com/SARISPARRA/ProyectoBioinf.git>

Integrantes: Oriana Granada Correa, Santiago Montoya Ortega y Sara Parra Díaz

Docente: Laura Salazar Jaramillo

Universidad EIA, Envigado

Fecha: 18/11/2024

1. Introducción

La microbiota vaginal desempeña un papel crucial en la salud reproductiva femenina, actuando como una barrera contra patógenos y contribuyendo a la homeostasis inmunológica del tracto genitourinario. Las especies de *Lactobacillus* son los microorganismos dominantes en la flora vaginal saludable y ejercen efectos beneficiosos a través de la producción de ácido láctico, peróxido de hidrógeno y bacteriocinas, que inhiben el crecimiento de patógenos como *Gardnerella vaginalis*, *Escherichia coli* y hongos del género *Candida* (Boris & Barbes, 2000; Reid et al., 2014). Las alteraciones en esta microbiota, como ocurre en la vaginosis bacteriana, pueden incrementar la susceptibilidad a infecciones y están asociadas con complicaciones reproductivas, lo que subraya la importancia de estrategias terapéuticas que incluyan el uso de probióticos basados en lactobacilos (Zhou et al., 2014).

Dentro de los probióticos estudiados, cepas de *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus crispatus* y *Lactobacillus acidophilus* han demostrado tener propiedades beneficiosas para la salud vaginal, reduciendo los síntomas de la vaginosis bacteriana y favoreciendo la recuperación de una microbiota equilibrada (Parolin et al., 2015; Reid et al., 2014). Sin embargo, la selección de cepas probióticas adecuadas requiere una caracterización genética precisa, ya que variaciones intraespecíficas pueden influir en su eficacia y seguridad. Por esta razón, el análisis filogenético basado en genes específicos, como el gen *gyrB*, resulta fundamental para identificar cepas con características beneficiosas, diferenciarlas de otras especies y comprender sus relaciones evolutivas (He et al., 2018; Li et al., 2020).

El gen *gyrB*, que codifica la subunidad B de la ADN girasa, es una herramienta de referencia en estudios filogenéticos de bacterias debido a su alta variabilidad y capacidad para discriminar entre especies y cepas estrechamente relacionadas. A diferencia de genes altamente conservados, *gyrB* permite un análisis más detallado de las diferencias genéticas entre cepas de lactobacilos, lo cual es esencial para la identificación de probióticos con potencial terapéutico (He et al., 2018). En este contexto, el uso de herramientas bioinformáticas como BLAST y ClustalW facilita la alineación y comparación de secuencias, permitiendo construir árboles filogenéticos que visualizan las relaciones evolutivas entre cepas (Li et al., 2020).

La presente investigación se centra en la caracterización genética de cepas de *Lactobacillus* mediante el análisis de secuencias de *gyrB*. Este estudio busca identificar variaciones genéticas relevantes y establecer relaciones filogenéticas que puedan orientar la selección de cepas con mayor eficacia en la prevención y tratamiento de infecciones vaginales. Al mejorar nuestra comprensión de la diversidad genética y la evolución de las cepas probióticas, se sientan las bases para desarrollar terapias más efectivas y seguras, lo que contribuye al avance en el campo de la salud femenina y en la prevención de enfermedades infecciosas en el tracto genitourinario (Parolin et al., 2015; Reid et al., 2014).

2. Metodología

2.1. Revisión de la Literatura y Selección de Cepas:

Se realizó una revisión exhaustiva de los genomas de cepas de *Lactobacillus* reconocidas por su presencia en la microbiota vaginal, utilizando bases de datos principales como PubMed y ScienceDirect. Estas cepas fueron seleccionadas en función de estudios previos que destacaban su efectividad en la salud vaginal. Las secuencias genómicas fueron descargadas y guardadas en formato FASTA para facilitar su análisis y manipulación.

2.2. Extracción del Gen *gyrB*:

En un sistema Linux (por ejemplo, en la versión Ubuntu 20.04), se diseñó un script en Shell para extraer de manera computacional la secuencia del gen *gyrB* y generar su complemento inverso. Este script permite identificar y extraer la región específica del gen dentro de una secuencia genómica, seguida de la conversión a su complemento inverso para su posterior análisis.

2.3. Búsqueda de Secuencias Similares con BLAST:

Para explorar la diversidad genética y funcionalidad del gen *gyrB*, se utilizó BLASTN en la página web de NCBI. Este análisis comparó las secuencias de *gyrB* de las cepas seleccionadas con otras en la base de datos para identificar homología genética con cepas no estudiadas y evaluar su posible potencial en salud vaginal.

2.4. Alineación de Secuencias con ClustalW:

Se creó un archivo llamado *gyrB_sequences.fasta* que contiene todas las secuencias en formato FASTA. El alineamiento se realizó utilizando ClustalW2 (v2.1) con el siguiente comando:

```
clustalw2 -INFILE=gyrB_sequences.fasta -ALIGN -OUTFILE=aligned_sequences.aln
```

El archivo de alineamiento resultante (*aligned_sequences.aln*) fue visualizado en Jalview versión 2.11.4.1 para analizar las diferencias y conservar regiones entre las secuencias alineadas.

2.5. Análisis Filogenético en R:

Utilizando la versión 4.3.1 de R, se desarrolló un código para construir el árbol filogenético basado en las alineaciones de secuencias obtenidas previamente. Las distancias evolutivas fueron calculadas con el modelo de Jukes-Cantor (JC69), y el árbol se construyó usando el método Neighbor-Joining. El árbol filogenético final se guardó como un archivo de imagen (*arbol_filogenetico.png*) y se ajustó visualmente para facilitar su interpretación.

2.6. Cálculo de la Matriz de Distancias:

Se generó una matriz de distancias evolutivas entre las cepas mediante la función *cophenetic.phylo* en R. La matriz fue visualizada como un gráfico de calor en *ggplot2*, donde los colores indican la magnitud de la distancia genética. Este enfoque permitió una comprensión detallada de las relaciones filogenéticas entre las cepas seleccionadas, identificando cepas con alta proximidad genética que podrían tener aplicaciones en salud vaginal.

