



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>

# **TESIS DOCTORAL.**

Título: Microbiota intestinal y colitis ulcerosa, abordaje metagenómico

Autor: Virginia Robles Alonso

Director: Dr. Francisco Guarner Aguilar

Facultad de Medicina

Programa de doctorado en Medicina

Universidad Autònoma de Barcelona

Año 2017



## Índice

<b>I. Introducción</b> .....	<b>4</b>
<b>1. Microbiota intestinal</b> .....	<b>4</b>
Funciones de la microbiota en el ser humano .....	4
Formas de estudiar la microbiota.....	6
Diversidad de la población bacteriana .....	14
Análisis de datos de la microbiota.....	16
Composición flora intestinal humana .....	18
Disbiosis .....	23
<b>2. Colitis ulcerosa</b> .....	<b>27</b>
Concepto.....	27
Epidemiología .....	27
Etiopatogenia .....	28
<b>3. Colitis ulcerosa y microbiota intestinal</b> .....	<b>43</b>
<b>II. Justificación, hipótesis y objetivos</b> .....	<b>49</b>
<b>III. Estudio I: Estudio de la microbiota fecal en pacientes con colitis ulcerosa en remisión en comparación con sanos. Análisis estudio METAHIT.</b> .....	<b>51</b>
Introducción.....	51
Objetivos.....	51
Material y métodos .....	51
Resultados .....	56
Discusión .....	73
<b>IV. Estudio 2. Estudio de los cambios inducidos por el polietilenglicol sobre la composición de la microbiota fecal de individuos sanos y de pacientes con colitis ulcerosa</b> .....	<b>80</b>
Introducción.....	80
Objetivos.....	82
Material y métodos .....	82
Resultados .....	90
Discusión .....	115
<b>V. Conclusiones</b> .....	<b>119</b>
<b>VI. Bibliografía</b> .....	<b>120</b>

## Abreviaturas

CCR: cáncer colorrectal

CMH: complejo mayor de histocompatibilidad

CU: colitis ulcerosa

DE: desviación estándar

EC: Enfermedad de Crohn

EII: enfermedad inflamatoria intestinal

FCS: fibrocolonoscopia

Kegg: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*

Ns: no significativo

OTUs: *operational taxonomic unit*

PCoA: *principal Coordinates Analysis*

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

qPCR: reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa

PEG: polietilenglicol

SEM: desviación estándar de la media

# I. Introducción

## 1. Microbiota intestinal

### **Funciones de la microbiota en el ser humano**

Los animales axénicos o *germ-free* son cepas de laboratorio, generalmente murinas pero también de otros pequeños mamíferos o incluso de especies aviares, que crecen y viven en ambientes completamente estériles, y por tanto sin contacto con micro-organismos ni colonización microbiana de ningún tipo. Habitualmente se obtienen de madres también axénicas mediante parto natural, o bien mediante cesárea en condiciones de máxima asepsia cuando se trata de madres con colonización microbiana convencional. Los estudios llevados a cabo con animales *germ-free* o con colonización intestinal controlada proporcionan evidencia científica sólida sobre la contribución de la microbiota en la fisiología del organismo anfitrión u hospedador. Estos experimentos han permitido identificar las funciones primarias que desempeña la microbiota en el anfitrión. Las clasificamos en metabólicas, defensivas y tróficas.

Las funciones metabólicas consisten principalmente en la recuperación de energía y nutrientes de los alimentos. Si comparamos los ratones axénicos con los convencionales podemos observar cómo los primeros presentan menor desarrollo corporal con órganos más pequeños, a pesar de una mayor ingesta de alimentos. Estos cambios son reversibles al realizar trasplantes de microbiota fecal procedente de ratones convencionales(1). A nivel humano, es conocido también que la colonización bacteriana nos provee de una serie de rutas metabólicas para la síntesis de componentes nutricionales elementales, incluyendo vitaminas y amino-acidos esenciales, que nuestro organismo no tiene capacidad de sintetizar(2). La microbiota intestinal se compone mayoritariamente de anaerobios estrictos, que extraen energía de la fermentación sacarolítica de substratos metabólicos no digeribles como carbohidratos complejos vegetales. Derivada de esta fermentación se generan ácidos grasos de cadena corta (acetato, propionato y butirato) que son utilizados directamente por los colonocitos, obteniendo así entre el 60-70% de sus requerimientos nutricionales de estos productos de fermentación(3). Estos ácidos grasos se generan en el metabolismo del piruvato,

producidos por la oxidación de la glucosa a través de la vía glucolítica de Embden-Meyerhof. Los ácidos grasos de cadena corta permiten además la acidificación del medio colónico impidiendo el crecimiento de patógenos bacterianos. En el colon distal tiene lugar además la fermentación proteolítica, que produce, en cambio, derivados nitrogenados como aminas, amonio y compuestos fenólicos, algunos de los cuales son considerados carcinógenos(4).

Las funciones defensivas consisten en lo que se ha llamado efecto barrera: la presencia de bacterias comensales que ocupan los nichos ecológicos accesibles previenen la invasión de elementos microbianos exógenos al ecosistema evitando su potencial infectividad. Otro aspecto del efecto barrera es la prevención del sobrecrecimiento de especies comensales con potencial patógeno. Es el caso del *Clostridium difficile* que es un comensal saludable habitualmente, pero después del uso de algunos antibióticos que aniquilan otros elementos de la microbiota, puede adquirir una posición dominante y producir toxinas que alteran la barrera intestinal y generan lesiones de la mucosa.

En relación a las funciones tróficas, cabe destacar el papel de la colonización bacteriana como motor fundamental de la inducción del sistema inmunitario adquirido y de sus mecanismos de regulación, según se ha venido reconociendo a lo largo de las últimas dos décadas. Los animales criados en condiciones de asepsia estricta muestran atrofia del sistema inmune de las mucosas (folículos linfoides de tamaño pequeño, escasez de linfocitos intraepiteliales y de la lamina propia) y también del sistema inmune sistémico (ganglios linfáticos de menor tamaño, bajo nivel de inmunoglobulinas)(5). Por tanto, parece que la presencia de microbiota en el intestino interviene de forma decisiva en el desarrollo y maduración del sistema inmune. El intestino humano constituye la principal barrera de contacto con el medio externo, sobre cuya superficie tienen lugar los fenómenos de reconocimiento inmunológico, en base a los cuales, el sistema inmune será capaz de distinguir entre patógenos potenciales o flora comensal o saprofita. Por otro lado, sobre esta barrera tiene lugar el contacto con los antígenos del medio externo, entre ellos, los alimentarios (el papel de la microbiota sobre el desarrollo inmune se aborda más profundamente en el apartado 2. Colitis ulcerosa, factores inmunológicos, barrera epitelial y tejido linfoide asociado a mucosas).

Es interesante comentar que estudios realizados con ratones *germ-free* demuestran que la colonización bacteriana perinatal influye en el desarrollo

estructural y funcional del cerebro. En dichos estudios, ratones axénicos y ratones convencionales son sometidos a tests de actividad motora y ansiedad, evidenciando en los primeros pautas de comportamiento diferentes (hiperactividad y menor ansiedad), así como una diferente expresión de neurotransmisores, proteínas relacionadas con la transmisión sináptica y expresión génica(6), demostrando con ello el papel de la microbiota intestinal en el desarrollo cerebral y las funciones conductuales. Los ratones *germ-free* exhiben, además, importantes alteraciones en el comportamiento social entre ellos la evitación y la disminución de la preferencia por la novedad sociales(7).

### **Formas de estudiar la microbiota**

- ✓ Repaso histórico del análisis de la microbiota: del cultivo a la metagenómica.  
Clásicamente se ha llevado a cabo el estudio microbiológico de un medio, sea éste orgánico o no, a través del cultivo. Esta técnica resulta muy económica, pero únicamente se cultivan con los métodos habituales, en el caso del intestino humano, menos del 30% de las especies bacterianas que lo habitan(8). En un reciente estudio que combina el empleo de técnicas de secuenciación de alto rendimiento y técnicas de cultivo en medio anaerobio se reporta que hasta el 50% de las especies son cultivables y caracterizables en conjunto(9). Otro estudio que emplea las mismas técnicas refiere que es posible el cultivo del 95% de las OTUs (*operational taxonomic unit* o filotipos) presentes con una abundancia mayor del 0,1%(10). Las limitaciones del cultivo de deben, entre otros factores, al desconocimiento de los requerimientos nutricionales de determinados subgrupos de bacterias y por ende la dificultad de cultivarlos en medios habituales. Además, existen anaerobios estrictos, muy sensibles al oxígeno, y que establecen una gran dependencia del entorno para poder sobrevivir, de forma que su existencia es difícilmente demostrable mediante cultivo. Pero de forma similar a su aplicación en el campo de la antropología o de la medicina forense, se puede identificar la huella biológica a través del estudio del ADN. La secuenciación del ADN consiste en determinar el orden de nucleótidos que conforman un gen o un fragmento del mismo. El reciente advenimiento de las *high throughput sequencing* o técnicas de secuenciación de alto rendimiento permiten la realización de millones de lecturas “*per run*” y

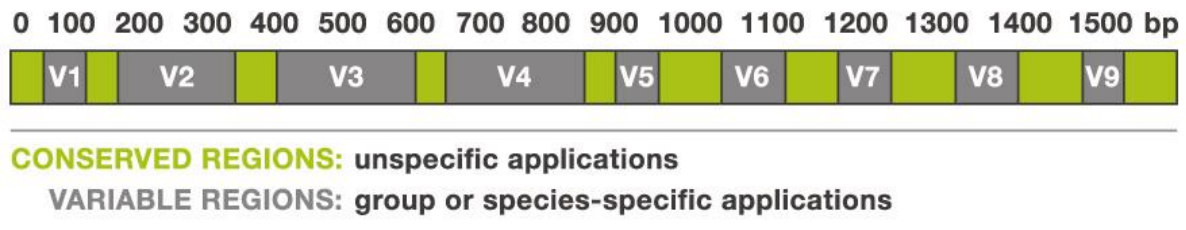
acortan el tiempo y los costes de la secuenciación, dando paso a nuevos abordajes para el estudio de la microbiota.

- ✓ Secuenciación de los genes que codifican para la subunidad 16S del ARN ribosomal (16S rRNA). De la misma forma que podemos identificar un vehículo mediante la matrícula y el color, y localizarlo, sin disponer de todas las características técnicas del mismo, podemos inferir la composición bacteriana sin necesidad de secuenciar íntegramente el genoma de la bacteria o comunidad de bacterias a estudio. Las características que hacen que el gen de la subunidad 16S sea un marcador fiel de la totalidad del ADN bacteriano son las siguientes: estar presente en todos los miembros de una población, solamente diferir entre individuos con genomas diferentes e idealmente diferir de forma proporcional a la distancia evolutiva entre los genomas distintos. Estas características son satisfechas por el gen 16S, común a todas las bacterias y con un contenido de unos 1500 pares de bases (fig.1), que se clasifican en regiones constantes y variables. Las regiones constantes son secuencias conservadas que han permanecido invariables a lo largo de la evolución. Se han descrito un total de 9 regiones variables y en base a su secuencia se puede determinar la taxonomía bacteriana, dando la posibilidad de discernir entre estratos de dominio y filo hasta nivel de género y especie, tras la comparación de similitud de secuencia en bases de datos específicas. Las regiones conservadas flanquean las regiones variables, y se usan para construir cebadores que complementen estas secuencias. Los cebadores están diseñados de una manera que permitiría posteriormente la amplificación de las regiones variables. Normalmente se procede a amplificar y secuenciar una o más de estas regiones variables, en el caso del *Earth Microbiome Project* se ha establecido la amplificación de la región V4, porque son los *primers* o cebadores de esta región los que son capaces de detectar mayor cantidad de Bacteria y Archaea(11), en concreto usamos 515F and 206R. Este método presenta sus limitaciones, puesto que en las bases de datos de acceso público únicamente encontramos el 10% de las bacterias, aquellas cultivables, previamente conocidas. Es decir, que hay secuencias de ADN que quedan huérfanas, sin que puedan ser asignadas a un estrato taxonómico u otro. Cabe destacar que algunas especies se diferencian en una región variable pero no en otra, por tanto, el uso de diferentes regiones variables tiene influencia en los *clusters* de



OTUs que conforman una muestra y, en consecuencia, en la descripción de la riqueza y uniformidad microbiológica de una muestra.

**Figura 1.** Regiones del gen 16srRNA. Regiones variables y regiones constantes.



Aunque existen varias técnicas de secuenciación de segunda generación disponibles comercialmente, son dos las más utilizadas: 454 Pyrosecuenciación® (Roche Diagnostics GMBH Ltd, Mannheim, Germany) e Illumina® (Illumina, San Diego, CA, USA). La **pirosecuenciación** es una técnica que mide la liberación de pirofosfato en una reacción de polimerización mediante una serie de reacciones enzimáticas acopladas que liberan luz cada vez que se incorpora un nucleótido a la cadena de ADN. La luz emitida es detectada por un sistema óptico especial que recoge el patrón de destellos luminosos que son emitidos. Mediante programas informáticos se interpretan estos patrones de luz y se generan unas gráficas que indican si ha habido incorporación o no de nucleótidos y su número, mostrando como resultado final la secuencia de ADN. Una vez establecida las secuencias del ADN, se puede inferir desde diferentes abordajes el contenido microbiológico de una muestra biológica compleja.

La técnica de secuenciación Illumina emplea polimerasas diseñadas por la empresa y nucleótidos fluorescentes y de terminador reversible. Las hebras de ADN y los *primers* se pegan a un portaobjetos, y se lleva a cabo una amplificación por la polimerasa, de forma que se crean colonias locales de ADN

o *clusters* de ADN. Tras este paso, se usan los cuatro tipos de bases nucleotídicas de terminador reversible, de forma que cuando una de ellas se une a la secuencia se para la reacción. Una cámara recoge la fluorescencia etiquetada de los nucleótidos, y determinará qué nucleótido es el que se ha unido en esa posición. Aquellos nucleótidos que no se hayan unido serán lavados para continuar con el ciclo: una vez que se ha identificado la primera base y se hayan lavado las demás, se eliminará el terminal de bloqueo del extremo 3' que impedía continuar con la síntesis de la cadena. Se vuelve a introducir una nueva tanda de nucleótidos y se continúa la secuenciación hasta completar toda la cadena de ADN. La amplificación en fase sólida crea hasta 1.000 copias idénticas de cada molécula de plantilla única en estrecha proximidad. Mediante éstas técnicas se podría secuenciar el genoma humano, que tardó 10 años en secuenciarse con los métodos previos, en unos minutos.

Existen variantes del abordaje 16S, entre los que encontramos la hibridación dot-blot, PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR), electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización, hibridación “in situ” fluorescente (FISH), los métodos basados en microarrays de 16S.

De la secuenciación del gen 16S de una muestra se deriva una cantidad ingente de datos, por lo que hemos de utilizar herramientas informáticas específicas. Uno de los softwares más utilizados es Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME)(12).

A la hora de describir la taxonomía bacteriana de un medio biológico es importante introducir el concepto de **OTUs**. El gen 16S contiene una serie de regiones constantes y variables. A lo largo del tiempo la deriva génica hace que se produzcan cambios a nivel de las zonas variables, por tanto, aunque en una misma muestra, o muestras secuenciales, se identifique la misma bacteria a nivel de composición, la secuencia de su gen 16S puede haber cambiado. Por otro lado, los amplicones (fragmentos de ADN) obtenidos de la amplificación del ADN pueden contener errores de secuencia o mutaciones y sería incorrecto asumir que una lectura se corresponde con una única especie. Por este motivo, si se requiriese un 100% de concordancia entre dos secuencias clonales de una misma bacteria, llegaríamos a la conclusión de que se trata de diferentes bacterias, cuando en realidad, se trata de los mismos genomas clonales pero sometidos a la deriva génica. Para solventar esta imprecisión se ha establecido

de forma arbitraria que todas aquellas secuencias de ADN bacteriano que presenten una concordancia  $\geq 97\%$  de pares de bases, pertenecerán al mismo OTU (*operational taxonomic unit* o filotipo) o *cluster* de secuencias casi idénticas. La asignación de diferentes secuencias a una u otra OTU, es conocido como *binning* y puede realizarse de diferentes maneras: por agrupación en base a similitud de secuencia, mediante el empleo de modelos filogenéticos que incorporan las tasas de mutación esperadas y relaciones evolutivas, o bien usando métodos supervisados que asignan directamente a los contenedores de secuencias taxonómicas. De esta forma, obtenemos un número manejable de OTUs por muestra que puede ser más fácilmente analizado y graficado. Los OTUs toman el estatus de especie en muchos análisis de diversidad microbiológico porque muchos genomas de especies carecen con frecuencia de determinados marcadores de secuencia. Una vez determinado el número de OTUs hemos de saber a qué especie representan, para ello se recurre a distintas **bases de datos**. GreenGenes, The Ribosomal Database Project (myRDP) o Silva son algunas de las más utilizadas. La información será graficada como análisis de componentes principales o análisis de correlación canónica para determinar qué OTUs representan la mayor fuente de variación en la población así como correlación con los metadata.

- ✓ Secuenciación integral del material genético procedente de una muestra biológica Se trata de los denominados *shotgun process* que consiste en fragmentar el genoma de un organismo (o una comunidad) en múltiples pequeños fragmentos, secuenciándolos por separado. Los segmentos de ADN se ensamblan como piezas de un rompecabezas utilizando determinados algoritmos bioinformáticos. Sin embargo, estos algoritmos no son perfectos, generándose errores o quimeras. Una vez ensamblados los diferentes fragmentos se procede a comparar las secuencias con las bases de datos disponibles para tal efecto, estableciendo así la riqueza de genes de la muestra. Por otro lado, antes de ensamblar los fragmentos génicos, el recuento de los mismos puede ser analizado como marcador taxonómico. Éste abordaje es el utilizado para el estudio de comunidades complejas como la microbiota intestinal, que ha llevado a acuñar el término 'metagenómica'(13). Se define

metagenoma como el genoma colectivo, o la combinación de genomas contenidos en una comunidad ecológica.

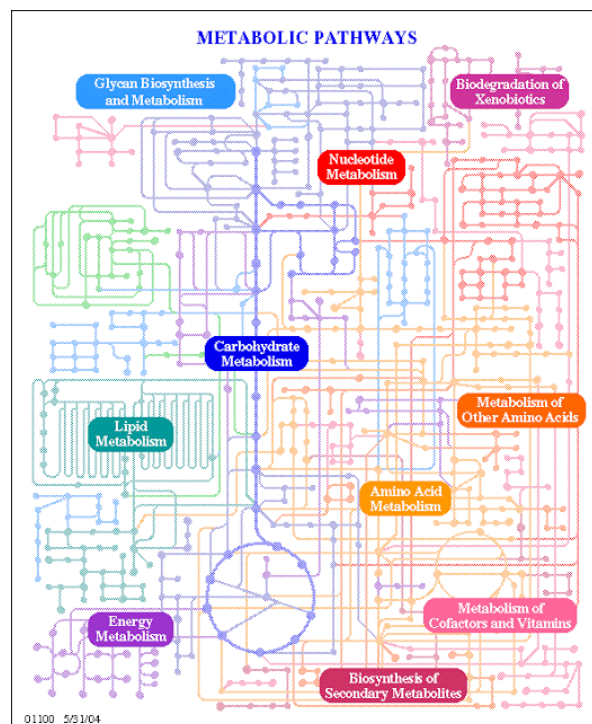
- ✓ Metagenómica funcional. En la actualidad, el estudio del genoma mediante secuenciación permite no sólo la identificación de genes, sino además el análisis y estudio de la función de los correspondientes productos proteicos para los que codifican dichos genes. Esta asignación de la función de cada una de las proteínas del organismo recién secuenciado está basada en la comparación de las secuencias de las proteínas en cuestión con las secuencias de proteínas de función conocida. De nuevo, al igual que realizamos a nivel génico, la inferencia se basa en una similitud estadísticamente significativa entre dos proteínas, lo que permite establecer un ancestro común. En este caso se habla de proteínas homólogas. Proteínas homólogas adoptan la misma estructura tridimensional y por tanto pueden poseer la misma función o funciones relacionadas. En base a la evolución de las proteínas homólogas, distinguimos dos tipos:

- Proteínas homólogas parálogas: proteínas que evolucionan por un proceso de duplicación en un mismo organismo y que tienden adoptar funciones relacionadas, aunque no necesariamente idénticas.
- Proteínas homólogas ortólogas: proteínas que evolucionan mediante un proceso de especiación, y por tanto poseen la misma función en distintos organismos.

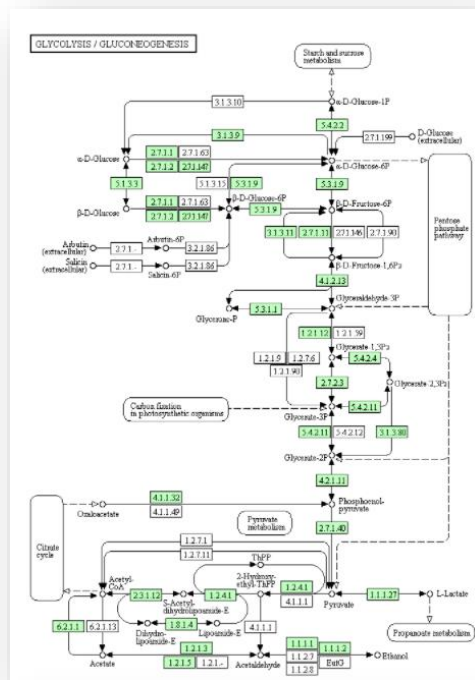
Por tanto la relación de ortología entre proteínas es la utilizada en la inferencia de proteínas en genomas recientemente secuenciados. La Enciclopedia de Genes y Genomas de Kioto (Kegg: *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) es un recurso bioinformático compuesto por una colección de bases de datos en línea de genomas, rutas enzimáticas y compuestos químicos biológicos. Permite la comprensión del significado funcional y la utilidad de una célula u organismo a partir de su información genómica. Se trata de una "representación informática" del sistema biológico (fig. 2). KO (*KEGG Orthology System*) está integrada por la base de datos PATHWAY (fig. 3), que registra las redes de interacciones moleculares dentro de las células y variantes de ellas específicas a organismos particulares, información de genes y proteínas generada en experimentos genómicos y proteínicos (*GENES/SSDB/KO databases*) y la información sobre componentes

químicos y reacciones que son relevantes en procesos celulares (*LIGAND database*). Además, Kegg proporciona herramientas para inferir funciones de alto nivel a partir del nivel de información molecular (*BRITE database*). Se han descrito alrededor de 20.000 funciones biológicas relacionadas con la vida de las bacterias en el hábitat intestinal humano. Algunas de ellas se necesitan para la autonomía bacteriana, como las principales rutas metabólicas (metabolismo hidrocarbonado, síntesis de aminoácidos) o la propia expresión génica (ARN y ADN polimerasas, ATP sintasa). Otros genes codifican proteínas que intervienen en funciones necesarias para la vida de las bacterias dentro del tracto gastrointestinal, es decir, proteínas relacionadas con la adhesión a células del hospedador (colágeno, fibrinógeno, fibronectina) o el aprovechamiento de azúcares derivados de los glucopéptidos secretados por células epiteliales(14).

**Figura 2.** Representación general de los mapas Kegg.



**Figura 3.** Representación del pathway de Glycolysis/Gluconeogénesis - Homo sapiens (human).



La base de datos de grupos ortólogos COG de NCBI (*Clusters of Orthologous Groups of Genes*) agrupa a las proteínas en base a sus relaciones filogenéticas y ha sido ampliamente utilizada en diversos proyectos genómicos para la asignación de funciones de las proteínas, tanto de genomas bacterianos, como de genomas eucariotas(15).

- ✓ *Metagenomic species*. Una reciente publicación de Nielsen et al.(16) aporta un nuevo abordaje en la forma de estudio bioinformático de la microbiota, permitiendo clasificar una gran cantidad de genes a los que no se les podría asignar su pertenencia a ninguna entidad biológica. El nuevo método consiste en la agrupación de genes en base a su co-abundancia, es decir, se considera que aquellos genes que se repiten el mismo número de veces en el mismo individuo pertenecen al mismo grupo de entidades biológicas relacionadas, lo que ha venido a denominarse *metagenomic species*. En la publicación se describe la existencia de 7.381 de estas entidades en una cohorte de 396 muestras fecales humanas, de las cuales 741 son agrupaciones de más de 700 genes sugiriendo que se trata de especies bacterianas, mientras que el resto son pequeñas, probablemente plásmidos, fagos o virus. Se aprovechó que

cierto grupo de individuos había ingerido un probiótico, *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* CNCM I-2494, para valorar la capacidad del método en identificar especies particulares. Pues bien, el 95% de las secuencias de genes correspondientes a *B. animalis* se asignaron a la misma *metagenomic specie*. Este método ha permitido además ampliar el catálogo de genes que conforman la microbiota intestinal humana de 3.3 millones(17) a casi 10 millones(18).

### **Diversidad de la población bacteriana**

A la hora de para llevar a cabo la descripción de la riqueza en especies de una determinada comunidad ecológica, frente a otra, podemos hacerlo desde diferentes aproximaciones.

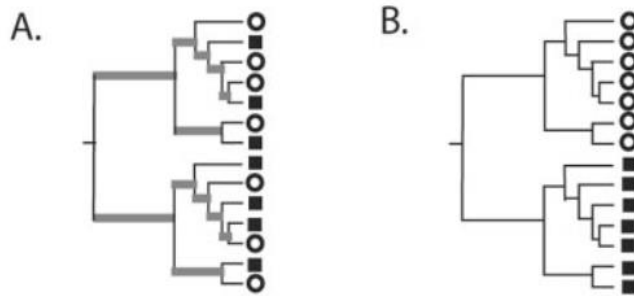
- Diversidad alpha o diversidad intramuestra. Cuando describimos la biodiversidad alpha de un medio hemos de tener en cuenta dos conceptos: la cantidad o riqueza de especies distintas (*richness*) y la abundancia de cada una de ellas, para estimar la equitatividad (*evenness*), es decir, el nivel de homogeneidad en abundancia entre las especies que participan en el ecosistema. Refleja el número de especies en una comunidad pequeña. Definimos la diversidad alpha de una comunidad microbiana mediante índices (Índice de Chao1, el índice de Jakknife, el Índice de Simpson o el Índice de diversidad de Shannon) que tiene en cuenta el número de especies (OTUs o filotipos) presentes en el hábitat y su abundancia relativa. Estos índices dan lugar a las denominadas curvas de rarefacción, ya que un creciente número de taxones secuenciados, permite estimaciones cada vez más precisas de la diversidad total de la población.
- Diversidad beta o diversidad entre muestras. Este parámetro cobra sentido ante la necesidad de comparar dos poblaciones o hábitats de un mismo ecosistema. Mide el número de taxas compartidas entre dos poblaciones. La diversidad beta actúa como un *score* de similitud entre poblaciones. Los índices de similitud de Sørensen y el Índice de Jaccard determinan la distancia entre muestras basándose únicamente en la presencia o ausencia de OTUs, mientras que los Índices de similitud de Bray–Curtis y Morisita miden la concordancia en base a la abundancia de OTUs en cada muestra(17). Estos parámetros, no obstante, no

tienen en cuenta la profundidad de la secuenciación, es por ello que las secuencias han de ser normalizadas, o bien usar métodos alternativos (17).

- ✓ Distancia Unifrac. La diversidad alpha y beta pueden ser analizadas no sólo mediante OTUs sino a través de la distribución filogenética (historia evolutiva). Se trata de abordajes diferentes pero complementarios, pudiendo ofrecer una información más integral de la estructura de la comunidad bacteriana. Para comparar la diversidad entre dos muestras diferentes hemos de construir una matriz de distancia entre las mismas, que nos permita conocer la diferencia en términos de taxonomía bacteriana. Los análisis que tienen en cuenta la diferencia filogenética entre especies consideran las muestras con mayor similitud de secuencia como más similares desde el punto de vista evolutivo. Se realiza mediante la construcción de un árbol filogenético. Al realizar un árbol filogenético, describimos la distancia UniFrac (fig. 4) entre una comunidad A y una comunidad B como la fracción de rama del árbol filogenético que pertenece a la comunidad A o a la comunidad B, pero no a ambas. La distancia UniFrac entre la comunidad A y la comunidad B se considera la fracción de la longitud de la rama en un árbol filogenético que es única para esa muestra. De esta forma, comunidades filogenéticamente muy similares entre sí tienen bajas distancias Unifrac, mientras que las comunidades muy diferentes, producen altas distancias UniFrac. Las distancias UniFrac pueden ser representadas en una matriz de distancia que se puede resumir y visualizar en el espacio de tres dimensiones mediante el uso del análisis de coordenadas principales, una técnica de reducción de dimensionalidad que sintetiza las distancias entre las muestras en un gráfico de dispersión en donde los puntos (que representan las muestras) que están más distantes de uno de otro, son más diferentes.



**Figura 4.** Distancias Unifrac. Círculos y cuadrados pertenecen a dos comunidades diferentes.

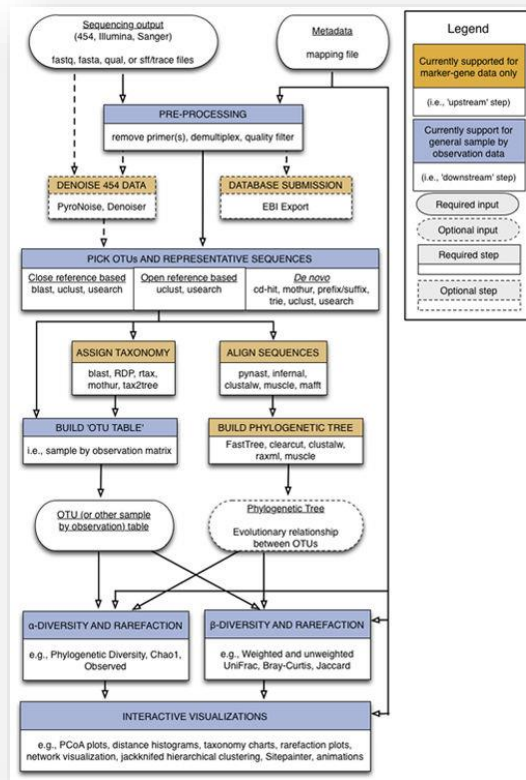


Las ramas unidas a los nodos son de color negro si son únicas para un entorno particular y gris si se comparten. (A) Árbol que representa comunidades filogenéticamente similares, donde una fracción significativa de la longitud de rama en el árbol es compartida (gris). (B) Árbol representando dos comunidades que son máximamente diferentes de manera que el 100% de la longitud de la rama sea único para el círculo o el ambiente cuadrado. Extraído de *Lozupone et al, Applied and environmental microbiology, 2005*.

### **Análisis de datos de la microbiota**

El software QIIME explota los metadatos aportados por la plataforma de secuenciación y reporta los datos sobre diversidad microbiológica. Cabe describir aquí el proceso de los metadatos a través de esta **herramienta QIIME**. (figura 5).

**Figura 5.** Esquema propuesto para análisis de datos generados por Illumina. (From www.qiime.org).



De forma genérica dividimos el proceso en dos etapas: *upstream* y *downstream*. El primer proceso, incluye todo el procesamiento de los datos en bruto (*raw data*), y la generación de los archivos que muestran las OTUs y el árbol filogenético para el posterior análisis microbiano. El segundo paso lleva a cabo análisis de la diversidad, estadísticas y el graficado de los datos. Existen diferentes funciones preconfiguradas de las que podemos hacer uso, y que además han sido publicadas y revisadas, lo que facilita el análisis. A lo largo del proceso de secuenciación tienen lugar errores en la determinación de la secuencia de nucleótidos, en forma de inserciones y deleciones. Por tanto, las secuencias han de filtrarse mediante una serie de algoritmos (*denoising procedure*) para evitar la sobreestimación del número de OTUs en la secuenciación. Consiste en que todas aquellas secuencias menores de 150 pares de bases, que contengan algún carácter ambiguo, o que no coincida con el *primer* serán descartadas. Tras este paso, tiene lugar el *demultiplexing step*, a través del cual, los *primers* y los *barcodes* empleados durante la PCR son

eliminados, ya que no son necesarios para ulteriores procedimientos. La última parte del preprocesamiento es la aplicación de un filtro para evaluar la calidad de la secuenciación. La calidad de las secuencias aportadas por la plataforma de secuenciación es evaluada mediante la aplicación de *Phred score*. Se asume que un *Phred Quality score* por encima de 20, tiene una probabilidad de asignación incorrecta de base de 1 por 100. Tras los pasos de preprocesamiento los metadatos están preparados para su asignación a las OTUs. Mediante el protocolo *UCLUST*, las secuencias son clasificadas en las diferentes OTUs en base a la similitud de secuencia, como se ha explicado previamente. A continuación, se realiza una identificación de secuencias quiméricas, que son artefactos técnicos que tienen lugar durante la amplificación por PCR. Posteriormente se realiza la asignación de las taxonomías, en la que se asigna a las OTUs el nombre del microorganismo mediante la herramienta *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)* que emplea bases de datos de *Greengenes* con el método *PyNAST*. Tras la asignación de secuencias, podemos inferir la construcción un árbol filogenético. Dicho árbol será utilizado en los *downstream*.

QIIME dispone de una herramienta para el análisis para el cálculo de las distancias Unifrac y la diversidad beta (comparación y análisis de comunidades microbianas). El último paso de este primer análisis es la construcción de una tabla OTU, que contiene todas las OTUs, con la correlación con la taxonomía y las abundancias por muestra.

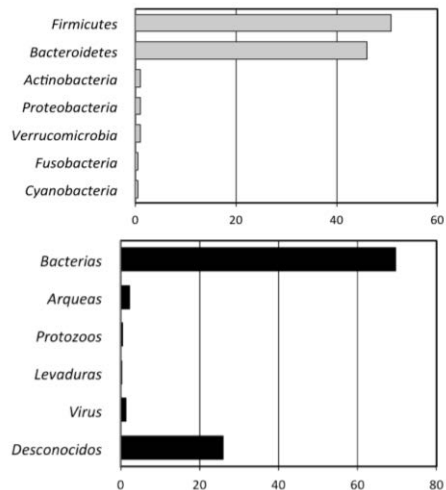
## **Composición flora intestinal humana**

Durante los últimos años, dos grandes proyectos realizados a gran escala y dotados de elevados recursos económicos se han encargado de la tarea de descifrar la estructura y las funciones de la microbiota intestinal humana, así como sus relaciones con la salud y la enfermedad. El proyecto MetaHIT, financiado por la Unión Europea, ha estudiado la microbiota intestinal en 700 personas observando su intervención en trastornos metabólicos (obesidad, diabetes de tipo 2) y en la inflamación intestinal(17). El Human Microbiome Project, subvencionado por National Institutes of Health (NIH) estadounidense ha estudiado la microbiota en diversas localizaciones (boca, fosas nasales, piel, tracto genital, intestino, etc.) de 300 personas definidas como sanas(19).

Se calcula que el colon alberga más de  $10^{14}$  microorganismos, esto es 100-200 billones (100.000.000.000.000) en terminología europea, la mayoría de los cuales pertenecen al dominio Bacteria, aunque se encuentran también Archaea, virus y formas eucariotas (levaduras y protozoos) (Figura 6A). El dominio Bacteria comprende 55 grandes clases o divisiones, también llamadas filos o phylum, de entre las que sólo siete y nueve se encuentran en la microbiota fecal humana. La gran mayoría de las bacterias (90 %) pertenecen a dos divisiones, Bacteroidetes y Firmicutes, y el resto son Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria, Verrucomicrobia y Cyanobacteria (Figura 6B). Bacteroides, Faecalibacterium y Bifidobacterium son los géneros más abundantes en la microbiota humana, aunque su abundancia relativa es muy variable entre las personas. Dentro del dominio Archaea se encuentra representación de muy pocas especies, en su mayoría pertenecientes a *Methanobrevibacter smithii*. Si se estudian estratos taxonómicos más profundos, a nivel de especie, se observa mucha más diversidad a expensas de una gran variabilidad bacteriana interindividual, de forma que se puede considerar que cada individuo es anfitrión de un perfil bacteriano único(8). Además, el espectro de comunidades bacterianas de la luz intestinal varía desde el ciego hasta el recto, de forma que la composición bacteriana dentro de un mismo individuo es diferente, según se analice una u otra región del colon. Sin embargo, cuando se estudia la microbiota asociada a la mucosa, su composición es relativamente estable desde el íleon terminal hasta el recto.

**Figura 6.** (A) Composición bacteriana de la microbiota humana según técnicas de secuenciación del gen 16S. Los datos indican el porcentaje de secuencias que pertenecen a cada una de las divisiones o clases del dominio Bacteria (datos obtenidos de Eckburg et al, 2005).

(B) El proyecto Europeo MetaHIT generó el primer catálogo de genes de la microbiota intestinal humana. La gráfica muestra el porcentaje de genes de los que se reconoce su pertenencia a cada uno de los dominios de los seres vivos. Hay un porcentaje importante de genes de los que no se tiene información suficiente para adscribirlos a uno de los dominios (datos obtenidos de Qin et al, 2010).



Además de las diferencias interpersonales, también se reconocen variaciones o fluctuaciones de la composición bacteriana en las muestras de una misma persona. Se cree que factores como la dieta, la ingesta de fármacos, los viajes o el mismo hábito deposicional condicionan la variabilidad de la composición de la microbiota a lo largo del tiempo. En un estudio reciente se obtuvieron muestras de tres localizaciones diferentes (intestino, boca y piel) de dos personas sanas a lo largo de un período de 6 y 15 meses, respectivamente. Las conclusiones revelaron que la diferencia entre las tres ubicaciones tiende a mantenerse estable a lo largo del tiempo, pero dentro de la misma localización corporal se detectó una gran variabilidad en cuanto a la composición con el paso del tiempo(20). En cuanto a las especies, son muy pocas las que constituyen un núcleo estable o permanente, ya que sólo el 5 % de las especies detectadas en muestras fecales permanecían en todas las muestras obtenidas a lo largo del tiempo en una misma persona(21).

