



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

**Estudi de diferents moduladors de la microbiota
i el seu efecte sobre la colitis ulcerosa
i la diversitat microbiana**

Erola Astó Sánchez-Lafuente



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

**ESTUDI DE DIFERENTS MODULADORS DE LA MICROBIOTA I EL SEU EFECTE SOBRE LA
COLITIS ULCEROSA I LA DIVERSITAT MICROBIANA**

Erola Astó

2019

UNIVERSITAT DE BARCELONA

FACULTAT DE FARMÀCIA I CIÈNCIES DE L'ALIMENTACIÓ

PROGRAMA DE DOCTORAT EN ALIMENTACIÓ I NUTRICIÓ

TESI DOCTORAL REALITZADA ENTRE EL DEPARTAMENT DE NUTRICIÓ I CIÈNCIA DELS ALIMENTS
I L'EMPRESA AB-BIOTICS S.A. SOTA EL MARC DE DOCTORATS INDUSTRIALS

**ESTUDI DE DIFERENTS MODULADORS DE LA MICROBIOTA I EL SEU EFECTE SOBRE LA
COLITIS ULCEROSA I LA DIVERSITAT MICROBIANA**

Memòria presentada per Erola Astó Sánchez-Lafuente per optar al títol de doctor per la
Universitat de Barcelona

Dr. Andreu Farran Codina
Director i Tutor

Erola Astó Sánchez-Lafuente
Doctorand

EROLA ASTÓ

2019

*Al meu fill Pau,
pel temps que hem deixat de passar junts.*

...i a la Laia, que està a punt d'arribar.

“Black holes ain’t as black as they are painted.
They are not the eternal prisons they were once thought.
Things can get out of a black hole both on the outside and possibly to another universe. So if you feel
you are in a black hole, don’t give up-there’s a way out”

Stephen Hawking

AGRAÏMENTS

M'agradaria començar expressant el meu agraïment al meu director de tesi, el Dr. Andreu Farran, per creure sempre que podia acabar la tesi doctoral tot i els entrebancs. Gràcies per la confiança i el suport durant aquests anys, espero que ens tornem a trobar.

Gràcies a AB-Biotics, l'empresa on tinc sort de treballar. En especial al Dr. Jordi Espadaler que sense els seus coneixements tot hauria estat més difícil, gràcies per estar-me a sobre donant tants i tants consells útils. I també gràcies en Sergi Audivert, per ensenyar-me que no tot és blanc o negre, sinó que també hi ha grisos i sempre es pot tirar endavant (i no plorar també!). Gràcies a tots els companys i companyes d'AB-Biotics, tan els que ja no hi són quan vaig començar com els que han vingut més tard per fer possible que em senti com a casa i vingui a treballar cada dia amb un somriure.

Als companys de la UIC i la UAB, per fer-me costat i fer-me veure que és normal que els estats emocionals durant el doctorat puguin i baixin, però sobretot per passar-nos-ho tant bé treballant.

Als meus amics de Viladrau, sobretot a la Carla i la Dèlia, perquè puc treure tot el que tinc a dins sense cap problema i quedar-me més a gust que amb ningú, gràcies per poder demostrar qui sóc amb vosaltres. I també en Pep i l'Yvonne, pels seus grans sopars de qualitat i les mil aventures viscudes amb poc temps, gràcies per les confiances.

A les meves amigues de la uni (La Giron Team), per preocupar-se en tot moment per mi i recolzar-me en tot moment tot i la distància.

A la família d'en Marc, per cuidar i entretenir tantes hores en Pau i fer-lo sentir com a casa.

A la meva família per introduir-me al món de la ciència i fer que des de sempre hagi tingut gran interès per contribuir-hi. Al meu tiet Lluís, qui em va transmetre tota la il·lusió del projecte d'AB-Biotics, gràcies per la teva confiança. I a la meva àvia, que ens prohibia dir "no puc", gràcies àvia ho he recordat en molts moments durant la tesi.

Als meus pares, per conduir-me sempre pel bon camí, gràcies per deixar-me lliure en les meves decisions i a la meva germana, gràcies per ser sempre un exemple a seguir. Per molt que les coses canviïn vosaltres sempre hi sou, gràcies.

Al meu marit Marc, que tot i no tenir molta paciència sempre en té una mica de guardada per quan a mi ja no me'n queda, gràcies per estar sempre convençut que el que vull sóc capaç de fer-ho. Però sobretot i per sobre de totes les coses, gràcies al meu fill Pau. Per treure'm mil somriures cada dia tot i molts arribar tard. No hi ha cosa que estimi més que a tu petit, perquè ningú més pot fer que tingui tanta energia.