3. Resultados

Los resultados obtenidos a partir del análisis filogenético de las cepas de *Lactobacillus* presentes en el microbiota vaginal revelaron las relaciones evolutivas entre las secuencias de ADN de diferentes cepas. Se identificaron similitudes y diferencias clave, las cuales fueron analizadas utilizando herramientas bioinformáticas. A continuación, se presentan los hallazgos detallados de este análisis, incluyendo el alineamiento de secuencias, la construcción del árbol filogenético y las inferencias derivadas de la matriz de distancias evolutivas.

3.1. Identificación de cepas.

Para llevar a cabo la identificación de las cepas de *Lactobacillus* con potencial terapéutico en la salud vaginal, se realizó una revisión exhaustiva de la literatura científica. En esta fase del estudio, nos centramos en identificar cepas reconocidas en investigaciones previas por su efectividad en la microbiota vaginal y en el tratamiento de infecciones como la vaginosis bacteriana. Utilizando artículos de referencia, se seleccionaron cepas conocidas:

L. rhamnosus GR-1

- **Acceso:** NZ_PESP01000001.1
- **Artículos de referencia:**

Reid, G. (2014). Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *Journal of Infectious Diseases*. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14633723>

Reid, G. (2010). Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020729210003796>

Reid, G. (2006). Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *Journal of Infectious Diseases*. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S128645790600058X>

- **Región complementaria:** (16692..18641)
- **Gen identificado:** /gene="gyrB"

La cepa ***Lactobacillus rhamnosus GR-1*** es una de las más estudiadas en el contexto de la salud vaginal debido a su capacidad para colonizar el epitelio vaginal y producir sustancias antimicrobianas que inhiben el crecimiento de patógenos. En los artículos consultados, se describe cómo *L. rhamnosus GR-1* ayuda a mantener el pH vaginal bajo mediante la producción de ácido láctico, lo cual crea un ambiente hostil para bacterias que causan vaginosis, como *Gardnerella vaginalis*. Además, se señala la capacidad de esta cepa para adherirse al epitelio vaginal, lo cual es crucial para evitar la recolonización de microorganismos patógenos. La importancia de esta cepa radica en su capacidad probada para restaurar la microbiota vaginal y en su potencial para ser utilizada en terapias probióticas para la vaginosis bacteriana.

Lactobacillus reuteri RC-14

- **Acceso:** NZ_PESO01000017.1
- **Artículos de referencia:**

Reid, G. (2014). Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *Journal of Infectious Diseases*. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1198743X14633723>

Reid, G. (2010). Oral probiotics can resolve urogenital infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0020729210003796>

Reid, G. (2006). Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *Journal of Infectious Diseases*. Recuperado de <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S128645790600058X>

- **Región complementaria:** (16692..18641)
- **Gen identificado:** /gene="gyrB"

En los estudios realizados, Reid destaca que *L. reuteri* RC-14 puede competir contra bacterias que causan vaginosis bacteriana, restaurando y equilibrando la microbiota vaginal. Además, esta cepa tiene la habilidad de adherirse al epitelio y estimular el sistema inmunitario local, lo que refuerza la protección contra infecciones. Su uso combinado con *L. rhamnosus* GR-1 es particularmente eficaz, ya que ambas cepas potencian sus efectos protectores, siendo recomendadas en terapias probióticas para la prevención de infecciones vaginales recurrentes.

Lactobacillus crispatus CTV-05

- **Acceso:** GL531736.1
- **Artículo de referencia:**
Hillier, S. L. (2024). *Lactobacillus crispatus* dominance and vaginal health. *Microbiome*. Recuperado de <https://link.springer.com/article/10.1186/s40168-024-01828-7>
- **Región complementaria:** (472535..474499)
- **Gen identificado:** /gene="gyrB"

Lactobacillus crispatus CTV-05 es ampliamente conocida por su capacidad para producir peróxido de hidrógeno (H₂O₂), que inhibe el crecimiento de bacterias patógenas asociadas con la vaginosis bacteriana. La investigadora Sharon L. Hillier y su equipo han evidenciado que esta cepa desempeña un papel importante en el mantenimiento de la salud vaginal al crear un ambiente hostil para los patógenos. Además, se ha demostrado que *L. crispatus* ayuda a reducir la tasa de recurrencia de vaginosis bacteriana, lo que la convierte en una opción ideal para ser utilizada en probióticos. Su acción protectora y su capacidad para dominar la microbiota vaginal la hacen indispensable para una microbiota vaginal equilibrada y resistente a infecciones.

Lactobacillus acidophilus La-14

- **Acceso:** CP005926.2
- **Artículo de referencia:**
Jang, S.-E. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* La-14 Attenuate *Gardnerella vaginalis*-Infected Bacterial Vaginosis in Mice. *Nutrients*. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28545241/>
- **Región:** (4283..6247)
- **Gen identificado:** /gene="gyrB"

Lactobacillus acidophilus La-14 es otra cepa importante en la prevención y tratamiento de la vaginosis bacteriana. La investigación de Se-Eun Jang muestra que *L. acidophilus* La-14 posee propiedades probióticas que le permiten adherirse al epitelio vaginal, produciendo ácido láctico y manteniendo un pH bajo que dificulta la proliferación de patógenos. Además, se ha demostrado que esta cepa reduce los síntomas de vaginosis y ayuda a prevenir infecciones recurrentes. Su capacidad para sobrevivir en el ambiente vaginal y adherirse al epitelio la convierte en un excelente candidato para el desarrollo de productos probióticos específicos para la salud vaginal.