El análisis metagenómico realizado sobre muestras fecales la cohorte METAHIT identificó un total de 3,3 millones de genes no redundantes que posteriormente fue ampliado hasta 10 millones. Este estudio también permitió establecer el primer catálogo de genes microbianos procedentes del intestino humano. Se calcula que cada persona alberga una media de 600.000 genes en el tracto gastrointestinal, de los que 300.000 genes son comunes al 50% de las personas. De los genes identificados, el 98 % son bacterianos, y se describieron entre 1.000 y 1.150 especies bacterianas, con una media de 160 especies por

persona(18).

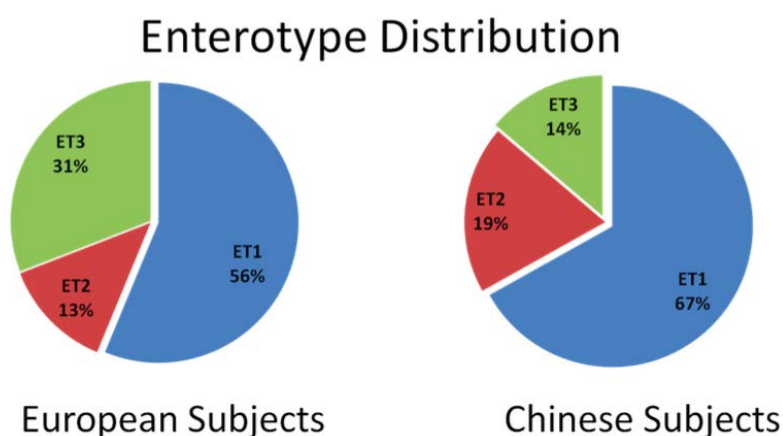
Curiosamente, a pesar de la gran variabilidad entre las personas en cuanto a taxonomía bacteriana, el perfil genético funcional expresado por la comunidad bacteriana es bastante similar en las personas sanas. Este concepto parece ser esencial a la hora de definir un ecosistema bacteriano sano, y así, un ecosistema será tanto más normal cuanto más se parezca su perfil funcional a un patrón definido.

En relación a los cambios geográficos, un interesante estudio que analizaba el gen 16S en las muestras fecales de una cohorte de niños y adultos sanos procedentes de tres áreas geográficas distintas (zona amazónica de Venezuela, poblados rurales de Malawi y población urbana de Estados Unidos) demostró la existencia de grandes diferencias en cuanto a la composición y la biodiversidad bacteriana entre la población estadounidense y las otras dos poblaciones con menos desarrollo económico y social(22). El análisis gráfico de composición por coordenadas principales discrimina claramente las muestras procedentes de Estados Unidos de las de las otras dos regiones (Malawi y Venezuela). Además, se constató que en las tres poblaciones la diversidad bacteriana aumentaba con la edad, pero que en las muestras procedentes de Estados Unidos se alcanzaba una diversidad menor en comparación con los otros dos grupos. Las diferencias entre poblaciones desarrolladas y no desarrolladas se relacionan con diferentes factores de exposición ambiental (transmisión vertical y horizontal), así como con patrones dietéticos.

En relación a la composición intestinal humana, se desconocía si la variación interindividual se manifestaba como un continuo de composiciones comunitarias diferentes o si la microbiota intestinal individual se congrega alrededor de composiciones comunitarias preferidas o ecosistemas estables. En este sentido se llevó a cabo un estudio en el que se analizaron 22 metagenomas intestinales humanos de individuos daneses, franceses, italianos y españoles, seleccionados por diversidad, y se combinaron con metagenomas de japoneses y americanos, con un grupo total de 39 individuos. El análisis establecía que el ecosistema intestinal humano se puede clasificar en torno a tres grupos, según la abundancia relativa de tres géneros(23): Bacteroides (enterotipo 1), Prevotella (enterotipo 2) y Ruminococcus (enterotipo 3). A estos grupos se les ha denominado «enterotipos» (fig. 7), y su descripción sugiere que las variaciones entre las personas están

estratificadas. Esta categorización parece no depender del sexo, la edad, la nacionalidad ni el índice de masa corporal. Estos hallazgos se han descrito en el proyecto MetaHIT para población europea, americana y japonesa. Se desconocen los fundamentos para este agrupamiento, aunque se especula con el hecho de que pudiera estar relacionado con patrones dietéticos de larga evolución, ya que el enterotipo con predominancia del género Bacteroides, o tipo 1, se ha asociado a una dieta rica en proteínas y grasa, en contraposición con el enterotipo de tipo 2 (predominancia del género Prevotella), más asociado al consumo de fibras e hidratos de carbono. Estos resultados se han reproducido posteriormente en una población china(24). En el estudio basado en el análisis de muestras fecales en una cohorte de niños y adultos sanos procedentes de la zona amazónica de Venezuela, áreas rurales de Malawi y Estados Unidos(22), se observa la misma agrupación por enterotipos en las poblaciones originarias de las áreas subdesarrolladas; sin embargo, al incluir la población procedente de Estados Unidos, esta clasificación pierde consistencia, apreciándose un predominio abrumador del enterotipo Bacteroides sobre el enterotipo Prevotella. Por otro lado, parece que en la población infantil no se produce clasificación alguna por enterotipos(23).

**Figura 7.** Distribución por enterotipos en poblaciones europea y china.



En relación a la composición de la microbiota intestinal, existe un interesante estudio que valora el impacto de la carga genética sobre la microflora intestinal, con este objetivo se analizó la diferencia en composición bacteriana (distancia Unifrac) de individuos procedentes de la misma familia, es decir madres con miembros gemelos (monocigóticos y dicigóticos) y población no emparentada(25). Se observó que había más similitud entre miembros de una misma familia que con individuos no emparentados. Sorprendentemente, no se encontraron diferencias en el grado de similitud, entre flora intestinal de gemelos monocigotos adultos y gemelos dicigotos adultos. En un estudio posterior (22) realizado en población de Malawi, se confirmó que la arquitectura filogenética de la microbiota fecal de gemelos monocigóticos no es más similar entre sí que la microbiota de gemelos dicigóticos de similar edad, siendo extensible a rangos de edad de 1-12 meses y 13-17 años. Sin embargo, en otro estudio de Lepage y cols. (26) la similitud entre gemelos monocigotos fue significativamente mayor que entre gemelos dicigotos o individuos no emparentados.

## **Disbiosis**

La disbiosis se describe como una desviación de la normalidad en la composición de la microbiota intestinal. Distintas patologías se ven asociadas a cambios en la composición de la microbiota intestinal, no obstante, el hecho de la asociación no implica necesariamente causalidad, pudiendo ser estos hallazgos consecuencia de la propia enfermedad. Para establecer un papel etiológico se precisa de estudios de intervención y seguimiento con restauración de la diversidad o composición teóricamente perdida. Los estudios con ratones gnotóbicos proporcionan un escenario idóneo para profundizar en este tipo de cuestiones. Distintas líneas de investigación sugieren el papel de la microbiota intestinal en patologías muy diversas, incluyendo la enfermedad inflamatoria intestinal, el síndrome metabólico, hígado graso no alcohólico, diabetes tipo 2, dislipemias, obesidad, síndrome del intestino irritable, trastornos de la conducta tipo autismo, etc. Algunas de estas líneas de investigación se comentan a continuación.

A lo largo de los últimos años la obesidad se presenta como un importante problema socio-sanitario en países occidentales debido a las comorbilidades asociadas. El aumento de su incidencia probablemente obedece a la conjunción de distintas causas. La vida sedentaria, el cambio de patrones dietéticos tradicionales



en países desarrollados o factores genéticos son algunos de los factores que contribuyen a la aparición de la obesidad. Se sabe que el tejido adiposo tiene capacidad de secretar adipocinas (leptina, TNF-alfa, interleucina 6, entre otras). Estas adipocinas están relacionadas con procesos inflamatorios y metabólicos que contribuyen a la aterosclerosis, dislipemias, hipertensión arterial, resistencia insulínica y diabetes mellitus tipo 2, y son un posible nexo entre la adiposidad y sus complicaciones cardiovasculares. En el proceso inflamatorio crónico y de bajo grado relacionado con la obesidad y el síndrome metabólico también destaca el aumento de las concentraciones de marcadores inflamatorios como la proteína C reactiva y marcadores de disfunción endotelial relevantes en el aumento del riesgo cardiovascular.

En modelos animales genéticamente predispuestos a sufrir obesidad (ratones con mutación selectiva del gen de la hormona saciante leptina) se ha descrito un descenso en la proporción de Bacteroidetes y un aumento en Firmicutes con respecto a ratones normales(27). Este desequilibrio se revierte al introducir una dieta hipocalórica a los ratones obesos. Por tanto, la dieta y la obesidad parecen constituir factores moduladores de la composición de la flora intestinal, pero no necesariamente causales de un estado de obesidad. En este sentido, el trasplante de flora fecal de ratones obesos a ratones axénicos o *germ-free*, hace que los segundos desarrollen las características fenotípicas de los primeros(28). De este estudio se desprende la hipótesis de que la composición de la flora intestinal es un factor que condiciona la forma en que aprovechamos la energía proveniente de la dieta, si bien, el grado de contribución, queda aún por determinar. A nivel humano cabe mencionar un interesante estudio de intervención aleatorizado y enmascarado, en el que se estudiaron los efectos de la infusión de microbiota intestinal de donantes de fenotipo delgado a individuos con síndrome metabólico. Séis semanas después de la infusión de la microbiota, la sensibilidad a la insulina de los receptores aumentó, junto con los niveles de producción de butirato(29).

La síntesis de ácidos grasos de cadena corta, generados a partir de la fermentación de carbohidratos no absorbibles, y sustrato metabólico de colonocitos, parece depender del tipo de flora, como se desprende de estudios animales con ratones selectivamente colonizados por *Bacteroides thetaiotaomicron* y *Methanobrevibacter smithii*, en los que se observa una mayor fermentación y una

mayor síntesis de ácidos grasos. Estudios en humanos sugieren el mismo perfil de rendimiento energético, de forma que en individuos obesos se han detectado niveles mayores de etanol en tests del aliento con respecto a individuos sanos, lo que indica indirectamente una mayor fermentación sacarolítica y rendimiento energético(30).

Según se publicó en la revista Nature, la falta de diversidad bacteriana en el intestino se asocia a riesgo de enfermedades metabólicas. El estudio incluyó individuos obesos y controles no obesos, pero detectó que las diferencias fenotípicas más importantes no dependían del sobrepeso sino de la variedad de genes bacterianos en la microbiota(31). Aquellos individuos con una baja diversidad, es decir poca variedad de genes bacterianos, presentaban un claro fenotipo inflamatorio: elevación de la proteína C reactiva, hiperglucemia, resistencia a la insulina y resistencia a la leptina, con mayor adiposidad corporal (acumulo de grasa corporal medido por absorciometría por rayos X de energía dual), independientemente de que fueran obesos o no. Además, el estudio sugiere que la presencia de algunas pocas especies bacterianas puede predecir qué individuos van a tener mayor riesgo de enfermedad metabólica, ya que la baja diversidad bacteriana se asocia a sobrecrecimiento de algunas especies. Estos criterios microbiológicos permitirían identificar subgrupos de individuos con mayor riesgo de desarrollar comorbilidades asociadas a la obesidad. Otro interesante hallazgo del mismo grupo de trabajo demuestra que la dieta hipocalórica incluyendo prebióticos (5-6 gramos de inulina al día) incrementa la diversidad de la microbiota intestinal, y reduce las anomalías inflamatorias, aunque sin restaurarlas por completo(32).

También está atrayendo mucha atención el posible papel de la microbiota intestinal en el riesgo cardiovascular. La fosfatidil-colina o lecitina es un fosfolípido involucrado en importantes funciones metabólicas, como la síntesis de neurotransmisores y aminoácidos, o estructurales, como formar parte de la membrana celular. Estudios recientes demuestran también que la microbiota intestinal interviene en la formación de metabolitos derivados de la fosfatidil-colina, en concreto la n-óxido trimetilamina (TMAO) cuyos niveles en plasma se relacionan directamente con el riesgo de desarrollo de eventos cardiovasculares(33). Estudios en humanos administrando un ciclo de antibióticos de amplio espectro parece disminuir a corto plazo los niveles de TMAO(34). Por otro lado, el descenso en los niveles de biodisponibilidad de fosfatidil-colina parece desencadenar el desarrollo

de hígado graso no alcohólico en ratones(35). Estos resultados refuerzan el concepto de la microbiota como órgano metabólico, que además de sus efectos beneficiosos, también puede estar implicada en determinados mecanismos fisiopatológicos que conviene identificar.

Es muy probable que la disbiosis o la disfunción de la microbiota intestinal pueda explicar buena parte de las manifestaciones clínicas de los trastornos funcionales del aparato digestivo, aunque todavía no tenemos evidencias científicas definitivas(36). En los síndromes funcionales del intestino se han reconocido anomalías en la motilidad intestinal, hipersensibilidad visceral, inflamación de bajo grado en la mucosa intestinal y comorbilidades de carácter psiquiátrico. Los estudios experimentales en ratones axénicos demuestran que la microbiota intestinal influye en todos y cada uno de esos mecanismos fisiopatológicos. Los ratones *germ-free* tienen un intestino delgado de pared más fina, más corto en longitud, con tiempo de tránsito más largo y sin actividad motora periódica en las fases interdigestivas. El intestino grueso está dilatado y también manifiesta inercia motora. Hay defectos en la nocicepción de modo que los ratones *germ-free* no desarrollan hipersensibilidad asociada a la inflamación(37). La colonización bacteriana normaliza todas las funciones, ya que tiene efectos tróficos sobre la pared intestinal (angiogénesis, infiltración de la mucosa y submucosa por células inmuno-competentes, desarrollo de la capa muscular y plexos nerviosos, etc.) y estimula la actividad motora(1). La investigación de la composición bacteriana en pacientes con síndrome de intestino irritable demuestra diferencias con respecto a controles asintomáticos, pero los resultados son poco consistentes entre los distintos estudios, en parte debido al uso de metodologías diversas y en parte debido a la propia heterogeneidad del síndrome. Los rasgos disbióticos más frecuentes en intestino irritable post-gastroenteritis son pérdida de diversidad, depleción de anaerobios y sobrecrecimiento de enterobacterias. La microbiota además contribuye tanto a la producción como al consumo de gas intestinal, y en pacientes con exceso de flatulencia se ha detectado exceso de *Bacteroides fragilis* y *Bilophila wadsworthia*, siendo la última una especie productora de gas sulfhídrico con potencial inflamatorio(38).

## 2. Colitis ulcerosa

### Concepto

La colitis ulcerosa (CU) es una entidad adscrita a las enfermedades inflamatorias crónicas intestinales, de etiología desconocida. Bajo el término enfermedad inflamatoria intestinal se engloban la Enfermedad de Crohn (EC), la colitis ulcerosa y la colitis microscópica. La colitis ulcerosa es una entidad que cursa con alternancia de períodos de actividad en forma de brotes y recidivas con fases quiescentes de remisión. Afecta de forma exclusiva a la mucosa del colon en profundidad, y de forma prácticamente constante encontramos implicado el recto, y desde ahí la inflamación se extiende de forma proximal y continua hasta alcanzar otras áreas del colon. Distinguimos en base a la extensión de la afectación la proctitis ulcerosa, la colitis izquierda, cuando la afectación alcanza el ángulo esplénico, y la colitis extensa o universal, cuando la afectación supera el ángulo esplénico.

### Epidemiología

Se trata de una enfermedad predominante en países desarrollados y con gradiente Norte-Sur, aunque su incidencia y prevalencias han crecido tanto en países de localización más meridional como en países en vías de desarrollo. Una revisión sistemática coloca la incidencia más alta de la CU en Europa con 24.3 casos por 100000 habitantes-año, seguida de 19.2 casos por 100000 habitantes-año en Norte América, y 6.3 por 100000 habitantes-año en Asia y Oriente medio. Con respecto a la prevalencia de CU, la prevalencia más alta se situó en Europa con 505 por 100000 habitantes-año, seguida de Norte América con 249 casos por 100000 habitantes-año, demostrando que la EII y en concreto la colitis ulcerosa es una enfermedad global y emergente(39), siendo muy similares los datos reportados en España. El patrón epidemiológico, por tanto, indica que los factores ambientales contribuyen necesariamente al aumento global de la incidencia de la EII y la CU, ya que los factores genéticos permanecen estables en el lapso temporal de solamente dos o tres generaciones.

## Etiopatogenia

- ✓ Factores genéticos: La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) posee una clara base genética fundamentada en los estudios de concordancia gemelar que la sitúan entre el 20-50% para la EC y entre el 14-19% para la CU (40–42), poniendo de manifiesto que es necesaria la conjunción de factores genéticos y ambientales para el desarrollo de la EII. Se trata de una enfermedad poligénica compleja, en la que actúan factores genéticos como epigenéticos, es decir, existen tanto genes de susceptibilidad propiamente dichos, como genes modificadores, que afectan al fenotipo de enfermedad en sujetos susceptibles (microRNAs). Se ha encontrado la asociación positiva entre algunas variaciones alélicas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA de clase II) y la colitis ulcerosa: DR2, DRB1\*1502 (más prevalente en población japonesa), DRB1\*0103 (asociado además a enfermedad pancolónica), DR9, así como una asociación negativa con DR4(43). Por otro lado, en la era genética de los “GWAS studies” (*Genome Wide Association Studies*) donde se analizan los denominados polimorfismos de nucleótido único (SNPs o *Single Nucleotide Polimorfism*) han sido descritos 163 locis de susceptibilidad para ambas enfermedades, de los cuales aproximadamente 47 se relacionan con la colitis ulcerosa(44), estableciendo las vías genético-moleculares que explican la etiopatogenia de la enfermedad inflamatoria intestinal. Para la colitis ulcerosa cabe también destacar la implicación de genes del epitelio de barrera (ECM1, CDH1, HNF4a, and LAMB1), genes reguladores de la diferenciación linfocitaria, como la disregulación en la ruta de señalización IL-23 (rc IL23, IL-12B, JAK2, STAT3), y las rutas de señalización de la IL-10(45).
- ✓ Factores medioambientales: como se ha descrito previamente, desde la segunda mitad del siglo XX, la incidencia y prevalencia de la EII están en aumento permanente, década tras década y de forma global pero con especial importancia en los países desarrollados(39). El patrón epidemiológico, por tanto, indica que los factores ambientales contribuyen necesariamente al aumento global de la incidencia de la EII, ya que los factores genéticos, si bien como acabamos de describir tienen relevancia en la EII, permanecen estables en el lapso temporal de solamente dos o tres generaciones. Por otro lado, existe un hecho que hace más sólida la necesidad de factores medioambientales en el desarrollo de la EII, y es que estudios migratorios ponen de manifiesto que los

inmigrantes, y en particular, su descendencia, procedentes todos ellos de áreas con baja prevalencia de EII, adquieren, con el paso de los años el mismo riesgo de sufrir EII que la población foránea(46). Por tanto, existen una serie de factores medioambientales asociados a la vida moderna, como la dieta, el uso de antibióticos, los cambios en la exposición a microorganismos ambientales, etc, que influyen en el riesgo de desarrollar una EII (tabla 1). Parece que todos estos factores actuarían en conjunto a través de la modificación de la composición de la microbiota intestinal, factor que también se ha asociado al riesgo a desarrollar EII y que ocupa un apartado concreto más adelante(47). Por consiguiente, los cambios en la colonización intestinal asociados al desarrollo socio-económico se perfilan como un factor de riesgo de atención prioritaria, no sólo por su importancia desde un punto de vista fisiopatológico, sino por su posible abordaje terapéutico.

**Tabla 1.** Factores medioambientales relacionados con los hábitos de vida modernos relacionados con alteraciones en la composición de la microbiota intestinal. Extraído de Manichanh et al, Nature Reviews Gastroenterology 2012.

<b>Los hábitos de vida modernos podrían estar relacionados con la colonización microbiana del intestino</b>	
<b>Hábitos de vida modernos</b>	<b>Estilos de vida tradicional</b>
Nacimiento en el hospital; aumento de la tasa de cesáreas	Nacimiento en casa vía vaginal
Bajo nº de miembros de la familia	Alto nº de miembros de la familia
Ambiente urbano, menor contacto con tierra (asfalto y hormigón)	Ambiente rural en contacto con microorganismos del suelo
Higienización del medio; medio colonizado por organismos multiresistentes	Colonización microbiológica ancestral del medio habitual
Empleo de antibióticos en épocas tempranas de la vida	No antibióticos en edad pediátrica
Higiene diaria	Acceso restringido al agua y jabón
Baja tasa de colonización por <i>H.Pylori</i>	Alta tasa de colonización por <i>H.Pylori</i>
Descenso de parásitos intestinales	Parásitos intestinales endémicos
Alimentos conservados por refrigeración	Conservación de alimentos por fermentación microbiológica
Consumo de alimentos procesados	Consumo de alimentos naturales

Los factores medio-ambientales analizados en estudios epidemiológicos se exponen a continuación.

- El **hábito tabáquico**, a diferencia de la Enfermedad de Crohn, tiene un efecto positivo sobre la colitis ulcerosa, ya que se asocia con menor tasa de recaídas, así como menor riesgo de colectomía(48,49).
- La **apendicectomía** (en concreto la inflamación del apéndice en forma de apendicitis o linfadenitis y no la resección en sí misma) se comporta como un factor protector para desarrollo de colitis ulcerosa, existiendo un meta-análisis de 17 estudios que demuestra tal asociación con una odds ratio de 0.307 (IC= 0.249-0.377)(50). Parece que este efecto protector sería exclusivo de pacientes menores de 20 años(51). En la EC esta asociación no está del todo clara. En un interesante estudio alemán se tomaron biopsias de apendicectomías procedentes de pacientes afectados de apendicitis confirmadas, frente a biopsias de apéndices de pacientes afectados de EC y otras entidades como controles. Hasta en el 62 % de los casos de apendicitis confirmada se aisló *Fusobacterium nucleatum* o *necrophorum* a nivel de la submucosa, frente a ningún caso en los controles. Además, varias bacterias antiinflamatorias se encontraban disminuidas de forma proporcional a la severidad de la apendicitis, estableciendo una disbiosis como posible causa subyacente de la misma(52). Dado que determinadas cepas de *Fusobacterium* se encuentran disminuidas en paciente con CU, se baraja la hipótesis de que exista una disbiosis apendicular local como fenómeno desencadenante de una colitis ulcerosa, y que su resección sea un mecanismo protector en individuos genéticamente predispuestos(53).
- Otro factor ambiental relacionado con el desarrollo de EII es la **lactancia materna**, que parece tratarse de factor protector; un meta-análisis de 14 estudios de casos y controles encontró que la lactancia materna ejercía un efecto protector para el desarrollo de CU, no así para EC (54). Un segundo meta-análisis encontró un efecto protector para sufrir EII de debut precoz, si bien no se alcanzó la significación estadística para EC o CU por separado(55). Parece que estas divergencias se deben a la duración de la lactancia, de forma que el efecto protector tiene lugar si la lactancia se prolonga más allá de los tres meses(56) factor que no es

tenido en cuenta en muchos de los estudios que aglutina el meta-análisis y actúa por tanto como un factor de confusión.

- El uso de **antibióticos** durante la infancia parece también aumentar el riesgo de desarrollar EII en población pediátrica, así lo demuestra un estudio danés, en base a una cohorte nacional prospectiva de niños, siendo estimado el RR global de 1.84 (95% CI 1.08 to 3.15) para los consumidores de antibiótico versus los no consumidores. Si bien parece que sólo aumenta el riesgo de sufrir EC (RR 3.41), aumentado a 4.43 los tres meses tras recibir el antibiótico, y la asociación mayor encontrada es para aquellos que recibieron al menos 7 cursos de antibióticos, pasando el RR a 7.32(57).
  - El **ambiente urbano** parece que aumenta el riesgo de EII frente al no urbano, como concluye un reciente meta-análisis(58). Parece que todos los factores descritos previamente, podrían alterar la composición de la microbiota colónica, de forma que, dicho cambio en conjunción con una serie de factores genéticos, explicaría el aumento de incidencia y prevalencia de EII. El factor dietético se ha sugerido también como uno de los promotores del cambio de la composición de la microbiota intestinal en los países desarrollados y que puede contribuir al aumento de la incidencia y prevalencia de la EII. Como hemos mencionado anteriormente la predominancia del género Bacteroides (enterotipo tipo 1), se ha asociado a una dieta rica en proteínas y grasa, más acorde con la dieta de los países desarrollados, en contraposición a la predominancia del género Prevotella (enterotipo tipo 2), más asociado al consumo de fibras e hidratos de carbono, y cuya dieta se asocia a poblaciones más rurales, y con recursos económicos más básicos basados en la agricultura(23).
- ✓ Factores inmunológicos. El Sistema inmune de las mucosas: la evidencia sugiere que una inadecuada respuesta inmune contra la microbiota intestinal, es responsable del desarrollo de la EII, en aquellos individuos genéticamente predispuestos. El sistema inmune, en el desarrollo de su papel defensivo puede ejercer dos tipos de respuesta: la inmunidad innata y la inmunidad adaptativa o adquirida. Ambas actúan de forma integrada y sinérgica. Se han identificado



disbalances, tanto a nivel de la barrera epitelial, como a nivel de la propia respuesta inmunológica, tanto innata como adaptativa. A continuación, se desglosa cada uno de ellos:

- Barrera epitelial y tejido linfoide asociado a mucosas (GALT). La barrera intestinal, compuesta por una cobertura de moco y la membrana epitelial subyacente, conforma nuestra principal área de comunicación con el medio externo. A su vez, la barrera mucosa está formada por una fina capa interna compuesta por mucinas y glicolípidos de membrana, y una capa externa compuesta de mucinas, inmunoglobulina A y péptidos antibacterianos no específicos. La importancia de la capa de moco en la prevención de la invasión bacteriana se pone de manifiesto en los modelos animales que utilizan ratones *knock out* para MUC2 (MUC2<sup>-/-</sup>), que codifica para la síntesis de la mucina más abundantemente secretada, que desarrollan colitis y un riesgo aumentado de cáncer colorrectal, asociado a la presencia de bacterias en contacto directo con el epitelio intestinal(59,60). En un interesante estudio de Swidsinski(61), se valoraba la integridad de la capa de mucina de biopsias de colon de pacientes con CU, colitis autolimitada, biopsias de apendicectomías y controles sanos. Los pacientes eran preparados mediante limpieza intestinal o bien mediante enemas de limpieza, cuando las biopsias eran distales. Las comunidades bacterianas que colonizaban el moco, se caracterizaban mediante el uso de hibridación in situ (FISH) utilizando sondas dirigidas con subunidad 16S del ARN ribosomal, previa fijación de la capa de mucina con una técnica dirigida a tal efecto. Los hallazgos revelaron que en pacientes con colitis ulcerosa el grosor de la capa de moco se encontraba adelgazada, con una menor superficie e infiltrada por leucocitos. Sin embargo, a pesar de dicho infiltrado inflamatorio, las bacterias son capaces de invadir el epitelio subyacente. En cualquier caso, aunque existen teorías que afirman que la barrera epitelial es una estructura estéril gracias a la existencia de la capa de moco, hoy sabemos que algunas bacterias (*segmented filamentous bacteria*), son capaces de interactuar con las células epiteliales a través de la capa de moco estimulando vías reguladoras de defensa. Otro sistema de defensivo fundamental de la barrera epitelial es la síntesis de péptidos antibacterianos. Algunos de ellos se expresan de manera constitutiva, como las alpha-

defensinas, otros de forma inducida tras señales producidas a través de la estimulación de sistema inmune innato, a través de *pathogen-associated molecular patterns* o PAMPs, como se detallará más adelante. Este tipo de estímulos dan lugar a la síntesis de RegIII gamma, una lectina antibacteriana secretada a nivel de intestino delgado(62). Bajo la capa mucosa, el epitelio intestinal está formado por una monocapa de células epiteliales unidas entre sí por uniones estrechas, y con los apéndices de las células dendríticas extruyendo entre las mismas. El epitelio intestinal se caracteriza además por la presencia de células caliciformes, células de Paneth, y linfocitos intraepiteliales, localizados entre los enterocitos, muchos de los cuales presentan un fenotipo citotóxico CD8+. En la superficie lateral de las células existe un sistema de uniones intercelulares llamado complejo de unión. Este sistema une a las células entre sí y define a las caras luminal y basolateral de cada célula. El complejo de unión está formado por la asociación de tres tipos de uniones intercelulares: la zonula ocluyente, (*tight junctions* o zonula ocludens, que conforman una barrera física y funcional, creando una barrera que rodea todo el perímetro celular; funcionalmente impiden la difusión intercelular, y permiten la polaridad evitando la difusión lateral de moléculas) la zonula adherente y los desmosomas o mácula de adhesión. Defectos a nivel de la permeabilidad epitelial se han descrito ampliamente en pacientes con EII (gracias a los *GWAS studies*) y se piensa que constituye un mecanismo patogénico primario. En particular, la CU, ha sido asociada a áreas genéticas de susceptibilidad a nivel de membrana como:

- ECM1: codifica para una glicoproteína extracelular expresada en órganos epiteliales.
- HNF4A: Codifica para el *hepatocyte nuclear factor-4 alpha*, factor de transcripción que regula el ensamble del complejo de unión. Los ratones que sufren la mutación de este gen presentan una severa colitis.
- CDH1 (E-cadherina) que codifica para una glicoproteína transmembrana que pertenece a la zona adherente implicada en la comunicación intercelular. Se asocia además a un mayor riesgo de CCR.

- LAMB1 (subunidad B1 laminina), glicoproteína expresada en la membrana basal.
- GNA12, que codifica para una GTP-asa, que interviene en la formación de las uniones estrechas, a través de la interacción con ZO-1 y Src.

El sistema inmune de las mucosas pertenece al denominado tejido linfoide asociado a mucosas, que tapiza las superficies respiratoria y digestiva. Se distribuye a lo largo de todo el tubo digestivo, entre el estrato epitelial y la lamina propia. Podemos distinguir dos formas de tejido, por un lado, las placas de Peyer (fig. 8), formadas por agregados de 5 o más folículos, y por otro los folículos linfoides aislados. Ambas estructuras se distribuyen a lo largo del intestino delgado, sin embargo, a nivel del intestino grueso, encontramos únicamente folículos linfoides aislados. Ambas estructuras contienen fundamentalmente precursores de linfocitos B, T y células presentadoras de antígeno. Cada folículo se asocia a un epitelio especializado suprayacente que contiene células M (que no secretan enzimas digestivos) y que se encarga de transportar los antígenos a su través hasta contactar con las células inmunes. Una vez que tiene lugar la exposición antigénica, el linfocito es activado, y migra hasta los ganglios linfáticos mesentéricos, donde tiene lugar su proliferación clonal. A continuación, pasa a la circulación sistémica, y retorna de nuevo a mucosa intestinal, donde tendrá lugar la respuesta inmune.

**Figura 8.** Placa de Peyer.



- Inmunidad innata. La respuesta inmune innata se caracteriza por ser rápida, inespecífica y no crear memoria inmunológica, ya que no depende de la activación de linfocitos. Se produce en respuesta a una serie de antígenos de estructuras comunes a las células procariontas como son lipopolisacárido (LPS) y los peptidoglicanos. Estos antígenos se denominan *pathogen-associated molecular patterns* (PAMPs)(63) y se unen a unos receptores denominados *pattern recognition receptors* (PRRs). Se conocen cuatro clases de PRRs: *RIG-I-like receptors*, que reconocen RNA viral, receptores para leptina tipo C, que reconocen estructuras fúngicas, *NOD-like receptors* (NLRs) y la familia de los *toll-like receptors* (TLRs) implicados en el reconocimiento de estructuras bacterianas. Mientras que los NLRs se localizan en citoplasma, los TLRs son receptores transmembrana, asociados a la membrana plasmática o a la membrana del compartimento endolisosomal. Los PRR activan una cascada que resulta en la síntesis de (NF)- $\kappa$ B, que induce la transcripción de genes, y la síntesis de sustancias proinflamatorias. Dichos receptores son expresados tanto por células inmunes como no inmunes. Una vez que un patógeno o un antígeno atraviesa la barrera epitelial, las células fagocíticas como los neutrófilos, monocitos o macrófagos son capaces de liberar una serie de citoquinas que, a su vez, inducen el reclutamiento de neutrófilos al lugar de la inflamación. Las células dendríticas, otro tipo de célula fagocítica, que actúa como célula

presentadora de antígeno, es capaz de inducir una respuesta inmunológica adquirida al presentar antígenos a células T *naive*. Por tanto, se trata de la primera línea de defensa frente a patógenos, rápida, inespecífica y se encuentra coordinada con la respuesta inmune adquirida(64). La ruta de la IL-23 tiene un papel clave en en dirigir la respuesta inmunológica frente a las bacterias, como nexos entre la respuesta inmune innata y adaptativa. Múltiples polimorfismos en su ruta han sido descritos tanto para EC como para CU poniendo de manifiesto su importancia en el desarrollo de la inflamación crónica intestinal. Se han identificado variantes de riesgo en el receptor de la IL-23, y en otros genes del eje, como STAT-3 y JAK-2 implicados en la transducción de señal, en la IL-12b, subunidad común entre la IL-12 y la IL-23, así como en CCR6, un receptor de citoquina expresado por las células que producen IL-17. La IL-23 no sólo está implicada en la diferenciación Th-17, sino también actúa sobre células del sistema inmune innato, como las células  $\gamma\delta$ T, que son una variante de las células T natural killer (NKT), y las células linfoides innatas (innate lymphoid cells) asociadas al tejido linfoide asociado a mucosas(65).

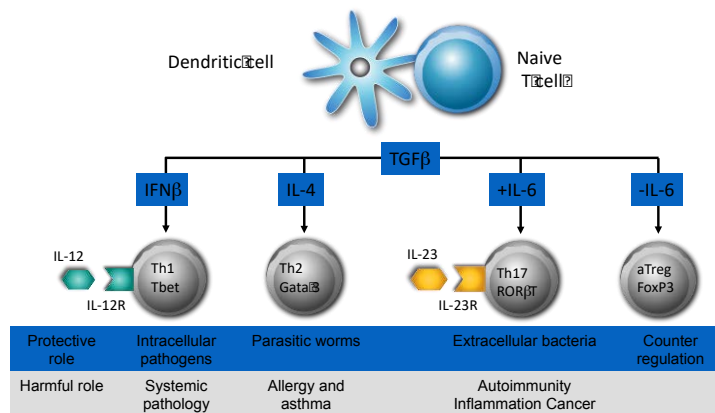
- Inmunidad adquirida. La inmunidad adquirida es específica contra el antígeno y genera memoria inmunológica, es decir, una defensa reproducible a lo largo del tiempo cuando tiene lugar el contacto con el antígeno que indujo la inmunización. Sus principales efectores son los linfocitos B y T, generadores de respuestas humorales y celulares respectivamente. Tanto las células B como las T son capaces de reconocer antígenos mediante receptores específicos (receptores BCR para células B y receptores TCR para las células T). La célula plasmática, efectora de la respuesta humoral secreta inmunoglobulinas, que serán Ig G, o Ig M, a nivel sistémico, o Ig A si se excretan a la luz de las mucosas. La IgA neutraliza los virus y bacterias, impidiendo la adherencia y colonización de las superficies mucosas. Por otro lado, la Ig A no activa el complemento, induciendo poca respuesta inflamatoria local. Los antígenos procesados por células presentadoras de antígeno desde la luz intestinal, se presentan a los linfocitos T a través del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Los linfocitos se subdividen en linfocitos citotóxicos (CD8+) o helper (CD4+) que reconocen moléculas del CMH tipo 1 y tipo 2 respectivamente, produciendo

su activación y expansión clonal dependiente de antígeno en los ganglios linfáticos mesentéricos(64). A continuación, se distribuyen por la circulación sistémica, y retornan a la membrana basal de la mucosa intestinal, donde tendrá lugar la respuesta inmune, sea de tolerancia o de rechazo. La expansión clonal de células T helper da lugar a linfocitos helper de distinto fenotipo: Th1, Th2, Th17, Tr1 o T reguladoras (fig. 9) según el perfil de citoquinas que expresen. Así, la respuesta Th1 a través de la producción de IFN- $\gamma$ , produce respuestas de hipersensibilidad retardada y activación de macrófagos, siendo efectivas en el aclaramiento de patógenos intracelulares. La respuesta Th2 produce interleukin IL-4, IL-5, IL-13 and IL-25, de importancia en la síntesis de IgE e induciendo una respuesta alérgica, y actuando en la eliminación de parásitos. Con posterioridad se describió la existencia de una tercera vía de diferenciación Th17(66), fundamental en favorecer la protección del huésped contra bacterias extracelulares y hongos, para las que las vías Th1 y Th2 no resultan efectivas. Por otro lado, estas células son también mediadoras de respuestas autoinmunes. Los linfocitos CD4+ Th17 sintetiza fundamentalmente IL-17, una citoquina que actúa sobre células epiteliales, endoteliales y fibroblastos, estimulando la producción de ciertas moléculas, entre ellas, quimiocinas, factores de crecimiento (G-CSF y GM-CSF) y moléculas de adhesión (ICAM-1) necesarias tanto para el reclutamiento de neutrófilos como para la propia granulopoyesis. Los linfocitos Th17 se diferencian a partir de células *naive*, en presencia de IL-6, IL-21, IL-23 y TGF- $\beta$ , un proceso potenciado por la acción de de TNF-alpha e inhibido por IFN- $\gamma$ (Th-1) y por la IL-4 (Th-2). Dependiendo del perfil de citoquinas que predomine a nivel de la mucosa intestinal, se diferenciarán unas u otras poblaciones de células Th17 que mediarán un función efectora o reguladora, así, en presencia de IL-23, las células Th-17 ejercerán una función proinflamatoria, generando IFN- $\gamma$  o induciendo un *feedback* positivo de la vía Th-1, como ocurre en la psoriasis y la artritis reumatoide. En la EII, las células Th-17, pueden diferenciarse en el intestino en células protectoras o patógenas: en presencia de TGF- $\beta$  e IL-21, las células Th-17 presentarán un perfil regulador. En un medio proinflamatorio, la IL-23 y la IL-6 inducen la producción de IL-17 e IL-23, indiciendo una diferenciación Th-17 efectora, permitiendo así perpetuar el

proceso inflamatorio. Por tanto, la diferenciación hacia Th-17 o T-reg dependerá del microambiente en el que se encuentre la célula T-naive.