ÍNDEX

Abreviatures	13
Resum	17
Introducció	21
1. Microbiota humana	23
1.1 Microbiota humana	23
1.2 Taxonomia microbiana	24
1.3 Microbiota intestinal	25
1.3.1 Microbiota intestinal segons l'edat	26
1.3.2 Microbiota intestinal segons la dieta	29
1.3.3 Microbiota intestinal i tractament amb antibiòtic	30
2. Funcions de la microbiota intestinal	31
2.1 Funcions metabòliques	31
2.2 Funcions protectores	32
3. Com estudiar la microbiota	34
3.1 Tècniques d'anàlisi	34
3.2 Paràmetres numèrics d'interpretació	37
3.3 Estudi de la microbiota per fermentació <i>ex vivo</i>	40
4. Modulació nutricional de la microbiota	44
4.1 Modulació nutricional de la microbiota amb probiòtics	44
4.1.1 Història i concepte	44
4.1.2 Identificació i selecció de microorganismes probiòtics	45
4.1.3 Seguretat dels probiòtics	47
4.1.4 Mecanismes d'acció dels probiòtics	48
4.2 Modulació nutricional de la microbiota amb prebiòtics.....	51
4.2.1 Història i concepte	51
4.2.2 Selecció de prebiòtics	52
4.2.3 Els prebiòtics fructans tipus inulina	52
4.2.4 Seguretat dels prebiòtics	53
4.2.5 Mecanismes d'acció dels prebiòtics.....	53
4.3 Altres moduladors de la microbiota	55
5. La malaltia inflamatòria intestinal	56
5.1 La Colitis Ulcerosa	58
5.1.1 Valoració de la malaltia	58
5.1.2 Tractaments actuals	60

5.1.3	Microbiota en la Colitis Ulcerosa	62
5.1.4	Probiòtics i Prebiòtics en la Colitis Ulcerosa	63
	Justificació i Objectius	65
	Objectiu 1	69
1.	Justificació de l'objectiu	71
2.	Resum dels resultats	71
	Objectiu 2	91
1.	Justificació de l'objectiu	93
2.	Resum dels resultats	94
	Discussió	111
	Conclusions	121
	Bibliografia	125

ABREVIATURES

(Ordre alfabètic)

AGCC: Àcids Grassos de Cadena Curta

ANOSIM: Analysis of Similarities

ANOVA: Analysis of Variance

ATCC: American Type Culture Collection

BAL: Bacteris Àcid Làctics

CAI: Clinical Activity Index

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CFU: Colony-Forming Unit

CIP: La Collection de l'Institut Pasteur

CU: Colitis Ulcerosa

DAI: Disease Activity Index

DSMZ: German Collection of Microorganisms and Cell Cultures

FDA: Food and Drug Administration

EFSA: European Food Safety Authority

FODMAP: Dieta baixa en Oligosacàrids, Disacàrids, Monosacàrids i Poliols fermentables