Lactobacillus rhamnosus HN001

- **Acceso:** NZ_ABWJ01000013.1
- **Artículo de referencia:**
Jang, S.-E. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* HN001 and *Lactobacillus acidophilus* La-14 Attenuate *Gardnerella vaginalis*-Infected Bacterial Vaginosis in Mice. *Nutrients*. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28545241/>
- **Región complementaria:** (10954..12915)
- **Gen identificado:** /gene="gyrB"

Lactobacillus rhamnosus HN001 ha sido reconocida por sus múltiples beneficios para la salud general y vaginal. Según el estudio de Se-Eun Jang, esta cepa es eficaz en la prevención y el tratamiento de infecciones vaginales gracias a su capacidad para producir ácido láctico, lo que ayuda a mantener un ambiente ácido en el tracto vaginal, inhibiendo el crecimiento de bacterias patógenas. Además, *L. rhamnosus* HN001 estimula la respuesta inmunitaria local, fortaleciendo las defensas naturales del cuerpo contra infecciones. Su uso en probióticos vaginales ofrece una alternativa natural y efectiva para mujeres con infecciones recurrentes y desbalances del microbiota.

3.2. Descarga de archivos FASTA

Posteriormente, se descargaron los archivos FASTA de los genomas de estas bacterias. Para identificar y ubicar las regiones específicas del gen **gyrB** en cada una de ellas, se realizó el siguiente script en Shell (.sh) para extraer el gen **gyrB** del genoma completo de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 y obtener su complemento inverso, utilizando un sistema Linux Ubuntu (Ubuntu 20.04). De forma similar se realizó el mismo procedimiento respectivamente para cada cepa:

Código obtener el extraer el gen del genoma y el complemento inverso

```
# Script para extraer y obtener el complemento inverso del gen gyrB en L. rhamnosus HN001
# Archivo de secuencia completa
fasta_file = "rhamnosusHN001_complete.fasta"

# Posiciones específicas para gyrB en L. rhamnosus HN001
start = 10954
end = 12915

# Leer el archivo FASTA
with open(fasta_file, "r") as file:
    lines = file.readlines()

# Concatenar toda la secuencia en una sola cadena (omitiendo la línea de encabezado)
sequence = "".join(line.strip() for line in lines if not line.startswith(">"))

# Extraer la secuencia específica entre las posiciones indicadas (ajuste a índice 0)
gyrB_sequence = sequence[start-1:end]

# Generar el complemento inverso
complement_reverse = gyrB_sequence.translate(str.maketrans("ATCGatcg", "TAGCtagc"))[::-1]

# Guardar el complemento inverso en un nuevo archivo
with open("gyrB_rhamnosusHN001_complement_reverse.fasta", "w") as output:
    output.write(">gyrB_complement_reverse_Lactobacillus_rhamnosus_HN001\n")
    output.write("\n".join([complement_reverse[i:i+60] for i in range(0,
len(complement_reverse), 60)]))

print("Extracción y complemento inverso completados para L. rhamnosus HN001.")
```

Este código realiza los siguientes pasos:

- Lee el archivo FASTA completo de *Lactobacillus rhamnosus* HN001.
- Extrae la secuencia específica del gen **gyrB** entre las posiciones indicadas.
- Genera el complemento inverso de la secuencia extraída.
- Guarda el resultado en un nuevo archivo FASTA, listo para su análisis posterior.

Este procedimiento se repitió para cada una de las cepas estudiadas, permitiendo una extracción precisa de las secuencias de interés y facilitando su análisis en investigaciones futuras sobre el papel de estas bacterias en la salud vaginal.

3.3. Búsqueda de secuencias similares con BLAST

Para ampliar el conocimiento sobre la diversidad genética y funcionalidad de bacterias con potencial terapéutico en el tratamiento de la vaginosis bacteriana, se realizó un análisis de similitud de secuencias del gen *gyrB* mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). El análisis se realizó en la página web de NCBI usando la herramienta BLASTN (BLAST Nucleotide). El objetivo principal fue identificar cepas bacterianas con secuencias similares de *gyrB* que no han sido estudiadas extensivamente, explorando así su potencial para futuros estudios en aplicaciones biomédicas.

El gen *gyrB* codifica una subunidad de la ADN girasa, una enzima crítica para la replicación y el mantenimiento del ADN bacteriano. Estudiar *gyrB* en diferentes cepas de *Lactobacillus* permite no solo establecer relaciones filogenéticas, sino también identificar bacterias potencialmente valiosas para aplicaciones en salud vaginal, al basarse en las propiedades conocidas de cepas relacionadas.

A continuación, se presentan los resultados de las búsquedas de secuencias similares del gen *gyrB* en cepas de *Lactobacillus* que aún no han sido ampliamente estudiadas:

BLAST con gyrB de Lactobacillus rhamnosus GR-1

Lactobacillus rhamnosus strain MG4644

- Acceso: CP161813.1
- Resultados:
- Score: 3369 bits (1824)
- Expect: 0.0
- Identidad: 1888/1920 (98%)
- Gaps: 0/1920 (0%)
- Strand: Plus/Plus
- Posición de *gyrB*: 4513..6474

Lactobacillus rhamnosus strain UO.H3002

- Acceso: CP144174.1
- Resultados:
- Score: 3363 bits (1821)
- Expect: 0.0
- Identidad: 1887/1920 (98%)
- Gaps: 0/1920 (0%)
- Strand: Plus/Plus
- Posición de *gyrB*: 2682103..2684064

BLAST con gyrB de Lactobacillus reuteri RC-14

Limosilactobacillus reuteri strain MD IIE-43

- Acceso: CP137611.1
- Resultados:

- Score: 3530 bits (1911)
- Expect: 0.0
- Identidad: 1917/1920 (99%)
- Gaps: 0/1920 (0%)
- Strand: Plus/Plus
- Posición de gyrB: 1781568..1783517

Limosilactobacillus reuteri strain IMAUJBR3

- Acceso: CP139478.1
- Resultados:
- Score: 3291 bits (1782)
- Expect: 0.0
- Identidad: 1874/1920 (98%)
- Gaps: 0/1920 (0%)
- Strand: Plus/Plus
- Posición de gyrB: 6250..8199

BLAST con gyrB de Lactobacillus crispatus CTV-05

Lactobacillus amylovorus strain PMRA3

- Acceso: CP029754.1
- Resultados:
- Score: 2139 bits (1158)
- Expect: 0.0
- Identidad: 1666/1919 (87%)
- Gaps: 4/1919 (0%)
- Strand: Plus/Plus
- Posición de gyrB: 4258..6222