La respuesta T reguladora llevada a cabo por las células T reguladoras permite el fenómeno de inmunotolerancia gracias a la secreción de citoquinas reguladoras de carácter antiinflamatorio como la IL-10 o el TGF-beta(66) en respuesta a antígenos que se reconocen como no patógenos, contrarrestando las otras respuestas respuestas Th-1, Th-2 y Th-17. Habitualmente, a nivel de la barrera intestinal, predomina un ambiente de inmunotolerancia probablemente mediado por células T reguladoras y permitiendo la exposición continua a los antígenos derivados de la dieta y a nuestra propia flora comensal, sin desarrollo de respuesta inmune antiinflamatoria.

**Figura 9.** Diferenciación clonal de los linfocitos T hacia T-helper 1, 2, 17, T-reguladores. Adaptado de Reiner et al., *Cell*, 2007



Clásicamente se ha relacionado la enfermedad de Crohn como una patología dirigida por una respuesta inmunológica adquirida dependiente de expansión clonal Th1, frente a la colitis ulcerosa con una respuesta Th2, con una excesiva producción de IL-5 e IL-13. Sin embargo, tanto cultivos de biopsias de pacientes con EC como de CU producen niveles comparables de IFN-γ(67) y en una reciente publicación se describe la presencia de un perfil mixto de citoquinas con

predominancia de IL-6, y ausencia de IL-13 en sobrenadantes de cultivos de biopsias de CU(68), poniendo en entredicho el paradigma Th1/ Th2 en la EC y la CU. Junto a las anteriores, parece que la respuesta Th17, mediada por la IL-12 puede tener algún papel en la EII. Elevados niveles de IL-17A se han detectado tanto en EC como en CU en comparación con individuos normales(69).

Por último, las células T-reg ejercen una gran poder antiinflamatorio en modelos experimentales de colitis y se encuentran deplecionadas en la sangre periférica de pacientes con EII activa versus población sana o EII inactiva(70). Por otro lado, se sabe que las células mononucleares de la lamina propia de los pacientes con EII son resistentes a la acción de las células T-reguladoras, efecto que puede ser revertido mediante la inhibición de Smad7, un inhibidor de la señal TGF- $\beta$ (71).

- **Papel de la microbiota intestinal en el desarrollo y homeostasis del sistema inmune de las mucosas.** Se sabe que la microbiota nos provee de funciones tróficas, metabólicas y defensivas. En cuanto a las funciones tróficas, como ya hemos comentado previamente, es fundamental el papel que ejercen la comunidad bacteriana en la inducción del sistema inmunitario adquirido y de sus mecanismos de regulación. Los animales criados en condiciones de asepsia estricta (*germ-free mice*) presentan una atrofia no sólo del sistema inmunitario a nivel de las mucosas con la expresión de folículos linfoides de pequeño tamaño, escasez de linfocitos intraepiteliales y de la lámina propia, sino también del sistema inmunitario sistémico (ganglios linfáticos de menor tamaño, nivel bajo de inmunoglobulinas)(72,73). Por otro lado, es también conocido que los animales criados en condiciones asépticas presentan menor tolerancia oral a los antígenos de la dieta. Todos estos cambios son reversibles tras la colonización de los *germ-free mice* con flora intestinal. Gran parte de la información de la que disponemos en relación a la interacción microbiota-mucosa intestinal se basa en estudios in vitro con bacterias aisladas y no frente a una comunidad ecológica compleja.

En estudios con ratones(74) se ha puesto de manifiesto cómo determinadas bacterias, en concreto las llamadas *segmented filamentous bacteria* (SFB) son capaces de interactuar con las células epiteliales, a



través de la capa de moco, de forma que estimulan las respuestas la vía reguladora mediante la secreción de citoquinas tales como IL-17 e IL-22. Dicha respuesta parece ser protectora frente a la infección intestinal de algunos patógenos como *C. rodentium*. *Bacteroides fragilis*(75), a través de su polisacárido A, provee al huésped de capacidades antiinflamatorias, ya que ha demostrado evitar la inflamación en modelos animales de colitis desencadenada por *Helicobacter hepaticus*. La colonización de *germ-free mice* con comunidades bacterianas complejas, estimula la expresión epitelial de RegIII $\gamma$ , un péptido antibacteriano, que se une a las bacterias a través de peptidoglicanos, sin activación del complemento, y limita la adhesión bacteriana al epitelio(76). Y no sólo las bacterias ejercen una estimulación del sistema inmune, sus productos metabólicos como los ácidos grasos de cadena corta derivados de la fermentación sacarolítica (butirato, acetato y propionato) poseen importantes propiedades antiinflamatorias tanto en estudios in vitro, como revirtiendo la inflamación en modelos murinos de colitis(77). Por lo tanto, parece que la presencia de la microbiota así como su actividad metabólica en el intestino ejercen un papel decisivo en el desarrollo, la maduración y homeostasis del sistema inmunitario. Por otro lado, la evidencia en diferentes estudios, tanto en animales como en humanos, distintas cepas de microorganismos probióticos han demostrado su capacidad para modular respuestas inmunológicas cuando son administrados por vía oral. Los probióticos son capaces de producir una estimulación de la inmunidad innata y de la inmunidad adquirida o específica, confiriendo al huésped un aumento potencial en la resistencia a microorganismos patógenos(78), o bien, pueden inducir una inhibición del sistema inmune en situaciones de hiperestimulación del mismo.

- **Uso de probióticos en la inducción del sistema inmunológico:** Una vez demostrado el hecho de que la microbiota es un factor necesario para el desarrollo y homeostasis del sistema inmune tanto local como sistémico, junto con su papel en la modulación del mismo, se ha planteado la posibilidad de que los probióticos (microorganismos vivos que, cuando se administran en cantidades adecuadas, confieren un

beneficio a la salud del consumidor(79)) sean capaces de estimular el sistema inmune o reducir la respuesta en función de la necesidad del individuo. Los mecanismos a través de los cuales los probióticos interactúan con la inmunidad del huésped, pueden agruparse a nivel molecular en tres categorías: inhibición de patógenos, homeostasis de la mucosa, y efecto inmunomodulador. La inhibición de patógenos consiste en la competencia directa que establece el probiótico con otros patógenos por la adherencia al epitelio intestinal, junto con la producción de sustancias antibacterianas, como son el ácido láctico y las bacteriocinas. En relación a la homeostasis de la mucosa los probióticos actúan inhibiendo expresión de genes proinflamatorios a nivel de las células epiteliales de la mucosa. Por otro lado favorecen el “efecto barrera” intestinal al inducir la síntesis de mucinas(79), o favoreciendo las *tigh junctions*, uniones intercelulares laterales fundamentales para el mantenimiento del citado efecto barrera(80). Por último, se ha demostrado el papel de cepas probióticas como inmunomoduladoras de la respuesta inmune de la mucosa al aumentar la secreción de citoquinas proinflamatorias. A nivel clínico, se han utilizado los probióticos con el objetivo de mejorar las infecciones adquiridas por vía gastrointestinal. De esta forma se sabe, por ejemplo, que la administración de distintas cepas de *Lactobacillus* mejoran la evolución de la diarrea infecciosa en niños, producida en la mayor parte de los casos por rotavirus, disminuyendo el tiempo la duración, la frecuencia de la diarrea así como el tiempo de hospitalización(81). Otro ejemplo de gran importancia clínica es el empleo de probióticos como profilaxis para disminuir la recurrencia de la diarrea por *Clostridium difficile*. Existe un metanálisis(82) en el que se demuestra que la profilaxis con probióticos disminuye la incidencia de diarrea por *Clostridium difficile* aunque de forma discreta, y sin aconsejar una cepa concreta. Una aplicación muy útil aunque todavía en fase de desarrollo consiste en el empleo de probióticos como agentes potenciadores de vacunas, aprovechando sus efectos en el aumento de células B secretoras de inmunoglobulinas específicas y de Ig A en suero. Un ejemplo ha sido el empleo de *Lactobacillus GG* como potenciador de la vacuna contra el rotavirus, que ha demostrado favorecer la

seroconversión(83). De Vrese y col. apreciaron un aumento significativo de los anticuerpos neutralizantes al combinar *L. rhamnosus GG* y *L. paracasei CRL431* junto con la vacuna atenuada oral del virus de la polio(84). En el caso de la vacuna de la gripe en ancianos los estudios mejor diseñados se exponen a continuación: El primero de ellos, utilizó *L. casei* Shirota frente a placebo en pacientes que recibían la vacuna contra la gripe. No se demostraron diferencias en la tasa de seroconversión ni en la de infecciones respiratorias. En un segundo estudio de similar diseño, pero menor número de pacientes, se empleó *Lactobacillus plantarum* (CECT 7315/7316), apreciando un significativo aumento en la seroconversión (Ig G e Ig A) frente al virus de la gripe. Otro probiótico empleado fue *Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*. Dicho estudio se realizó en dos fases (fase piloto y fase de confirmación). En el grupo que recibió el probióticos se observó un mayor título de anticuerpos, si bien los resultados sólo fueron significativos en la segunda fase de confirmación. Por otro lado se apreció una mayor tasa de seroconversión en aquellos que recibían la vacuna contra el virus de la gripe H3N2. En el cuarto y último estudio se utilizó *Lactobacillus paracasei* (NCC 2461) junto con fructo-oligosacáridos frente a placebo para evaluar la respuesta a la vacuna del virus de la gripe y del neumococo 23-valente. En este caso, se objetivó una menor incidencia de infecciones respiratorias, aunque sin diferencias en el título de anticuerpos.

Más allá del efecto de los probióticos disminuyendo la incidencia y severidad de las infecciones, los mecanismos en virtud de los cuales, un determinado probiótico modula la respuesta a la vacuna no son del todo conocidos. La exposición de modelos murinos de colon a *Lactobacillus gasseri* genera diversificación de las poblaciones de linfocitos B a nivel de la lamina propia. En otro estudio la administración de *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei* NTU a ratones indujo una mayor interacción entre los linfocitos T CD4+ y las células dendríticas. Por tanto, pudiera ser que determinados probióticos (efecto cepa-dependiente) mejoraran la respuesta a las vacunas en ancianos, aunque quedan muchas incógnitas por descubrir, existiendo variables como el tipo de vacuna, o el grado de seroconversión. La enfermedades alérgicas, entre las que se incluyen la

alergia alimentaria, dermatitis atópica o asma, son reflejo de una y exacerbada e inadecuada respuesta inmune local y/o sistémica, y en las que pudiera existir un nicho terapéutico para el uso de probióticos, dado el efecto inmunomodulador. Se han empleado diferentes cepas, fundamentalmente de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium*, aunque por el momento es necesaria más evidencia para recomendar su empleo sistemático(85). Como conclusión es interesante resaltar el papel del sistema inmune de las mucosas como órgano inmune implicado tanto en respuestas inmunológicas de rechazo frente a agresiones externas como en la tolerancia a elementos de la dieta o la propia flora. En el desarrollo de este tejido inmune que tapiza el tubo digestivo es fundamental el papel de primado que ejerce la microbiota intestinal, sin cuya estimulación, los órganos inmuno-competentes permanecerían atróficos tanto a nivel local como sistémico. Emerge un lugar de aplicación potencial (y en algunos casos ya real) de los probióticos como moduladores del sistema inmune ayudando tanto a la prevención como al tratamiento de distintas enfermedades infecciosas y alérgicas.

### 3. Colitis ulcerosa y microbiota intestinal

Como se ha descrito anteriormente, la EII y en concreto la colitis ulcerosa, es una entidad de etiología compleja donde los factores ambientales, genéticos y relacionados con la microflora intestinal desencadenan y perpetúan una inflamación crónica del tracto gastrointestinal. En el apartado de epidemiología de la colitis ulcerosa previamente se ha descrito un aumento en la incidencia y prevalencia globales a lo largo de las últimas décadas de las enfermedades inflamatorias intestinales, si bien, dicho aumento es más patente en países desarrollados. Este dato se relaciona como se ha explicado también previamente con los estilos de vida adoptados en los países occidentales. La hipótesis de que la forma de vida adoptada en los países desarrollados podría alterar los mecanismos de colonización microbiológica del intestino humano cobra cada vez más peso en la visión integrada del desarrollo de la EII. Como ya sabemos, la interacción de la microbiota con el sistema inmune de las mucosas a nivel intestinal es fundamental para la inducción y homeostasis de la inmunidad. Se postula que, en la EII las

lesiones de la mucosa se generan tras una excesiva respuesta inmunitaria contra la microbiota que coloniza el intestino, aunque se sospecha que una alteración en la colonización microbiana intestinal primaria podría desencadenar, o al menos contribuir, a dicha respuesta inmune sobredimensionada, en individuos genéticamente predispuestos. La base racional que integra a la microbiota intestinal como factor etiopatogénico de la EII reside en diversas observaciones clínicas, algunas de ellas se recogen en la tabla 2 extraída de la revisión de Sartor(86), aunque las más reveladoras se desprenden de los siguientes hechos: la diversión del tránsito fecal a través del colon en pacientes con EC, induce la remisión y curación de la mucosa, mientras que el restablecimiento del tránsito fecal reactiva de nuevo la enfermedad(87). Del mismo modo, en pacientes con CU el tratamiento a corto plazo con antibióticos de amplio espectro reduce la inflamación de la mucosa y la actividad microbiológica medidos respectivamente a través de la cuantificación de interleucinas en heces y el test de H2 con lactulosa(88), este hecho ha sido demostrado también clínicamente(89, 90). Si tenemos en cuenta los modelos animales de CU (los ratones manipulados genéticamente para tal efecto), apreciamos que el desarrollo de la CU sólo tendrá lugar en presencia de la flora intestinal habitual. Es decir, las bacterias intestinales han de existir para que la enfermedad tenga lugar. La microbiota fecal juega un papel necesario en la fisiopatología de la EII, y frente a ella tiene lugar una reacción inflamatoria exacerbada, como ponen de manifiesto algunos estudios en los que se cuantifica la cantidad de inmunoglobulinas en aspirado luminal o procedente de biopsias de intestino. Se aprecia un aumento de las mismas en comparación no sólo a individuos sanos sino frente a pacientes con patología isquémica intestinal, sugiriendo que en la EII existe una pérdida de tolerancia frente a determinados patógenos (91, 92). En otro interesante estudio se extrajeron linfocitos T de individuos con EC procedentes de sangre periférica, intestino inflamado e intestino no inflamado; tras el cultivo de los mismos con antígenos bacterianos no patógenos, se pudo apreciar cómo los linfocitos T procedentes de mucosa inflamada eran hiperreactivos mientras que los linfocitos de sangre periférica y de mucosa normal tenían abolida estas respuesta(93). De lo anteriormente expuesto, podríamos asumir que en la EII existe un factor luminal, presumiblemente la microbiota intestinal, frente a la que se desarrolla una una respuesta inflamatoria inmuno-mediada intestinal exacerbada.

**Tabla 2.** Evidencia clínica que relaciona la microbiota entérica con la patogénesis de la EII.

Adaptado de Sartor 2008.

<b>Evidencia clínica que relaciona la microbiota entérica con la patogénesis de la EII</b>
La enfermedad de Crohn, la colitis ulcerosa y la reservoritis, se localizan en segmentos de intestino con alta concentración de bacterias
Colonización microbiana anormal en Enfermedad de Crohn, Colitis ulcerosa y reservoritis
Aumento de la virulencia de E coli en la enfermedad de Crohn
Alteración de la actividad metabólica de la microbiota en la enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y pouchitis
Aumento de las bacterias asociadas a las mucosas en los pacientes con EII
Aumento de la invasión y translocación de la mucosa en la enfermedad de Crohn activa y colitis ulcerosa
Polimorfismos de genes que codifican para receptores bacterianos en la enfermedad de Crohn
La desviación de la corriente fecal previene y trata la enfermedad de Crohn y pouchitis; La inflamación se repite tras la restauración del flujo fecal
Respuestas serológicas y de células T a antígenos microbianos entéricos en pacientes con enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y pouchitis
Los antibióticos tratan la pouchitis y la colitis de Crohn / ileocolitis
Los probióticos previenen la recaída de la pouchitis y la colitis ulcerosa

Habida cuenta de la existencia del factor microbiológico en la patogénesis de la EII, y en concreto de la CU, y gracias al desarrollo de nuevas técnicas de secuenciación, se ha podido describir la composición de la microbiota en estos individuos. De forma global los cambios descritos en pacientes con CU se clasifican en reducción de la diversidad, menor estabilidad a lo largo del tiempo, y mayor o menor expresión de ciertas especies.

Existe una variedad de estudios que pone de manifiesto el papel de la composición de la microbiota en la patogénesis de la EII: son los estudios llevados a cabo entre gemelos, ya que son los idóneos para discriminar entre la contribución de la impronta o deriva genética y los factores ambientales relacionados con la composición de la microbiota. En un estudio llevado a cabo entre gemelos discordantes para colitis ulcerosa, en la que se analizaba el ADN bacteriano de biopsias de procedentes de sigma se pudieron objetivar una menor diversidad bacteriana, así como una baja representación de Bacteroidetes a nivel de filo, con mayor abundancia relativa de Actinobacteria y Proteobacteria en los gemelos que

padecían colitis ulcerosa respecto a los gemelos sanos. Curiosamente, en los gemelos no afectados se apreciaba menor diversidad bacteriana que en los controles sanos, hecho que habla a favor de la heredabilidad en la composición de la microbiota (94). Sin embargo, otro estudio semejante llevado a cabo en 40 parejas de gemelos, entre los que al menos uno de ellos padecía EII y analizándose muestras fecales, no se reportaron diferencias entre el hermano con colitis ulcerosa en remisión y el hermano sano(95). Cabe destacar que la gran mayoría de los pacientes incluidos se encontraban en remisión, situación que se la relacionado con el restablecimiento de la composición de la microbiota(86). En estudios en pacientes con colitis ulcerosa en remisión en población no gemelar, se ha descrito también un descenso del filo Firmicutes(96), descrito ampliamente como el más abundante en población sana.

En otro estudio de Frank et al. (97) se detectó un descenso global del filo Firmicutes y Bacteroidetes con incremento de Proteobacteria and Actinobacteria. Otro dato interesante es que se piensa que el descenso de Firmicutes depende de la inestabilidad de las taxas dominantes a lo largo del tiempo(98). Una vez descritos de forma global estos cambios, se plantean dudas cómo hasta qué punto el tratamiento de la EII puede justificar cambios en la microbiota intestinal. En este sentido no existen estudios en pacientes con colitis ulcerosa, pero sí encontramos un estudio en EC que arroja luz sobre esta cuestión. Se tomaron muestras de más de 400 niños recién diagnosticados de EC. Las muestras procedían de biopsias de diferentes localizaciones, y fecales. Este estudio reveló utilizando múltiples covariables clínicas en un modelo de regresión múltiple, que el fenotipo de la enfermedad, se asociaba a marcados cambios en la diversidad de especies, siendo todos estos cambios anteriores a cualquier intervención terapéutica. Además, de este estudio se desprende también que la disbiosis obtenida de muestras de biopsias refleja cambios que no se correlacionan con los datos procedentes de muestras fecales, siendo por tanto las muestras de biopsias más representativas que las fecales a la hora de describir la composición microbiana (99). Otra duda importante es si la disbiosis descrita tiene lugar de forma semejante en periodos de actividad o remisión de la enfermedad. Para solventar esta duda se diseñó un estudio en el que se incluyeron pacientes con EC y CU y remisión que presentaban exacerbaciones a lo largo del tiempo. Mediante técnica del gen 16S se compararon las muestras, revelando diferencias no significativas entre periodos de remisión y

actividad. Sin embargo, se asoció el uso de tiopurínicos con menor diversidad (OTUs observadas) de forma significativa(100). Impresiona que este hecho se relaciona más que con el uso de tiopurínico, con la tendencia a hacer brotes repetidos a lo largo del tiempo.

Otro importante concepto a destacar es el hecho de que la disbiosis en pacientes con EII no es evidenciable únicamente a nivel de filo, sino también a nivel de especies poco abundantes, y a las que son atribuibles muchas más funciones de las que inicialmente se pensaba. Por ello, si nos acercamos a cepas bacterianas concretas, encontramos algunas, con características antiinflamatorias que están disminuídas, y otras, consideradas patógenas, aumentadas, como es el caso de subespecies *Desulfovibrio*, sulfato-reductasa (95), cuya producción de sulfito de hidrógeno se ha relacionado con toxicidad sobre el epitelio colónico. En un reciente estudio con modelos murinos de colitis IL10 (-/-) se apreció cómo una dieta rica en grasas saturadas (derivados lácteos), sin grasas poliinsaturadas (aceite de oliva), genera cambios de composición de la microbiota consistentes en aumento de especies poco abundantes, como las bacterias reductoras de sulfato, entre las que se encuentran *Bilophila wadsworthia*. El aumento de estas bacterias reductoras de sulfato se asoció además a una respuesta Th-1 y aumento de la incidencia de colitis en ratones IL10 (-/-) pero no en ratones normales. Parece que estos efectos son mediados por la grasa derivada de los lácteos estimulando la conjugación de la taurina de los ácidos biliares y aumentando la disponibilidad de sulfuro orgánico, sustrato metabolizado por microorganismos sulfato reductores como la *Bilophila wadsworthia* dando lugar a sulfuro de hidrógeno, denominado ácido sulfhídrico, con capacidad citotóxica(101). Este estudio sugiere que las dietas de tipo occidental altas en ciertas grasas saturadas pueden aumentar la prevalencia de las enfermedades inmunes mediadas como la enfermedad inflamatoria intestinal en huéspedes genéticamente susceptibles(102). Existe otro estudio revelador en muchos aspectos, ya que recoge biopsias de pacientes con CU activa, EC activa y colitis isquémica. En las biopsias de los pacientes con colitis ulcerosa se encontró *Fusobacterium varium* de forma significativamente mayor que en los otros dos grupos, hallazgo que se correlacionó con la reacción en suero frente a *Fusobacterium varium* mediante *Western blot* (103). En un segundo estudio del mismo autor, se procedió a infundir a ratones *Fusobacterium varium* en enemas,



provocando inflamación en forma de colitis(104). Otro estudio de Sokol, encontró en ocho de nueve pacientes con colitis ulcerosa activa una mayor representación de *E.coli* (105).

En relación a las bacterias con características anti-inflamatorias, se ha apreciado una menor abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* (perteneciente al grupo del *Clostridium leptum*), tanto en pacientes afectos de colitis ulcerosa en remisión clínica(106) como en colitis ulcerosa activa y EC. En un interesante estudio que reclutó pacientes con colitis ulcerosa en remisión, familiares de primer grado y controles sanos, se cuantificó mediante PCR el recuento total de bacterias y de *F. prausnitzii*. Se identificó un descenso de *Fp* tanto en pacientes como en familiares *versus* controles. Además, se siguió a los pacientes en remisión a lo largo de un año y se observó cómo los niveles bajos de *Fp* se asociaban significativamente con periodos de remisión cortos, es decir, de menos de 1 año. Otra observación interesante es que los pacientes en remisión reciente al entrar en el estudio, si recuperaban *Fp* hasta los recuentos de los controles sanos, permanecían en remisión al menos 1 año, sin embargo, si no se alcanzaban los niveles de los controles sano, recaían (107). Otro estudio demostró el mismo hallazgo tanto en pacientes con colitis ulcerosa activa como Enfermedad de Crohn activa en comparación con voluntarios sanos(96).

En otro estudio de Sokol se encontró también descenso de *Akkermansia muciniphila* en pacientes con CU activa(96). Junto con las alteraciones cuantitativas descritas hasta ahora, se ha de mencionar que en la colitis ulcerosa existe un aumento en la densidad de bacterias que invaden el epitelio colónico, en pacientes con colitis ulcerosa activa(109). Para concluir resumimos que los hallazgos reportados hasta el momento, ponen de manifiesto: un descenso en la diversidad global, una inestabilidad a lo largo del tiempo, un descenso global del phyla Firmicutes y Bacteroidetes con incremento de Proteobacteria y Actinobacteria, y por último un descenso de bacterias con propiedades antiinflamatorias, como aumento de determinadas especies como *Akkermansia muciniphila* y *Faecalibacterium prausnitzii*.

## II. Justificación, hipótesis y objetivos

La colitis ulcerosa es una entidad de etiología compleja donde los factores ambientales, genéticos y relacionados con la microflora intestinal desencadenan y perpetúan una inflamación crónica del tracto gastrointestinal. Se han evidenciado cambios en la composición de la microbiota fecal en pacientes con CU en actividad frente a sanos, pero no está claro si los cambios disbióticos son secundarios a la enfermedad o por el contrario pueden jugar cierto papel en la fisiopatología de la inflamación intestinal. La literatura es controvertida con respecto a si estos cambios se mantienen en periodos de remisión de la enfermedad. Si los cambios disbióticos desaparecen durante los periodos de remisión y la estabilidad de la microbiota se restituye completamente, será poco probable que la disbiosis juegue un papel primario en la fisiopatología de las lesiones. La pérdida de diversidad en la microbiota intestinal se ha demostrado no sólo en pacientes con colitis ulcerosa activa, sino también en pacientes con diarreas agudas autolimitadas. La aceleración del tránsito colónico tiene un efecto de lavado que por sí mismo compromete la diversidad y riqueza del ecosistema intestinal. A lo largo de los últimos años se han implementado nuevas técnicas de metagenómica, a través de las cuales se secuencian íntegramente el material genético bacteriano de una muestra biológica. La primera parte de esta tesis estudia una población de sujetos incluidos en el estudio METAHIT, compuesto por pacientes con colitis ulcerosa en remisión con alta tasa de brotes, baja tasa de brotes, familiares emparentados y voluntarios sanos.

### **Hipótesis:**

- En la colitis ulcerosa hay una disbiosis intestinal permanente que puede demostrarse durante los periodos de remisión.
- La disbiosis de la colitis ulcerosa no es puramente efecto secundario de la diarrea (efecto de lavado por aceleración del tránsito intestinal).

Para investigar estas hipótesis de trabajo nos hemos planteado los siguientes

### **objetivos:**

- Comparar la composición de la microbiota fecal de pacientes con CU en remisión con la de personas sanas empleando técnicas de secuenciación de alto rendimiento.
- Analizar si la preparación de limpieza colónica con PEG produce cambios permanentes en la composición de la microbiota intestinal de individuos sanos y pacientes con colitis ulcerosa en remisión mediante la aplicación de técnicas de secuenciación del gen 16S rRNA.

### **III. Estudio I: Estudio de la microbiota fecal en pacientes con colitis ulcerosa en remisión en comparación con sanos. Análisis estudio METAHIT.**

#### Introducción

Como se ha establecido previamente, la microbiota fecal juega un papel necesario en la fisiopatología de la EII. Los cambios en la composición de la microbiota intestinal descritos hasta ahora son reproducibles, si bien la recuperación de la diversidad microbiana en periodos de remisión, no está establecida, existiendo en este sentido, datos contradictorios. La parte I de esta Tesis tiene como hipótesis el hecho de que en la colitis ulcerosa hay una disbiosis intestinal permanente que puede demostrarse durante los periodos de remisión

Objetivos:

- Primario: Comparar la composición de la microbiota fecal de pacientes con CU en remisión con la de personas sanas empleando técnicas de secuenciación de alto rendimiento.
- Secundarios:
  - Comparación de la microbiota fecal entre los dos fenotipos de pacientes afectados de CU en remisión, brotadores y no brotadores.
  - Análisis y comparación de funciones de los productos proteicos para los que codifican los genes bacterianos.

#### Material y métodos

##### Diseño del estudio

El proyecto METAHIT tuvo como objetivo principal la secuenciación de genes y genomas completos de los micro-organismos que colonizan el intestino humano en una muestra de más de 700 individuos europeos, con la finalidad de identificar las funciones de la microbiota intestinal humana y su posible repercusión en los trastornos metabólicos (obesidad, diabetes tipo 2) y en la enfermedad inflamatoria intestinal (EC y CU). La primera parte de esta Tesis se ha dedicado al análisis de los datos obtenidos en dos cohortes de pacientes afectados de colitis ulcerosa de la Unidad d'Atenció Crohn-colitis del Servicio de Digestivo del Hospital Universitari

Vall d'Hebron, que participaron en el proyecto Europeo MetaHIT (2008-2013). El diseño del estudio, reclutamiento y seguimiento de los pacientes se hizo con la colaboración de los Dres. Francisco Guarner, Francesc Casellas y Natalia Borrue. El monitor de los estudios clínicos para el seguimiento de pacientes y obtención de datos y muestras Sr. Antonio Torrejón. El procesamiento de las muestras fecales para su secuenciación genómica, los estudios de qPCR y los análisis de calprotectina fueron realizados por las Dras. Chaysavanh Manichanh y Encarna Varela en el laboratorio de Digestivo del VHIR. La secuenciación de las muestras se encargó al Beijing Genomics Institute de Shenzhen (China), y fue llevada a cabo por el equipo del profesor Wang Jun utilizando equipos y tecnología de Illumina. El análisis bio-informático de las secuencias para el ensamblaje de genes se realizó en la Unidad de Bioinformática del EMBL en Heidelberg (Alemania) por los Dres. Peer Bork y Mani Arumugam. El análisis taxonómico y funcional de la base de datos de genes se realizó en su mayor parte por los Dres. Jeroen Raes y Falk Hildebrand en VIB (Vlaams Instituut voor Biotechnologie) de la Vrije Universiteit de Bruselas (Bélgica). Todos estos grupos formaron parte del consorcio del proyecto MetaHIT. Los datos y secuencias de estos pacientes se han utilizado en diversas publicaciones previas del consorcio sobre el catálogo de genes en el metagenoma intestinal(14), los enterotipos(23), y las especies metagenómicas(16).

El trabajo de investigación en esta parte de la Tesis ha consistido en el análisis estadístico de los datos clínicos y metagenómicos de las cohortes de pacientes y controles reclutados en el Hospital Vall d'Hebron, y la generación del estudio descriptivo del metagenoma intestinal en colitis ulcerosa. Se trata de un estudio original pendiente de publicación.

Los estudios en colitis ulcerosa que hemos analizado en esta parte de la Tesis se describen en la figura 10. Para su realización se reclutaron los 4 grupos que se detallan a continuación:

- Pacientes afectos de colitis ulcerosa en remisión con alta tasa de brotes (grupo UCb), muestra de 30 pacientes.
- Pacientes de colitis ulcerosa en remisión con baja tasa de brotes (grupo UCn), muestra de 42 pacientes.
- Familiares sanos del primer grupo (grupo HR), muestra de 28 individuos.
- Controles sanos no emparentados (grupo H), muestra de 11 sujetos.

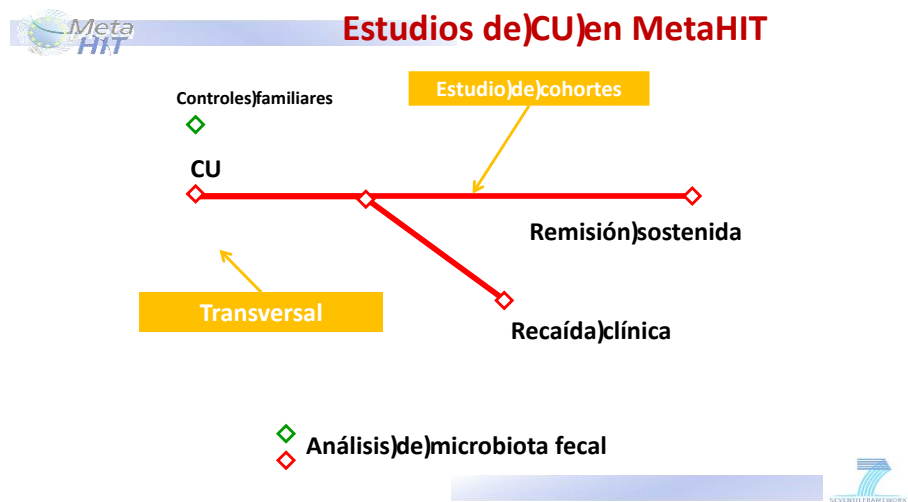
Los pacientes afectos de CU debían llevar en remisión al menos 6 meses como criterio de inclusión en el estudio.

Se definió el perfil de alta tasa de brotes previos (UCb) con el criterio de haber presentado al menos tres brotes de actividad en los últimos 5 años, y el perfil de baja tasa de brotes (UCn) con la ausencia de dicho criterio.

Se procedió a recoger muestras fecales basales de pacientes y controles para el estudio transversal. Además, los grupos afectos de CU eran seguidos a lo largo de un año o bien hasta presentar un brote, con visitas regulares cada tres meses para obtención de datos clínicos y muestras (estudio de cohortes).

En este trabajo se analizará solamente el estudio transversal entre los grupos afectos de CU, familiares sanos e individuos no emparentados, empleando un abordaje metagenómico así como técnicas de secuenciación de alto rendimiento.

**Figura 10.** Diseño del estudio METAHIT.



Para realizar la extracción del DNA se han de llevar a cabo una serie de reacciones encaminadas a provocar una lisis mecánica y química de las células, eliminación mediante precipitación de proteínas y otros residuos. A continuación, se procede a la precipitación de los ácidos nucleicos, resuspensión e incubación en hielo, eliminando el RNA y obteniendo DNA, que es purificado tras varios lavados con etanol y mezclado con una solución buffer(87).

El proceso físico-químico para su obtención se detalla a continuación: las alícuotas de material fecal (250 mg) preparadas en bolitas de zirconio-sílice y son dispersadas en una solución de 250ul de Guanidina Tiocianato, 40 µl de N- Lauril sarcosina al 10%, 500 µl de N-Lauril sarcosina al 5% y 0.1 M Tris HCl, todo ello en incubación a 70°. Al final de esta incubación, se procede a homogenizar la muestra mediante *Bead Beater* (Biospec Products©). Añadimos 0.015 g de PVPP (polivinilpolipirrolidona) en la muestra, de forma que en varios pasos se provoca la precipitación de proteínas y detritus celulares. Tras la digestión enzimática del RNA remanente, se obtiene el DNA, que es purificado con etanol y resuspendido con 200µl de buffer Tris-EDTA (ácido etilendiamintetracético). A continuación, se confirma que el DNA no se ha degradado: se procede a cuantificación de 1 mg de DNA mediante el empleo de un NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Nucliber©) y se confirma su integridad mediante electroforesis utilizando Agilent 2100 Bioanalyzer -Agilent Technologies©.

Las funciones de cada reactivo se presentan en la tabla 3.

**Tabla 3.** Función de los reactivos empleados en la extracción del DNA

<b>Reactivo</b>	<b>Características químicas</b>	<b>Función</b>
<b>Guanidina Tiocianato</b>	Agente caotrópico	Función desnaturalizante
<b>Lauril sarcosina</b>	Detergente aniónico	Inhibe hexoquinasas. Solubiliza proteínas y membranas
<b>Tris (hidroximetil amino metano)</b>	Tampón biológico	Estabiliza el pH de la solución (entre 7,0 y 8,0)
<b>PVPP (Polivinilpolipirrolidona)</b>	Polifenol	Absorción selectiva de polifenoles oxidables y polimerizables generando estabilidad
<b>EDTA (ácido etilendiamintetracético)</b>	Agente quelante	Atrapa los iones magnesio presentes en el medio para evitar la acción de enzimas que degradan al ADN

Posteriormente se procedió a la construcción y secuenciación de la biblioteca de ADN mediante la fragmentación y secuenciación íntegra del DNA bacteriano procedente de las muestras fecales mediante el método Illumina

siguiendo el flujo de trabajo estandarizado en el proyecto METAHIT (14). Se aislaron células microbianas(bacterias), se lisaron las células para aislamiento del DNA para su posterior fragmentación en una longitud objetivo y se secuenciaron los genes resultantes.

A continuación, se realizó el ensamblaje de novo de los fragmentos de ADN secuenciados por Illumina, la predicción de genes y construcción del conjunto de genes no redundantes, asignación taxonómica y análisis bioinformático.

En el análisis funcional se determinaron:

- Grupos COG (Clusters of Orthologous Groups): son clusters de proteínas generadas por comparación de secuencias de proteínas de genomas completos. Cada cluster contiene proteínas o grupos de parálogos de al menos tres linajes. La base de datos COG contienen tanto clusters procariontes (COGs) como eucariontes (KOGs), que serán utilizadas por nosotros.
- Riqueza de KO's (KEGG Orthology system): los genes de proteínas anotados por COG se clasificaron en 39 categorías funcionales, y los genes que fueron anotados por KEGG fueron asignados a los módulos KEGG.

El análisis estadístico de los datos se realizó en QIIME y en R. Para trabajar con datos normalizados, se analizó un número igual de secuencias para todos los grupos. La prueba de Shapiro-Wilk se utilizó para comprobar la normalidad de la distribución de datos. Los datos paramétricos con distribución normal se compararon mediante la prueba t de Student para datos pareados o no emparejados. Ante datos no paramétricos, la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon fue utilizada para datos pareados y la prueba U de Mann-Whitney para datos no pareados. La prueba de varianza de Kruskal-Wallis se utilizó para comparar el número medio de secuencias de los grupos, es decir, el de diferentes grupos de pacientes basados en parámetros distintos con el de sanos, a distintos niveles taxonómicos. El test de Friedman se utilizó para medidas repetidas y pareadas de análisis de varianza. Se utilizó el análisis mixto de varianza (ANOVA), un diseño mixto ANOVA, para tener en cuenta que las mediciones repetidas se



recogen en un estudio longitudinal en el que se evalúa el cambio a lo largo del tiempo. Realizamos análisis con la técnica no paramétrica ANOVA multivariado (NPMANOVA), un análisis de varianza no paramétrico, para probar las diferencias en la composición de la comunidad microbiana. Aplicamos la regresión lineal del análisis multivariante para encontrar asociaciones entre metadatos clínicos (edad, índice de masa corporal (IMC), sexo, hábito de fumar, consumo de medicamentos y localización de la enfermedad) y la abundancia de la comunidad microbiana. Cuando fue posible, el análisis proporcionó el *false discovery rate* (FDR) y expresado en el texto como q, para evitar el error tipo I en las comparaciones múltiples (FDR <0,05 es considerado significativo).