FOS: Fructooligosaccharides

GALT: Gut-Associated Lymphoid Tissue

GOS: Galactooligosaccharides

GP: Grau de Polimerització

GRAS: Generally Recognized As Safe

HMP: Human Microbiome Project

HPDI: High Polymerization Degree Inulin

ISAPP: International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics

LPDI: Low Polymerization Degree Inulin

LTA: Lipoteichoic Acid

MetaHIT: Metagenomics of the Human Intestinal Tract

MII: Malaltia Inflammatory Intestinal

NGS: Next Generation Sequencing

NLR: NOD-like Receptor

NMDS: Non-metric Multidimensional Scaling

OMS: Organització Mundials de la Salut

OTU: Operational Taxonomic Unit

PCA: Principal Component Analysis

PCoA: Principal Coordinate Analysis

PCR: Polymerase Chain Reaction

PERMANOVA: Permutational Multivariate Analysis of Variance

PPK: Polyphosphate Kinase

PUFA: Poly- Unsaturated Fatty Acids

QPS: Qualified Presumption of Safety

SCCAI: Simple Clinical Colitis Activity Index

SHIME: Simulator of Human Intestinal Microbial Ecosystem

SII: Síndrome de l'Intestí Irritable

SIMGI: Simulador Gastrointestinal Dinamico

TLR: Toll-like Receptor

TNF: Tumor Necrosis Factor

UCDAI: Ulcerative Colitis Disease Activity Index

WGO: World Gastroenterology Organisation

XOS: Xylooligosaccharides

RESUM

La microbiota intestinal juga un paper important en la salut humana degut al gran nombre de funcions que realitza al cos humà. El seu desequilibri s'ha trobat relacionat amb algunes malalties com és el cas de la Colitis Ulcerosa, una malaltia intestinal inflamatòria. Els tractaments actuals per tractar aquesta malaltia crònica intenten mantenir els pacients lliures de rebrots el major temps possible, però sovint provoquen efectes secundaris en els pacients, pel que és interessant buscar una alternativa per evitar-ho. S'ha observat que els pacients amb Colitis Ulcerosa (i en malalties similars com el Crohn) pateixen una reducció de la diversitat microbiana intestinal, sobretot abans de patir una recaiguda. Els moduladors de la microbiota, com els probiòtics i els prebiòtics, poden ajudar a mantenir i aconseguir l'equilibri de la microbiota intestinal, pel que el seu ús en aquests tipus de pacients semblaria una bona estratègia per millorar la seva qualitat de vida recuperant la microbiota intestinal. Tot i així, dins dels probiòtics existeix una gran varietat de soques i espècies, que no tenen perquè actuar de la mateixa manera, pel que el seu efecte probiòtic pot variar entre elles. De la mateixa manera, les fibres prebiòtiques presenten estructures molt diverses i encara falta molta investigació per determinar l'efecte que causen cada una d'elles. De totes maneres, s'ha demostrat que la suplementació amb aquestes fibres en alguns casos augmenta la diversitat intestinal, pel que podria ser una opció per tractar persones amb baixa diversitat microbiana. Per aquesta raó, en la present tesi doctoral s'ha realitzat una revisió sistemàtica i una metanàlisi sobre l'eficàcia d'aquests moduladors en pacients amb Colitis Ulcerosa. Segons la metanàlisi realitzada, els probiòtics són beneficiosos pels pacients amb Colitis Ulcerosa tot i presentar una gran heterogeneïtat entre estudis. Es van trobar efectes significatius per aconseguir la remissió en pacients actius de Colitis Ulcerosa quan s'utilitzaven probiòtics que contenien el gènere *Bifidobacterium*, i també quan s'utilitzaven les escales recomanades per la FDA (UCDAI i DAI) per determinar l'estat de remissió d'aquests pacients, però no amb altres escales. Per altre banda, es va comprovar que existeixen molt pocs estudis clínics amb prebiòtics per aquesta malaltia. Arran d'aquesta observació, s'ha estudiat l'efecte del grau de polimerització dels prebiòtics tipus fructans (inulines i fructooligosacàrids), pel fet d'ésser els més comuns, sobre la diversitat de la microbiota humana per tal de recollir informació útil de cara al disseny de possibles intervencions en humans que incloguin el tractament amb aquestes substàncies. Aquest estudi s'ha realitzat mitjançant un sistema de fermentació *ex vivo* que reproduïx les condicions del còlon humà amb una situació de pèrdua de diversitat de microbiota humana. Segons aquesta fermentació *ex vivo*, l'únic fructà que presentava una recuperació significativa de l'alfa diversitat de les mostres va ser la inulina de major grau de polimerització. A nivell composicional, la microbiota resultant era semblant a la aconseguida per la inulina de baixa polimerització, tot i que la recuperació de diversitat assolida per aquesta no assolí la significança estadística. D'altra banda, el fructà amb la polimerització més baixa (fructooligosacàrid) no aconseguí modificar la diversitat, i va resultar en una microbiota diferent de les inulines. Com a conclusió d'ambdós estudis, podem dir que les evidències

indiquen que els probiòtics que contenen el gènere *Bifidobacterium* semblen ser un tractament efectiu pels pacients amb Colitis Ulcerosa activa però també sembla necessari utilitzar un únic tipus d'escala que permeti detectar bé els efectes del probiòtic en els pacients. Pel que fa als prebiòtics tipus fructans, el grau de polimerització influeix significativament a l'hora de restablir la diversitat microbiana, de manera que només els fructans de cadena més llarga (alta polimerització) semblen afavorir la diversitat microbiana, mentre que els més curts (fructooligosacàrids) no semblen tenir aquest efecte.