Lactobacillus helveticus strain SCB0641

- Acceso: CP094500.1
- Resultados:
- Score: 2128 bits (1152)
- Expect: 0.0
- Identidad: 1666/1922 (87%)
- Gaps: 4/1922 (0%)
- Strand: Plus/Plus
- Posición de gyrB: 4474..6438

BLAST con gyrB de Lactobacillus acidophilus La-14

Lactobacillus amylovorus strain JBD401

- Acceso: CP012389.1
- Resultados:
- Score: 2104 bits (1139)
- Expect: 0.0
- Identidad: 1660/1924 (86%)

- Gaps: 10/1924 (0%)
- Strand: Plus/Plus
- Posición de gyrB: 1007671..1009617

Lactobacillus amylovorus GRL 1112

- Acceso: CP002338.1
- Resultados:
- Score: 2189 bits (1185)
- Expect: 0.0
- Identidad: 1676/1920 (87%)
- Gaps: 6/1920 (0%)
- Strand: Plus/Plus
- Posición de gyrB: 4303..6267

BLAST con gyrB de Lactobacillus rhamnosus HN001

Lactobacillus rhamnosus strain CE1

- Acceso: CP073317.1
- Resultados:
- Score: 3386 bits (1833)
- Expect: 0.0
- Identidad: 1891/1920 (98%)
- Gaps: 0/1920 (0%)
- Strand: Plus/Plus
- Posición de gyrB: 2656868..2658829

Lactobacillus rhamnosus strain BIO5326

- Acceso: CP046267.1
- Resultados:
- Score: 3369 bits (1824)
- Expect: 0.0
- Identidad: 1888/1920 (98%)
- Gaps: 0/1920 (0%)
- Strand: Plus/Plus
- Posición de gyrB: 4888..6849

Extracción de secuencias de gyrB de cepas similares no estudiadas

Para cada una de las cepas mencionadas, se identificaron y extrajeron las secuencias del gen gyrB con el fin de facilitar su análisis posterior. Estas cepas representan nuevas oportunidades de estudio en cuanto a sus propiedades funcionales y su potencial aplicación en la salud vaginal, dados sus altos porcentajes de similitud con cepas conocidas de Lactobacillus.

Secuencias de la GyrB de estas nuevas cepas no estudiadas:

1. Lactobacillus rhamnosus strain MG4644: CP161813.1: 4513..6474

2. Lacticaseibacillus rhamnosus strain UO.H3002: CP144174.1: 2682103..2684064
3. Limosilactobacillus reuteri strain MD IIE-43: CP137611.1: 1781568..1783517
4. Limosilactobacillus reuteri strain IMAUJBR3: CP139478.1: 6250..8199
5. Lactobacillus amylovorus strain PMRA3: CP029754.1: 4258..6222
6. Lactobacillus helveticus strain SCB0641: CP094500.1: 4474..6438
7. Lactobacillus amylovorus strain JBD401: CP012389.1: 1007671..1009617
8. Lactobacillus amylovorus GRL 1112: CP002338.1: 4303..6267
9. Lacticaseibacillus rhamnosus strain CE1: CP073317.1: 2656868..2658829
10. Lacticaseibacillus rhamnosus strain BIO5326: CP046267.1: 4888..6849

Se realizó el mismo procedimiento del código de extraer el gen de la secuencia del genoma de la sección 3.2, pero en este caso no requirió sacar el complemento porque era ya directamente el gen.

3.4. Alineación con ClustalW

Posteriormente, se realizó un alineamiento de las secuencias utilizando CLUSTAL 2.1 Multiple Sequence Alignments.

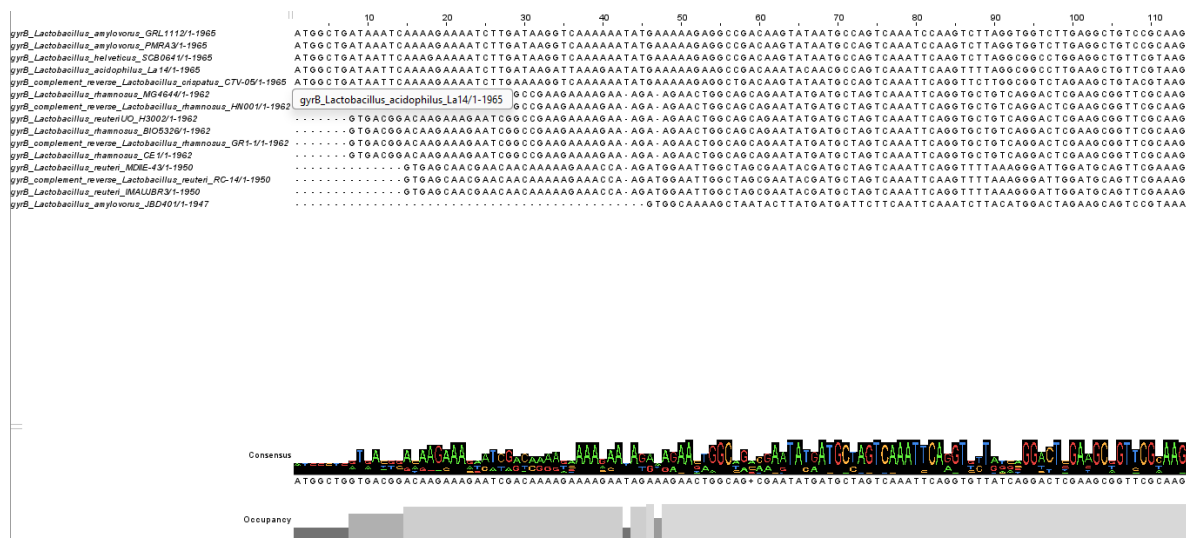
Se creó un archivo llamado gyrB_sequences.fasta que contiene todas las secuencias en formato FASTA necesarias para realizar el alineamiento de todas las cepas mencionadas anteriormente. Utilizando ClustalW, se ejecutó el alineamiento de estas secuencias con el siguiente comando:

```
clustalw2 -INFILE=gyrB_sequences.fasta -ALIGN -OUTFILE=aligned_sequences.aln
```

El archivo resultante aligned_sequences.aln contiene el alineamiento de las secuencias en un formato que muestra las posiciones de las bases alineadas y las diferencias entre las secuencias.