## Resultados

### Características basales

A continuación, se detallan las características demográficas basales de los diferentes grupos. Se comparan además los grupos de CU con perfil brotador y no brotados (grupos UCb y UCn) en tabla 4, y los grupos de sanos emparentados y sanos no emparentados (grupos H y HR) en tabla 5. Se recogen las variables edad, sexo, hábito tabáquico, índice de masa corporal, edad de debut de la enfermedad, extensión de la misma, tratamiento, manifestaciones extraintestinales, tiempo de evolución de la enfermedad, calprotectina fecal para los pacientes con colitis ulcerosa, encontrando diferencias únicamente para la variable edad. Se recogieron las variables edad, sexo, hábito tabáquico, índice de masa corporal y parentesco para el grupo de sanos emparentados (HR) y edad, sexo, hábito tabáquico, índice de masa corporal para el grupo de sanos (H).

**Tabla 4.** Características demográficas y relacionadas con la enfermedad de los grupos UCb y UCn.

Características	Grupo colitis brotadores (UCb) N=30	Grupo colitis no brotadores (UCn) N=42	p
Edad, años	39±11	44±9.9	< 0.05
Sexo varón	9 (32%)	17 (43%)	ns
Hábito tabáquico	7 (25%)	8 (20%)	ns
Índice de masa corporal, Kg/m <sup>2</sup>	23±4.2	25.2±0.6	ns
Edad de debut de la colitis, años	30±11	33.55±10.1	ns

<b>Extensión de la colitis ulcerosa</b>			
Proctitis	8 (28%)	19 (48%)	ns
Colitis izquierda	7 (25%)	10 (25%)	
Pancolitis	13 (46%)	11 (28%)	
<b>No tratamiento</b>	2 (7%)	4(10%)	
<b>Tratamiento</b>			ns
5-ASA	19 (67%)	25(64%)	
Tiopurínicos	7 (25%)	10(26%)	
<b>Manifestaciones extra-intestinales</b>	5 (17%)	9 (23%)	ns
<b>Tiempo de evolución de la colitis (meses)</b>	107±71	134±87	ns
<b>Calprotectina, mg/dL</b>	214±326	179±360	ns

**Tabla 5.** Características demográficas de los grupos HR y H.

Características	Familiares sanos (HR)	Sanos no emparentados (H)	p
	N=28	N=11	
<b>Edad, años</b>	38.5±14.1	30±8.3	ns
<b>Sexo varón</b>	14 (45%)	7 (58%)	ns
<b>Hábito tabáquico</b>	8 (25%)	4 (33%)	ns
<b>Índice de masa corporal, kg/m<sup>2</sup></b>	24.3±3.8	23±3.3	ns
<b>Parentesco</b>			
Hermanos	16 (51%)		
Hijos	6 (19%)	-	-
Gemelos no idénticos	2 (6%)		
Progenitor	7 (22%)		

Variables cuantitativas expresadas como media±desviación estándar y cualitativas como número y porcentaje

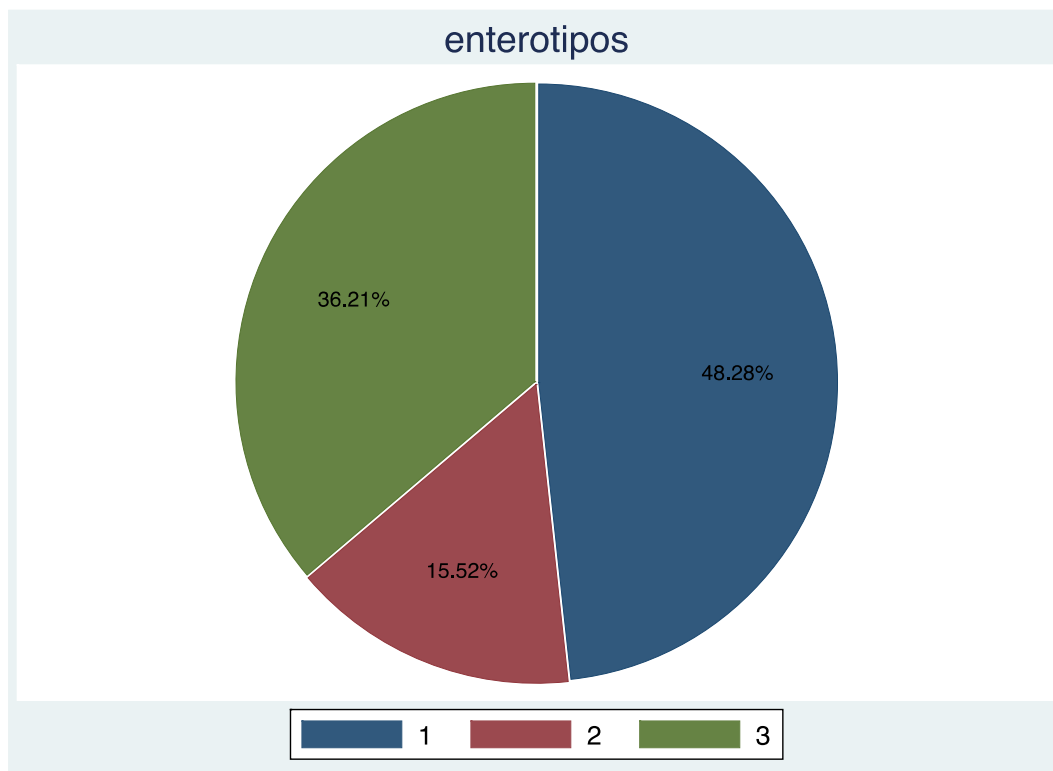
Al comparar las características demográficas básicas entre grupo de CU brotadores (UCb) y no brotadores (UCn) no se encontraron diferencias salvo en la edad media, que sería discretamente menor en el grupo UCn (39 vs 44).

Al comparar las características basales entre los grupos de sanos emparentados y no emparentados no se encontraron diferencias

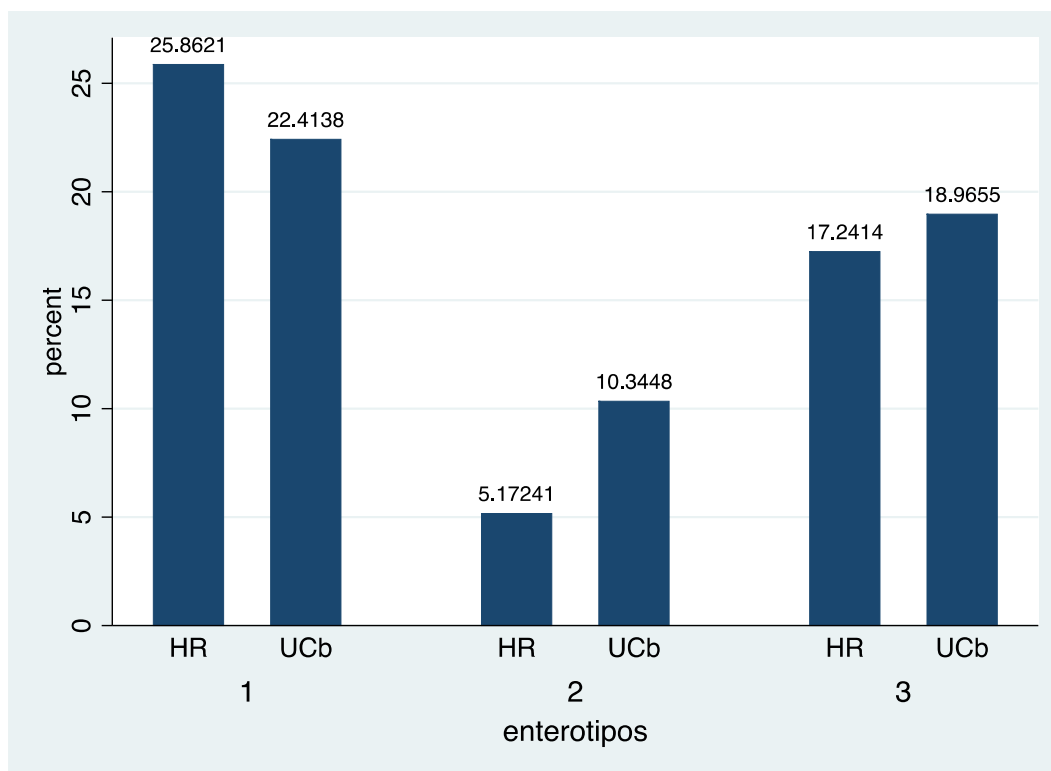
### Distribución de enterotipos

Disponemos de la distribución de enterotipos únicamente para los grupos de pacientes con colitis ulcerosa con alta tasa de brotes (UCb) y de sus familiares sanos (HR). De forma global, la distribución de enterotipos es similar entre ambos grupos, siendo el más frecuente el enterotipo 1 (predominancia del género Bacteroides), seguidos de los enterotipos 3 y 2 (predominancias de los géneros Ruminococo y Prevotella respectivamente). La frecuencia de los enterotipos es similar a la de la población europea descrita en el artículo de Arumugan(23).

**Figura 11.** Distribución global de enterotipos.



**Figura 12.** Distribución de enterotipos en los grupos UCb y HR. UCb: grupo de pacientes con CU y alta tasa de brotes. HR: sanos emparentados con el grupo anterior.



### Análisis metagenómico.

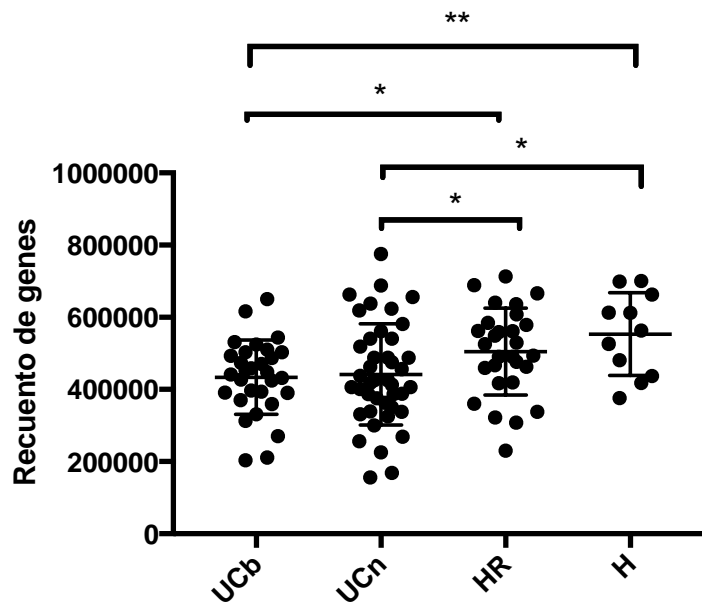
- Riqueza genética:

Se define la riqueza genética como el número de genes distintos o no-redundantes que se detectan en un ecosistema. El nivel de abundancia de cada gen se mide por el número de lecturas que se corresponden con ese mismo gen. Por tanto, el conteo de genes microbianos distintos hace referencia únicamente a la riqueza genética del ecosistema pero no informa sobre su diversidad, ya que no aporta información sobre la abundancia relativa de cada gen. A continuación, se detalla la media del número de genes no redundantes por grupo.

**Tabla 6.** Riqueza genética en términos de recuento de genes para los distintos grupos de estudio.

Grupo	Recuento de genes no redundante
<b>Grupo UCb</b>	444480±102844
<b>Grupo UCn</b>	421375±140133
<b>Grupo HR</b>	509354±120342
<b>Grupo H</b>	562500±114447

El grupo con mayor recuento de genes (mediana) corresponde al grupo H (sanos) seguido HR (sanos emparentados), posteriormente UCb (CU con perfil brotador) y UCn (CU con perfil no brotador). Se encontraron diferencias significativas de forma global ( $H=11.54$ ,  $p < 0,0091$ ). Al comparar los distintos grupos, no se encontraron diferencias entre pacientes con CU con perfil brotador vs no brotador, tampoco entre los grupos de familiares sanos con controles sanos. Se encontraron diferencias entre el grupo de CU brotadores con sus familiares sanos, así como con los controles sanos. De la misma manera se encontraron diferencias significativas entre los pacientes con CU y perfil no brotador con familiares sanos y controles sanos (fig. 13).



**Figura 13.** Gráfico de riqueza genética por grupos (mediana y DE). Kruskal Wallis  $H=11.54$ ,  $p < 0,0091$ . (\*)  $Z=3.274$ ,  $p=0.047$  para UCb vs HR,  $Z=3.274$ ,  $p=0.0094$  para UCb vs H,  $Z, p=0.0325$  para UCn vs HR, según el test U de Mann Whitney, (\*\*)  $Z=3.274$ ,  $p= 0,0094$  según el test U de Mann-Whitney. UCb: pacientes con CU y perfil brotador. UCn: pacientes con CU y perfil no brotador. HR: familiares sanos. H: voluntarios sanos.

Si agrupamos a todos lo pacientes con CU y a todos los sujetos sanos, se mantienen las diferencias significativas entre grupos (fig. 14).

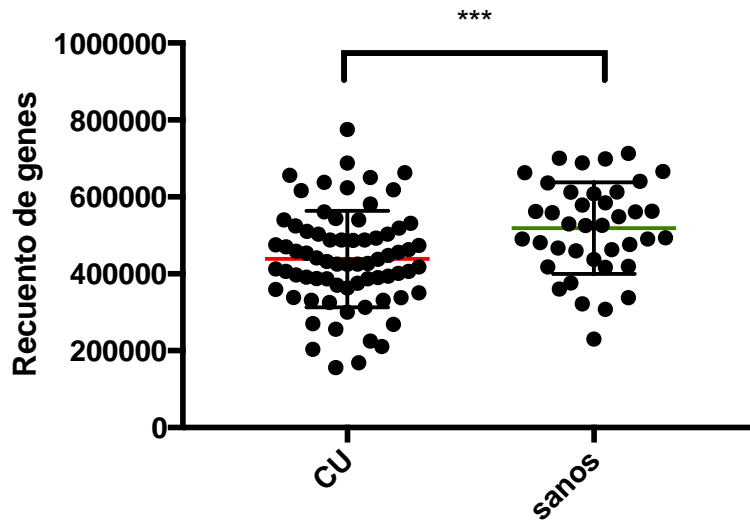
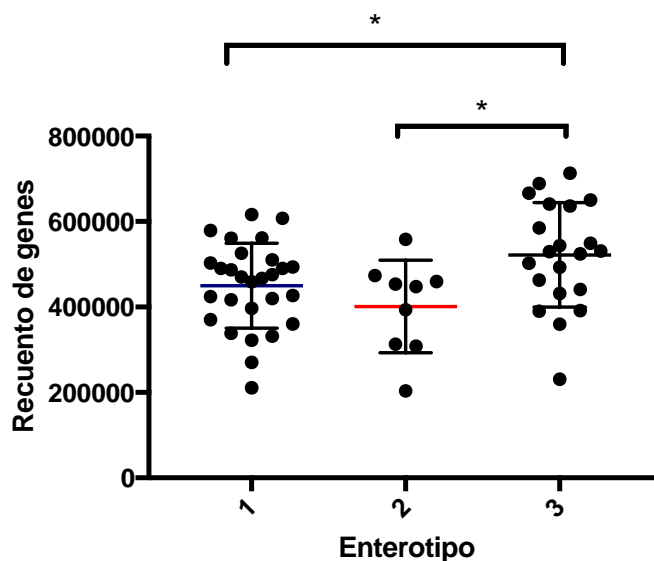


Figura 14. Riqueza genética entre el global de pacientes con CU y el global de sanos (mediana y DE). (\*\*\*)  $Z = -3.274$ ,  $p = 0.0009$  según el test U de Mann-Whitney.

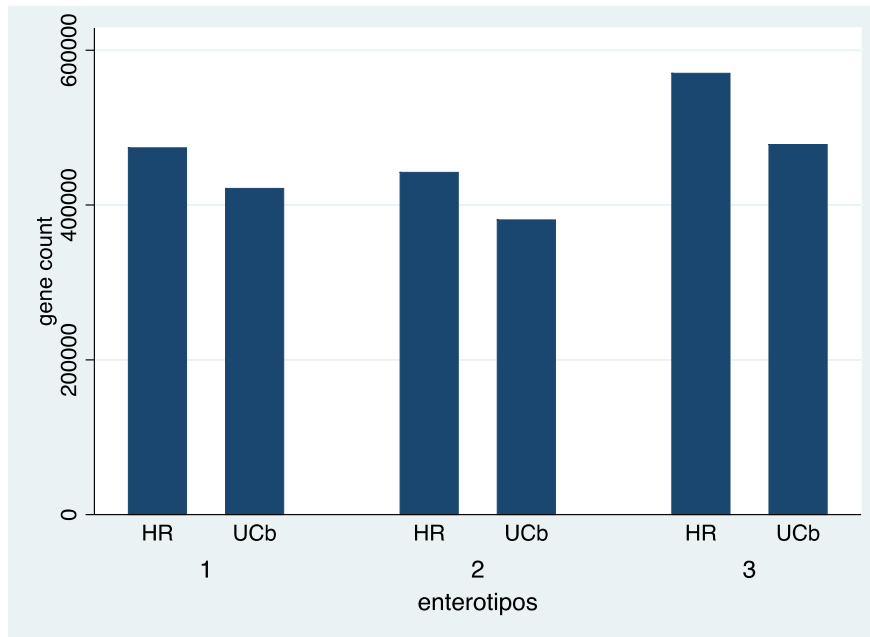
Si analizamos la riqueza genética entre enterotipos, recordando que únicamente disponemos del perfil de enterotipos para los grupos de pacientes con colitis ulcerosa y alta tasa de brotes (UCb) y de sanos emparentados con el anterior grupo (HR). El enterotipo 3 muestra el mayor número de genes no redundantes con una mediana 529762, seguido de los enterotipos 1 y 2 con medianas de 468617 y de 447988 respectivamente. Se encontraron diferencias significativas entre los enterotipos 1 y 2 con el enterotipo 3.

Figura 15. Riqueza genética entre enterotipos.



La distribución al estratificar entre grupos fenotípicos no varió, si bien se ha de destacar el bajo tamaño muestra en el subgrupo H.

**Figura 16.** Riqueza genética entre enterotipos, estratificando por fenotipos.



### Taxonomía bacteriana

El análisis filogenético de los datos obtenidos por metagenómica se analizará en dos grupos: en primer lugar, una comparación entre el grupo de pacientes con colitis ulcerosa con perfil brotador (UCb) y sus familiares sanos (HR). En segundo lugar, se comparan el total de los pacientes afectados de colitis ulcerosa (UC) y el total de los sanos (TH).

### **Comparación entre pacientes con colitis ulcerosa con perfil brotador y sus familiares sanos.**

Es interesante resaltar el hecho de que hasta el 48,1% de los genes encontrados pertenecen a taxonomías desconocidas (figura 17). El dominio más abundante pertenece a las Bacterias, con un 51,5% de los genes encontrados. Se identifican también organismos del dominio de Archaea (0,407% de las

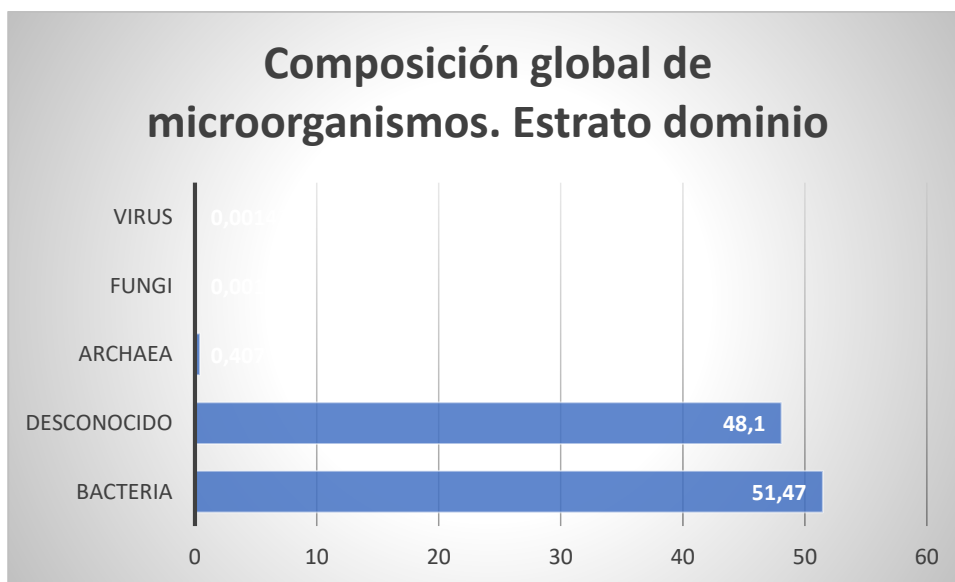
secuencias), con mayor predominio en HR sobre UCb sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas (tabla 6).

Se identifica además DNA de organismos eucariotas, entre ellos, los hongos con un muy bajo porcentaje sobre el total de secuencias (0,00187%). En nuestro análisis se identifica el hongo Microsporidia en un 1 por mil de las secuencias, y en un muy bajo porcentaje, 1 por 10000 de las secuencias, Ascomycota, y sin identificar diferencias entre ambos grupos.

Cabe destacar la identificación de secuencias eucariotas pertenecientes al reino Plantae en concreto a la división Streptophyta y división Chlorophyta. Consideramos estas secuencias génicas pertenecientes a la dieta, a pesar de que el análisis se corrige para secuencias humanas, así como para alimentos habituales.

Los virus son sistemas biológicos totalmente dependientes que muchos científicos prefieren considerar como no vivos, por lo que se clasifican aparte. Para ellos, se ha propuesto el dominio informal Acytota (acelular). El 0,00143% (1 de cada 10000 secuencias) de los genes encontrados pertenecen a virus.

**Figura 17.** Clasificación filogenética global grupos UCb y HR. Las unidades se expresan en %.



**Tabla 6.** Composición global de microorganismos grupos UCb y HR. Estratos de dominio y reino.

Organismo	% total	Valor p	Valor q
Dominio Bacteria	51,470	ns	ns
Organismos desconocidos	48.1	ns	ns
Dominio Archaea;	0,407	ns	ns



(Reino Euryarchaeota)			
Dominio Eukaryota; (Reino Fungi)	0,001876	ns	ns
Virus	0,00143	ns	ns

Si nos restringimos al dominio Bacteria los filos más abundantes son Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria con un 27, 21, 1 y 0.5% de las secuencias respectivamente, y sin encontrar diferencias significativas entre los grupos UCb y HR (tabla 7). Tras los anteriores, encontramos los filos Verrucomicrobia (al que pertenece la especie *Akkermansia muciniphila*), con un 0.2% de las secuencias y demostrando diferencias significativas entre los grupos comparados con un predominio en los HR sobre el grupo UC. El filo Tenericutes, muy poco abundante, con 2 por 10.000 de las secuencias, es predominante en el grupo UCb de forma significativa. Cabe destacar el filo Chlorobi (1 de cada 100.000 secuencias) es predominante en los HR con diferencias cercanas a la significación estadística.

**Tabla 7.** Composición filogenética bacteriana (estrato filo) grupos UCb y HR.

Filo	% Total	Valor p	Valor q	Dirección
<b>Firmicutes</b>	21,84	ns	ns	
<b>Bacteroidetes</b>	27,43	ns	ns	
<b>Actinobacteria</b>	1,37	ns	ns	
<b>Proteobacteria</b>	0,524615827	ns	ns	
<b>Verrucomicrobia</b>	0,252622128	0,000431046	0,00495703	HR
<b>Fusobacteria</b>	0,028117189	ns	ns	
<b>Lentisphaerae</b>	0,002548075	ns	ns	
<b>Tenericutes</b>	0,000233417	0,00018625	0,004283758	UCb
<b>Synergistetes</b>	9,31E-05	ns	ns	
<b>Spirochaetes</b>	9,26E-05	ns	ns	
<b>Acidobacteria</b>	4,26E-05	ns	ns	
<b>Chlorobi</b>	3,59E-05	0,008679649	0,066543977	HR
<b>Cyanobacteria</b>	3,45E-06	ns	ns	

Si profundizamos en un estrato mayor, a nivel de género, distinguimos 4 de ellos con diferencias significativas entre los grupos: Ureaplasma y Lactobacillus,

con predominio en UCb, Akkermansia y Edwardsiella con predominio en HR. Además, Lactobacillus y Clostridiales no clasificables (más abundante en UCb) rozan la significación estadística.

**Tabla 8.** Composición filogenética bacteriana (estrato genero) con diferencias significativas.

Filo Clase Orden Familia Genero	% total	Valor p	Valor q	dirección
<b>Tenericutes; Mollicutes; Mycoplasmatales; Mycoplasmataceae; Ureaplasma</b>	21,84	0,00018625	0,02905505	UCb
<b>Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Verrucomicrobiaceae; Akkermansia</b>	27,43	0,000403959	0,03150879	HR
<b>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Edwardsiella</b>	1,37	0,000753924	0,03920403	HR
<b>Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus</b>	0,07	0,003765408	0,003765408	UCb
<b>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Género desconocido</b>	0,928038677	0,00418196	0,130477147	UCb

Por último, a nivel de especie, describimos diferencias entre los grupos para las siguientes especies: *Ureaplasma urealyticum* y *Lactobacillus amylovorus* con predominio para UCb y *Akkermansia muciniphila*, y *Edwardsiella tarda* para HR. *Faecalibacterium prausnitzii* se identificó con gran abundancia (1.9% de las secuencias), sin apreciar diferencias en la abundancia entre los grupos.

**Tabla 9.** Composición filogenética bacteriana (estrato especie) con diferencias significativas.

Filo Clase Orden Familia Genero Especie	% total	Valor p	Valor q	dirección
<b>Tenericutes; Mollicutes; Mycoplasmatales; Mycoplasmataceae; Ureaplasma urealyticum</b>	0,000233417	0,00018625	0,071706381	UCb
<b>Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Verrucomicrobiaceae; Akkermansia muciniphila</b>	0,252561777	0,000403959	0,072565156	HR
<b>Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales;</b>	0,03256105	0,000644126	0,072565156	UCb

Lactobacillaceae; Lactobacillus amylovorus				
Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Edwardsiella tarda	0,000183146	0,000753924	0,072565156	HR

### **Comparación entre el total de pacientes afectados de colitis ulcerosa (UC) y el total de individuos sanos (TH).**

A nivel de dominio, se mantiene la estructura de la composición microbiológica descrita en el anterior grupo. Cabe destacar que en este caso existe un predominio de Archaea a favor de TH con diferencias significativas. Dentro del dominio Archaea, el reino identificado es Euryarchaeota (tabla 10).

**Tabla 10.** Composición global de microorganismos grupos UC y TH. Estratos de dominio y reino.

Organismo	% total	Valor p	Valor q	dirección
Dominio Bacteria	50,79	ns	ns	
Organismos desconocidos	48,9	ns	ns	
Dominio Archaea; (Reino Euryarchaeota)	0,33	0,007093856	0,040789672	sanos
Dominio Eukaryota; (Reino Fungi)	0,00168	ns	ns	
Virus	0,0015	ns	ns	

Dentro del dominio Bacteria los filos más abundantes son Bacteroidetes (28%), Firmicutes (20%), Actinobacteria (1.3%) y Proteobacteria (0.6%) sin encontrar tampoco diferencias entre ambos grupos comparados. El filo Verrucomicrobia, con un 0.2% de las secuencias, predomina de forma significativa en individuos sanos, Tenericutes predomina en pacientes con CU colitis ulcerosa, de forma similar al anterior análisis. Por último, el filo Chlorobi (1 de cada 100.000 secuencias) es predominante en los TH alcanzando la significación estadística.

Si ascendemos al siguiente estrato encontramos un grupo de 14 géneros con diferencias significativas (tabla 11), que incluyen los géneros mencionados previamente junto con Methanobrevibacter y Desulfovibrio que muestran predominancia en los pacientes sanos (TH) y que tienen importancia en el metabolismo del metano y del sulfuro de hidrógeno.

**Tabla 11.** Composición filogenética bacteriana (estrato genero) con diferencias significativas.

<b>Filo Clase Orden Familia Genero</b>	<b>% total</b>	<b>Valor p</b>	<b>Valor q</b>	<b>Dirección</b>
<b>Tenericutes; Mollicutes; Mycoplasmatales; Mycoplasmataceae; Ureaplasma</b>	21,84	0,00018625	0,02905505	UC
<b>Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Verrucomicrobiaceae; Akkermansia</b>	27,43	0,000403959	0,03150879	TH
<b>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Edwardsiella</b>	1,37	0,000753924	0,03920403	TH
<b>Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus</b>	0,07	0,003765408	0,003765408	UC
<b>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; genero desconocido</b>	0,826407726	0,000264389	0,008248947	UC
<b>Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae; Alistipes</b>	1,264897204	0,00113399	0,029483749	TH
<b>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiales Family XI. Incertae Sedis; Parvimonas</b>	0,001480261	0,00145477	0,032420599	UC
<b>Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Veillonellaceae; Mitsuokella</b>	0,006578821	0,001701162	0,033172668	TH
<b>Firmicutes; Bacilli; Gemellales; Gemellaceae; Gemella</b>	8,81E-05	0,002462489	0,042683144	UC
<b>Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Prevotellaceae; Paraprevotella</b>	0,141384856	0,003758099	0,05862635	TH
<b>Archaea; Euryarchaeota; Methanobacteria; Methanobacteriales; Methanobacteriaceae; Methanobrevibacter</b>	0,333088303	0,007093856	0,085129403	TH
<b>Bacteria; Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae; Desulfovibrio</b>	0,024203748	0,007094117	0,085129403	TH
<b>Bacteria; Proteobacteria; Betaproteobacteria; Burkholderiales; Oxalobacteraceae; Oxalobacter</b>	9,28E-06	0,008061105	0,089823739	Two sided
<b>Bacteria; Chlorobi; Chlorobia; Chlorobiales; Chlorobiaceae; Chlorobium</b>	3,29E-05	0,006910082	0,085129403	Two sided

En otro estrato mayor, se identifican hasta un total de 386 especies, 21 de ellas muestran una predominancia estadísticamente significativa en algún grupo. Cinco de ellas, son especies de *Streptococcus*, mostrando menor abundancia en el grupo UC. Se identifica además *Saccharomyces cerevisiae*, sin apreciar diferencias en ambos grupos (tabla 12).

Cabe destacar también el hallazgo de diferencias significativas en la abundancia de virus Caudovirales, siendo mayor en el grupo UC. Los Caudovirales pertenecen a un orden de virus que comprende a la mayor parte de los bacteriófagos (95%), que son virus que infectan exclusivamente bacterias.

**Tabla 12.** Composición filogenética (estrato especie) con diferente expresión entre grupos UC y TH.

Filo Clase Orden Familia Genero Especie	% total	Valor p	Valor q	Dirección
<b>Tenericutes; Mollicutes; Mycoplasmatales; Mycoplasmataceae; Ureaplasma urealyticum</b>	0,000170183	5,65E-06	0,002173637	UC
<b>Bacteroidetes; Bacteroidia; Bacteroidales; Rikenellaceae; Alistipes shahii</b>	0,33361504	2,17E-05	0,004185223	TH
<b>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Peptostreptococcaceae; Peptostreptococcus stomatis</b>	0,000275085	8,99E-05	0,01140562	UC
<b>Verrucomicrobia; Verrucomicrobiae; Verrucomicrobiales; Verrucomicrobiaceae; Akkermansia muciniphila</b>	0,219904696	0,000120866	0,01140562	TH
<b>Proteobacteria; Gammaproteobacteria; Enterobacteriales; Enterobacteriaceae; Edwardsiella tarda</b>	0,000196111	0,000148125	0,01140562	TH
<b>Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Lactobacillaceae; Lactobacillus amylovorus</b>	0,021774188	0,000180669	0,01159292	UC
<b>Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae; Desulfovibrio sp.</b>	0,004866129	0,000251719	0,012723736	TH
<b>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; resto desconocido</b>	0,825900776	0,000264389	0,012723736	UC

<b>Firmicutes; Bacilli; Lactobacillales; Streptococcaceae; Streptococcus anginosus</b>	0,000806675	0,000967594	0,04139152	UC
<b>Proteobacteria; Deltaproteobacteria; Desulfovibrionales; Desulfovibrionaceae; Desulfovibrio desulfuricans</b>	6,95E-06	0,001217173	0,046861174	2 sided
<b>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiales Family XI. Incertae Sedis; Anaerococcus lactolyticus</b>	1,60E-05	0,001524761	0,049511993	UC
<b>Firmicutes; Negativicutes; Selenomonadales; Veillonellaceae; Mitsuokella multacida</b>	0,006578833	0,001701162	0,049511993	TH
<b>no RNA stage; ?; Caudovirales; ?;? Phage</b>	0,00013652	0,00173236	0,049511993	UC
<b>Firmicutes; Clostridia; Clostridiales; Clostridiales Family XI. Incertae Sedis; Parvimonas micra</b>	0,001026688	0,001800436	0,049511993	UC

### **Abundancia de *Faecalibacterium prausnitzii* por q-PCR**

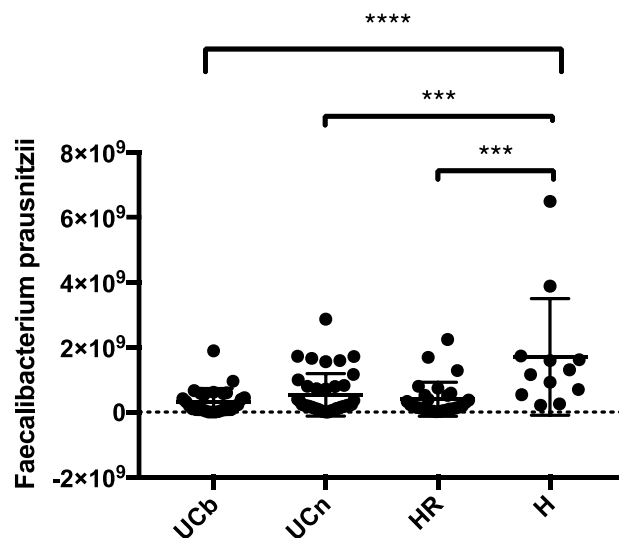
Se completó el estudio metagenómica con la cuantificación mediante q-PCR la abundancia de *Faecalibacterium prausnitzii* (FP) de los diferentes grupos incluidos. La media de *Faecalibacterium prausnitzii* en los distintos grupos se presenta en la tabla 13.

**Tabla 13.** Abundancia de *Faecalibacterium prausnitzii* por q-PCR en los distintos grupos.

<b>Grupo</b>	<b>Abundancia q-PCR (copias/gramo)</b>
<b>Grupo UCb</b>	3.31e+08
<b>Grupo UCn</b>	5.30e+08
<b>Grupo HR</b>	3.97e+08
<b>Grupo H</b>	1.70e+09

El grupo con mayor cantidad de FP fue el de controles sanos con 1.70e+09 copias/gramo, por encima del siguiente grupo, de pacientes afectados de colitis ulcerosa con perfil no brotador con 5.30e+08 copias por gramo. El grupo de

familiares sanos a continuación presenta una media de  $3.97e+08$  copias por gramo. El grupo con un menor número de copias por gramo de *FP* es el grupo de pacientes afectados de colitis ulcerosa con un perfil brotador. Encontramos diferencias significativas entre el grupo H y el resto de los grupos (figura 19). Es interesante resaltar el hecho de que no existen diferencias significativas, aunque sí una tendencia entre la mayor abundancia de *FP* entre pacientes con CU en remisión con alta y baja tasa de brotes.

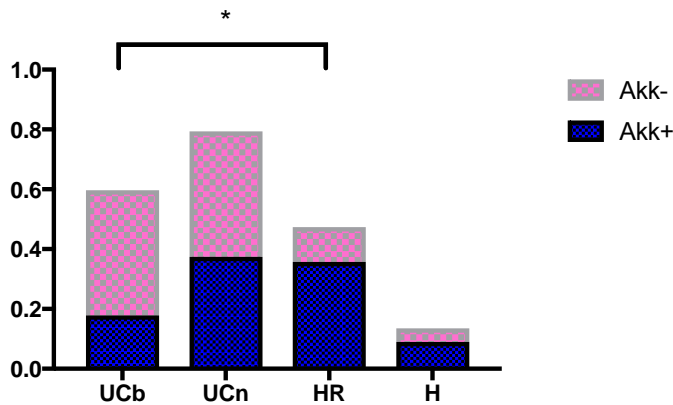


**Figura 19.** Abundancia (copias/gramo) de *Faecalibacterium prausnitzii* entre los distintos grupos. (\*\*\*\*)  $Z = 3.571$ ,  $p < 0.0001$ , según el test U de Mann Whitney. (\*\*\*)  $Z = 3.236$ ,  $p = 0.0008$ , según el test U de Mann Whitney para UCn vs H. (\*\*\*)  $Z = 3.402$ ,  $p = 0.0002$ , según el test U de Mann Whitney para HR vs H. UCb: pacientes con CU y perfil brotador. UCn: pacientes con CU y perfil no brotador. HR: familiares sanos. H: voluntarios sanos

### Abundancia de *Akkermansia muciniphila* por qPCR.

Se procedió establecer mediante qPCR la presencia o ausencia de la cantidad de *Akkermansia muciniphila* en los diferentes grupos de estudio. Apreciamos cómo el grupo HR muestra la tasa más alta de positividad con un 80%, seguido de un 62,5% en el grupo H. El grupo UCb muestra un 53,8%, y por último en grupo UCn muestra las menores tasas de positividad para *Akkermansia muciniphila* con un 35,7%. Encontramos diferencias significativas entre los grupos UCb y HR, sin embargo, no se identifican al comparar los grupos UCn y H. No se encontraron diferencias en el estatus (positivo o negativo) para *Akkermansia* entre grupo de CU brotadores y no brotadores. Tampoco se encontraron diferencias entre los familiares sanos emparentados y los sanos no emparentados.

**Figura 27.** Estatus *Akkermansia muciniphila* en los diferentes grupos.



Si comparamos el total de pacientes sanos y el grupo total de pacientes afectados de colitis ulcerosa encontramos diferencias significativas con un 46.2% de positividad entre pacientes afectados de colitis ulcerosa *versus* 75.7% de positividad en el grupo de sanos ( $\chi^2=7.8031$ ,  $p= 0.005$ ).