INTRODUCCIÓ

1. La Microbiota humana

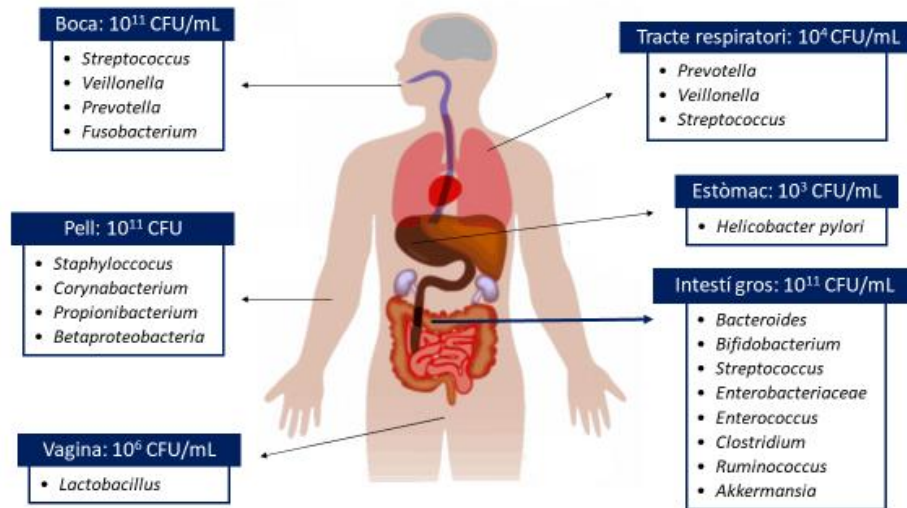
1.1 Microbiota humana

La microbiota autòctona és el conjunt de virus, arqueobacteris, bacteris i organismes eucariòtics que colonitzen el cos humà. Aquests microorganismes contribueixen a la salut i el benestar humà presentant una relació mutualista amb l'individu [1,2]. El cos humà es troba colonitzat per trilions (10^{14} - 10^{15}) de microorganismes repartits de diferent manera en diferents zones del cos, adaptats a les diferents condicions (Figura 1). Per exemple, la pell es troba dominada pels gèneres *Staphylococcus*, *Corynebacterium*, *Propionibacterium* i *Betaproteobacteria* [3], la boca per *Streptococcus*, *Veillonella*, *Prevotella* i *Fusobacterium* entre d'altres [4], l'estómac tot i presentar un pH extremadament àcid conta amb la presència d'*Helicobacter pylori* [5], la vagina amb una dominància del gènere *Lactobacillus* [6] i el tracte respiratori amb *Prevotella*, *Veillonella* i *Streptococcus* [7]. La quantitat de microorganismes a cada zona varia, concretament al còlon és on trobem una colonització major de microorganismes on s'han detectat aproximadament 10^{13} - 10^{14} bacteris (10^{11} - 10^{12} cèl·lules/ml) [1,8] i es troba dominat pels fílums *Bacteroidetes* i *Firmicutes* que inclouen més del 90% dels microorganismes de l'organisme i alguns dels gèneres més representats són *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Ruminococcus* i *Akkermansia* [9,10]. És per aquesta raó que el còlon és una de les zones més interessants per a estudiar la microbiota humana.

Per altre banda, tot i que hi hagi microorganismes que es trobin de manera fixa en determinades zones, es creu que els nínxols ecològics del microbioma humà no són entorns aïllats, sinó una xarxa de comunitats interrelacionades que experimenten un intercanvi constant [11]. Per exemple, a la llet materna es poden trobar bacteris que provenen de la pell de la mare, però també se'n troben de gèneres que són estrictament anaeròbics i que per tant no podrien sobreviure a l'ambient de la pell, com són els bifidobacteris. Per aquesta raó es pensa que hi ha una ruta endògena on les cèl·lules dendrítiques o macròfags penetren a l'epiteli intestinal de la mare captant bacteris no patogènics per tal de portar-los fins a les glàndules mamàries, creant així una ruta enteromamària [12].

En el passat, s'havia arribat a estimar que els humans presentàvem 10 vegades més cèl·lules bacterianes que humanes al cos [13], però Sender *et al.* al 2016 [1] va estudiar de nou aquesta relació determinant que les cèl·lules bacterianes es troben al mateix ordre que les cèl·lules humanes i que la seva massa en un home de 70kg es troba al voltant dels 200g.

Figura 1. Representació dels gèneres més abundants a diverses parts del cos humà. *Imatge adaptada de <http://www.whatisbiotechnology.org> amb contingut de Sender et al. 2016 [1], Mathieu et al. 2018 [14], O'Hanlon et al. 2011 [15].*

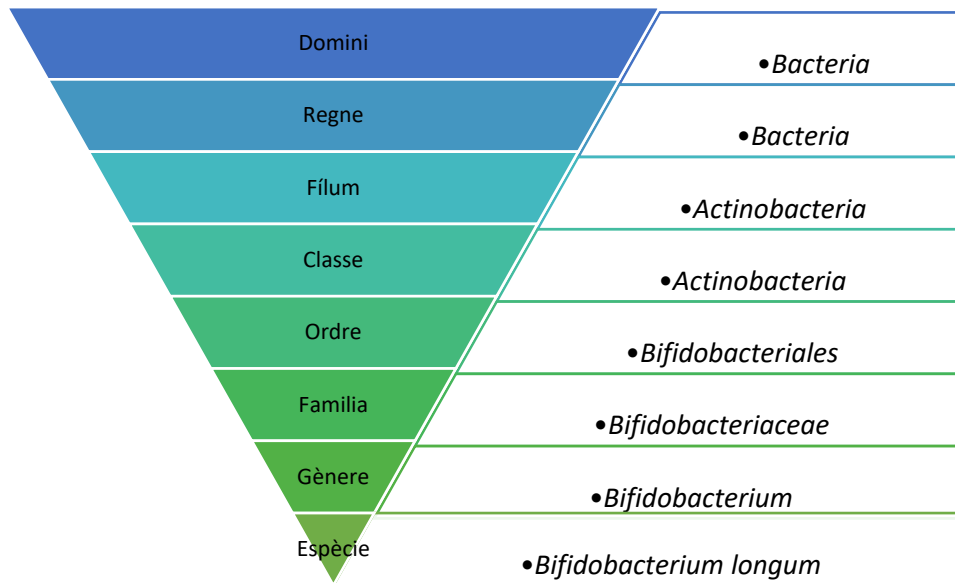


La importància de la microbiota queda de manifest quan considerem l'evidència de que sense aquests microorganismes no seria possible la vida de l'ésser humà, el qual viu en simbiosis amb els seus bacteris. Fins i tot, alguns autors la consideren un òrgan degut a les diferents funcions que dur a terme [16–18].

1.2 Taxonomia microbiana

Degut al gran nombre d'espècies que hi ha al planeta, no només bacterianes sinó també d'altres organismes procariotes i eucariotes, es requereix un sistema de classificació que permeti la organització de totes les espècies. Va ser Aristòtil qui va començar a classificar organismes segons les seves similituds i posteriorment Linnaeus va utilitzar una classificació jeràrquica per entendre millor la classificació [19]. Aquesta classificació s'anomena taxonomia ja que es basa en diferents categories (taxons) segons les seves relacions evolutives i serveixen així per classificar els diferents éssers vius. La primera categoria en ordre jeràrquic decreixent, per tant després de la classificació de vida, és el domini, seguit pel regne, el fílum, la classe, l'ordre, la família, el gènere i per últim l'espècie (Figura 2).