Para visualizar y analizar claramente los resultados del archivo generado en formato .aln, se utilizó el software Jalview versión 2.11.4.1, donde se examinaron detalladamente las diferencias entre las secuencias alineadas.

Figura 1. Alineación con ClustalW en Jalview



Fuente: Realización propia.

Se observa el alineamiento de secuencias del gen *gyrB* en diversas cepas de *Lactobacillus*, visualizado en Jalview versión 2.11.4.1. La sección superior muestra las secuencias alineadas, con puntos que indican coincidencias con la secuencia consenso. En la parte inferior, se presenta un logotipo de secuencia (sequence logo) que destaca la frecuencia de nucleótidos en cada posición, permitiendo identificar regiones conservadas y variaciones específicas entre las cepas. La barra de ocupación también proporciona una visión general de las posiciones con mayor variabilidad, resaltando aquellas que son más conservadas.

Este análisis permite observar la diversidad genética entre las cepas, así como las posibles variaciones funcionales en el gen *gyrB*. En los Anexos, se incluirá el archivo .aln completo de la alineación para una revisión detallada de las secuencias.

3.5. Análisis filogenético

Para explorar las relaciones evolutivas entre diferentes cepas de *Lactobacillus*, se realizó un análisis filogenético utilizando el gen *gyrB*. Este análisis se basó en los siguientes pasos:

- **Alineación de Secuencias:** Se cargó el archivo de alineación de secuencias de *gyrB* (aligned_sequences.aln), previamente obtenido mediante el alineamiento de las secuencias homólogas de las cepas seleccionadas.
- **Cálculo de la Matriz de Distancias:** Con la biblioteca ape de R, se calculó la matriz de distancias entre las secuencias alineadas usando el modelo de sustitución JC69 (Jukes-Cantor 69). Este modelo es adecuado para secuencias con pocas variaciones y permite obtener una medida cuantitativa de las diferencias genéticas entre las cepas.
- **Construcción del Árbol Filogenético:** A partir de la matriz de distancias, se utilizó el método de Neighbor-Joining (NJ) para construir el árbol filogenético. Este método es ampliamente utilizado para reconstruir árboles filogenéticos debido a su eficiencia y precisión en la agrupación de secuencias similares.
- **Visualización y Guardado del Árbol:** El árbol resultante se visualizó y guardó en un archivo de imagen (arbol_filogenetico.png). Se aplicaron ajustes estéticos, como colores para las ramas y etiquetas alineadas, con el objetivo de mejorar la claridad de la representación visual del árbol.

Código análisis filogenético

El análisis filogenético se realizó en R utilizando la versión 4.3.1. Se desarrolló un código para construir el árbol filogenético basado en las alineaciones de secuencias obtenidas previamente con ClustalW. A continuación, se presentan los comandos utilizados en R para este procedimiento:

```
library(ape)
library(phangorn)

# Cargar el archivo de alineación
alignment <- read.dna("aligned_sequences.aln", format = "fasta")
print("Alineación cargada correctamente")

# Calcular la matriz de distancias
dist_matrix <- dist.dna(alignment, model = "JC69")
print("Matriz de distancias calculada correctamente")

# Construir el árbol filogenético
nj_tree <- nj(dist_matrix)
print("Árbol filogenético construido correctamente")

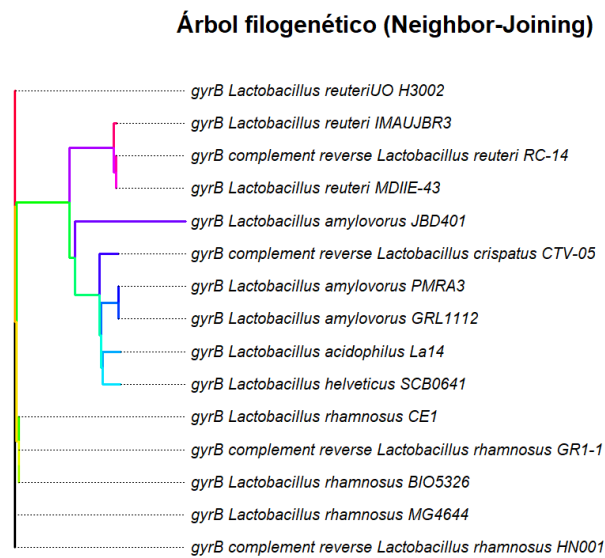
graphics.off()
tryCatch({
  png("arbol_filogenetico.png", width = 1200, height = 900, res = 150)

  branch_colors <- rainbow(n = length(nj_tree$edge[, 1])) # Colores para cada rama
```

```
# Ajustes de plot para mejorar la apariencia
plot(nj_tree,
     main = "Árbol filogenético (Neighbor-Joining)",
     cex = 0.8,                                # Tamaño de las etiquetas
     label.offset = 0.02,                       # Separación de etiquetas respecto a las ramas
     x.lim = c(0, 1.5),                        # Ajustar el límite horizontal para más espacio
     edge.color = branch_colors,                # Colorear cada rama
     edge.width = 2,                            # Ancho de las ramas
     align.tip.label = TRUE)                   # Alinear las etiquetas en el borde

dev.off()
print("El árbol filogenético se ha guardado como 'arbol_filogenetico.png'")
}, error = function(e) {
  print("No se pudo guardar el archivo.")
  print(e)
}
```

Figura 2. Árbol filogenético



Fuente: Realización propia

Agrupación y Color de Cepas:

Las cepas de *Lactobacillus reuteri*, representadas en tonos específicos (como el rosa y morado), forman un grupo claramente definido en el árbol. Esto indica una alta similitud genética y una cercanía filogenética dentro de esta especie. Ejemplos incluyen *L. reuteri* UO H3002 y *L. reuteri* IMAUJBR3, los cuales están muy próximos entre sí en términos evolutivos. Su similitud filogenética y proximidad en el árbol sugieren que podrían compartir características funcionales útiles en la prevención de infecciones bacterianas.