### Composición funcional

#### Análisis de función basado en KOGs databases (módulos BSB)

Se detectaron un total de 120 funciones biológicas. Al comparar los grupos UCb y HR, no se detectaron diferencias significativas, sin embargo, al comparar el grupo total de pacientes con CU y el total de sanos, encontramos 8 grupos BSB significativamente diferentes. En el grupo de sanos se aprecia un enriquecimiento de la función de producción de propionato vía kinasa, metanogénesis, ciclo de Krebs y beta oxidación anaeróbica de los ácidos grasos. Además, hay un aumento, aunque menos evidente en el grupo de sanos de las funciones de catalasa, superóxido dismutasa, degradación de la metionina (la metionina es uno de los dos aminoácidos proteínogénicos que contienen azufre) y producción de butirato y propionato (tabla 14).



**Tabla 14.** Descripción de funciones biológicas con diferencias entre grupos.

Descripción	Valor p	Valor q	Dirección
Producción de propionato vía kinasa	0.000135	0.016173	H
Metanogénesis a partir de moléculas orgánicas	0.001934	0.08569	H
Degradación del sorbitol	0.003866	0.08569	UCn
Ciclo de Krebs (Helicobacter pathway)	0.003978	0.08569	H
Beta oxidación anaeróbica de los ácidos grasos	0.004092	0.08569	H
Degradación de los fructanos	0.004452	0.08569	UCn
Metanogénesis por reducción de CO <sub>2</sub>	0.005001	0.08569	H
Degradación treonina (vía glicina)	0.005713	0.08569	H

Al amplificar el poder estadístico adscribiendo los módulos funcionales a categorías con mayor jerarquía, seguimos fallando en encontrar diferencias al comparar el grupo de CU brotadores y sus familiares sanos. Sin embargo, al comparar los grupos totales, hemos detectado varias diferencias significativas: el metabolismo de los ácidos grasos de cadena corta (a expensas del metabolismo del acetato y el butirato), y la degradación de aminoácidos están significativamente sobrerexpresados en el grupo de sanos.

#### Análisis de función basado en módulos KEGG

De acuerdo a la jerarquía superior del módulo KEGG, encontramos que los módulos relacionados con la transcripción del ADN mostraron un descenso progresivo al comparar los grupos H, HR y UC, de forma significativa. Por otro lado, existe un aumento en sanos frente a CU de la función de “otros metabolismos orgánicos” como el metabolismo de los aminoácidos. El metabolismo de los glicosaminoglicanos está disminuido en pacientes con CU. Otra categoría funcional el metabolismo de glicolípidos, es también menor en paciente con CU.

**Tabla 15.** Funciones KEGG diferencialmente expresadas en los grupos H (sanos), HR (sanos emparentados) y UC (pacientes con CU).

Descripción	Valor p	Valor q	Dirección
<b>Transcripción</b>	6.42E-05	0.002503	H >> HR >> UC
<b>Otros metabolismos energéticos</b>	0.003764	0.043789	UC = HR > H
<b>Metabolismo de glicosaminoglicanos</b>	0.004187	0.043789	H >> HR = UC
<b>Metabolismo de Glicolípidos</b>	0.004491	0.043789	H > UC = HR
<b>Síntesis de ATP</b>	0.008741	0.068181	UC > HR = H
<b>Catión metálico, hierro sideróforo</b>	0.012649	0.08222	H > HR = UC

## Discusión

A lo largo de los últimos años la mejora de la tecnología de secuenciación ha permitido el mejor conocimiento de la diversidad microbiana que coloniza la biosfera así como sus funciones en el ecosistemas terrestre y más particularmente en el ser humano. El proyecto MetaHIT ha estudiado la composición de la microbiota intestinal en humanos, poniendo de manifiesto su intervención en trastornos metabólicos y en la inflamación intestinal mediante el empleo de técnicas de secuenciación de alto rendimiento, que consiste en la secuenciación íntegra del material genético procedente de una muestra biológica.

La parte I de esta tesis aborda las diferencias en la composición de la microbiota fecal entre pacientes con CU en remisión con la de personas sanas empleando técnicas de secuenciación de alto rendimiento. Secundariamente se buscan diferencias a nivel de función de genes bacterianos entre grupos y similitudes entre dos fenotipos de pacientes con colitis ulcerosa en remisión (brotadores y no brotadores).

La observación de los enterotipos en el intestino humano ha reducido la complejidad en el estudio de la microbiota. En nuestro estudio se han presentado los distintos enterotipos únicamente para dos grupos, pacientes con CU y alta tasa de brotes y sus familiares sanos, mostrando la mayor abundancia del enterotipo tipo 1 (predominancia del género *Bacteroides*), seguidos de los enterotipos 3 y 2 (predominancias de los géneros *Ruminococo* y *Prevotella* respectivamente). Como hemos mencionado anteriormente la predominancia de nuestro enterotipo más

frecuente, se ha asociado a una dieta rica en proteínas y grasa, más acorde con la dieta de los países desarrollados, al que pertenecen los pacientes y sanos que participaron en el estudio. El segundo enterotipo más frecuente fue el 3, con predominancia del género Ruminococo, sin poder asociarse tan claramente a un contexto ditético, y en tercer lugar el enterotipo Prevotella más asociado al consumo de fibras e hidratos de carbono. Por nuestra parte, no se realizó una encuesta dietética a los grupos estudiados para poder correlacionar con la ocurrencia de los enterotipos. No se detectaron diferencias en su distribución entre el grupo de sanos y enfermos, hecho esperable, teniendo en cuenta el parentesco entre ambos grupos, factor que influiría tanto en la heredabilidad de la microbiota como en los factores ambientales que también la modelan (alimentación o hábitos de higiene). La principal publicación que estableció la existencia de los enterotipos fue extraída con parte de los sujetos de nuestro estudio y por tanto no puede ser comparada con esta publicación. En nuestro estudio el enterotipo 3 mostraba una mayor abundancia de genes bacterianos, seguidos del 1 y del 2, con diferencias significativas del primero con los dos segundos.

En relación a la riqueza genética, podemos estratificar su cuantía entre pacientes con CU y sanos. Los dos grupos fenotípicos de pacientes (brotadores y no brotadores) presentaban una riqueza genética similar entre ellos, pero menor que la riqueza genética de los familiares sanos. A su vez, los familiares sanos mostraban menor recuento de genes bacterianos que los controles sanos. Este dato corrobora los datos expuestos previamente en cuanto a la microbiota más común entre sujetos emparentados por impronta genética y cohabitación. Como se ha establecido en una publicación de Le Chatelier(88), el mapeo de las lecturas de secuenciación puede predecir la abundancia de bacterias intestinales. Y esto permitió establecer diferentes poblaciones microbianas entre sujetos con baja y alta riqueza genética, así aquellos con mayor riqueza genética mostraban mayor abundancia de bacterias con efectos beneficiosos. En base a lo establecido anteriormente, podríamos afirmar que **existe diferente composición intestinal y riqueza microbiológica entre el grupo de pacientes con CU, familiares emparentados y sujetos sanos. La presencia de similar recuento de genes entre los fenotipos de pacientes con mayor y menor perfil brotador implicaría una microbiota similar entre ambos grupos fenotípicos, sugiriendo que su origen más o menos agresivo no dependería de la abundancia microbiológica.**

Por otro lado la persistencia de más tiempo en remisión tampoco tendería a restaurar la diversidad perdida, como algunos habían sugerido previamente(5).

Si abordamos la composición microbiológica de los grupos estudiados es interesante destacar que prácticamente la mitad de las secuencias genéticas, una vez excluidas las secuencias humanas y alimentarias, pertenecen a taxonomías desconocidas. Como hemos descrito previamente, la microbiota intestinal humana no sólo está formada por bacterias, se identifican también organismos del dominio Archaea (4 de cada 1000 secuencias). Las Archaeas tienen capacidad metanogénica, es decir, son capaces de reducir CO<sub>2</sub> o moléculas orgánicas como ácido acético o metanol para generar metano. Se identifica además un predominio de secuencias en el total de sujetos sanos sobre pacientes afectados de CU, que posteriormente se correlaciona además con un incremento de la función metanogénica, por reducción de CO<sub>2</sub> o a partir de moléculas orgánicas. Existen escasas publicaciones, pero consistentes, que demuestran que el fenotipo metanogénico es menor en pacientes con EII, y más claramente en pacientes afectados de colitis ulcerosa en comparación con sujetos sanos (89). Se piensa, no obstante, que la generación de metano está relacionada con el tiempo de tránsito colónico, así a menor tránsito colónico, menor producción de metano(90). A nivel de estrato especie, se identifica una mayor cantidad de *Methanobrevibacter smithii*, el principal metanógeno en el colon humano, en sujetos sanos frente a CU, sin alcanzar una clara significación estadística. Se piensa además que la función metanogénica no es esencial para el ser humano (88).

Encontramos en nuestro estudio secuencias génicas pertenecientes a organismos eucariotas, entre ellos los hongos, con un muy bajo porcentaje sobre el total de secuencias (1 de cada 100.000 secuencias). A nivel de filo, identificamos los hongos Ascomycota y Microsporidia como los más abundantes de forma global, sin encontrar diferencias entre sujetos sanos y pacientes con colitis ulcerosa, lo que contrasta con datos previos donde se los filos reportados como los más abundantes fueron Ascomycota y Basidiomycota(91). En este estudio, Sokol y cols. observaron que los pacientes afectados de EII (EC y CU) presentaban un aumento de Basidiomycota con un concomitante descenso de Ascomycota en comparación con los sujetos sanos. A nivel de especie, en nuestra población se aprecia una mayor cantidad de *Saccharomyces cerevisiae* en sanos frente a los pacientes con CU, sin alcanzar la significación estadística, hallazgo similar al estudio de Sokol y cols.

Estos autores también encontraron que la especie *Candida albicans* estaba aumentada en la EII mientras que en nuestro estudio no se identificó *Candida albicans* en ningún grupo. Este conflicto en los resultados, podría explicarse por los diferentes fenotipos estudiados: nuestros pacientes con CU se encontraban en remisión, mientras que Sokol y cols. estudiaron pacientes con EII en remisión y actividad. Además, incluyeron también pacientes con Enfermedad de Crohn. Vale la pena mencionar que las técnicas utilizadas fueron diferentes. En nuestro estudio se realizó metagenómica frente a la secuenciación de ITS2 del estudio reportado.

Poco se sabe sobre la interacción huésped-hongo a nivel intestinal y cómo puede influir sobre la EII. Estudios en ratones han encontrado una relación entre la gravedad de la colitis y la ausencia de Card 9 y Dectina 1, que están involucradas en la inmunidad innata que actúa frente a los hongos (92). Dos estudios en ratones knock-out para estos receptores reportaron desarrollo de formas de colitis inducida más grave que los ratones wild-type. Esto subraya el potencial papel que el microbioma humano podría ejercer sobre el desarrollo y evolución de la colitis ulcerosa (93) (94).

A través del análisis metagenómico se identifican virus como parte del ecosistema intestinal en 1 de cada 100.000 secuencias sin embargo, su importancia en el equilibrio del ecosistema intestinal es vital, y sigue los modelos de interacción interespecie depredador-presa según el cual la supervivencia de la especie depredadora está condicionada a la existencia de otra especie que le sirve de presa (95). Cabe destacar también el hallazgo de diferencias significativas en la abundancia de virus Caudovirales, siendo mayor en el grupo UC. Los Caudovirales pertenecen a un orden de virus que comprende la mayor parte de los bacteriófagos, que son virus que infectan exclusivamente a bacterias. Este hecho era ya conocido: pacientes con EII presentan una expansión significativa de bacteriófagos Caudovirales (96). Por otro lado, no se identifican diferencias en la abundancia de virus eucariotas. Se desconoce por completo si estas alteraciones pueden desarrollar un papel patogénico en el desarrollo de la EII. Los metagenomas virales están significativamente enriquecidos para el metabolismo del ADN (en consonancia con la necesidad de los virus de autosuficiencia) así como para los procesos para la respiración, la fotosíntesis y el metabolismo de carbohidratos(95).

Una vez descrito el viroma, microbioma, las Archaeas y los micro-organismo desconocidos en nuestra cohorte, pasamos a comentar los hallazgos referentes al dominio Bacteria. En nuestro estudio no distinguimos diferencias en la composición entre sanos y enfermos en relación a los filos más abundantes (Bacteroidetes, Firmicutes, Proteobacteria y Actinobacteria). Previamente se había descrito (95,97) en pacientes con colitis ulcerosa en remisión un descenso del filo Firmicutes y Bacteroidetes con incremento de Proteobacteria y Actinobacteria. En relación a los filos menos abundantes encontramos diferencias significativas, con un incremento de Verrucomicrobia (al que pertenece la especie *Akkermansia muciniphila*) en sanos en comparación con pacientes con CU, hallazgo concordante con lo reportado hasta ahora por análisis por 16S (95). El filo Tenericutes, muy poco abundante (2 de cada 10.000 secuencias), es predominante en el grupo UCb de forma significativa. Cabe destacar el filo Chlorobi (1 de cada 100.000 secuencias) es predominante en los HR con diferencias cercanas a la significación estadística.

Si profundizamos hacia estrato de género se mantiene el predominio de Archaeas en sanos a través de su género *Methanobrevibacter*. Evidenciamos además una mayor abundancia en sanos del género *Desulfovibrio*, conjunto de bacterias que obtienen su energía de la oxidación de los compuestos inorgánicos como el azufre, produciendo sulfuro de hidrógeno (bacterias reductoras de sulfato). Como sabemos, el sulfuro de hidrógeno se considera tóxico para el colonocito en tanto que deteriora la oxidación de los ácidos grasos como el butirato (98). El aumento de *Desulfovibrio* en pacientes sanos no concuerda con lo descrito en estudios previos, que demostraban con técnicas dependientes de cultivo la presencia de mayor cantidad de bacterias productoras de sulfuro y actividad productora de sulfuro de hidrógeno en pacientes afectados de colitis ulcerosa (99,100). Estudios más recientes, que empleaban técnicas moleculares habían detectado mayor abundancia de *Desulfovibrio piger* (por PCR) en EII frente a sanos/ afectados de otros trastornos digestivos (101). Sin embargo, en otro estudio también reciente, que empleaba PCR cuantitativa en biopsias de colon y heces, no mostró diferencias para *Desulfovibrio* spp. entre pacientes con colitis ulcerosa y sanos (102). A nivel de función no se aprecian diferencias en cuanto a la oxidación de los compuestos inorgánicos como el azufre. Los cambios en su abundancia podrían también obedecer a otros factores ambientales como la dieta (95). También, a nivel de género, encontramos otras diferencias, con mayor abundancia

de los géneros *Ureaplasma* y *Lactobacillus* en pacientes con CU y *Akkermansia* y *Edwardsiella* en sanos.

En otro estrato mayor, a nivel de especie, las mayores diferencias se obtienen de la comparación del total de los grupos. Se identificaron un total de 386 especies, 21 de ellas muestran una predominancia estadísticamente significativa en algún grupo. Sorprendentemente, *Ureaplasma urealyticum* mostró un predominio en pacientes afectados de CU y alta tasa de brotes, como en el grupo total de CU. *Ureaplasma urealyticum*, perteneciente al filo Tenericutes, posee capacidad de adherencia y fusión con células epiteliales e inmunológicas, lo que establece su potencial efecto patógeno. Este dato no había sido reportado con anterioridad, pero sí había detectado la presencia de la especie *Mycoplasma pneumoniae*, muy cercana filogenéticamente con *Ureaplasma urealyticum* en biopsias de pacientes afectados de EII en mayor cuantía que en sanos (103) así. Este dato encajaría con la sospecha de que en un ecosistema alterado determinadas especies patógenas toman la predominancia pudiendo desarrollar efectos patógenos en el huésped(104).

La especie *Faecalibacterium prausnitzii* fue muy abundante (1.9% de las secuencias) aunque no se encontraron diferencias significativas entre grupos en el análisis metagenómico. Al completar el estudio metagenómico con la cuantificación mediante PCR de *Faecalibacterium prausnitzii*, sí se identificaron claras diferencias encontrando además mayor predominio entre voluntarios sanos y el resto de los grupos. Sin embargo, en nuestro estudio no se encontraron diferencias entre los grupos “brotadores” y “no brotadores” como se había comunicado en anteriores publicaciones (105).

En relación a la especie *Akkermansia muciniphila*, en el abordaje metagenómico distinguimos mayor abundancia de esta especie en pacientes con CU con perfil brotador sobre familiares sanos, manteniendo diferencias en los grupos totales. Por qPCR, se mantienen las diferencias entre pacientes brotadores y familiares emparentados. Todos los hallazgos son consistentes con lo reportado en la literatura donde su depleción se asoció a un curso más severo, y su presencia a una remisión más estable al año(86).

Por último, analizando la función que desempeñan las proteínas que codifican para los genes encontrados, podemos identificar hasta 120 funciones biológicas. De ellas, únicamente 8 se encuentran diferencialmente expresadas entre pacientes con CU y el grupo de sanos. Algunas funciones menos importantes como la producción de metano, más marcada en sanos y probablemente relacionadas con el tránsito colónico. Otras funciones, como la mayor producción de ácidos grasos de cadena corta, que ha sido ampliamente descrita por otros métodos (3) y viene a confirmarse por metagenómica funcional, junto con mayor beta-oxidación de los ácidos grasos. Se identifica también, si nos adscribimos a un grupo jerárquico funcional mayor, un menor estrés oxidativo en sanos en comparación con colitis por la mayor presencia de la función catalasa. De forma global podemos afirmar que el estrés oxidativo en el intestino de los pacientes sanos es ligeramente menor con respecto a pacientes afectados de CU.

De acuerdo a la jerarquía superior del módulo KEGG, cabe destacar que el metabolismo de los glicosaminoglicanos (al que pertenecen los mucopolisacáridos que componen el moco) es menor en pacientes con UC. Este hecho concuerda con el hecho confirmado de que en pacientes con CU existe una menor expresión de mucinas(106), y se ha relacionado con la menor abundancia de *Akkermansia muciniphila*, una bacteria que degradadora de mucina. Otra categoría significativamente diferente es el metabolismo de los glicolípidos, con una reducción en los pacientes con CU. Esto concuerda con el hecho de los niveles en la biosíntesis de los glicolípidos poseen efectos antiinflamatorios (51).



## **IV. Estudio 2. Estudio de los cambios inducidos por el polietilenglicol sobre la composición de la microbiota fecal de individuos sanos y de pacientes con colitis ulcerosa.**

### Introducción

Aunque existe evidencia que apunta a la alteración de la composición de la microbiota como una de las co-causas de la colitis ulcerosa, no se puede afirmar de forma taxativa que una disbiosis sea la causa de la enfermedad; podría tratarse de un epifenómeno secundario a factores fisiopatológicos de la enfermedad, entre ellos la diarrea que muestran los pacientes a lo largo de su historia natural.

Una vez establecida en la parte I de esta tesis la menor riqueza genética, menor abundancia y menor expresión de ciertas funciones protectoras en pacientes con CU en relación con sanos, nos planteamos si dicha pérdida de diversidad puede ser debida a una aceleración del tránsito colónico per sé. Se conocen factores que pueden alterar la composición de la microbiota sobre voluntarios sanos a corto y a largo plazo, como el empleo de antibióticos(107,108), los antiinflamatorios no esteroideos (109) o la dieta (27,110). El “efecto lavado” provocado por la diarrea podría explicar los cambios en la diversidad o “estados disbióticos” conocidos previamente en tanto que constituye un elemento disruptor.

Por otro lado, los estados disbióticos o desequilibrios provocados por estos factores externos pueden provocar la expansión de patobiontes, que son patógenos, miembros de una comunidad equilibrada que toman la predominancia o se expanden como resultado del desequilibrio establecido, pudiendo desarrollar efectos patogénicos en el huésped. En el caso de la enfermedad inflamatoria intestinal, no se ha señalado nunca hacia un patobionte concreto, si bien se piensa que el sobrecrecimiento de un consorcio de bacterias sinérgicas podría tener una capacidad patogénica.

Existen estudios previos que evalúan los cambios de la microbiota intestinal en relación al uso de laxantes sobre la composición de la microbiota. El primero de ellos (111) valora el efecto del polietilenglicol (PEG) sobre una muestra de voluntarios sanos. Veintitrés sujetos fueron aleatorizados a recibir dos tipos de preparación: dos dosis separadas de 1L de PEG o una sola dosis de 2L. Se

tomaron muestras basales, tras la preparación, y los días +14 y +28 tras la solución laxante. El estudio de la microbiota se realizó mediante el empleo de *microarrays* filogenéticos, con cobertura para más de 1000 filotipos y PCR cuantitativa. Los resultados indicaron que la abundancia bacteriana descendió 31 veces con respecto a la basal. El 22% de los sujetos presentó un gran cambio de la microbiota, perdiendo su especificidad individual según los dendogramas jerárquicos. Aunque a los 14 días las poblaciones bacterianas se recuperaban, el impacto sobre la flora fue mayor cuando se administraron 2L de PEG. Se describió además un aumento de Proteobacteria, Fusobacteria y *Dorea formicigenerans*. Describimos otro estudio (112) que evaluó los cambios de las solución laxantes (tanto PEG como picosulfato sódico) sobre 10 voluntarios sanos y un grupo de 8 pacientes afectos de EII, 5 de los cuales estaban diagnosticados de Enfermedad de Crohn y 3 de colitis ulcerosa. Uno de los pacientes con Enfermedad de Crohn no se encontraba en remisión de la enfermedad. Los tres pacientes con colitis ulcerosas se encontraban en remisión. Se tomaron muestras fecales y por biopsias antes y después de la preparación. Para el estudio de la microbiota se empleó la pirosecuenciación del gen 16s rRNA. En los resultados se describió que en el grupo de pacientes afectos de EII descendió la diversidad medida por el índice de Shannon únicamente en las muestras de biopsia, tras la limpieza. Cabe destacar que no se encontraron diferencias entre población sana y población afectada de EII tras la preparación. Por tanto, la microbiota del moco se vió afectada frente a la luminal. No se presentan los estudios realizados con técnicas de amplificación de los genes ribosomales mediante electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE) ni estudios que incluyan muy pocos pacientes.

Por otro lado, la experiencia clínica nos dice que algunos pacientes refieren la aparición de brotes de actividad de la colitis ulcerosa tras la realización de una colonoscopia. Para dilucidar si tras la realización de una FCS podía aumentar el riesgo de brote de actividad, Menees(113) llevó a cabo un estudio de carácter prospectivo y de diseño cruzado en el que se reclutaron 55 pacientes con CU en remisión clínica a los que se les realizaba una colonoscopia en el contexto de cribado de cáncer colorrectal. El objetivo era averiguar si la colonoscopia se asociaba a una exacerbación de los síntomas de la colitis ulcerosa así como la necesidad de intensificación de tratamiento debido a los mismos. La evaluación clínica se realizó mediante el SCCAI (Simple Clinical Colitis Activity Index) antes, y

en las semanas 1 y 4 tras la FCS. El 79% recibió preparación con Fosfosoda (fosfato sódico), el resto (21%) con PEG. Se controlaron factores como el consumo de antiinflamatorios no esteroideos, antibióticos, abandono del hábito tabáquico y adherencia a la medicación semana previa a FCS. Las conclusiones revelaron que 1 de cada 8 sujetos presenta una recaída de su CU y 1 de cada 10 precisó de escalada en su tratamiento de base con aminosalicilatos. Destacamos el hecho de que, si bien los pacientes se describen como en remisión, algunos de ellos se encontraban bajo el tratamiento de corticoides. Por tanto, los pacientes, o al menos algunos de ellos, presentaban una remisión de muy corta evolución.

## Objetivos

- ✓ El objetivo primario: conocer si la preparación de limpieza colónica con PEG produce cambios permanentes sobre la composición de la microbiota intestinal de individuos sanos y pacientes con colitis ulcerosa en remisión mediante la aplicación de técnicas de secuenciación del gen 16S rRNA.
- ✓ Los objetivos secundarios:
  - Conocer si los cambios inducidos son reversibles a corto plazo (2 meses).
  - Analizar la evolución de la calprotectina fecal entre sanos y pacientes con CU antes y después de la administración del PEG

## Material y métodos

### Estudio en voluntarios sanos:

El estudio se llevó a cabo mediante un ensayo clínico fase I.

Los criterios de inclusión fueron: voluntarios sanos con una edad comprendida entre los 18 y los 75 años.

Los criterios de exclusión:

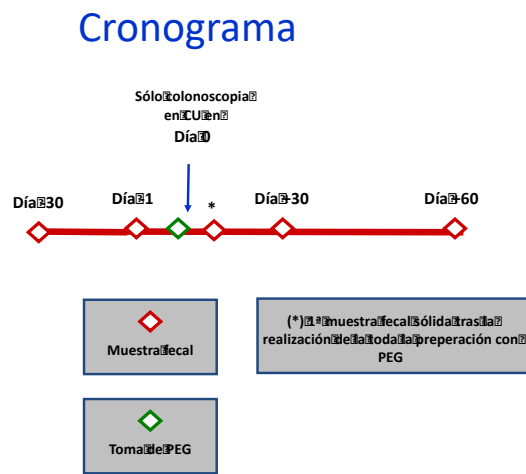
- ✓ Enfermedad orgánica localizada en aparato digestivo o a otro nivel
- ✓ Embarazo o lactancia
- ✓ Tratamiento antibiótico los 2 meses previos al estudio
- ✓ Viaje a países en vías de desarrollo los 2 meses previos al estudio
- ✓ Pacientes sometidos a dietas hipocalóricas.
- ✓ Uso de probióticos / fármacos / productos de herbolario

✓ Alergia o intolerancia conocida al PEG

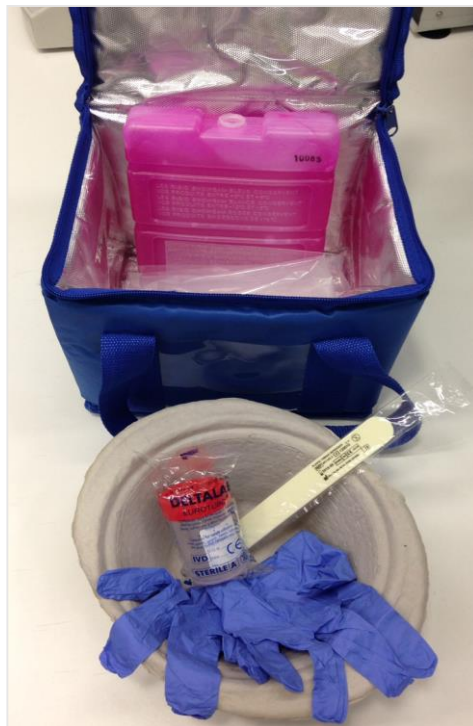
El estudio fue aceptado por el comité ético del Hospital Universitario Vall d'Hebron e inscrito en el registro europeo de ensayos clínicos (EudraCTnº: 2011-003034-13). Los voluntarios sanos reclutados fueron informados verbalmente y mediante consentimiento informado. Participaron un total de 15 voluntarios sanos, teniendo que ser retirados 3 de ellos por toma de antibióticos. Se tomaron muestras fecales en distintos momentos antes y después de la toma de PEG. Como indica el cronograma de la figura 28 se toman muestras fecales 30 días y 1 día antes de la toma de PEG con el objeto de conocer la estabilidad de la flora fecal. A continuación, se procede a tomar la preparación colónica con PEG en la forma comercial de Solución evacuante Bohm® (16 sobres). Una vez realizada toda la limpieza, se tomará otra muestra de la primera deposición formada realizada (\*). Se tomarán nuevas muestras los días +30 y + 60 tras la toma de la solución de PEG. Las muestras se recogerán en el domicilio del voluntario y serán congeladas inmediatamente tras su obtención (-20°C). Para el traslado de las muestras al laboratorio se emplearán sistemas portátiles térmicos (figura 29) para evitar que su descongelación. Posteriormente, se trasladaron al laboratorio para su almacenamiento a -80° hasta su procesamiento. Se realizaban alícuotas de las muestras fecales de 250 mg cada una sin descongelado de las mismas empleando hielo seco (CO<sub>2</sub> sólido).

Tanto la información demográfica de los voluntarios, así como sus muestras, fueron codificados para impedir su identificación (siguiendo la Ley de Investigación Biomédica- Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica).

**Figura 28.** Cronograma de recogida de muestras en voluntarios sanos / pacientes con CU.



**Figura 29.** Sistemas portátiles para recogida y traslado de muestras.



### Estudio en pacientes con colitis ulcerosa:

Se llevó a cabo un estudio observacional en pacientes con colitis ulcerosa en remisión clínica, que fueran a ser sometidos a una videocolonoscopia (FCS) en el contexto de cribado de cáncer colorrectal.

#### Criterios de inclusión:

- ✓ Pacientes diagnosticados de colitis ulcerosa por criterios habituales por lo menos 1 año antes de su inclusión en el estudio.
- ✓ Pacientes en remisión clínica durante al menos 6 meses antes de su inclusión en el estudio.
- ✓ Los pacientes incluidos habrían presentado al menos tres brotes de actividad inflamatoria en los últimos 5 años.

#### Criterios de exclusión:

- ✓ Proctitis ulcerosa
- ✓ Embarazo o lactancia
- ✓ Tratamiento antibiótico los 2 meses previos al estudio
- ✓ Viaje a países en vías de desarrollo los 2 meses previos al estudio
- ✓ Pacientes sometidos a dietas hipocalóricas.
- ✓ Uso de probióticos / fármacos / productos de herbolario
- ✓ Alergia o intolerancia conocida al PEG

El estudio fue aprobado por parte del comité ético del Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Los pacientes reclutados fueron informados verbalmente y mediante consentimiento informado. Se reclutaron un total de 15 pacientes afectados de colitis ulcerosa. Finalmente participaron un total de 11 pacientes con CU, tres pacientes salieron del estudio por toma de antibióticos y un paciente perdió las muestras fecales.

Se tomaron muestras fecales en distintos momentos antes y después de la toma de PEG. Como indica el cronograma de la figura 29 se toman muestras fecales 30 días y 1 día antes de la toma de PEG con el objeto de conocer la estabilidad de la flora fecal. A continuación, se procede a tomar la preparación colónica con PEG en la forma comercial de Solución evacuante Bohm® (16 sobres). Posteriormente se realiza la colonoscopia. Tras la realización de la misma,

se tomará otra muestra fecal de la primera deposición formada realizada (\*). Se tomarán nuevas muestras los días +30 y + 60 tras la toma de la solución de PEG. Las muestras se recogerán en el domicilio del voluntario y serán congeladas inmediatamente tras su obtención (-20°C). Para el traslado de las muestras al laboratorio se emplearán sistemas portátiles térmicos (figura 29) para evitar que se descongelaran. Posteriormente, se trasladaron al laboratorio para su almacenamiento a -80° hasta su procesamiento. Se realizaban alícuotas de las muestras fecales de 250 mg cada una sin descongelado de las mismas empleando hielo seco (CO<sub>2</sub> sólido).

Tanto la información demográfica de los pacientes así como sus muestras, serán codificados para impedir su identificación (siguiendo la Ley de Investigación Biomédica- Ley 14/2007, de 3 de julio, de Investigación biomédica).

#### Extracción de DNA

La extracción de DNA se llevó a cabo siguiendo el mismo proceso reportado en el apartado anterior (página 48).

#### Amplificación por Illumina de la región variable V4 del gen 16S.

Se procedió a la amplificación del material genético bacteriano mediante una reacción PCR convencional de la región variable V4 del gen 16S rRNA. La elección de los *primers* (cebadores) se ha realizado mediante el software PrimerProspector ([http://pprospector.sourceforge.net/\(114\)](http://pprospector.sourceforge.net/(114))). Para la amplificación se emplean los *primers* universales V4F\_517\_17 5' GCCAGCAGCCGCGGTAA -3' (*Forward primer*) y V4R\_805\_19: 5'- GACTACCAGGGTATCTAAT -3' (*Reverse primer*). El empleo de estos *primers* garantiza la amplificación de prácticamente el 100% de los dominios de las Bacterias y Archaeas. Además, en el *reverse primer* se coloca un *barcode* único para cada muestra. Se trata de secuencias denominadas *Multiplex identifiers* (MIDs) de 12 bases (Roche©), cuya función es identificar individualmente cada muestra.

La PCR convencional consiste en 0.75 unidades de AmpliTaq Gold (*Taq*) polymerase (Life Technologies©) y 20pmol/μl del *forward* y *reverse primers* (IDT Technologies©) llevándose a cabo en una Mastercycler gradient (Eppendorf©) a 94°C durante 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 94°C durante 30 segundos, 56°C

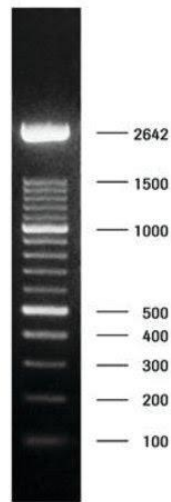
durante 20 segundos, 72°C durante 40 segundos, y un ciclo final a 72°C durante 7 minutos.

Los amplicones se purificaron por primera vez usando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen ©), cuantificados, usando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nucliber ©), y luego se agruparon en igual concentración. Los amplicones agrupados (2nM) se sometieron luego a secuenciación utilizando la tecnología Illumina © MiSeq en la unidad de soporte técnico de la Universidad Autónoma de Barcelona (UAB) siguiendo los protocolos estándar de la plataforma Illumina.

Tras la extracción de ADN, se comprobó la amplificación la integridad del mismo mediante la realización de electroforesis. La electroforesis en gel de agarosa es una de las técnicas analíticas utilizadas en la caracterización de ácidos nucleicos según tamaño molecular. Debido a la carga negativa neta por los grupos fosfato en el ADN y el ARN, tiene lugar una migración de las moléculas hacia el ánodo cuando se aplica un campo eléctrico; sin embargo, la matriz, formada por la agarosa en la sal del tampón, ofrece una resistencia al movimiento. Las moléculas lineales de mayor tamaño molecular tendrán dificultad para pasar por los poros de la matriz, quedándose en la región superior del gel, mientras que los fragmentos de menor tamaño se movilizarán con facilidad, alcanzando la parte inferior del gel. Se empleó gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio en tampón de Tris Actate EDTA (TAE) 1x Tris. Se mezclaron 5 µl de ADN amplificado por PCR con colorante de carga (azul de bromofenol al 0,25%, xileno-cianol FF al 0,25%, glicerol al 30% en agua) y se añadieron a los pocillos de gel de agarosa solidificado junto con un marcador de Peso Molecular XIV. La electroforesis se realizó en un tanque de electroforesis (Bio-Rad ©) a 90 V durante 45 minutos para visualizar bandas de amplicón. La aparición de bandas, visualizadas en un sistema Gel Doc XR + (Bio-Rad ©), confirmó que se habían generado amplicones durante la amplificación por PCR. La ausencia de bandas podría referirse a la ausencia de suficiente ADN bacteriano en la muestra o la presencia de inhibidores de PCR en el ADN resultante, y una muestra de ADN diluido sería necesaria para lograr amplicones. Los productos de PCR que mostraban bandas en gel de agarosa se purificaron usando el QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen ©) de acuerdo con las instrucciones del fabricante y se cuantificaron utilizando un espectrofotómetro NanoDrop ND-1000 (Nucliber ©).



**Figura 30.** Marcador de peso molecular (DNA molecular Weight Marker XIV- 100 bp ladder).



**Figura 31.** Gel de amplificación tras PCR. Los amplicones muestran un peso molecular equivalente a 300 pares de bases.



### Análisis de los datos de secuencias

El conjunto de secuencias crudas se analizaron mediante el software QIIME 1.8.0, seguimos el protocolo descrito por Navas-Molina(115). El primer paso consiste en filtrar la calidad de las secuencias mediante la aplicación de una puntuación mínima de Phred score de 20. Se empleó el algoritmo UCLUST (116), diseñado para agrupar secuencias de nucleótidos o aminoácidos en grupos basados en la similitud de secuencias, en nuestro caso se estableció una similitud del 97%. Posteriormente, se identifican y eliminan las secuencias quiméricas utilizando ChimeraSlayer(117). Puesto que cada OTU puede comprender muchas

secuencias relacionadas, elegimos una secuencia representativa de cada una. Las secuencias representativas se alinearon usando PyNAST frente a la alineación de la plantilla de Greengenes (liberación gg\_13\_8) y la taxonomía se asignó a las OTU detectadas usando la base de datos de referencia de la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) y el archivo de mapeo taxonomía de Greengenes.

El script `make_phylogeny.py` fue utilizado para crear árboles filogenéticos usando el programa FastTree(118). Para definir correctamente la riqueza de especies para el análisis de la diversidad entre muestras (diversidad beta), la tabla OTU se estableció en 3337 secuencias por muestra. La rarefacción se utiliza para superar los casos en los que los recuentos de lectura no fueron similares en número entre muestras.

Con el fin de evitar taxones positivos falsos, aquellos OTU que no representan al menos el 0,2% de las secuencias de una muestra determinada se eliminaron de la tabla OTU resultante. Se clasificaron los taxones desde estrato dominio hasta el nivel de especie. Para proporcionar estimaciones de la diversidad alfa de la comunidad, calculamos Chao1. Para calcular la diversidad entre muestras, se aplicaron métricas de Unifrac ponderadas y no ponderadas para construir matrices filogenéticas de distancia, que luego se usaron para construir árboles de racimo jerárquicos utilizando un método de grupo de pares no ponderado con representaciones de la media aritmética (UPGMA) y PCoA. Por último, los análisis de redundancia basada en la distancia se realizaron utilizando los valores propios obtenidos en el PCoA.

### Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos se realizó en QIIME y en R. Para trabajar con datos normalizados, se analizó un número igual de secuencias para todos los grupos. La prueba de Shapiro-Wilk se utilizó para comprobar la normalidad de la distribución de datos. Los datos paramétricos con distribución normal se compararon mediante la prueba t de Student para datos pareados o no emparejados. Ante datos no paramétricos, la prueba de los rangos con signo de Wilcoxon fue utilizada para datos pareados y la prueba U de Mann-Whitney para datos no pareados. La prueba de varianza de Kruskal-Wallis se utilizó para comparar el número medio de secuencias de los grupos, es decir, el de diferentes

grupos de pacientes basados en parámetros distintos con el de sanos, a distintos niveles taxonómicos. El test de Friedman se utilizó para medidas repetidas y pareadas de análisis de varianza. Se utilizó el análisis mixto de varianza (ANOVA), un diseño mixto ANOVA, para tener en cuenta que las mediciones repetidas se recogen en un estudio longitudinal en el que se evalúa el cambio a lo largo del tiempo. Realizamos análisis con la técnica no paramétrica ANOVA multivariado (NPMANOVA), un análisis de varianza no paramétrico, para probar las diferencias en la composición de la comunidad microbiana. Aplicamos la regresión lineal del análisis multivariante para encontrar asociaciones entre metadatos clínicos (edad, índice de masa corporal (IMC), sexo, hábito de fumar, consumo de medicamentos y localización de la enfermedad) y la abundancia de la comunidad microbiana. Cuando fue posible, el análisis proporcionó el *false discovery rate* (FDR) para evitar el error tipo I en las comparaciones múltiples (FDR <0,05 es considerado significativo).

## Resultados

### Descripción demográfica global

Se reclutaron un total de 12 voluntarios con 5 muestras a lo largo del tiempo cada uno, obteniendo un total de 84 muestras para dicho grupo. Los datos clínicos se muestran en la tabla 16.

**Tabla 16.** Datos clínicos de voluntarios sanos

N	Edad media	Género	IMC
12	37.6 (18–63, SD=13)	7M/5H	23.7 (SD=3.4)

En el grupo de colitis ulcerosa se reclutaron un total de 11 pacientes, con 5 muestras a lo largo del tiempo cada uno, las características demográficas de los mismos se presentan en la tabla 17. En un paciente se extraviaron 2 muestras, generando un total de 53 muestras. En total se obtienen 137 muestras. Las colonoscopias de todos los pacientes incluidos fueron normales. Tras la preparación un paciente presentó un brote de actividad, precisando de tratamiento con corticoides tópicos, y posteriormente de corticoides orales. Sus muestras fueron incluidas en el análisis.

**Tabla 17.** Características demográficas pacientes con CU.

<b>Variable</b>	<b>Grupo CU N=11</b>
<b>Edad, años</b>	37.5±11.4
<b>Sexo, varón</b>	3 (27%)
<b>Hábito tabáquico</b>	
Fumador	1 (25%)
No-fumador	6 (46%)
Ex-fumador	4 (28%)
<b>Edad de debut, años</b>	27.5±2.6
<b>Extensión</b>	
Colitis izquierda	4 (36.3%)
Pancolitis	7 (63.6%)
<b>Tiempo de evolución (años)</b>	10.3±7.5
<b>Tratamiento</b>	
Combinado	8 (73%)
Monoterapia	2 (18%)
Combinado + aféresis	1 (9%)
<b>Manifestaciones extra-intestinales</b>	2 (18%)
<b>Brote tras colonoscopia</b>	Sí 1 (9%)

#### Descripción de los datos de secuencias globales

Se analizó la microbiota de 137 muestras. Se describen un total de 3.892.300 (casi 4 millones) de secuencias de alta calidad con un número de pares de bases de 314, empleando Phred score de 20, con 558 OTUs (o especies). La media de secuencias por muestra fue de 28410 (DE 7844.144), con un mínimo de secuencias de 3337 y un máximo de 46751. Con el fin de comparar la comunidad microbiana entre las muestras, se procede a normalizar las secuencias a 3337 por muestra (ajuste según la muestra con el menor número de secuencias).

#### Descripción de los efectos del PEG sobre la microbiota de los sujetos sanos

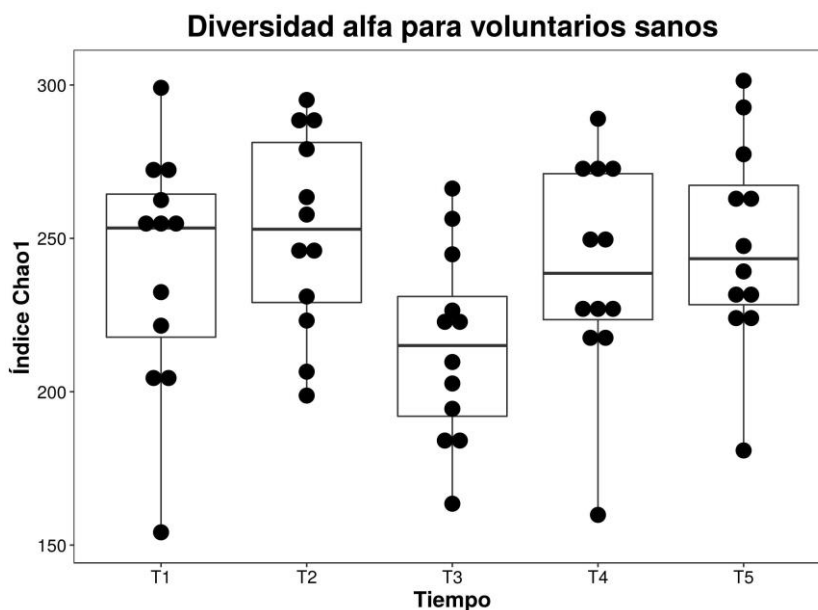
De forma global, en los 12 individuos sanos se detectaron un total de 10 filos, 52 familias, 88 géneros y 474 especies (Tabla 18). Los grupos más abundantes a nivel de filo fueron Firmicutes y a nivel de especie Ruminococcus.

**Tabla 18.** Distribución de grupos microbiológicos en sanos a distintos niveles taxonómicos.

Grupo taxonómico	Grupos microbiológicos detectados en sanos	Grupo más abundante en sanos
Filum	10	Firmicutes
Clase	20	Clostridia
Orden	26	Clostridiales
Familia	52	Ruminococcaceae
Género	88	Lachnospiraceae;g__
Especie	474	Ruminococcus; s__bromii

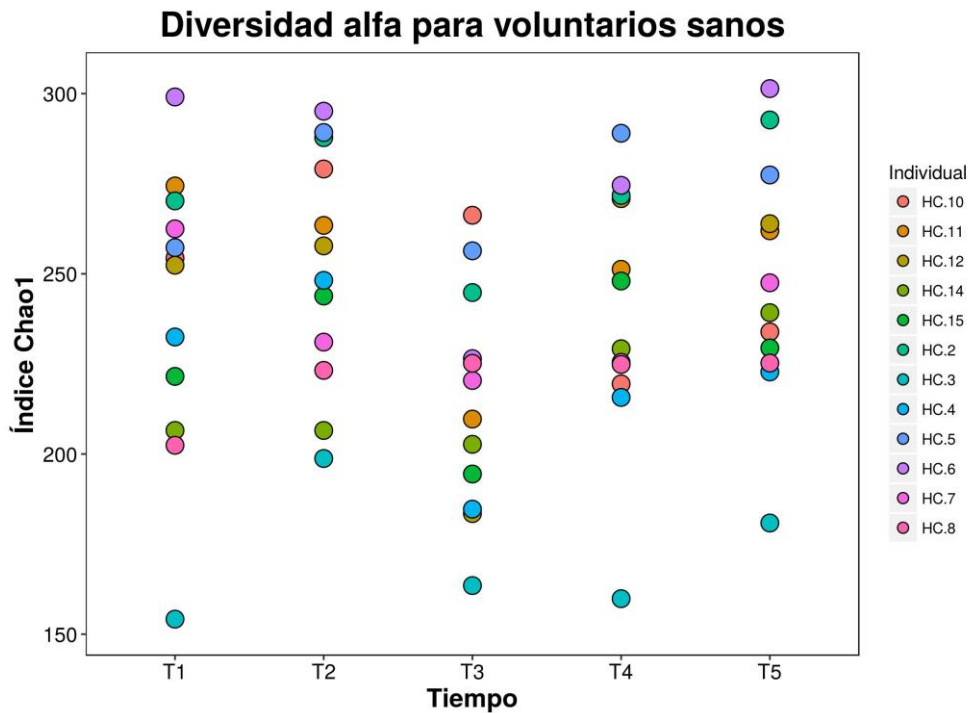
A nivel de diversidad alfa o intra-muestra expresada mediante el índice Chao, que tiene en cuenta la riqueza y la abundancia relativa, apreciamos un descenso en el tiempo 3, (tras la limpieza con PEG) sin que éste alcance la significación estadística ( $p=0.567$ , T3 vs T5; t-test). Posteriormente, la riqueza y abundancia microbiológicas, tienden a recuperarse a tiempo 5 (+60 días).

**Figura 32.** Índice Chao1 basado en OTU a nivel de especie se estimó para los diferentes tiempos de los controles sanos. Se aprecia un descenso en el Índice de Chao1 en el tiempo 3



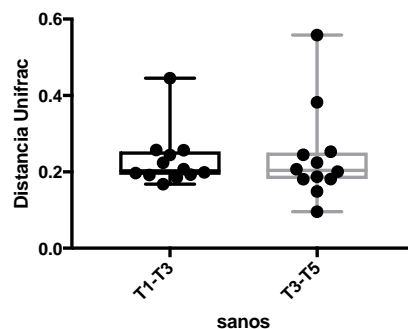
Si analizamos gráficamente la diversidad alfa, a través del Índice Chao por individuo, apreciamos, cómo hay una tendencia individual al descenso en el tiempo 3. Este descenso tiene lugar de forma similar en pacientes con Índice Chao basales elevados, intermedios o bajos (figura 33).

**Figura 33.** Índice de Chao1 basado en OTU a nivel de especie se estimó para los diferentes tiempos de los controles sanos. Descenso en el Índice de Chao1 en el tiempo 3.



En relación al efecto del PEG sobre la microbiota, desde el punto de vista de la distancia filogenética, no se aprecian variaciones en las distancias unifrac intraindividuo (fig. 34).

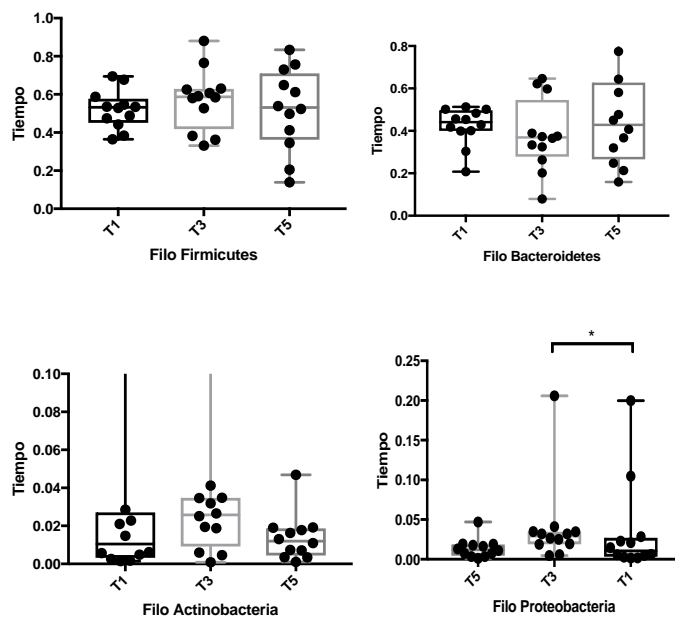
**Figura 34.** Distancias Unifrac no ponderadas intra-sujeto para la población de sujetos sanos para los tiempos T1-T3 y T3-T5.



Desde un punto de vista taxonómico, si analizamos la evolución de la abundancia relativa de los filos más abundantes a lo largo de los tiempos T1, T3 y T5, se aprecia tras la administración del PEG un descenso del filo Bacteroidetes y

un aumento de los filos Firmicutes, Actinobacteria y Proteobacteria (figura 35). Existe una tendencia a la recuperación posterior (tiempo 5) de todos ellos.

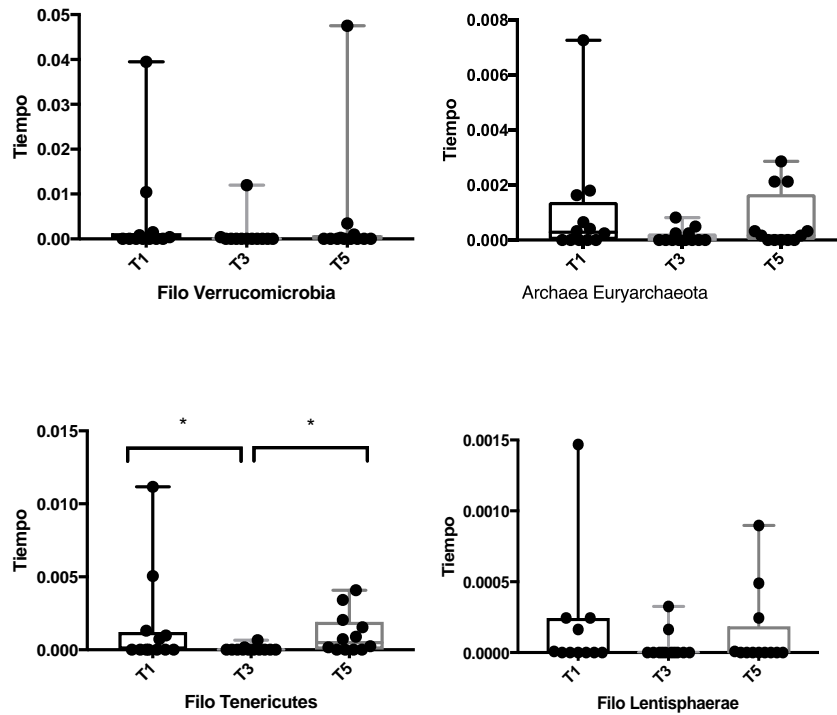
**Figura 35.** Composición microbiológica en voluntarios sanos a nivel de los filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria según secuencias 16S. T1: -30 días, T3: primera tras preparación, T5: + 60 días. (\*) Test de Friedman,  $X^2=10.5$ ,  $p=0.0052$ , alcanzando únicamente diferencias significativas en el filo Proteobacteria entre los tiempos T3 y T5 (prueba de los rangos de Wilcoxon,  $Z=2.483$ ,  $p=0.0015$ ).



En contraposición, cabe destacar un descenso global en los filos menos abundantes como Verrucomicrobia, a la que pertenece (*Akkermansia muciniphila*), Archaea Euryarchaeota y Lentisphaerae (del que sólo se conoce la especie *Victivallis vadensis*). En todos los grupos existe una tendencia a la recuperación en tiempo 5. En ningún caso se alcanzó la significación estadística. En el caso del filo Tenericutes existe un descenso significativo entre los tiempos T1 y T3 y con recuperación posterior, entre los tiempos T3 y T5 (test de Friedman,  $\chi^2(3)=7.75$ ,  $p=0.0208$ ; prueba de los rangos de Wilcoxon T1-T3,  $Z=0,1626$ ,  $p=0.06$ ;  $Z=-2.486$ ,  $p=0.00117$ ) (fig. 36).

**Figura 36.** Composición microbiológica a nivel de filos Verrucomicrobia, Archaea Euryarchaeota, Tenericutes, Lentisphaerae en voluntarios sanos según secuencias 16S. T1: -30 días, T3: primera tras

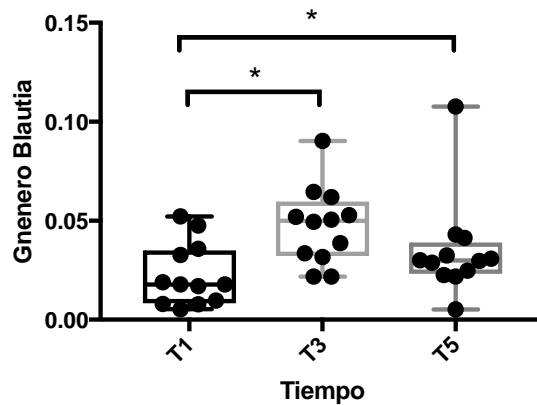
preparación, T5: + 60 días. (\*) En el caso del filo *Tenericutes* existe un descenso significativo entre los tiempos T1 y T3 y entre los tiempos T3 y T5 (test de Friedman,  $\chi^2(3)=7.75$ ,  $p=0.0208$ ; prueba de los rangos de Wilcoxon T1-T3  $Z= 0,1626$ ,  $p=0.06$ ;  $Z= -2.486$ ,  $p=0.00117$ )



Profundizando hacia estratos más profundos, como géneros y especies productores de butirato, es destacable el comportamiento del género *Blautia*. Se trata de uno de los más abundantes del intestino humano, conformando hasta el 16% del total de la microbiota humana. Posee capacidad de producir acetato y está incrementado en pacientes con con síndrome de intestino irritable. El género *Blautia* aumenta de forma significativa tras lavado con PEG, descendiendo a los valores de abundancia relativa previos en T5. Se detectan diferencias significativas (test de Fiedman,  $\chi^2(3)=11.6$ ,  $p = 0.003$ ) entre los tiempos T1 y T3 (prueba de los rangos de Wilcoxon,  $Z=-3.003$ ,  $p=0.0024$ ), T1 y T5 (prueba de los rangos de Wilcoxon,  $Z=1.965$ ,  $p=0.01$ ).

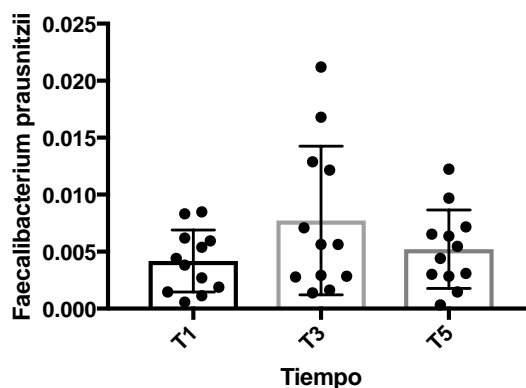
**Figura 37.** Abundancia relativa del genero *Blautia* en sanos según secuencias 16S. T1: -30 días, T3: primera tras preparación, T5: + 60 días. (\*) Test de Fiedman,  $\chi^2(3)=11.6$ ,  $p = 0.003$ , entre los tiempos T1 y T3: prueba de los rangos de Wilcoxon,  $Z=-3.003$ ,  $p=0.0024$ , T1 y T5: prueba de los rangos de Wilcoxon,  $Z=1.965$ ,  $p=0.01$ .





*Faecalibacterium prausnitzii*, pertenece al filo Firmicutes, clase Clostridia, familia Ruminococcaceae también una de las especies más abundantes del intestino humano y productoras de butirato, con propiedades antiinflamatorias. Se aprecia una tendencia al aumento tras la preparación con PEG, recuperándose posteriormente, pero sin alcanzar la significación estadística (test de Friedman,  $\chi^2(3)=2.16$ ,  $p = 0.33$ ). El motivo para la explicación de dicho aumento podría ser explicado por el hecho de que *Faecalibacterium prausnitzii* es una bacteria que habita en íleon, por tanto, la limpieza colónica explicaría su paso a zonas más proximales del intestino.

**Figura 36.** Abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* en sanos según secuencias 16S. T1: -30 días, T3: primera tras preparación, T5: + 60 días.



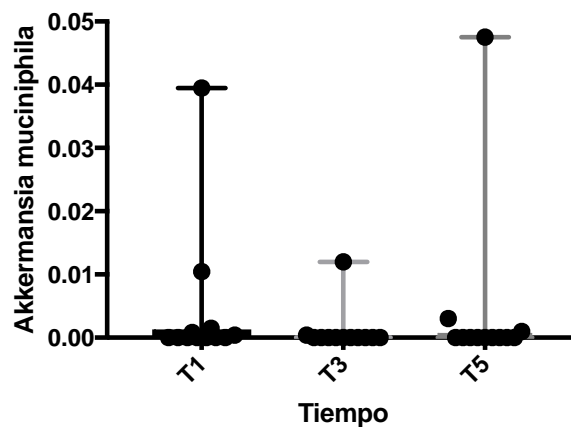
*Akkermansia muciniphila* pertenece al filo Verrucomicrobia. Es un micro-organismo comensal que coloniza la capa de moco del colon. Tiene la capacidad

de utilizar la mucina del colon como sustrato. *Akkermansia muciniphila* se detectó en 7 de los 12 individuos en el periodo basal, pero sólo en 2 de las muestras en T4 y en 3 de las muestras de T5. Media ( $\pm$ SEM) de abundancia relativa (T1  $0.42\pm 0.5$ ; T3  $0.16\pm 0.38$ ; T5  $0.25\pm 0.45$ ). Si analizamos la abundancia relativa, apreciamos, de forma similar, un descenso no significativo (test de Fiedman,  $\chi^2(3)=1.77$ ,  $p = 0.41$ ).

**Tabla 18.** Presencia o ausencia de *Akkermansia muciniphila* (Akk). Media y SEM. SEM: desviación estándar.

	T1	T3	T5
Akk-	7	10	9
Akk+	5	2	3
Media y SEM	$0.42\pm 0.16$	$0.16\pm 0.18$	$0.25\pm 0.45$

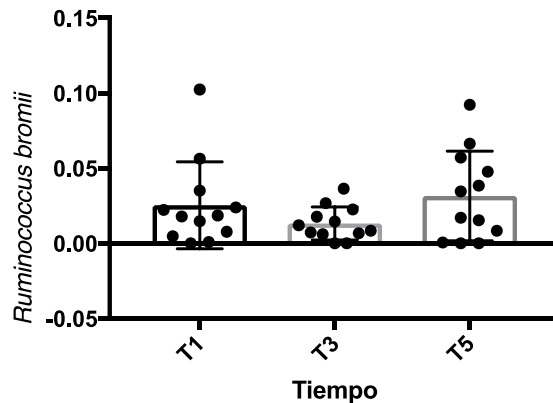
**Figura 37.** Abundancia relativa de *Akkermansia muciniphila* en sanos según secuencias 16S. T1: -30 días, T3: primera tras preparación, T5: + 60 días.



La familia *Lachnospiraceae* pertenece a la clase Clostridia, filo Firmicutes. A ella pertenece *Ruminococcus bromii*, una de las especies más abundantes del intestino humano. Es el mayor degradador de almidón y producción de butirato, y por tanto muy beneficiosa. Si analizamos su comportamiento en relación a la limpieza colónica con PEG en sanos, se detecta un descenso de su abundancia relativa, recuperándose posteriormente (test de Fiedman,  $\chi^2(3)=3.1$ ,  $p = 0.21$ ).

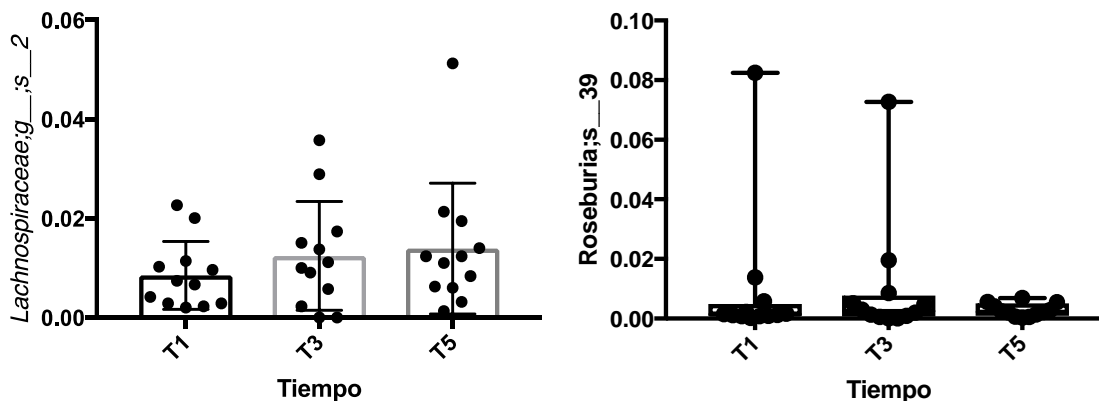
**Figura 38.** Abundancia relativa de *Ruminococcus bromii* en sanos según secuencias 16S. T1: -30 días,

T3: primera tras preparación, T5: + 60 días.



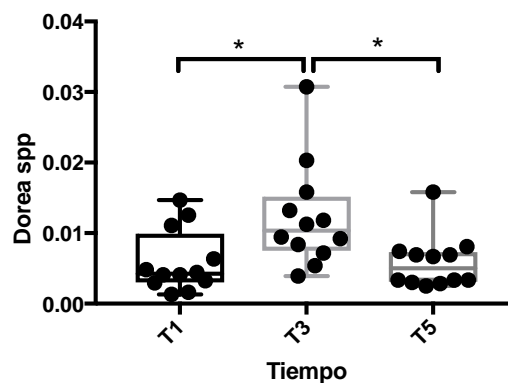
En nuestros pacientes sanos, la especie identificada como más abundante de pertenece la familia *Lachnospiraceae*, es indentificada como g\_\_s\_\_2. Muestra una tendencia al aumento tras la preparación con PEG (test de Fiedman,  $\chi^2(3)=1.16$ ,  $p = 0.55$ ). La siguiente especie más abundante en nuestra muestra de voluntarios sanos es *Roseburia*;s\_\_39, productora de butirato, perteneciente, como la anterior, al filo Firmicutes, clase Clostridia, familia *Lachnospiraceae*. Parece que permanece permanece inalterada tras la toma de PEG en sanos (test de Fiedman,  $\chi^2(3)=0.5$ ,  $p = 0.55$ ).

**Figura 39.** Abundancia relativa de *Lachnospiraceae*, g\_\_s\_\_2, *Roseburia*;s\_\_39 en sanos según secuencias 16S. T1: -30 días, T3: primera tras preparación, T5: + 60 días.



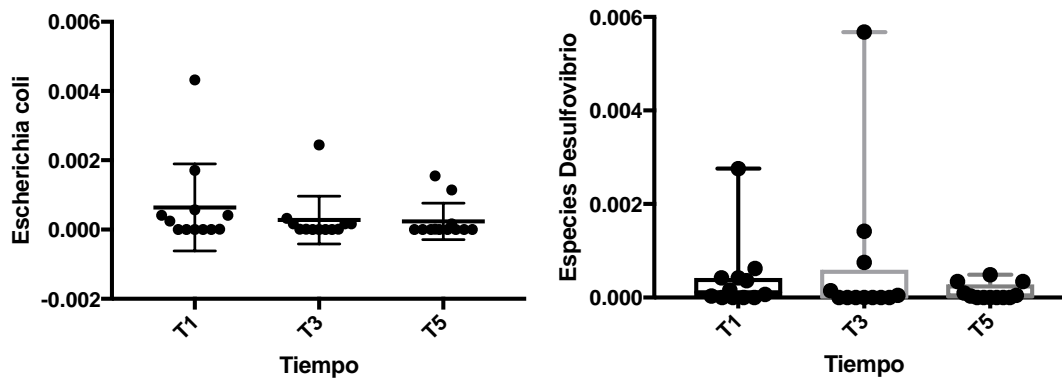
Las especies de *Dorea* pertenecen a familia Lachnospiraceae y son los los principales productores de gas a nivel intestinal habiéndose demostrado un aumento en pacientes afectos de SII (119). En pacientes sanos se identifica un aumento significativo de especies *Dorea* tras la administración del PEG con una recuperación posterior (test de Fiedman,  $\chi^2(3)=10$ ,  $p = 0.0065$ ). Al comparar los tres tiempos se detectan diferencias significativas entre los tiempos T1 y T3 (fig. 40).

**Figura 40.** Abundancia relativa de *Dorea spp.* en sanos según secuencias 16S. T1: -30 días, T3: primera tras preparación, T5: + 60 días. (\*) Test de Fiedman,  $\chi^2(3)=10$ ,  $p = 0.0065$ . Al comparar los tres tiempos se detectan diferencias significativas entre los tiempos T1 y T3 (prueba de los rangos de Wilcoxon,  $Z=-3.231$ ,  $p=0.02$ ), T3 y T5 (prueba de los rangos de Wilcoxon,  $Z=-2.9$ ,  $p=0.001$ ).



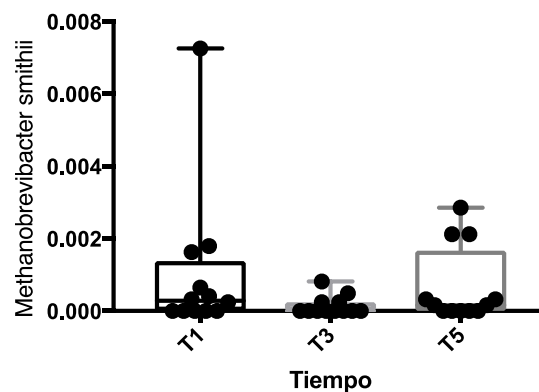
Tras el análisis de grupos productores de butirato, se analizarán los datos de determinadas especies consideradas patógenas, como la especie *Escherichia coli*. Ésta tiende al descenso en sanos sin recuperación posterior (test de Fiedman,  $\chi^2(3)=1.5$ ,  $p = 0.25$ ). En relación a las especies especies *Desulfovibrio*, se han reportado abundancias alteradas en la colitis ulcerosa. Nosotros apreciamos en sanos, un discreto descenso tras la administración del PEG sin recuperación posterior, sin alcanzar la significación estadística (test de Fiedman,  $\chi^2(3)=3.2$ ,  $p = 0.2$ ). La especie *Desulfovibrio desulfuricans* no se detecta en nuestros voluntarios sanos.

**Figura 41.** Abundancia relativa de *Escherichia coli* y especies *Desulfovibrio* en sanos según secuencias 16S. T1: -30 días, T3: primera tras preparación, T5: + 60 días.



Si analizamos la abundancia de *Methanobrevibacter smithii*, una bacteria metanogénica, se aprecia un descenso no significativo test de Fiedman,  $\chi^2(3)=4.3$ ,  $p = 0.11$ ) (Figura 42).

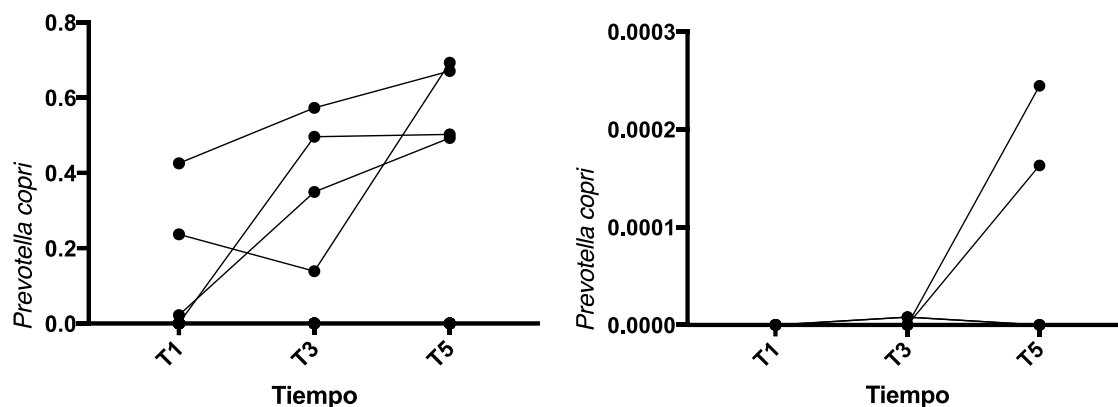
**Figura 42.** Abundancia relativa de *Methanobrevibacter smithii* en sanos según secuencias 16S. T1: -30 días, T3: primera tras preparación, T5: + 60 días.



*Prevotella copri* pertenece al filo Bacteroidetes, clase Bacteroidetes. Se ha podido indentificar en mayor cantidad en pacientes con artritis reumatoide en comparación con individuos sanos, si bien no se puede establecer un vínculo definitivo. Esta especie podría causar una reducción de otras especies beneficiosas. Un estudio realizado en ratones mostró que los ratones colonizados con *Prevotella copri* tenían una enfermedad más grave que los ratones control (120). Curiosamente esta bacteria, a diferencia de la tendencia general, tiende a aumentar tras la preparación con PEG (test de Fiedman,  $\chi^2(3)=3.2$ ,  $p = 0.19$ ). En el

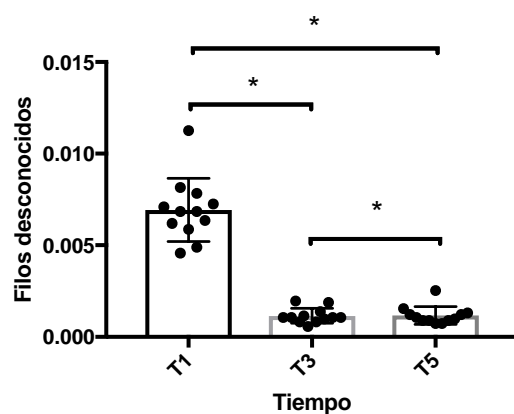
grupo de pacientes cuyos recuentos eran inexistentes a nuestro nivel profundidad de secuenciación también se aprecia un aumento de la abundancia de *Prevotella copri* (test de Fiedman,  $\chi^2(3)=2$ ,  $p = 0.5$ ).

**Figura 42.** a. Abundancia relativa de *Prevotella copri* en sanos a través de los tiempos T1, T3 y T5. b. Abundancia relativa de *Prevotella copri* en sanos a través de los tiempos T1, T3 y T5 en sanos, con recuentos basales de 0.



Si exploramos la abundancia relativa de secuencias bacterianas que no pueden adscribirse fillos conocidos apreciamos como, tras la administración de PEG, existe una tendencia al descenso, con diferencias significativas de forma global (test de Fiedman,  $\chi^2=18.43$ ,  $p < 0.0001$ ), identificando diferencias entre los distintos tiempos T1, T3 (prueba de los rangos de Wilcoxon,  $Z=$ ,  $p=0.0005$ ). No existe, sin embargo, tendencia a la recuperación tras la administración del PEG (T3 vs T5 prueba de los rangos de Wilcoxon,  $Z=$ ,  $p=0.0005$ ).

**Figura 43.** Abundancia relativa de fillos desconocidos en sanos según secuencias 16S. T1: -30 días, T3: primera tras preparación, T5: + 60 días. (\*) (test de Fiedman,  $\chi^2=18.43$ ,  $p < 0.0001$ ), identificando diferencias entre los distintos tiempos T1, T3 (prueba de los rangos de Wilcoxon,  $Z=$ ,  $p=0.0005$ ). No existe, sin embargo, tendencia a la recuperación tras la administración del PEG (T3 vs T5 prueba de los rangos de Wilcoxon,  $Z=$ ,  $p=0.0005$ ).



Cabe destacar que con nuestro nivel de detección no identificamos especies bacterianas sí identificadas mediante metagenómica, como *Ureaplasma urealyticum*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Clostridium butiricum*.

#### Descripción de los efectos del PEG sobre la microbiota de pacientes afectos de colitis ulcerosa

En los 11 pacientes con CU, se detectaron 9 filos conocidos, 43 familias, 79 géneros y 352 especies, con media de especies por muestra de 95.5 con (DE de 26.4).

El 96% de las secuencias pertenecían a los filos Firmicutes y Bacteroidetes, el 3% pertenecían a los filos Proteobacteria y Actinobacteria.

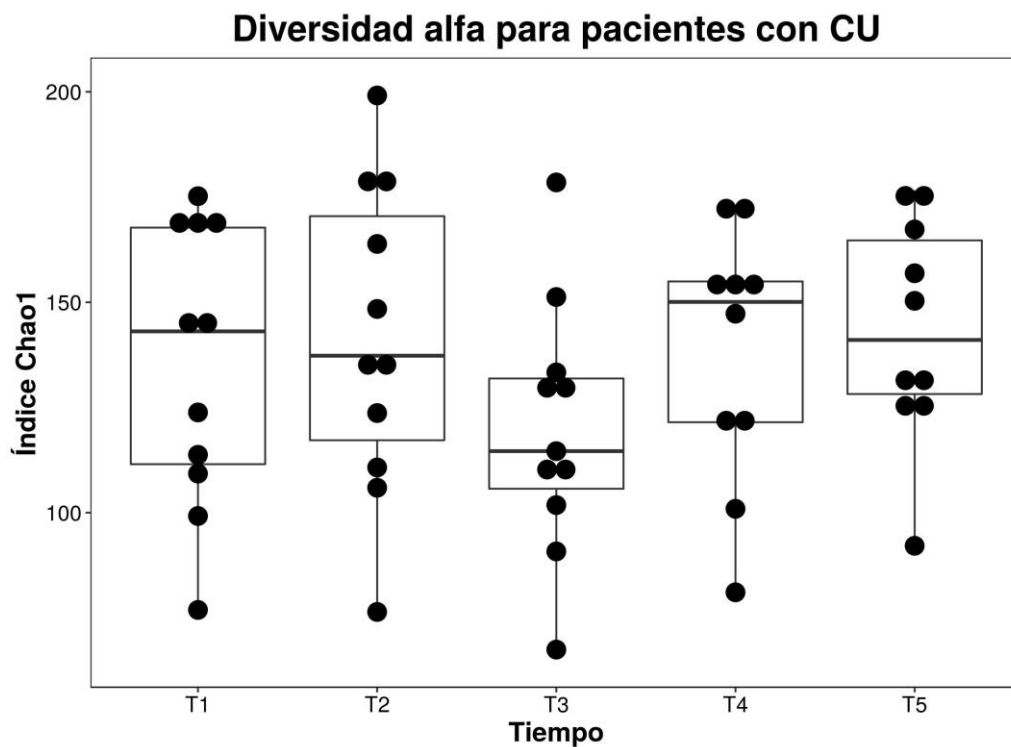
**Tabla 19.** Distribución de grupos microbiológicos a distintos niveles taxonómicos.