Figura 2. Classificació taxonòmica de l'espècie *Bifidobacterium longum*



Cal destacar que, cada categoria presenta la seva nomenclatura i que totes elles excepte l'espècie presenten un únic nom amb una terminologia determinada per tal de poder-les diferenciar. En canvi, l'espècie conté una combinació de noms on el primer és el nom del gènere en majúscula separat pel nom que determinarà l'espècie en minúscula [20]. Tots els bacteris es troben dins del regne *Bacteria* on els principals fílums trobats en la microbiota humana són els *Firmicutes*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* i *Proteobacteria* [21].

Aquesta classificació és molt important i s'ha de tenir en compte ja que alguns grups bacterians que es troben dins d'un mateix grup de classificació no tenen perquè comportar-se de la mateixa manera ni aportar les mateixes funcions sobre el cos humà. Per exemple, dins del fílum *Firmicutes* podem trobar la classe *Clostridia* on hi pertanyen els gèneres *Faecalibacterium*, *Ruminococcus* o *Clostridium* i més endavant veurem que algunes espècies que pertanyen a aquests gèneres es poden trobar relacionades amb malalties mentre que d'altres amb funcions beneficioses per a la salut.

1.3 Microbiota intestinal

La microbiota intestinal es troba influenciada per múltiples factors que inclouen, la manera de néixer, la primera alimentació, l'edat, la composició de la dieta i la medicació amb antibiòtics [9,16]. Tot i que la composició general de la microbiota intestinal és similar a la majoria de persones sanes, cada individu presenta una composició de la microbiota diferent [22]. D'aquesta manera, la microbiota intestinal es pot adaptar als diferents canvis que la influeixen i seguir en un equilibri saludable o en un estat d'homeòstasi microbiana, concepte conegut amb el nom d'eubiosi. Algunes situacions però,

poden fer que la microbiota perdi el seu equilibri, presentant un estat de disbiosi microbiana. La disbiosi pot venir donada ja sigui per una reducció d'espècies beneficioses a l'intestí, un augment de bacteris patògens o una pèrdua de diversitat. La pèrdua de diversitat microbiana és la manera més comuna de la disbiosi i s'ha observat constantment en malalties digestives com són la Colitis Ulcerosa (CU) i la malaltia de Crohn [23]. En canvi, durant l'estat d'eubiosi la diversitat microbiana és elevada provocant que la microbiota presenti més resiliència als canvis que la poden influir negativament. El concepte de tornar a l'homeòstasi microbiana s'anomena rebiosi [24].

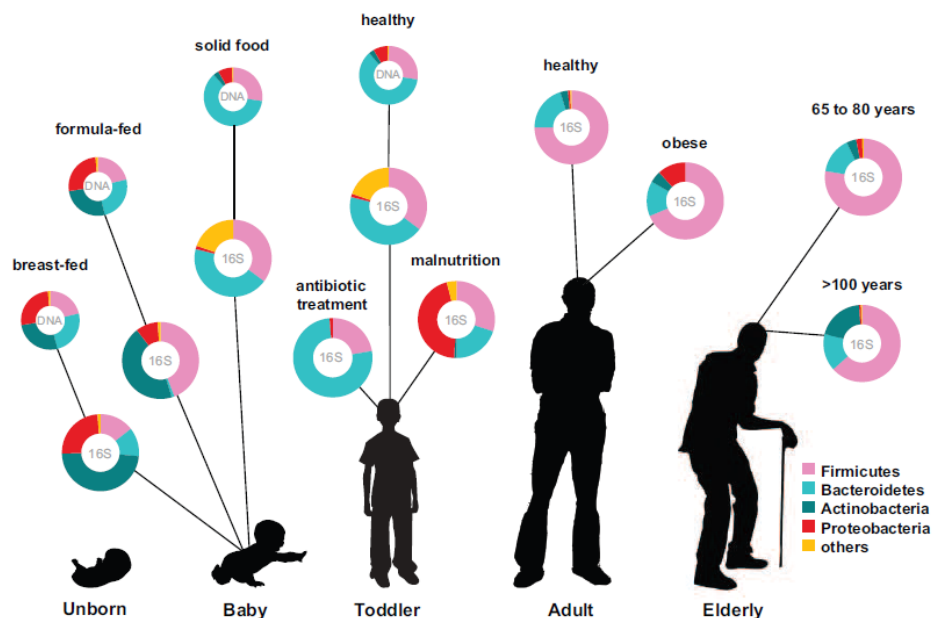
1.3.1 Microbiota intestinal segons l'edat