Cepa de *Lactobacillus amylovorus*:

Las cepas de *Lactobacillus amylovorus* se agrupan en un clado separado, representado con tonos verde y azul. Cepas como *L. amylovorus* JBD401, PMRA3, y GRL1112 muestran una relación cercana, lo que indica una baja distancia genética entre ellas. Esta agrupación filogenética sugiere que estas cepas podrían compartir propiedades probióticas beneficiosas y podrían considerarse para estudios de tratamiento debido a su similitud con cepas bien conocidas de *Lactobacillus*.

Lactobacillus acidophilus y helveticus:

Lactobacillus acidophilus La14 y *Lactobacillus helveticus* SCB0641, representadas en tonos cyan, forman un clado separado pero cercano entre sí, indicando que comparten una relación filogenética más estrecha que con otras especies en el árbol. Esto implica que ambas cepas podrían tener funciones compartidas y, potencialmente, efectos similares en aplicaciones probióticas.

Lactobacillus rhamnosus:

Las cepas de *Lactobacillus rhamnosus* aparecen agrupadas en el árbol en tonos de verde y amarillo. Cepas como *L. rhamnosus* CE1 y BIO5326 están estrechamente relacionadas y muestran una distancia genética corta en el árbol, lo cual resalta su cercanía evolutiva. Por otro lado, *L. rhamnosus* HN001 se encuentra dentro de este grupo, aunque ligeramente más distante. La cercanía genética en este clado sugiere que estas cepas podrían tener propiedades comunes útiles en la salud vaginal, y su relación cercana a otras cepas de interés las convierte en candidatas para investigaciones adicionales.

Especies Potenciales para Tratamiento

Al observar la proximidad genética en el árbol, se puede inferir que ciertas cepas no estudiadas extensivamente, como *Lactobacillus amylovorus* PMRA3 y *Lactobacillus reuteri* MD IIE-43, podrían tener aplicaciones terapéuticas similares a cepas ya conocidas y probadas en salud vaginal, debido a su cercanía filogenética con especies utilizadas en probióticos. Estas cepas comparten clados con especies probióticas establecidas, sugiriendo que podrían poseer funciones y características antimicrobianas similares, que serían útiles en la prevención de infecciones como la vaginosis bacteriana.

3.5. Análisis matriz de distancias

Para obtener un análisis más detallado de las relaciones entre las cepas estudiadas, se decidió calcular una matriz de distancias entre las especies, lo que permite visualizar cuantitativamente las similitudes y diferencias genéticas. Este enfoque proporciona una visión más específica de las distancias evolutivas entre las cepas de *Lactobacillus* analizadas, complementando la información del árbol filogenético.

- **Generación de la Matriz de Distancias entre Especies:** A partir del árbol filogenético, se generó una matriz de distancias entre las especies utilizando la función `cophenetic.phylo`, que calcula las distancias filogenéticas entre cada par de especies. Este paso es crucial para comprender las similitudes y diferencias a un nivel más detallado.
- **Visualización de la Matriz de Distancias:** La matriz de distancias entre especies se transformó en un gráfico de calor utilizando `ggplot2`, donde los colores indican la magnitud de la distancia genética. En el gráfico, los colores más claros representan una mayor similitud (distancias menores), mientras que los tonos más oscuros indican una mayor distancia genética. Esto permite identificar visualmente los grupos de cepas que están más estrechamente relacionados.

La matriz de distancias entre las secuencias se calculó en R (versión 4.3.1). A continuación, se muestra el código utilizado para generar la matriz de distancias basada en la alineación previa, permitiendo analizar las relaciones genéticas entre las secuencias:

```
library(ape)

library(phangorn)
library(ggplot2)
library(reshape2)

# Cargar el archivo de alineación
alignment <- read.dna("aligned_sequences.aln", format = "fasta")
print("Alineación cargada correctamente")

# Calcular la matriz de distancias
dist_matrix <- dist.dna(alignment, model = "JC69")
print("Matriz de distancias calculada correctamente")

# Construir el árbol filogenético
nj_tree <- nj(dist_matrix)
print("Árbol filogenético construido correctamente")

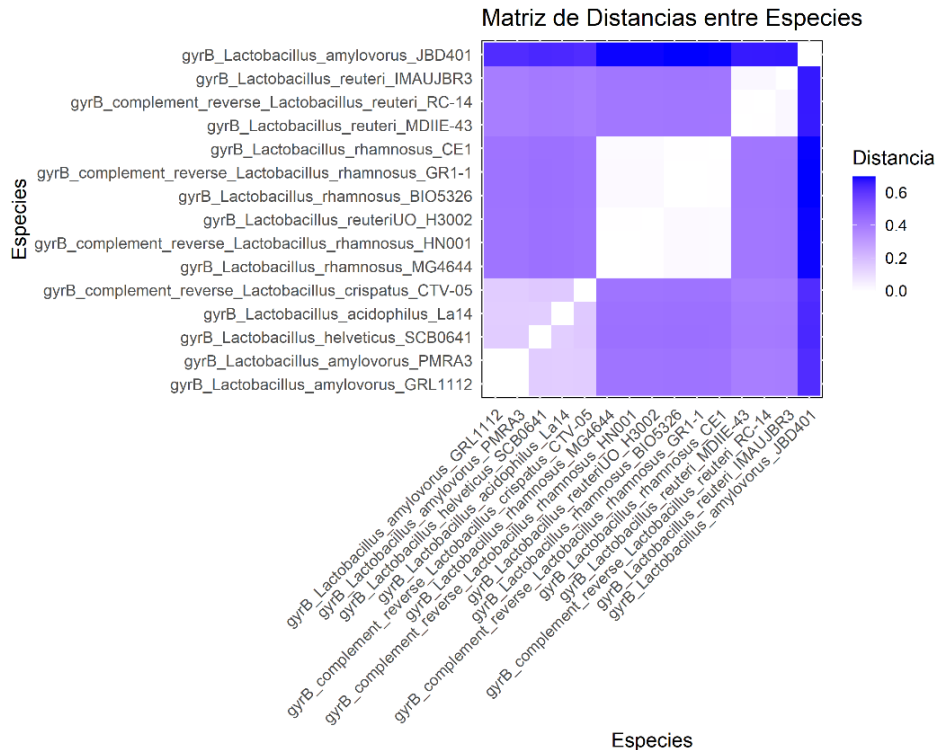
# Calcular la matriz de distancias entre las especies usando el árbol filogenético
distance_matrix <- cophenetic.phylo(nj_tree)

# Convertir la matriz a formato largo para ggplot
distance_melted <- melt(distance_matrix)

# Crear el gráfico de calor
ggplot(distance_melted, aes(Var1, Var2, fill = value)) +
  geom_tile() +
  scale_fill_gradient(low = "white", high = "blue") +
  labs(title = "Matriz de Distancias entre Especies",
       x = "Especies",
       y = "Especies",
       fill = "Distancia") +
  theme_minimal() +
  theme(axis.text.x = element_text(angle = 45, hjust = 1))

# Guardar el gráfico de calor
ggsave("distancias_especies.png", width = 10, height = 8, dpi = 300)
```