Grupo taxonómico	Grupos microbiológicos detectados	Grupo más abundante
Filum	8	Firmicutes
Clase	16	Bacteroidia
Orden	21	Clostridiales
Familia	43	Bacteroidaceae
Género	79	Lachnospiraceae;g__
Especie	352	<i>Ruminococcaceae</i> ;g__; <i>s__3</i>

Si analizamos el Índice Chao, marcador de diversidad y abundancia relativa, apreciamos un descenso en el tiempo 3, es decir tras la limpieza con PEG, sin alcanzar la significación estadística ( $p=0.69$ , T3 vs T5 ; t-test). Posteriormente, la

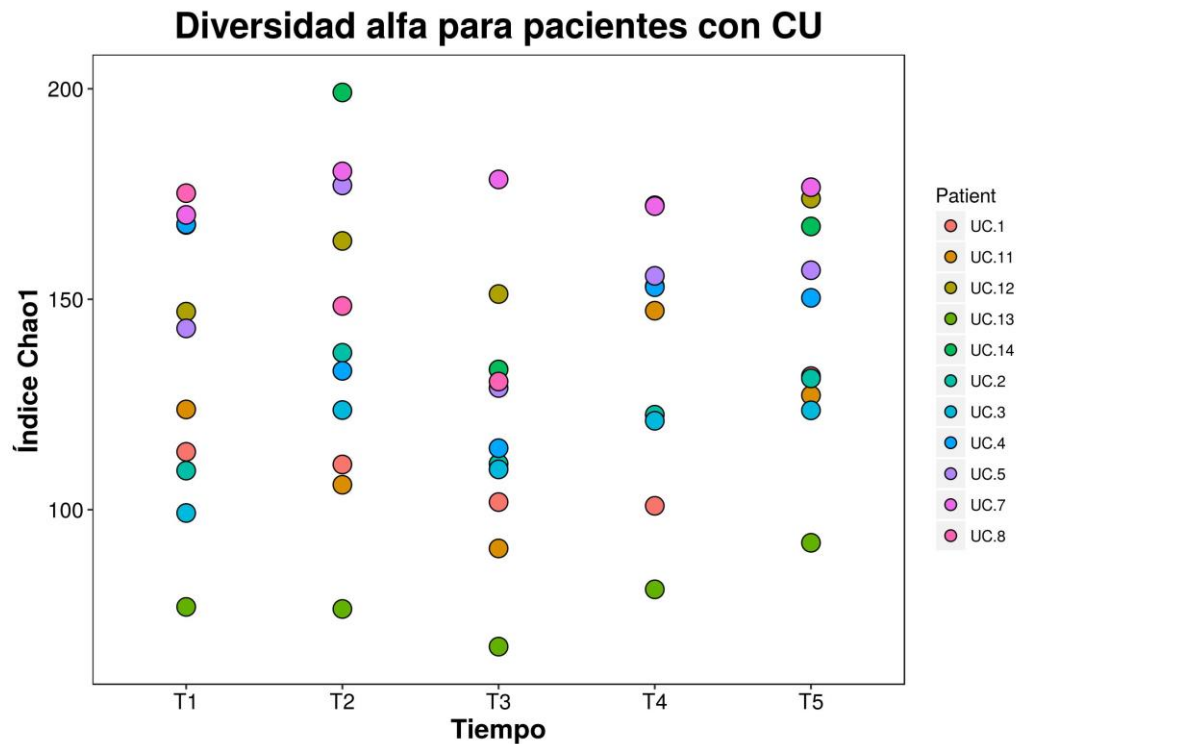
riqueza y abundancia microbiológicas, tienden a recuperarse a tiempo 5 (+60 días). Se trata del mismo comportamiento que en sanos. Si analizamos los pacientes de forma individual, todos ellos, independientemente de la riqueza basal muestran un descenso en T3 (fig. 45).

**Figura 44.** Descenso en el Índice de Chao1 en el tiempo 4. Índice de Chao1 basado en OTU a nivel de especie se estimó para los diferentes tiempos en pacientes con colitis ulcerosa.



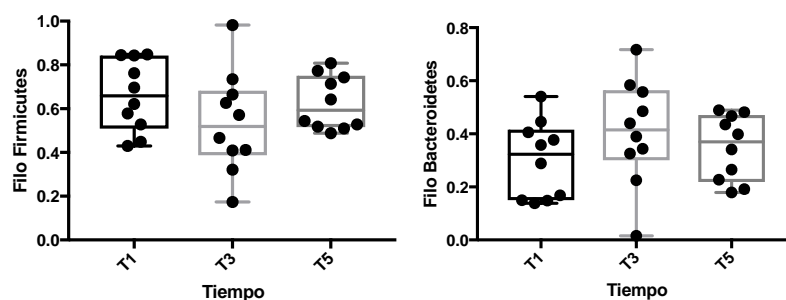
**Figura 45.** Descenso en el Índice de Chao1 en el tiempo 4. Índice de Chao1 basado en OTU a nivel de especie se estimó para los diferentes tiempos de los pacientes con CU.

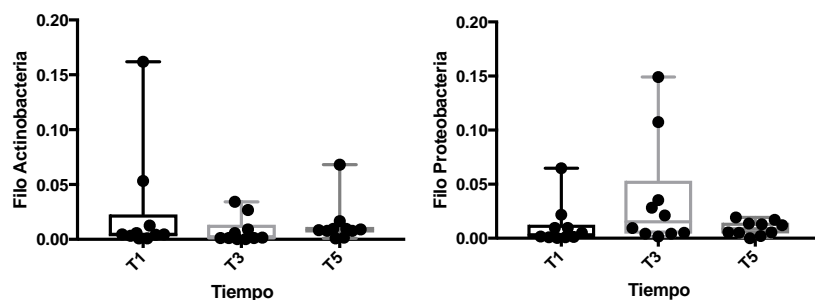




En relación a los filos más abundantes, tras la preparación con PEG, se identificó, a nivel de filo, un descenso en Firmicutes y Actinobacteria, con un aumento de Proteobacteria y Bacteroidetes. Ninguno de estos datos alcanzaron la significación estadística (Fig. 46). Existe una tendencia a la recuperación posterior (tiempo 5) de todos ellos.

**Figura 46.** Composición microbiológica en pacientes con CU a nivel de filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Proteobacteria según secuencias 16S. T1: -30 días, T3: primera tras preparación, T5: + 60 días.

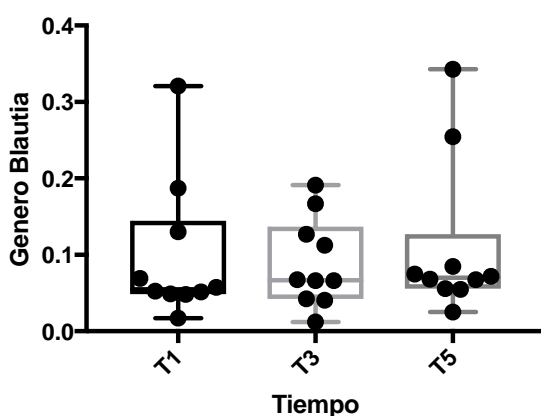




No se identifican los filos Verrucomicrobia (*Akkermansia muciniphila* y *Prostheco bacter fluviatilis*) ni Lentisphaerae. Los filos Archaea Euryarchaeota y Tenericutes únicamente se identifican en un paciente.

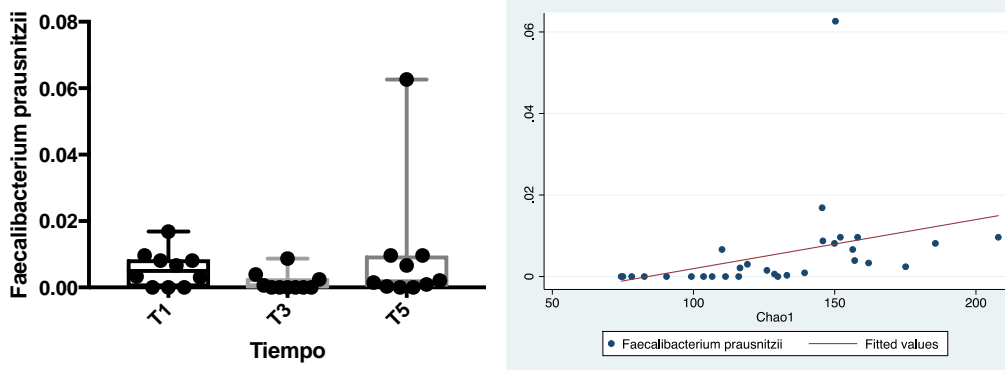
El género *Blautia* prácticamente no se modifica tras el lavado con PEG.

**Figura 47.** Composición microbiológica en pacientes con CU a nivel del género *Blautia* según secuencias 16S. T1: -30 días, T3: primera tras preparación, T5: + 60 días.



Especies muy abundantes, como *Faecalibacterium prausnitzii*, tiende a descender en pacientes con CU tras la administración de PEG, sin alcanzar la significación estadística. Existe una correlación positiva entre el índice Chao1 y la abundancia relativa de *FP* (coef Rho de 0.7,  $p > 0.0000$ ).

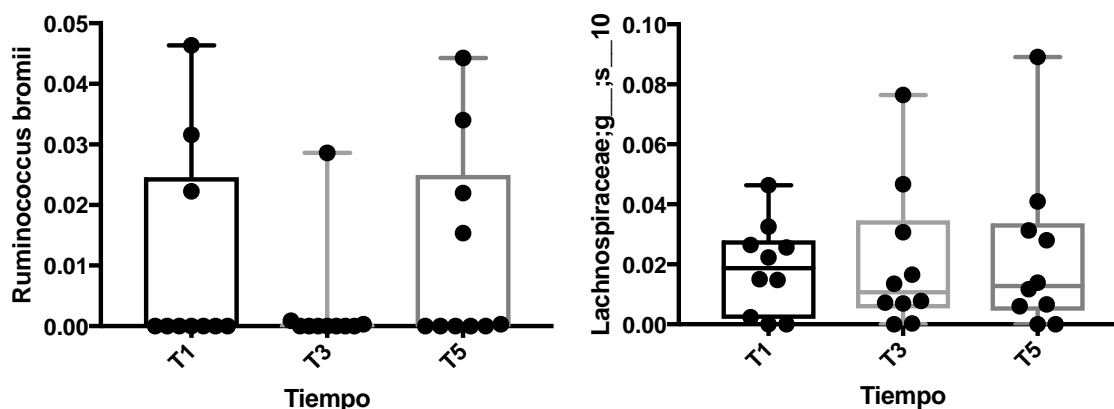
**Figura 48.** a. Abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* en pacientes con CU según secuencias 16S. T1: -30 días, T3: primera tras preparación, T5: + 60 días. b. Correlación positiva entre Chao1 y abundancia de *FP*.



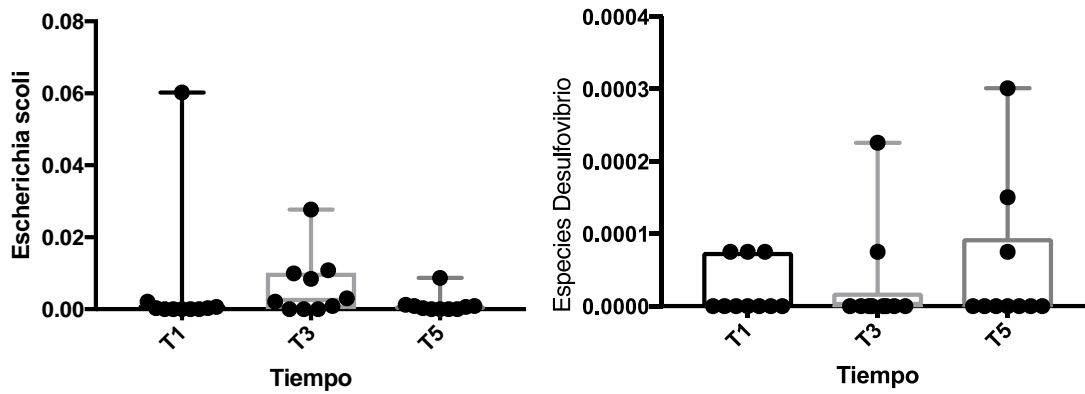
No es posible identificar *Akkermansia muciniphila* con nuestro nivel de detección en pacientes afectos de CU.

*Ruminococcus bromii*, bacteria que realiza fermentación sacarolítica y produce butirato, tiende también al descenso con recuperación posterior en paciente con CU tras PEG, de forma similar a los sanos y sin alcanzar la significación (test de Fiedman,  $\chi^2(3)=3.5$ ,  $p=0.2$ ). *Lachnospiraceae*;g\_\_s\_\_10 y *Roseburia*;s\_\_39 se mantienen inalteradas tras el PEG. No se ha podido indentificar la presencia de *Roseburia hominis*, bacteria deficitaria en pacientes afectos de CU(121).

**Figura 50.** Abundancia relativa de *Lachnospiraceae*, g\_\_s\_\_2, *Roseburia*;s\_\_39 y *Ruminococcus bromii* en pacientes con CU según secuencias 16S. T1: -30 días, T3: primera tras preparación, T5: + 60 días.

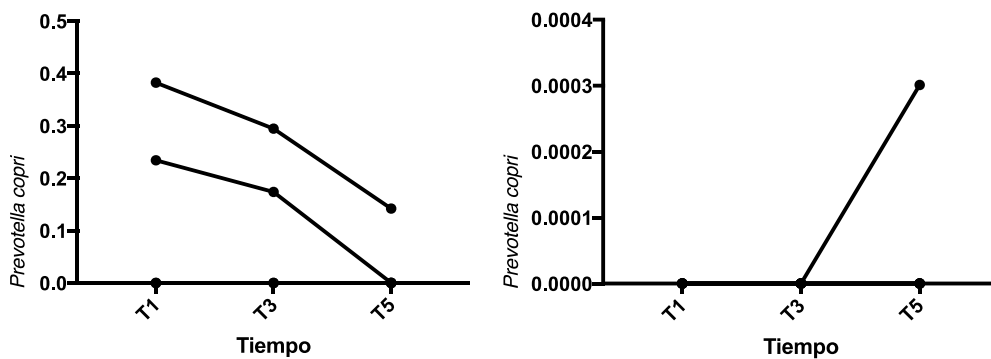






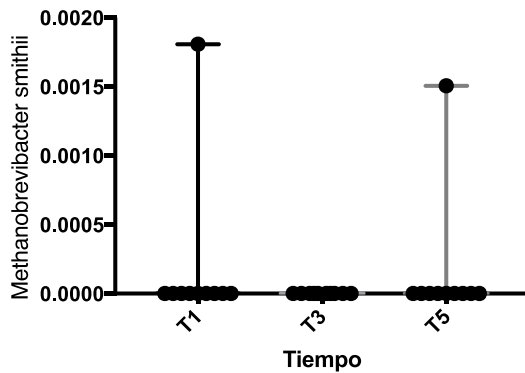
*Prevotella copri* tiende a disminuir discretamente, en aquellos que previamente estaban colonizados.

**Figura 53.** a. Abundancia relativa de *Prevotella copri* en pacientes con CU a través de los tiempos T1, T3 y T5. b. Abundancia relativa de *Prevotella copri* en pacientes con CU a través de los tiempos T1, T3 y T5 en sanos, con recuentos basales de 0.



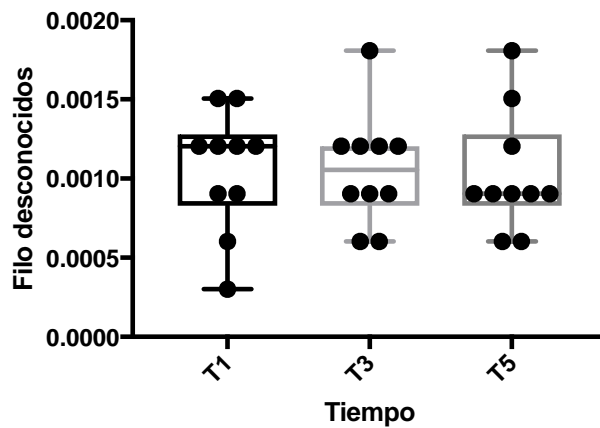
*Methanobrevibacter smithii* únicamente se identifica únicamente en 4 pacientes, en ellos tiende a disminuir tras el PEG, sin recuperación posterior.

**Figura 54.** Abundancia relativa de *Methanobrevibacter smithii* en CU a través de los tiempos 1, 3 y 5.



Los filios desconocidos no muestran grandes cambios tras la administración del PEG frente a lo reportado en sanos.

**Figura 55.** Abundancia relativa de Filios desconocidos en CU a través de los tiempos 1, 3 y 5.

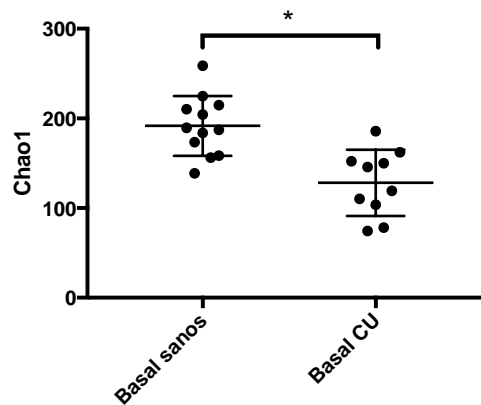


Comparación de los efectos del PEG sobre la microbiota en voluntarios sanos versus pacientes con CU

Hasta ahora se han valorado los efectos de la administración del PEG sobre la diversidad de la microbiota en sanos y en pacientes con CU por separado. En este apartado se compararán los efectos en voluntarios sanos frente a los pacientes afectados de CU.

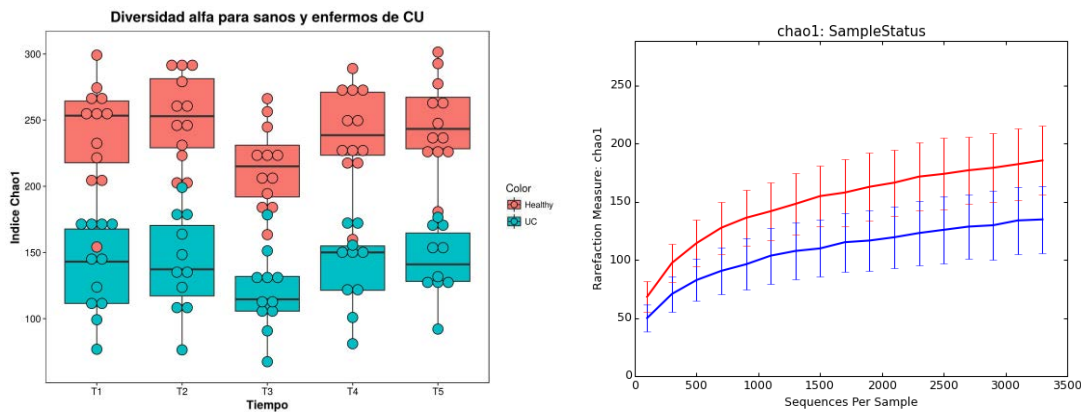
Cabe destacar, como ya se había descrito en la parte I de esta tesis y concordante con la evidencia científica previa(26), la menor diversidad de la microbiota intestinal basal (T1) entre paciente con CU en remisión vs voluntarios sanos. Efectivamente, si comparamos los índices Chao1 basales (T1) entre sanos y CU se aprecian diferencias significativas entre ambos ( $Z= -3.231, p=0.0006$ ) (fig 56).

**Figura 56.** Diversidad según el índice Chao1 en el T1 entre sanos y pacientes con CU. (\*)  $Z = -3.231$ ,  $p = 0.0006$ , según el test U de Mann Whitney.



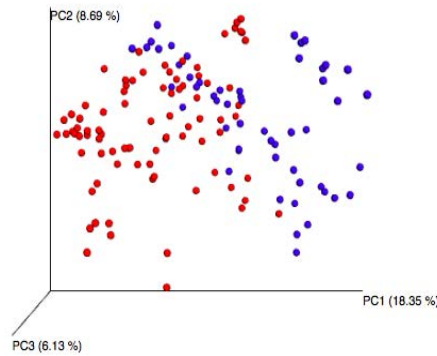
De forma global, las diferencias en la diversidad microbiana se mantienen a lo largo del período de administración del PEG, independientemente del efecto del mismo (fig. 57).

**Figura 57.** a. Diversidad según índice Chao1 para voluntarios sanos (rojo) y pacientes afectados de CU (azul). b. Curvas de rarefacción con índice Chao 1 según profundidad de secuenciación entre sanos (rojo) y pacientes con CU (azul).



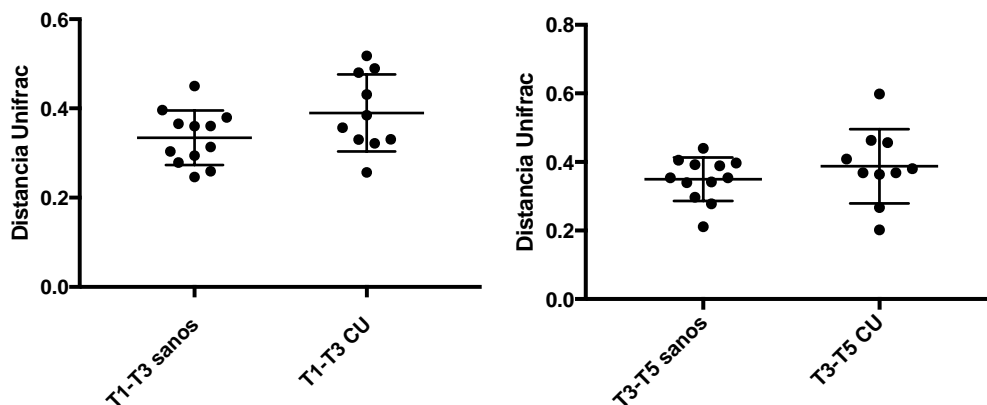
Si analizamos y las graficamos según el análisis de componentes principales, con el objeto de buscar algún tipo de agrupamiento se aprecian dos *clusters* claramente diferenciados para voluntarios sanos y para pacientes afectados de CU (fig.58).

**Figura 58.** Variabilidad en términos de microbiota entre pacientes afectados de CU (azul) y voluntarios sanos (rojo). Las comunidades se agruparon utilizando PCoA de la matriz de distancia UniFrac.



Desde un punto de vista filogenético, la diversidad en tanto a distancias Unifrac entre los voluntarios sanos y pacientes afectados de CU no varía de forma significativa (fig. 59).

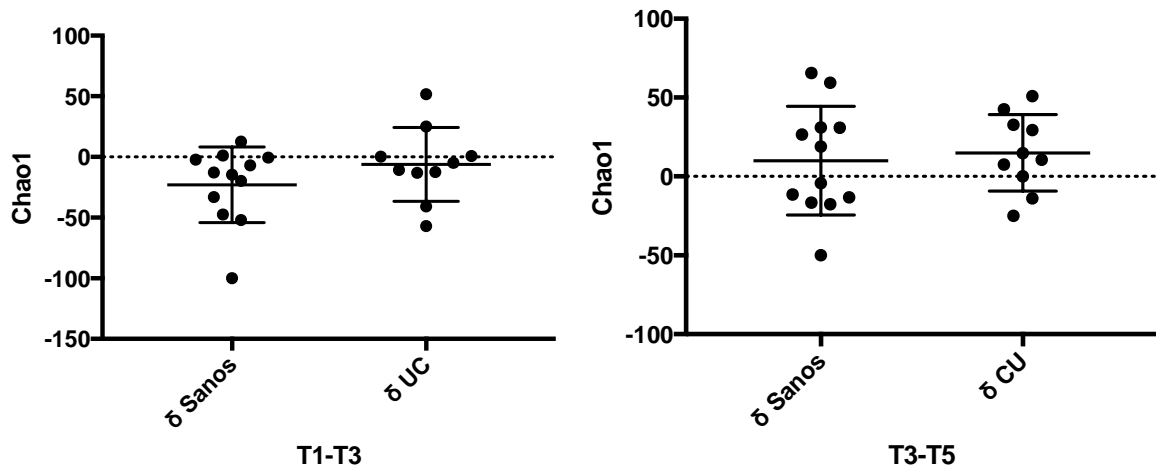
**Figura 59.** a. Distancias Unifrac no ponderadas e intra-sujeto para la población de sanos y para pacientes con CU para los tiempos T1-T3. b. Distancias Unifrac no ponderadas e intra-sujeto para la población de sanos y para pacientes con CU para los tiempos T3-T5.



Si tenemos en cuenta la magnitud de cambio ( $\delta$ ) del índice Chao1 como consecuencia de la administración del PEG en el grupo de voluntarios sanos y en el grupo de pacientes con CU, no se aprecian diferencias significativas entre los tiempos T1-T3 y los tiempos T3-T5, es decir, el PEG no tiene más efecto sobre la diversidad en uno u otro grupo (fig. 59).

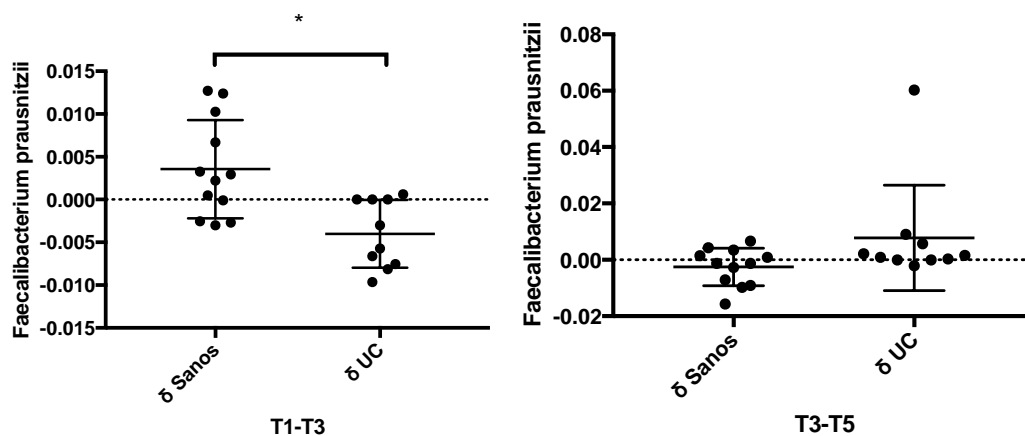
**Figura 59.** a. Cambios en el índice Chao1 en el grupo de sanos y en el grupo de CU entre los tiempos T1-T3 ( $p=0.3$ ). b. Cambios en el índice Chao1 en el grupo de sanos y en el grupo de CU entre los tiempos T3-T5 ( $p=0.7$ ).  $\delta$  sanos: magnitud del cambio de Chao1 en sanos.  $\delta$  CU: magnitud del cambio de Chao1 en pacientes con CU.





En relación la magnitud de cambio ( $\delta$ ) de la abundancia de determinadas especies como *Faecalibacterium prausnitzii* entre voluntarios sanos y pacientes con CU, se distinguen diferencias significativas entre ambos grupos para T1-T3 ( $Z=-2.773$ ,  $p=0.0044$ ), sin mantenerse las diferencias en los tiempos T3-T5. Es decir, el impacto sobre la abundancia de *Faecalibacterium prausnitzii* es diferente entre voluntarios sanos y pacientes afectados de CU (fig. 60).

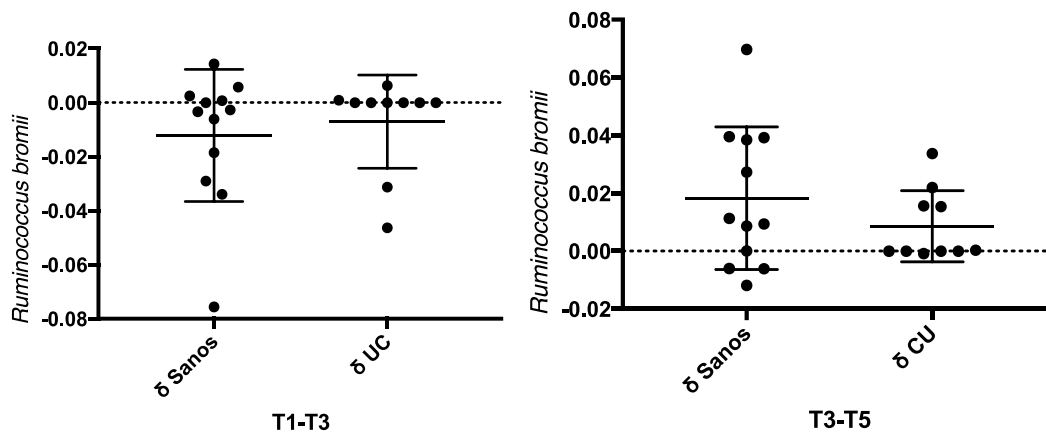
**Figura 60.** Cambios en la abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* en el grupo de sanos y en el grupo de CU entre los tiempos T1-T3 ( $Z=-2.773$ ,  $p=0.0044$ ). b. Cambios en la abundancia relativa de *Faecalibacterium prausnitzii* en el grupo de sanos y en el grupo de CU entre los tiempos T3-T5 ( $Z=-2.773$ ,  $p=0.0044$ ).  $\delta$  sanos: magnitud del cambio de abundancia de *Faecalibacterium prausnitzii* en sanos.  $\delta$  CU: magnitud del cambio de abundancia de *Faecalibacterium prausnitzii* en pacientes con CU.



En el caso de otras bacterias productoras de butirato, como *Ruminococcus bromii* la magnitud de los cambios que acontecen no cambian entre grupos (fig. 61). De forma similar ocurre con la abundancia de otras bacterias productoras de

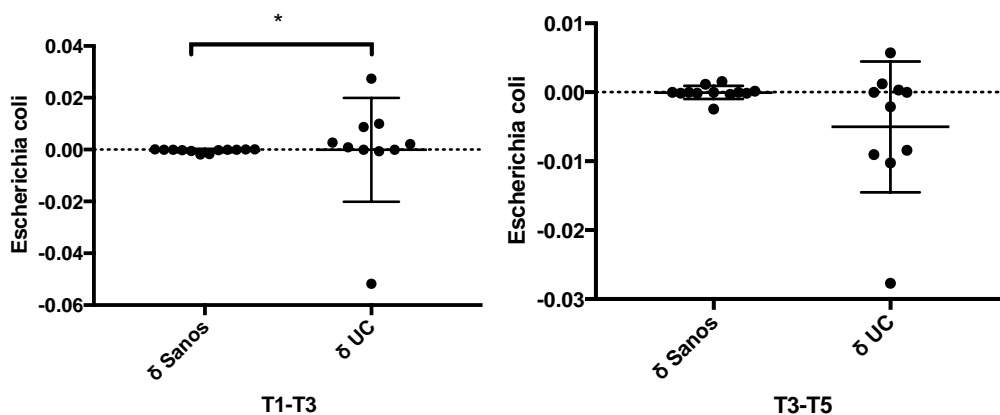
butirato, como *Lachnospiraceae*;g\_\_s\_\_10, Roseburia;s\_\_39 y el género Blautia.

**Figura 61.** Cambios en la abundancia relativa de *Ruminococcus bromii* en el grupo de sanos y en el grupo de CU entre los tiempos T1-T3, no se alcanza la significación estadística. b. Cambios en la abundancia relativa de *Ruminococcus bromii* en el grupo de sanos y en el grupo de CU entre los tiempos T3-T5, no se alcanza la significación estadística.  $\delta$  sanos: magnitud del cambio en sanos.  $\delta$  CU: magnitud del cambio en pacientes con CU.



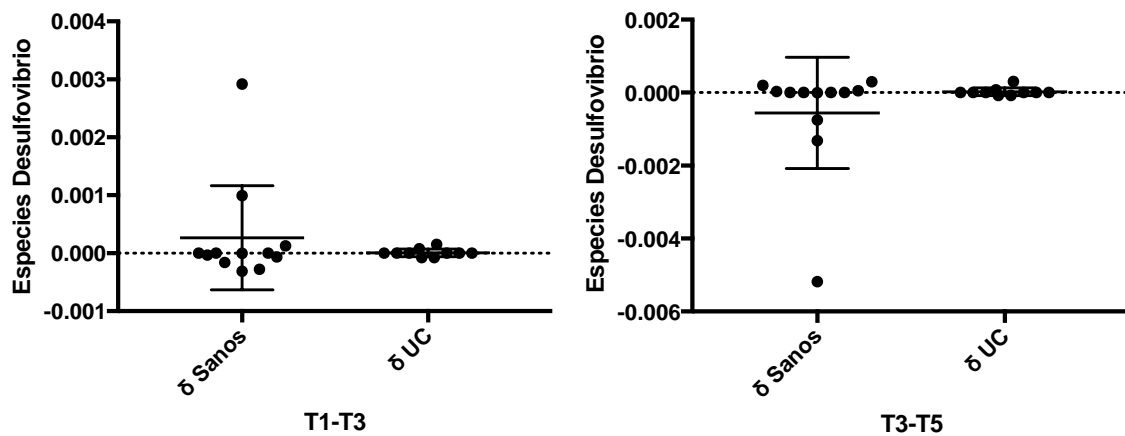
Analizando como se comporta la abundancia relativa de bacterias patógenas como *Escherichia coli*, la diferencia de rangos es mayor de forma estadísticamente significativa entre los pacientes afecto de CU *versus* voluntarios sanos en los tiempos T1-T3 ( $Z= 1.984$ ,  $p=0.00475$ ). La magnitud de cambio entre los tiempos T3-T5 no alcanza la significancia estadística (fig. 62).

**Figura 62.** Cambios en la abundancia relativa de *Escherichia coli* en el grupo de sanos y en el grupo de CU entre los tiempos T1-T3 ( $Z= 1.984$ ,  $p=0.00475$ ). b. Cambios en la abundancia relativa de *Escherichia coli* en el grupo de sanos y en el grupo de CU entre los tiempos T3-T5 ( $Z=-2.773$ ,  $p=0.0044$ ).  $\delta$  sanos: magnitud del cambio en sanos.  $\delta$  CU: magnitud del cambio en pacientes con CU.

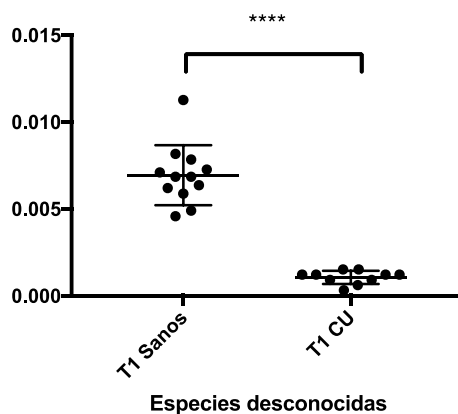


Otras especies patógenas, como las pertenecientes a *Desulfovibrio spp* apenas muestran diferencias en los cambios que tienen lugar entre sanos y CU (fig. 63).

**Figura 63.** Cambios en la abundancia relativa de *Desulfovibrio spp* en el grupo de sanos y en el grupo de CU entre los tiempos T1-T3, no se alcanza la significación estadística. b. Cambios en la abundancia relativa de *Desulfovibrio spp* en el grupo de sanos y en el grupo de CU entre los tiempos T3-T5, no se alcanza la significación estadística.  $\delta$  sanos: magnitud del cambio en sanos.  $\delta$  CU: magnitud del cambio en pacientes con CU.



Las especies desconocidas en sanos caen radicalmente tras la preparación en sanos, sin embargo no hay cambios en pacientes con CU. Cuando analizamos en T1 las diferencias en especies desconocidas entre sanos y pacientes con CU apreciamos cómo en sanos la riqueza en mucho mayor.



**Figura 64.** Diversidad según el índice Chao1 en el T1 (basal) entre sanos y pacientes con CU. (\*\*\*\*)  $Z = -3.971$ ,  $p < 0.0001$ , según el test U de Mann Whitney.

## Comportamiento paciente brotador tras la administración de PEG

Un paciente presentó un brote de actividad tras la preparación de PEG. Su colonoscopia resultó rigurosamente normal. El día después de la colonoscopia el paciente se puso en contacto telefónico para explicar los síntomas. El paciente presentó un brote moderado que precisó de corticoides orales, con buena respuesta a los mismos. Si bien un solo paciente no permite realización de comparaciones, analizando al paciente no se evidenciaron cambios ostensibles en la composición de la microbiota con respecto a los demás miembros de su grupo.

## Discusión

Ha quedado establecida en la parte I de esta tesis la pérdida de diversidad microbiana de pacientes con CU en remisión frente a familiares sanos y sanos no emparentados. Sabemos también que algunos factores ambientales pueden modificar la composición de la flora intestinal, pudiendo desencadenar además reactivaciones de la enfermedad por distintos mecanismos.

Las colonoscopias son procedimientos realizados con cierta frecuencia a pacientes afectados de colitis ulcerosa. La solución de limpieza colónica realizada previa a la realización de colonoscopia supone la ingesta de un laxante osmótico como el PEG diluido en 4L de volumen con el objeto de una limpieza completa del tubo digestivo. Desde el punto de vista teórico se considera un disruptor del ecosistema colónico. La evidencia científica, a través de los artículos publicados hasta la actualidad, parece establecer que las limpiezas colónicas completas provocan escasos cambios de diversidad de la microbiota intestinal sobre la población sana, siendo estos cambios además reversibles a corto plazo. Nos planteamos si la solución de limpieza colónica provoca en los pacientes con CU con perfil brotador cambios diferentes a los provocados sobre individuos sanos. El único estudio publicado hasta la actualidad aglutina tres pacientes con CU y cinco con Enfermedad de Crohn, poblaciones de pacientes no homogéneas desde el punto de vista de la composición de la microbiota. Sus resultados indican que la flora asociada al moco sufre cambios de diversidad tras la preparación únicamente en la población de pacientes con EII. En la flora fecal no se aprecian cambios significativos.

La parte II de la presente tesis aporta como novedad el análisis de una población de pacientes con CU homogénea desde el punto de vista fenotípico: la

población de pacientes con colitis ulcerosa en remisión de al menos 6 meses y alta tasa de brotes. Si estudiamos las muestras basales (T1) entre sujetos sanos y pacientes con CU apreciamos cómo los segundos presentan menor diversidad (índice Chao1) de la microbiota intestinal vs voluntarios sanos, alcanzando además la significación estadística. De igual manera, el nº de especies totales detectadas en la población de sanos es de 474 frente a 352 especies detectadas en la población de CU. Si analizamos y las graficamos según el análisis de componentes principales, con el objeto de buscar algún tipo de agrupamiento se aprecian dos *clusters* claramente diferenciados para voluntarios sanos y para pacientes afectados de CU.