La composició bacteriana canvia ràpidament durant la primera infància, s'estabilitza en l'edat adulta i es deteriora quan envellim, presentant així una variació al llarg de la vida de l'ésser humà [25]. Tot i que es creu que els nadons neixen totalment estèrils alguns estudis han demostrat la presència de bacteris, amb molt poca quantitat, tant a la placenta, al líquid amniòtic, al cordó umbilical i fins i tot al meconi dels nadons, suggerint que la microbiota humana es pot establir abans del naixement [16,26]. El que sabem segur gràcies a un gran nombre d'estudis és la importància del desenvolupament de la microbiota en els nadons durant els primers moments de vida. Durant el part vaginal, el nounat està exposat a l'ambient, principalment matern, i és on comença a adquirir un ecosistema microbià dinàmic que es denominarà microbiota normal, i que es troba dominat pel gènere *Bifidobacterium*. L'adquisició d'aquesta microbiota es crea per contacte directe amb bacteris vaginals i fecals de la mare però quan el nadó neix per cesària aquest contacte no es dona i per tant l'adquisició de microbiota no es dur de la mateixa manera. Alguns estudis han investigat les diferències entre la microbiota dels recents nascuts demostrant que nadons nascuts per cesària presenten reduccions en els nivells de *Bifidobacterium* [27], pertanyents al fílum *Actinobacteria* i més població de *Bacteroidetes* que de *Firmicutes* respecte els nascuts per part vaginal [16].

Així els primers moments de vida són molt importants per la colonització de la microbiota a l'intestí que es troba afavorida per un pH gàstric relativament elevat i amb una secreció biliar atenuada a diferència de les condicions que es donaran més endavant [28]. És tant impressionant aquesta primera colonització del tracte gastrointestinal que es passa de tenir uns 10^5 bacteris/mL a concentracions equivalents a un adult durant només el primer mes de vida [1]. La colonització va canviant durant els primers mesos de vida sobretot per la dieta administrada al nadó. La llet materna que presenta requeriments nutricionals i fisiològics faran que sigui la millor alimentació per al nadó, amb un alt contingut de proteïnes, greixos, carbohidrats i immunoglobulines. A més a més, aquesta llet també conté unes 600 espècies bacterianes diferents, sobretot del gènere *Bifidobacterium* i oligosacàrids no digeribles que serviran com a prebiòtic estimulant el creixement selectiu d'aquest gènere més

abundant. Per tant, la llet materna i la introducció successiva de diferents aliments afectaran a la maduració del microbioma intestinal del nadó així com també del seu sistema immunitari [16,28]. Al voltant dels 3 anys, la composició de la microbiota es manté relativament estable durant la major part de vida d'un adult sa, però aquest domini del fílum *Actinobacteria* dominat pel gènere *Bifidobacterium* es va perdent al llarg de la vida, canviant cap a un domini major dels fílums *Bacteroidetes* i *Firmicutes* [27]. Finalment durant l'envelliment, la microbiota intestinal es veu afectada disminuint la diversitat i creant una microbiota diferent segurament degut a la disminució de la quantitat de dents, de la funció salival, la digestió i el temps de trànsit intestinal [27]. En la població jove, s'ha observat un major nombre de *Firmicutes* respecte a la gent gran que presenten major nombre de *Bacteroidetes* i una disminució significativa de *Bifidobacterium*, *Bacteroides* i *Clostridium* clúster IV (Figura 3) [27].

Figura 3. Representació dels canvis de la microbiota al llarg de la vida de l'ésser humà. *Imatge de Ottman 2012* [27]



El Projecte de Microbioma Humà de l'institut Nacional de Sanitat dels Estats Units (HMP) [8] i el Projecte Europeu de Metagenòmica del tracte Intestinal Humà (MetaHIT) [29] han descrit variacions considerables de la composició microbiana segons varis factors com hem vist fins ara [8]. La importància d'aquests estudis recau en poder observar diferències entre la microbiota de diferents individus i poblacions però sobretot entre individus sans i individus amb malalties cròniques. Per tal de poder entendre aquestes diferències i degut a la gran complexitat que presenta l'ecosistema intestinal, el consorci MetaHIT el 2011 [22] va identificar patrons composicionals de microbiota trobant variacions d'aquesta i les va agrupar en diferents clústers anomenats enterotips. És important tenir en compte que no només s'estratifiquen els microbiomes de l'intestí humà en enterotips, sinó que també

se n'han proposat per altres parts del cos com és la vagina. L'estudi, va agrupar resultats metagenòmics de mostres fecals de tres països, Dinamarca, Espanya i Estats Units, i es va basar en la composició taxonòmica, independentment de l'edat, el sexe, els antecedents culturals i la geografia dels donants per acabar definint un total de 3 enterotips diferents definits a la taula 1 [22,25]. L'estratificació es dona a nivell de gènere on queda millor reflectit el nínxol ecològic microbià i demostren que els diferents enterotips proporcionen l'energia a l'organisme per vies diferents a partir dels compostos fermentables [30].