Figura 3. Matriz de distancias entre especies



Fuente: Realización propia

Las especies más similares, con distancias genéticas bajas, están representadas por tonos claros, indicando una alta cercanía filogenética. Esto es particularmente notable en cepas como *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 y *L. rhamnosus* HN001, que muestran una gran similitud en sus secuencias de gyrB.

Las cepas de *Lactobacillus reuteri* y *Lactobacillus amylovorus* también presentan agrupaciones con distancias genéticas bajas entre ellas, lo que sugiere que podrían compartir funciones y características similares en aplicaciones terapéuticas.

En contraste, cepas como *Lactobacillus acidophilus* La14 y *Lactobacillus helveticus* SCB0641 muestran una mayor distancia genética con respecto a otras especies, indicando una menor similitud y, posiblemente, funciones especializadas o diferentes.

Identificación de Especies Potenciales para Tratamiento

De las cepas menos estudiadas en aplicaciones probióticas, el análisis de la matriz de distancias y el gráfico de calor destaca algunas cepas desconocidas como candidatos prometedores debido a su cercanía genética con cepas probióticas conocidas y efectivas en el tratamiento de la vaginosis bacteriana. A continuación, se presentan las cepas que podrían tener un gran potencial terapéutico:

- ***Lactobacillus reuteri* IMAUJBR3 y *Lactobacillus reuteri* MD IIE-43:**

Estas cepas de *Lactobacillus reuteri* muestran una baja distancia genética con respecto a otras cepas de *L. reuteri* bien estudiadas, como RC-14. Su similitud genética sugiere que podrían tener propiedades beneficiosas similares, como la producción de compuestos antimicrobianos y la capacidad de competir contra patógenos en el ambiente vaginal. *L. reuteri* IMAUJBR3 y MD IIE-43 representan excelentes candidatos para estudios adicionales, ya que podrían desempeñar un papel significativo en la restauración del microbiota vaginal.

- ***Lactobacillus helveticus* SCB0641:**

Aunque *Lactobacillus helveticus* no ha sido extensamente estudiado en el contexto de la salud vaginal, estas cepas presentan una alta similitud genética con otras cepas de *Lactobacillus helveticus*

conocidas por sus beneficios probióticos el sistema digestivo. Estas cepas merecen investigación adicional para evaluar su efectividad en la prevención y tratamiento de la vaginosis bacteriana.

- ***Lactobacillus rhamnosus BIO5326:***

Aunque *Lactobacillus rhamnosus* es una especie relativamente bien conocida, la cepa BIO5326 no ha sido ampliamente explorada en aplicaciones de salud vaginal. Sin embargo, su proximidad genética a cepas establecidas de *L. rhamnosus* como GR-1 y HN001 sugiere que podría compartir muchas de sus propiedades beneficiosas. BIO5326 podría ser un candidato prometedor en el tratamiento de infecciones vaginales y merece estudios adicionales para evaluar su funcionalidad en este contexto.

De las cepas desconocidas o menos estudiadas, *Lactobacillus reuteri* IMAUJBR3, *Lactobacillus reuteri* MD IIE-43, *Lactobacillus helveticus* SCB0641 y *Lactobacillus rhamnosus* BIO5326 destacan como candidatos prometedores para el tratamiento de la vaginosis bacteriana. Su cercanía filogenética con cepas probióticas reconocidas sugiere que podrían poseer propiedades funcionales similares, lo cual justifica estudios adicionales para explorar su efectividad y potencial terapéutico en la salud vaginal.

Tabla 1. Búsqueda bibliográfica cepas seleccionadas

Cepa	Conocimientos Actuales	Aplicación Actual en Tratamiento	Cita
<i>Lactobacillus reuteri</i> IMAUJBR3	Conocida por su producción de compuestos antimicrobianos; estudios limitados en aplicaciones específicas.	No se utiliza actualmente en tratamientos específicos.	(Bäckhed et al., 2012; Hill et al., 2014)
<i>Lactobacillus reuteri</i> MD IIE-43	Similar a otras cepas de <i>L. reuteri</i> en producción de ácido láctico y efecto antimicrobiano; potencial para salud digestiva.	Usada en algunos productos probióticos para la salud digestiva.	(Reid et al., 2001; Spinler et al., 2017)
<i>Lactobacillus helveticus</i> SCB0641	Usada en algunos contextos de salud digestiva; estudios limitados en salud vaginal y probióticos.	No se utiliza actualmente en tratamientos específicos.	(Kadlec et al., 2015; Wallace et al., 2017)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> BIO5326	Aplicaciones en salud digestiva; limitada investigación en aplicaciones vaginales.	Utilizada en probióticos digestivos, sin aplicaciones reconocidas en salud vaginal.	(Morita et al., 2017; Kober et al., 2021)