Es interesante poner de manifiesto cómo afecta la administración del PEG a la microbiota de nuestra población de voluntarios sanos: analizando la evolución del índice Chao1, marcador de diversidad y abundancia relativa, se aprecia cómo en la primera muestra tras la colonoscopia se produce un descenso (tiempo 3), que posteriormente tiende a recuperarse al mes y a los dos meses (tiempos 4 y 5) de la toma del PEG. Por tanto, la administración del PEG disminuye tanto la riqueza de bacterias como su abundancia relativa. Esta evolución del índice Chao1 tras el PEG tiene lugar de forma superponible en pacientes afectados de colitis ulcerosa, a pesar de que éstos parten de poblaciones microbianas más pobres. Existe también una tendencia a la recuperación de la riqueza perdida. Por tanto, la resiliencia de la microbiota tras la preparación colónica en términos de diversidad global tiene lugar de forma similar entre voluntarios sanos y pacientes afectados de CU. Desde el punto de vista de la distancia filogenética de las muestras tras la administración del PEG no se aprecian cambios significativos en ninguna de las dos poblaciones. Recordemos que los análisis que tienen en cuenta la diferencia filogenética entre especies consideran las muestras con mayor similitud de secuencia como más similares desde el punto de vista evolutivo.

A continuación, analizaremos la cinética intramuestra de determinados grupos taxonómicos a través de la preparación, desde estrato de filo a especie, pasando por género. Pero hemos de exponer que, el análisis de los estratos más superficiales ha de complementarse con filos menos abundantes y especies concretas, ya que, aunque poco abundantes, exhiben funciones importantes en el mantenimiento de la homeostasis de la microbiota (tanto beneficioso como deletéreo). *Akkermansia muciniphila*, perteneciente al filo Verrucomicrobia tiene

efectos antiinflamatorios y la abundancia del filo Tenericutes se ha relacionado con la presencia de N-óxido-trimetilamina (TMAO), relacionado con el desarrollo de aterosclerosis (122).

Si analizamos la evolución de la abundancia de los filos bacterianos podemos apreciar cómo en voluntarios sanos se produce un aumento de los filos más abundantes (Firmicutes, Bacteroidetes y Proteobacteria), salvo Actinobacteria que desciende, con tendencia a la recuperación posterior, pero sin alcanzar ninguno de estos datos la significación estadística. Por el contrario, se produce un descenso global de los filos menos abundantes, como Verrucomicrobia, Lentisphaerae, Archaea Euryarchaeota y Tenericutes, alcanzando este último la significancia. En pacientes afectos de CU los filos Firmicutes y Actinobacteria descienden y un aumentan Proteobacterias y Bacteroidetes. Sin embargo, con nuestro nivel de detección, prácticamente no se identifican los filos Verrucomicrobia, Lentisphaerae, Archaea Euryarchaeota y Tenericutes únicamente se identifican en un paciente con CU.

Es interesante resaltar la evolución de la abundancia de géneros y especies productores de butirato: podemos evidenciar una tendencia a aumentar tras la administración del PEG en la abundancia relativa del género Blautia, Dorea spp, *Faecalibacterium prausnitzii* y *Lachnospiraceae, g\_\_s\_\_2* frente a un discreto descenso de *Akkermansia muciniphila*. Los aumentos descritos no son significativos. *Lachnospiraceae, g\_\_s\_\_2* y *Roseburia; s\_\_39* no se modifican. Sin embargo, en pacientes afectos de CU en remisión se evidencia una tendencia al descenso (*Ruminococcus bromii* y *Faecalibacterium prausnitzii*) o bien no se identifican con nuestra capacidad de detección (*Akkermansia muciniphila*). *Akkermansia muciniphila* es una bacteria adherida al moco, se trata de una bacteria degradadora de mucina, de donde extraen su principal fuente de nutrientes. Su descenso concuerda con los hallazgos descritos en el estudio de Shobar (112), en el que se establece una mayor pérdida de bacterias asociadas al moco.

Es interesante analizar cómo afecta la toma del PEG al comportamiento de bacterias consideradas patógenas como *Escherichia coli* y *Desulfovibrio* spp, con descenso de ambas en sanos. En contraposición, llama la atención la tendencia al incremento significativo en pacientes con CU de *Escherichia coli* y la estabilidad de

Desulfovibrio spp. Se ha descrito aumento de *E. Coli* en pacientes afectos de CU en actividad (123).

*Methanobrevibacter smithii* desciende en ambas poblaciones, tanto sanos como CU de forma no significativa. Cabe destacar que se trata de una bacteria muy relacionada con el tránsito colónico. Se piensa, que la generación de metano está relacionada con el tiempo de tránsito colónico, así a menor tránsito colónico, menor producción de metano(90).

Es interesante también destacar el hecho de que el global de las especies desconocidas, cae de forma manifiesta en sanos tras el PEG, pero se mantiene estable en pacientes con CU. Este hecho se debe a que, basalmente, el grupo de sanos es mucho más rico en especies desconocidas.

Por tanto, si bien las tendencias no alcanzan la significación estadística, podemos concluir que el impacto de la administración del PEG, si bien a nivel global es similar entre sanos y CU, al estudiar estratos taxonómicos más profundos, el impacto no es similar. Existe una tendencia a la recuperación a los dos meses.

Limitaciones del estudio: nuestra investigación no incluyó el estudio con biopsias, lo que podría aproximarnos mejor a la microbiota asociada a la mucosa.

## V. Conclusiones

1. Existe una gradación en cuanto a riqueza genética bacteriana entre pacientes con colitis ulcerosa en remisión, familiares emparentados y voluntarios sanos.
2. No se identifican diferencias en cuanto a riqueza genética bacteriana de los dos fenotipos incluidos: pacientes con colitis ulcerosa en remisión brotadores y no brotadores.
3. Desde el punto de vista de la metagenómica funcional apreciamos diferencias entre sanos y pacientes afectados de colitis ulcerosa en cuanto a funciones desarrolladas por la microbiota: en pacientes sanos se produce un menor estrés oxidativo y una mayor producción de ácidos grasos de cadena corta frente a pacientes afectados de colitis ulcerosa.
4. Tras la administración del polietilenglicol se produce una pérdida en la diversidad de la microbiota que tiende a recuperarse a los 2 meses. Estos cambios son similares en ambos grupos de estudio.
5. Analizando estratos profundos de taxonomía bacteriana, el polietilenglicol provoca una pérdida de bacterias productoras de butirato en pacientes con colitis ulcerosa frente a un ascenso en individuos sanos. De la misma forma, como efecto del polietilenglicol, distinguimos un ascenso de bacterias patógenas en pacientes con colitis ulcerosa frente a un descenso de las mismas en sanos.



## VI. Bibliografía

1. Wostmann BS. The germfree animal in nutritional studies. *Annu Rev Nutr* [Internet]. 1981 Jul [cited 2017 Apr 3];1(1):257–79. Available from: <http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.nu.01.070181.001353>
2. Moran NA. Symbiosis. *Curr Biol* [Internet]. 2006 Oct 24 [cited 2017 Apr 10];16(20):R866–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982206022123>
3. Roediger WE, Heyworth M, Willoughby P, Piris J, Moore A, Truelove SC. Luminal ions and short chain fatty acids as markers of functional activity of the mucosa in ulcerative colitis. *J Clin Pathol* [Internet]. 1982 Mar [cited 2017 Apr 10];35(3):323–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7068924>
4. Guarner F, Malagelada J-R. Gut flora in health and disease. *Lancet* (London, England) [Internet]. 2003 Feb 8 [cited 2017 Apr 10];361(9356):512–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0140673603124890>
5. Rajilić-Stojanović M, Shanahan F, Guarner F, de Vos WM. Phylogenetic Analysis of Dysbiosis in Ulcerative Colitis During Remission. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2013 Mar [cited 2017 Jun 7];19(3):481–8. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-201303000-00003>
6. Diaz Heijtz R, Wang S, Anuar F, Qian Y, Björkholm B, Samuelsson A, et al. Normal gut microbiota modulates brain development and behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2011 Feb 15 [cited 2017 Apr 10];108(7):3047–52. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1010529108>
7. Desbonnet L, Clarke G, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF. Microbiota is essential for social development in the mouse. *Mol Psychiatry* [Internet]. 2014 Feb 21 [cited 2017 Apr 18];19(2):146–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/mp.2013.65>
8. Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora. *Science* (80- ) [Internet]. 2005 Jun 10 [cited 2017 Apr 10];308(5728):1635–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15831718>
9. Goodman AL, Kallstrom G, Faith JJ, Reyes A, Moore A, Dantas G, et al. Extensive personal human gut microbiota culture collections characterized and manipulated in gnotobiotic mice. [cited 2017 Apr 24]; Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3076821/pdf/pnas.201102938.pdf>
10. Lau JT, Whelan FJ, Herath I, Lee CH, Collins SM, Bercik P, et al. Capturing the diversity of the human gut microbiota through culture-enriched molecular profiling. *Genome Med* [Internet]. 2016 [cited 2017 Apr 25];8(1):72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27363992>
11. Gilbert JA, Meyer F, Jansson J, Gordon J, Pace N, Tiedje J, et al. The Earth Microbiome Project: Meeting report of the “1 EMP meeting on sample selection and acquisition” at Argonne National Laboratory October 6 2010. *Stand Genomic Sci* [Internet]. 2010 Dec 25 [cited 2017 Apr 18];3(3):249–53. Available from: <http://www.standardsingenomics.org/index.php/sigen/article/view/sigs.144352>

12. Tringe SG, Hugenholtz P. A renaissance for the pioneering 16S rRNA gene. *Curr Opin Microbiol* [Internet]. 2008 Oct [cited 2017 Apr 18];11(5):442–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369527408001264>
13. Frank DN, Pace NR. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr Opin Gastroenterol* [Internet]. 2008 Jan [cited 2017 Apr 18];24(1):4–10. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00001574-200801000-00003>
14. Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* [Internet]. 2010 Mar 4 [cited 2017 Apr 18];464(7285):59–65. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature08821>
15. Tatusov RL, Koonin E V, Lipman DJ. A genomic perspective on protein families. *Science* [Internet]. 1997 Oct 24 [cited 2017 Apr 18];278(5338):631–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9381173>
16. Nielsen HB, Almeida M, Juncker AS, Rasmussen S, Li J, Sunagawa S, et al. Identification and assembly of genomes and genetic elements in complex metagenomic samples without using reference genomes. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2014 Aug 6 [cited 2017 Apr 18];32(8):822–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt.2939>
17. Qin J, Li Y, Cai Z, Li S, Zhu J, Zhang F, et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* [Internet]. 2012 Oct 4 [cited 2017 Apr 18];490(7418):55–60. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11450>
18. Li J, Jia H, Cai X, Zhong H, Feng Q, Sunagawa S, et al. An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2014 Aug 6 [cited 2017 Apr 18];32(8):834–41. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nbt.2942>
19. NIH HMP Working Group TNHW, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res* [Internet]. 2009 Dec [cited 2017 Jun 8];19(12):2317–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19819907>
20. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* [Internet]. 2010 May 11 [cited 2017 Apr 18];7(5):335–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nmeth.f.303>
21. Human Microbiome Project Consortium C, Gevers D, Knight R, Abubucker S, Badger JH, Chinwalla AT, et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* [Internet]. 2012 Jun 13 [cited 2017 Apr 18];486(7402):207–14. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11234>
22. Yatsunenkov T, Rey FE, Manary MJ, Trehan I, Dominguez-Bello MG, Contreras M, et al. Human gut microbiome viewed across age and geography. *Nature* [Internet]. 2012 May 9 [cited 2017 Apr 18];486(7402):222–7. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature11053>
23. Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* [Internet]. 2011 May 12 [cited 2017 Apr 18];473(7346):174–80. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09944>
24. Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y-Y, Keilbaugh SA, et al.

- Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* [Internet]. 2011 Oct 7 [cited 2017 Apr 18];334(6052):105–8. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1208344>
25. Turnbaugh PJ, Hamady M, Yatsunencko T, Cantarel BL, Duncan A, Ley RE, et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. *Nature* [Internet]. 2009 Jan 22 [cited 2017 Apr 18];457(7228):480–4. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature07540>
  26. Lepage P, Häsler R, Spehlmann ME, Rehman A, Zvirbliene A, Begun A, et al. Twin Study Indicates Loss of Interaction Between Microbiota and Mucosa of Patients With Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* [Internet]. 2011 Jul [cited 2017 May 29];141(1):227–36. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21621540>
  27. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2005 Aug 2 [cited 2017 Apr 18];102(31):11070–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033867>
  28. Blaut M, Klaus S. Intestinal microbiota and obesity. *Handb Exp Pharmacol* [Internet]. 2012 [cited 2017 Apr 18];(209):251–73. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-24716-3\\_11](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-24716-3_11)
  29. Vrieze A, Van Nood E, Holleman F, Salojärvi J, Kootte RS, Bartelsman JFWM, et al. Transfer of intestinal microbiota from lean donors increases insulin sensitivity in individuals with metabolic syndrome. *Gastroenterology* [Internet]. 2012 Oct [cited 2017 Apr 19];143(4):913–6.e7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S001650851200892X>
  30. Samuel BS, Gordon JI. A humanized gnotobiotic mouse model of host-archaeal-bacterial mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Jun 27 [cited 2017 Apr 19];103(26):10011–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0602187103>
  31. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* [Internet]. 2013 Aug 29 [cited 2017 Apr 19];500(7464):541–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12506>
  32. Cotillard A, Kennedy SP, Kong LC, Prifti E, Pons N, Le Chatelier E, et al. Dietary intervention impact on gut microbial gene richness. *Nature* [Internet]. 2013 Aug 29 [cited 2017 Apr 19];500(7464):585–8. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature12480>
  33. Wang Z, Klipfell E, Bennett BJ, Koeth R, Levison BS, Dugar B, et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. *Nature* [Internet]. 2011 Apr 7 [cited 2017 Apr 19];472(7341):57–63. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature09922>
  34. Tang WHW, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* [Internet]. 2013 Apr 25 [cited 2017 Apr 19];368(17):1575–84. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1109400>
  35. Dumas M-E, Barton RH, Teye A, Cloarec O, Blancher C, Rothwell A, et al. Metabolic profiling reveals a contribution of gut microbiota to fatty liver phenotype in insulin-resistant mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Aug 15 [cited 2017 Apr 19];103(33):12511–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0601056103>
  36. Simrén M, Barbara G, Flint HJ, Spiegel BMR, Spiller RC, Vanner S, et al.

- Intestinal microbiota in functional bowel disorders: a Rome foundation report. *Gut* [Internet]. 2013 Jan [cited 2017 Apr 19];62(1):159–76. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2012-302167>
37. Amaral FA, Sachs D, Costa V V, Fagundes CT, Cisalpino D, Cunha TM, et al. Commensal microbiota is fundamental for the development of inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2008 Feb 12 [cited 2017 Apr 19];105(6):2193–7. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0711891105>
  38. Manichanh C, Eck A, Varela E, Roca J, Clemente JC, González A, et al. Anal gas evacuation and colonic microbiota in patients with flatulence: effect of diet. *Gut* [Internet]. 2014 Mar [cited 2017 Apr 19];63(3):401–8. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2012-303013>
  39. Molodecky NA, Soon IS, Rabi DM, Ghali WA, Ferris M, Chernoff G, et al. Increasing incidence and prevalence of the inflammatory bowel diseases with time, based on systematic review. *Gastroenterology* [Internet]. 2012 Jan [cited 2017 Apr 19];142(1):46–54.e42; quiz e30. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508511013783>
  40. Halfvarson J, Jess T, Bodin L, Järnerot G, Munkholm P, Binder V, et al. Longitudinal concordance for clinical characteristics in a Swedish-Danish twin population with inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2007 Dec [cited 2017 Apr 19];13(12):1536–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17828780>
  41. Orholm M, Binder V, Sørensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol* [Internet]. 2000 Oct [cited 2017 Apr 19];35(10):1075–81. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11099061>
  42. Thompson NP, Driscoll R, Pounder RE, Wakefield AJ. Genetics versus environment in inflammatory bowel disease: results of a British twin study. *BMJ* [Internet]. 1996 Jan 13 [cited 2017 Apr 19];312(7023):95–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8555939>
  43. Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, Bunce M, Jewell DP. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2001 Jun [cited 2017 Apr 19];15(6):731–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11380312>
  44. Anderson CA, Boucher G, Lees CW, Franke A, D'Amato M, Taylor KD, et al. Meta-analysis identifies 29 additional ulcerative colitis risk loci, increasing the number of confirmed associations to 47. *Nat Genet* [Internet]. 2011 Mar 6 [cited 2017 Apr 19];43(3):246–52. Available from: <http://www.nature.com/doi/doi/10.1038/ng.764>
  45. Thompson AI, Lees CW. Genetics of ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2011 Mar [cited 2017 Apr 20];17(3):831–48. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-201103000-00017>
  46. Bernstein CN, Shanahan F. Disorders of a modern lifestyle: reconciling the epidemiology of inflammatory bowel diseases. *Gut* [Internet]. 2008 Sep 1 [cited 2017 Apr 20];57(9):1185–91. Available from: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2007.122143>
  47. Manichanh C, Borrueal N, Casellas F, Guarner F. The gut microbiota in IBD. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2012 Oct 21 [cited 2017 Apr

- 20];9(10):599–608. Available from:  
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nrgastro.2012.152>
48. Lakatos PL. Environmental factors affecting inflammatory bowel disease: have we made progress? *Dig Dis* [Internet]. 2009 [cited 2017 Apr 20];27(3):215–25. Available from:  
<http://www.karger.com/doi/10.1159/000228553>
  49. Ananthakrishnan AN. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)* [Internet]. 2013 Jun [cited 2017 Apr 20];9(6):367–74. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23935543>
  50. Koutroubakis IE, Vlachonikolis IG. Appendectomy and the development of ulcerative colitis: results of a metaanalysis of published case-control studies. *Am J Gastroenterol* [Internet]. 2000 Jan [cited 2017 Apr 20];95(1):171–6. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1111/j.1572-0241.2000.01680.x>
  51. Shen C, Bullens D, Kasran A, Maerten P, Boon L, Aerts JMF., et al. Inhibition of glycolipid biosynthesis by N-(5-adamantane-1-yl-methoxy-pentyl)-deoxynojirimycin protects against the inflammatory response in hapten-induced colitis. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2004 Jul [cited 2017 Apr 22];4(7):939–51. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15182733>
  52. Swidsinski A, Dörffel Y, Loening-Baucke V, Theissig F, Rückert JC, Ismail M, et al. Acute appendicitis is characterised by local invasion with *Fusobacterium nucleatum/necrophorum*. *Gut* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2017 Apr 22];60(1):34–40. Available from:  
<http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2009.191320>
  53. Roblin X, Neut C, Darfeuille-Michaud A, Colombel JF. Local appendiceal dysbiosis: the missing link between the appendix and ulcerative colitis? *Gut* [Internet]. 2012 Apr [cited 2017 Apr 22];61(4):635–6. Available from:  
<http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2011-300576>
  54. Klement E, Cohen R V, Boxman J, Joseph A, Reif S. Breastfeeding and risk of inflammatory bowel disease: a systematic review with meta-analysis. *Am J Clin Nutr* [Internet]. 2004 Nov [cited 2017 Apr 22];80(5):1342–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15531685>
  55. Barclay AR, Russell RK, Wilson ML, Gilmour WH, Satsangi J, Wilson DC. Systematic review: the role of breastfeeding in the development of pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr* [Internet]. 2009 Sep [cited 2017 Apr 22];155(3):421–6. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022347609002376>
  56. Geary RB, Richardson AK, Frampton CM, Dodgshun AJ, Barclay ML. Population-based cases control study of inflammatory bowel disease risk factors. *J Gastroenterol Hepatol* [Internet]. 2010 Feb [cited 2017 Apr 23];25(2):325–33. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1746.2009.06140.x>
  57. Hviid A, Svanström H, Frisch M. Antibiotic use and inflammatory bowel diseases in childhood. *Gut* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2017 Apr 23];60(1):49–54. Available from:  
<http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2010.219683>
  58. Soon IS, Molodecky NA, Rabi DM, Ghali WA, Barkema HW, Kaplan GG. The relationship between urban environment and the inflammatory bowel

- diseases: a systematic review and meta-analysis. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2012 May 24 [cited 2017 Apr 23];12(1):51. Available from: <http://bmcgastroenterol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-230X-12-51>
59. Van der Sluis M, De Koning BAE, De Bruijn ACJM, Velcich A, Meijerink JPP, Van Goudoever JB, et al. Muc2-deficient mice spontaneously develop colitis, indicating that MUC2 is critical for colonic protection. *Gastroenterology* [Internet]. 2006 Jul [cited 2017 Apr 23];131(1):117–29. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508506007621>
  60. Velcich A, Yang W, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, et al. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* [Internet]. 2002 Mar 1 [cited 2017 Apr 23];295(5560):1726–9. Available from: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1069094>
  61. Swidsinski A, Loening-Baucke V, Theissig F, Engelhardt H, Bengmark S, Koch S, et al. Comparative study of the intestinal mucus barrier in normal and inflamed colon. *Gut* [Internet]. 2007 Mar 1 [cited 2017 Apr 23];56(3):343–50. Available from: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2006.098160>
  62. Brandl K, Plitas G, Schnabl B, DeMatteo RP, Pamer EG. MyD88-mediated signals induce the bactericidal lectin RegIII gamma and protect mice against intestinal *Listeria monocytogenes* infection. *J Exp Med* [Internet]. 2007 Aug 6 [cited 2017 Apr 23];204(8):1891–900. Available from: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20070563>
  63. Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell* [Internet]. 2010 Mar 19 [cited 2017 Apr 23];140(6):805–20. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867410000231>
  64. Hooper LV, Macpherson AJ. Immune adaptations that maintain homeostasis with the intestinal microbiota. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2010 Mar [cited 2017 Apr 23];10(3):159–69. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nri2710>
  65. Cella M, Fuchs A, Vermi W, Facchetti F, Otero K, Lennerz JKM, et al. A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity. *Nature* [Internet]. 2009 Feb 5 [cited 2017 Apr 23];457(7230):722–5. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature07537>
  66. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* [Internet]. 2006 Jun [cited 2017 Apr 24];24(6):677–88. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S107476130600269X>
  67. Rovedatti L, Kudo T, Biancheri P, Sarra M, Knowles CH, Rampton DS, et al. Differential regulation of interleukin 17 and interferon gamma production in inflammatory bowel disease. *Gut* [Internet]. 2009 Dec 1 [cited 2017 Apr 24];58(12):1629–36. Available from: <http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2009.182170>
  68. Bernardo D, Vallejo-Díez S, Mann ER, Al-Hassi HO, Martínez-Abad B, Montalvillo E, et al. IL-6 promotes immune responses in human ulcerative colitis and induces a skin-homing phenotype in the dendritic cells and T cells they stimulate. *Eur J Immunol* [Internet]. 2012 May [cited 2017 Apr 24];42(5):1337–53. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/eji.201142327>
  69. Kobayashi T, Okamoto S, Hisamatsu T, Kamada N, Chinen H, Saito R, et al. IL23 differentially regulates the Th1/Th17 balance in ulcerative colitis and

- Crohn's disease. *Gut* [Internet]. 2008 Dec 30 [cited 2017 Apr 24];57(12):1682–9. Available from:  
<http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2007.135053>
70. Fantini MC, Becker C, Tubbe I, Nikolaev A, Lehr HA, Galle P, et al. Transforming growth factor beta induced FoxP3+ regulatory T cells suppress Th1 mediated experimental colitis. *Gut* [Internet]. 2006 May 1 [cited 2017 Apr 24];55(5):671–80. Available from:  
<http://gut.bmj.com/cgi/doi/10.1136/gut.2005.072801>
  71. Fantini MC, Rizzo A, Fina D, Caruso R, Sarra M, Stolfi C, et al. Smad7 controls resistance of colitogenic T cells to regulatory T cell-mediated suppression. *Gastroenterology* [Internet]. 2009 Apr [cited 2017 Apr 24];136(4):1308–16, e1-3. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508508023111>
  72. Hooper L V. Bacterial contributions to mammalian gut development. *Trends Microbiol* [Internet]. 2004 Mar [cited 2017 Apr 24];12(3):129–34. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X04000150>
  73. Pollard M, Sharon N. Responses of the Peyer's Patches in Germ-Free Mice to Antigenic Stimulation. *Infect Immun* [Internet]. 1970 Jul [cited 2017 Apr 24];2(1):96–100. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16557807>
  74. Ivanov II, Atarashi K, Manel N, Brodie EL, Shima T, Karaoz U, et al. Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* [Internet]. 2009 Oct 30 [cited 2017 Apr 24];139(3):485–98. Available from:  
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867409012483>
  75. Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* [Internet]. 2008 May 29 [cited 2017 Apr 24];453(7195):620–5. Available from:  
<http://www.nature.com/doi/10.1038/nature07008>
  76. Cash HL, Whitham C V, Behrendt CL, Hooper L V. Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin. *Science* [Internet]. 2006 Aug 25 [cited 2017 Apr 24];313(5790):1126–30. Available from:  
<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1127119>
  77. Okamoto T, Sasaki M, Tsujikawa T, Fujiyama Y, Bamba T, Kusunoki M. Preventive efficacy of butyrate enemas and oral administration of *Clostridium butyricum* M588 in dextran sodium sulfate-induced colitis in rats. *J Gastroenterol* [Internet]. 2000 [cited 2017 Apr 24];35(5):341–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10832668>
  78. Cross ML. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. *FEMS Immunol Med Microbiol* [Internet]. 2002 Dec 13 [cited 2017 Apr 24];34(4):245–53. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12443824>
  79. Guarner F, Schaafsma GJ. Probiotics. *Int J Food Microbiol* [Internet]. 1998 Feb 17 [cited 2017 Apr 24];39(3):237–8. Available from:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9553803>
  80. Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, Engelhardt R, Seidler U, Hansen W, et al. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. Fox D, editor. *PLoS One* [Internet]. 2007 Dec 12 [cited 2017 Apr 24];2(12):e1308. Available from:  
<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0001308>

81. Van Niel CW, Feudtner C, Garrison MM, Christakis DA. Lactobacillus therapy for acute infectious diarrhea in children: a meta-analysis. *Pediatrics* [Internet]. 2002 Apr [cited 2017 Apr 24];109(4):678–84. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11927715>
82. Johnston BC, Ma SSY, Goldenberg JZ, Thorlund K, Vandvik PO, Loeb M, et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*-associated diarrhea: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* [Internet]. 2012 Dec 18 [cited 2017 Apr 24];157(12):878–88. Available from: <http://annals.org/article.aspx?doi=10.7326/0003-4819-157-12-201212180-00563>
83. Isolauri E, Joensuu J, Suomalainen H, Luomala M, Vesikari T. Improved immunogenicity of oral D x RRV reassortant rotavirus vaccine by *Lactobacillus casei* GG. *Vaccine* [Internet]. 1995 Feb [cited 2017 Apr 24];13(3):310–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7631519>
84. de Vrese M, Rautenberg P, Laue C, Koopmans M, Herremans T, Schrezenmeir J. Probiotic bacteria stimulate virus-specific neutralizing antibodies following a booster polio vaccination. *Eur J Nutr* [Internet]. 2005 Oct 1 [cited 2017 Apr 24];44(7):406–13. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00394-004-0541-8>
85. Ozdemir O. Any benefits of probiotics in allergic disorders? *Allergy asthma Proc* [Internet]. 2010 Mar 1 [cited 2017 Apr 24];31(2):103–11. Available from: <http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1088-5412&volume=31&issue=2&spage=103>
86. Casellas F, N Borrueal CM. Low microbial gene diversity and depletion of *Akkermansia muciniphila* is associated with a relapsing course of ulcerative colitis. Barcelona;
87. Godon JJ, Zumstein E, Dabert P, Habouzit F, Moletta R. Molecular microbial diversity of an anaerobic digester as determined by small-subunit rDNA sequence analysis. *Appl Environ Microbiol* [Internet]. 1997 Jul [cited 2017 Apr 20];63(7):2802–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9212428>
88. Le Chatelier E, Nielsen T, Qin J, Prifti E, Hildebrand F, Falony G, et al. Richness of human gut microbiome correlates with metabolic markers. *Nature* [Internet]. 2013 Aug 28 [cited 2017 Jun 10];500(7464):541–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23985870>
89. Scanlan PD, Shanahan F, Marchesi JR. Human methanogen diversity and incidence in healthy and diseased colonic groups using *mcrA* gene analysis. *BMC Microbiol* [Internet]. 2008 May 20 [cited 2017 Apr 22];8(1):79. Available from: <http://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2180-8-79>
90. Perman JA. Methane and colorectal cancer. *Gastroenterology* [Internet]. 1984 Sep [cited 2017 Apr 22];87(3):728–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6745622>
91. Sokol H, Leducq V, Aschard H, Pham H-P, Jegou S, Landman C, et al. Fungal microbiota dysbiosis in IBD. *Gut* [Internet]. 2016 Feb 3 [cited 2017 Apr 22];gutjnl-2015-310746. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26843508>
92. Richard ML, Lamas B, Liguori G, Hoffmann TW, Sokol H. Gut fungal microbiota: the Yin and Yang of inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2015 Mar [cited 2017 Apr 22];21(3):656–65. Available from:



- <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-201503000-00019>
93. Sokol H, Conway KL, Zhang M, Choi M, Morin B, Cao Z, et al. Card9 Mediates Intestinal Epithelial Cell Restitution, T-Helper 17 Responses, and Control of Bacterial Infection in Mice. *Gastroenterology* [Internet]. 2013 Sep [cited 2017 Apr 20];145(3):591–601.e3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23732773>
  94. Iliev ID, Funari VA, Taylor KD, Nguyen Q, Reyes CN, Strom SP, et al. Interactions Between Commensal Fungi and the C-Type Lectin Receptor Dectin-1 Influence Colitis. *Science* (80- ) [Internet]. 2012 Jun 8 [cited 2017 Apr 22];336(6086):1314–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22674328>
  95. Sokol H, Seksik P, Furet JP, Firmesse O, Nion-Larmurier I, Beaugerie L, et al. Low counts of *Faecalibacterium prausnitzii* in colitis microbiota. *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2009 Aug [cited 2017 Jun 8];15(8):1183–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19235886>
  96. Norman JM, Handley SA, Baldridge MT, Droit L, Liu CY, Keller BC, et al. Disease-Specific Alterations in the Enteric Virome in Inflammatory Bowel Disease. *Cell* [Internet]. 2015 Jan 29 [cited 2017 Apr 22];160(3):447–60. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25619688>
  97. Frank DN, St. Amand AL, Feldman RA, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR. Molecular-phylogenetic characterization of microbial community imbalances in human inflammatory bowel diseases. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2007 Aug 21 [cited 2017 Jun 8];104(34):13780–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17699621>
  98. Roediger WE, Duncan A, Kapaniris O, Millard S. Reducing sulfur compounds of the colon impair colonocyte nutrition: implications for ulcerative colitis. *Gastroenterology* [Internet]. 1993 Mar [cited 2017 Apr 22];104(3):802–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8440437>
  99. Pitcher MC, Beatty ER, Cummings JH. The contribution of sulphate reducing bacteria and 5-aminosalicylic acid to faecal sulphide in patients with ulcerative colitis. *Gut* [Internet]. 2000 Jan [cited 2017 Apr 22];46(1):64–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10601057>
  100. Gibson GR, Cummings JH, Macfarlane GT. Growth and activities of sulphate-reducing bacteria in gut contents of healthy subjects and patients with ulcerative colitis. *FEMS Microbiol Lett* [Internet]. 1991 Dec [cited 2017 Apr 22];86(2):103–12. Available from: <https://academic.oup.com/femsle/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6968.1991.tb04799.x>
  101. Loubinoux J, Bronowicki J-P, Pereira IAC, Mougénel J-L, Faou AE. Sulfate-reducing bacteria in human feces and their association with inflammatory bowel diseases. *FEMS Microbiol Ecol* [Internet]. 2002 May 1 [cited 2017 Apr 22];40(2):107–12. Available from: <https://academic.oup.com/femsec/article-lookup/doi/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00942.x>
  102. Fite A, Macfarlane GT, Cummings JH, Hopkins MJ, Kong SC, Furrie E, et al. Identification and quantitation of mucosal and faecal desulfovibrios using real time polymerase chain reaction. *Gut* [Internet]. 2004 Apr [cited 2017 Apr 22];53(4):523–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15016746>
  103. Chen W, Li D, Paulus B, Wilson I, Chadwick VS. High prevalence of *Mycoplasma pneumoniae* in intestinal mucosal biopsies from patients with

- inflammatory bowel disease and controls. *Dig Dis Sci* [Internet]. 2001 Nov [cited 2017 Jun 10];46(11):2529–35. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11713965>
104. Short FL, Murdoch SL, Ryan RP. Polybacterial human disease: the ills of social networking. *Trends Microbiol* [Internet]. 2014 Sep [cited 2017 Jun 10];22(9):508–16. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0966842X14001164>
  105. Varela E, Manichanh C, Gallart M, Torrejón A, Borrueal N, Casellas F, et al. Colonisation by *Faecalibacterium prausnitzii* and maintenance of clinical remission in patients with ulcerative colitis. *Aliment Pharmacol Ther* [Internet]. 2013 Jul [cited 2017 Apr 22];38(2):151–61. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/apt.12365>
  106. Longman RJ, Poulosom R, Corfield AP, Warren BF, Wright NA, Thomas MG. Alterations in the composition of the supramucosal defense barrier in relation to disease severity of ulcerative colitis. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2006 Dec [cited 2017 Jun 10];54(12):1335–48. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16924127>
  107. Jernberg C, Lofmark S, Edlund C, Jansson JK. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. *Microbiology* [Internet]. 2010 Nov 1 [cited 2017 May 28];156(11):3216–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20705661>
  108. Panda S, El khader I, Casellas F, López Vivancos J, García Cors M, Santiago A, et al. Short-Term Effect of Antibiotics on Human Gut Microbiota. Cotter PD, editor. *PLoS One* [Internet]. 2014 Apr 18 [cited 2017 May 28];9(4):e95476. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24748167>
  109. Rogers MAM, Aronoff DM. The influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the gut microbiome. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2016 Feb [cited 2017 May 28];22(2):178.e1-178.e9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26482265>
  110. De Filippo C, Cavalieri D, Di Paola M, Ramazzotti M, Poulet JB, Massart S, et al. Impact of diet in shaping gut microbiota revealed by a comparative study in children from Europe and rural Africa. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2010 Aug 17 [cited 2017 May 28];107(33):14691–6. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1005963107>
  111. Jalanka J, Salonen A, Salojärvi J, Ritari J, Immonen O, Marciani L, et al. Effects of bowel cleansing on the intestinal microbiota. *Gut* [Internet]. 2015 Oct [cited 2017 May 29];64(10):1562–8. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2014-307240>
  112. Shobar RM, Velineni S, Keshavarzian A, Swanson G, DeMeo MT, Melson JE, et al. The Effects of Bowel Preparation on Microbiota-Related Metrics Differ in Health and in Inflammatory Bowel Disease and for the Mucosal and Luminal Microbiota Compartments. *Clin Transl Gastroenterol* [Internet]. 2016 Feb 11 [cited 2017 May 29];7(2):e143. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26866392>
  113. Menees S, Higgins P, Korsnes S, Elta G. Does colonoscopy cause increased ulcerative colitis symptoms? *Inflamm Bowel Dis* [Internet]. 2007 Jan [cited 2017 May 7];13(1):12–8. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=00054725-200701000-00003>
  114. Walters WA, Caporaso JG, Lauber CL, Berg-Lyons D, Fierer N, Knight R.

- PrimerProspector: de novo design and taxonomic analysis of barcoded polymerase chain reaction primers. *Bioinformatics* [Internet]. 2011 Apr 15 [cited 2017 Apr 24];27(8):1159–61. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btr087>
115. Navas-Molina JA, Peralta-Sánchez JM, González A, McMurdie PJ, Vázquez-Baeza Y, Xu Z, et al. Advancing our understanding of the human microbiome using QIIME. *Methods Enzymol* [Internet]. 2013 [cited 2017 Apr 24];531:371–444. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124078635000198>
  116. Edgar RC. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. *Bioinformatics* [Internet]. 2010 Oct 1 [cited 2017 Apr 24];26(19):2460–1. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article-lookup/doi/10.1093/bioinformatics/btq461>
  117. Haas BJ, Gevers D, Earl AM, Feldgarden M, Ward D V, Giannoukos G, et al. Chimeric 16S rRNA sequence formation and detection in Sanger and 454-pyrosequenced PCR amplicons. *Genome Res* [Internet]. 2011 Mar 1 [cited 2017 Apr 24];21(3):494–504. Available from: <http://genome.cshlp.org/cgi/doi/10.1101/gr.112730.110>
  118. Price MN, Dehal PS, Arkin AP. FastTree: computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol* [Internet]. 2009 Jul 1 [cited 2017 Apr 24];26(7):1641–50. Available from: <https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/msp077>
  119. Rajilić-Stojanović M, Biagi E, Heilig HGJ, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology* [Internet]. 2011 Nov [cited 2017 May 25];141(5):1792–801. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0016508511010766>
  120. Bernard NJ. Rheumatoid arthritis: *Prevotella copri* associated with new-onset untreated RA. *Nat Rev Rheumatol* [Internet]. 2013 Nov 26 [cited 2017 May 11];10(1):2–2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24275964>
  121. Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, Arijis I, Eeckhaut V, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* [Internet]. 2014 Aug [cited 2017 May 17];63(8):1275–83. Available from: <http://gut.bmj.com/lookup/doi/10.1136/gutjnl-2013-304833>
  122. Koeth RA, Wang Z, Levison BS, Buffa JA, Org E, Sheehy BT, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis. *Nat Med* [Internet]. 2013 Apr 7 [cited 2017 May 25];19(5):576–85. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23563705>
  123. Pilarczyk-Zurek M, Chmielarczyk A, Gosiewski T, Tomusiak A, Adamski P, Zwolinska-Wcislo M, et al. Possible role of *Escherichia coli* in propagation and perpetuation of chronic inflammation in ulcerative colitis. *BMC Gastroenterol* [Internet]. 2013 Dec 8 [cited 2017 May 17];13(1):61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23566070>
- NA. Symbiosis. *Curr Biol*. 2006 Oct 24;16(20):R866-71. PubMed PMID: 17055966. Epub 2006/10/24. eng.