Taula 1. Diferents enterotips segons la composició de la microbiota intestinal. *Basada en els estudis d'Arumugan et al. [22] i Costea et al. [25]*

Enterotip 1	<p>Hi predominen els bacteris del gènere <i>Bacteroides</i>. Es troba associat a dietes riques en proteïnes animals i greixos saturats i relacionat amb la producció de vitamina B7 (biotina), B2 (riboflavina) i C (àcid ascòrbic i dehidroascòrbic).</p> <p>Els individus que el presenten es troben relacionats amb poca diversitat microbiana, amb esteatohepatitis no alcohòlica, càncer colorectal, celiaquia, senescència immunitària i inflamació constant de baix grau. També presenten un augment significatiu de limfòcits i proteïna C- reactiva.</p>
Enterotip 2	<p>Es troba dominat per <i>Prevotella</i> que és inversament proporcional als nivells de <i>Bacteroides</i>.</p> <p>Es troba associat a individus amb dietes no occidentals i/o riques en fibra i per tant les hidrolases d'aquest grup es troben especialitzades en la degradació de les fibres vegetals i a la vegada amb la disminució potencial de la fermentació lipolítica i proteolítica. També es troba associat a la producció de vitamina B1 (tiamina) i àcid fòlic i lligat a un ús prolongat d'antibiòtics, a l'artritis reumatoide i diabetis tipus 2.</p>
Enterotip 3	<p>Es troba sobrerepresentat pel fílum <i>Firmicutes</i>, més exactament pel gènere <i>Ruminococcus</i>.</p> <p>L'enterotip presenta una gran quantitat de taxons no identificats. Es troba relacionat amb la descomposició de la mucina, un tipus de proteïna produïda per les cèl·lules de l'epiteli que a la vegada produeix secrecions mucoses a l'organisme i això pot ajudar a l'intestí en l'absorció de nutrients.</p> <p>També es troba relacionat a amb una diversitat microbiana elevada, un estat inflamatori baix, i només s'ha trobat relacionat amb menor risc d'aterosclerosis.</p>

Des que es van definir aquests tres enterotips han estat posats en qüestió. Altres estudis prefereixen agrupar els grups bacterians només entre l'enterotip 1 i 2, en canvi d'altres prefereixen fer-ho amb 4 enterotips diferents [25]. Per tant, la classificació en tres enterotips pot ser que no sigui la més correcte

i encara faltin estudis per poder agrupar correctament la microbiota, tot i així de moment és la més utilitzada.

En la majoria d'estudis, els enterotips dels individus estudiats no han variat al llarg de llargs períodes de temps, indicant que normalment l'ecosistema, i per tant aquests enterotips, són estables en l'edat adulta [31]. Tot i així s'han observat excepcions provocades per tractaments amb antibiòtics, transplantaments fecals o canvis a la dieta de llarg períodes [27].

1.3.2 Microbiota intestinal segons la dieta

La dieta presenta un paper fonamental en la funció i composició de la microbiota intestinal determinant una relació entre l'hoste i el microbioma intestinal. La composició i funcions del microbioma són responsables del metabolisme humà, regulant així l'equilibri entre la salut i la malaltia com hem vist i és per aquesta raó que una dieta sana ha de tenir en compte tant les necessitats dels bacteris comensals com les del cos humà [32].

La majoria de dietes a curt termini en humans sans donen lloc a alteracions ràpides i no s'arriben a produir canvis en la taxonomia de la microbiota, tot i que s'ha demostrat que dietes extremes sense fibres complexes presenten un efecte pronunciat sobre la microbiota humana fent que el principal component dietètic relacionat amb el microbioma sigui la fibra dietètica [32]. Quan l'individu presenta una absència d'ingesta de fibra i un augment de greixos a la dieta es pot observar un augment en l'abundància de microorganismes tolerants a la bilis (*Alistipes*, *Bilophila* i *Bacteroides*) i una disminució en els nivells de *Firmicutes* com *Roseburia*, *Eubacterium* i *Ruminococcus* encarregats de metabolitzar polisacàrids vegetals [33]. Cada població presenta una dieta diferent fent que la microbiota també variï. S'ha descrit que la microbiota dels nens europeus presenten menys quantitat de *Prevotella*, més quantitat de *Bacteroides*, menor riquesa microbiana i una producció menor d'àcids grassos de cadena curta (AGCC) que els nens de Burkina Faso, que presenten una dieta rica en fibra i proteïnes no animals si la comparem amb la dieta occidental [34]. Són molts els estudis que han demostrat un augment de la riquesa microbiana amb dietes riques en fruites, verdura i fibra. Tot i així, la dieta baixa en oligosacàrids, disacàrids, monosacàrids i poliols fermentables (FODMAP) s'utilitza actualment per a reduir la inflamació en pacients amb síndrome d'intestí irritable. La dieta es basa en una menor ingestió de carbohidrats difícils d'absorbir, i una disminució del consum d'aliments rics en fibra que els bacteris fermentarien a l'intestí gros. Algunes fruites que serien aptes per menjar seguint aquesta dieta són els plàtans, les baies i els cítrics. En canvi, pomes, peres i fruites amb os no estarien recomanades. A més a més la dieta prohibeix el consum de mel, edulcorants, el blat i els llegums mentre que permet sucs, sucre, civada i arròs [35]. Tot i que aquesta dieta provoca menys concentració d'AGCC a l'intestí, és utilitzada pel tractament de malalties inflamatòries intestinals (MII) manifestant així la complexitat

entre la producció, l'absorció i l'excreció dels AGCC [36]. El fet de disminuir els AGCC pot provocar l'alteració dels beneficis de la microbiota intestinal causant un efecte negatiu en l'absorció de nutrients, pel que el seguiment d'aquesta dieta a llarg termini no està recomanat. Tot i així, aquesta dieta ha demostrat una reducció d'alguns símptomes gastrointestinals com el dolor i la inflor en el 86% dels pacients amb síndrome de l'intestí irritable (SII) [37]. D'altra banda, no millora la consistència fecal [38] i la seva complexitat fa que sigui de difícil mantenir al llarg del temps. Malgrat que el SII i les MII presenten clares diferències fisiopatològiques, principalment lligades al grau d'inflamació i a la presència d'ulceracions visibles, la similitud en els símptomes externs entre SII i les MII fa que també es proposi aquesta dieta per als pacients amb MII [39].