Fuente: Realización propia

La tabla destaca cepas de *Lactobacillus* menos estudiadas, como *Lactobacillus reuteri* IMAUJBR3, *L. reuteri* MD IIE-43, *Lactobacillus helveticus* SCB0641 y *L. rhamnosus* BIO5326, que muestran una cercanía filogenética con cepas probióticas bien establecidas en aplicaciones de salud vaginal. Aunque estas cepas actualmente se usan principalmente en contextos de salud digestiva, su similitud genética con cepas que tienen efectos antimicrobianos y protectores en el microbiota vaginal sugiere que podrían compartir propiedades beneficiosas, como la inhibición de patógenos y la promoción de un ambiente saludable en el tracto vagina

4. Discusión

Respecto a la motivación y el planteamiento del problema, este estudio se ubica en la necesidad de encontrar cepas probióticas de *Lactobacillus* que puedan apoyar el tratamiento de la vaginosis bacteriana, explorando cepas menos estudiadas y su potencial en salud vaginal. Los resultados obtenidos mediante el análisis filogenético brindaron una clasificación genética detallada de las cepas, lo que permite relacionar sus propiedades funcionales con cepas reconocidas.

Entre los nuevos aprendizajes se destacan el uso de herramientas bioinformáticas para alineamientos de secuencias, la construcción de árboles filogenéticos, y la visualización de matrices de distancia, permitiendo entender mejor la variabilidad genética entre cepas y su posible impacto terapéutico. Sin embargo, se encontraron limitaciones importantes, como la dependencia de las secuencias disponibles en bases de datos, lo cual restringe la variedad de cepas que se pueden analizar.

Para avanzar en este tema, sería valioso realizar estudios experimentales que confirmen las propiedades probióticas de las cepas identificadas en este análisis. Además, la secuenciación de nuevas cepas de *Lactobacillus* enriquecería las bases de datos, permitiendo análisis genéticos más robustos y específicos. También podría considerarse una combinación de métodos computacionales con ensayos *in vitro* para validar la efectividad de estas cepas en el tratamiento de la vaginosis bacteriana.

5. Conclusiones

En conclusión, este estudio ha permitido identificar varias cepas de *Lactobacillus* menos estudiadas, como *Lactobacillus reuteri* IMAUJBR3, *L. reuteri* MD IIE-43, *L. helveticus* SCB0641 y *L. rhamnosus* BIO5326, que muestran una cercanía filogenética significativa con cepas probióticas reconocidas por sus beneficios en la salud vaginal. Estas cepas, actualmente exploradas principalmente en contextos de salud digestiva, presentan un gran potencial para aplicaciones terapéuticas en el tratamiento de la vaginosis bacteriana, dada su posible capacidad para inhibir patógenos y equilibrar el microbiota vaginal. La efectividad del gen *gyrB* como marcador filogenético en este análisis ha demostrado ser útil para clasificar y seleccionar cepas con características deseables, mientras que el uso de la matriz de distancias y el árbol filogenético ha facilitado la identificación de relaciones cercanas entre cepas conocidas y desconocidas. Este enfoque ofrece una base sólida para futuras investigaciones en el desarrollo de nuevos probióticos específicos para la salud vaginal, apoyando la selección de cepas prometedoras para estudios adicionales de efectividad y seguridad.

6. Bibliografía

- Bäckhed, F., et al. (2012). Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(1), 32-39.
- Boris, S., & Barbes, C. (2000). Role played by lactobacilli in controlling the population of vaginal pathogens. *Microbes and Infection*, 2(5), 543-546. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)00313-0](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)00313-0)
- He, Z., Zhang, H., Gao, S., Lercher, M. J., Chen, W. H., & Hu, S. (2018). Evolution of the bacterial gene *gyrB* and its potential as a phylogenetic marker. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1343. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01343>
- Hill, C., et al. (2014). Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11(8), 506-514.
- Kadlec, R., et al. (2015). Comparative genomics of *Lactobacillus amylovorus* and insights into its probiotic potential. *Microbial Cell Factories*, 14(1), 198.
- Kober, M. M., et al. (2021). Probiotics in the management of vaginal health in pregnant women: A systematic review. *Journal of Clinical Gynecology and Obstetrics*, 10(2), 39-44.
- Li, Z., Huang, J., & He, Z. (2020). Insights into the phylogenetic relationships of the genus *Lactobacillus*. *Microbiome*, 8(1), 89. <https://doi.org/10.1186/s40168-024-01828-7>

- Morita, H., et al. (2017). Comparative genome analysis of *Lactobacillus amylovorus* and *Lactobacillus gasseri*. *Scientific Reports*, 7(1), 13144.
- Parolin, C., Marangoni, A., Laghi, L., Foschi, C., Nahui Palomino, R. A., Calonghi, N., & Vitali, B. (2015). Isolation of vaginal lactobacilli and characterization of anti-*Candida* activity. *PLoS ONE*, 10(6), e0131220. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131220>
- Reid, G., Beuerman, D., Heinemann, C., & Bruce, A. W. (2014). Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 32(1), 37-41. [https://doi.org/10.1016/S0020-7292\(10\)00379-6](https://doi.org/10.1016/S0020-7292(10)00379-6)
- Reid, G., et al. (2001). Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(4), 658-672.
- Spinler, J. K., et al. (2017). Next-generation probiotics: The spectrum from probiotics to live biotherapeutics. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 209-215.
- Wallace, T. C., et al. (2017). Health effects of consuming whole grain *Lactobacillus* in humans: The role of fiber. *Nutrition Reviews*, 75(4), 244-255.
- Zhou, X., Westman, R., Hickey, R., Hansmann, M. A., Kennedy, C., & Forney, L. J. (2014). Vaginal microbiota of women with frequent vulvovaginal candidiasis. *Infectious Diseases in Obstetrics and Gynecology*, 2014, 1-9. [https://doi.org/10.1016/S1198-743X\(14\)63372-3](https://doi.org/10.1016/S1198-743X(14)63372-3)