Tot i que la microbiota amb el canvi de dietes s'observi alterada no hi ha una clara associació entre el canvi de dieta i el canvi d'enterotip a no ser que la dieta sigui a llarg termini [27,31].

1.3.3 Microbiota intestinal i tractament amb antibiòtic

A banda de la dieta, un altre factor extern que pot afectar a la microbiota és el tractament amb antibiòtics. Tot i que els antibiòtics han estat utilitzats per tractar infeccions bacterianes amb molt d'èxit, en els països desenvolupats el seu ús ha sigut desmesurat i mal utilitzat, comportant l'aparició de bacteris resistents a aquestes substàncies i provocant problemes a la salut pública. La teràpia amb antibiòtics afecta tant al bacteri diana com a la comunitat que es troba associada a l'hoste, especialment a l'intestí, i per aquesta raó indueix a una reducció de la diversitat microbiana [40]. Per exemple, s'ha observat que el tractament durant catorze dies amb antibiòtics beta-lactàmics fa desaparèixer certs taxons com, del filum *Actinobacteria* (els gèneres *Slackia* i *Bifidobacterium*), dels *Firmicutes* (els gèneres *Streptococcus*, *Roseburia*, *Eubacterium* i *Subdoligranulum*), dels *Proteobacteria* (el gènere *Gemmiger*), i també dels *Bacteroidetes* (el gènere *Barnesiella*) [41]. Altres antibiòtics són altament actius en front a bacteris anaeròbics, com la clindamicina, provocant un impacte important sobre la microbiota intestinal ja que provoca una reducció important de la majoria de Firmicutes i alguns Actinobacteris, facilitant que el patògen oportunista *Clostridium difficile* pugui tenir un creixement excessiu. També pacients tractats amb moxifloxacina presenten reduccions en els nivells dels gèneres *Faecalibacterium* i *Bacteroides*. Altres antibiòtics també han demostrat alteracions i desequilibris en la microbiota intestinal i s'ha observat que el tractament amb antibiòtics causa que la microbiota alliberi carbohidrats de la mucosa com la fucosa i l'àcid siàlic, afavorint l'expansió de patògens oportunistes com *Salmonella typhimurium* o *Escherichia coli* [40]. El tractament amb antibiòtics, a banda de la disbiòsi que pot causar en adults sans, és de les primeres medicacions que es dona en nadons o nens petits que encara no presenten una comunitat bacteriana definitiva. Per aquesta raó, desequilibris en la microbiota degut a l'ús d'antibiòtics en la primera infància, amb la

combinació de susceptibilitats genètiques poden causar un impacte al sistema immunitari provocant malalties cròniques en edats més avançades com la MII, l'asma i l'obesitat [42,43].

2. Funcions de la microbiota intestinal

La importància de les funcions dels microorganismes intestinals és el que fa que la microbiota intestinal sigui tant rellevant en la salut humana i que la vida no sigui possible sense ella. Moltes d'aquestes funcions es troben interconnectades entre sí i estan relacionades amb la fisiologia humana. Aquestes funcions es poden dividir entre funcions metabòliques i funcions protectores que inclouen la fermentació d'aliments no digeribles en metabòlits absorbibles, l'eliminació de toxines, la síntesi de vitamines essencials així com també d'aminoàcids, la competència amb patògens, el reforç de la barrera intestinal i la regulació del sistema inflamatori i immunitari [44].

2.1 Funcions metabòliques

Els enzims humans no són capaços d'utilitzar els compostos alimentaris no digeribles com són alguns carbohidrats, així que aquests aliments arriben a l'intestí gros casi intactes on són fermentats per la microbiota intestinal generant AGCC i gasos com CH₄, H₂, CO₂. El tipus i la quantitat d'AGCC i els gasos generats depenen de múltiples factors, incloent l'edat, la dieta, la disponibilitat dels carbohidrats no digeribles, la composició de la microbiota, el trànsit intestinal i la zona del còlon [45].

Els principals AGCC generats per la microbiota són l'acetat, el propionat i el butirat [46]. L'acetat és el principal AGCC que hi ha al còlon i és essencial pel creixement d'altres bacteris. A més a més actua proporcionant una font d'energia per als teixits perifèrics, com el fetge, on s'utilitza per a la lipogènesis i la síntesi del colesterol [46]. L'acetat es produeix per una gran quantitat de bacteris però en canvi, el propionat i el butirat són produïts per bacteris específics [36]. Els principals productors de butirat a l'intestí són els *Firmicutes* com *Lachnospiraceae* i *Faecalibacterium prausnitzii*. En canvi, el propionat és produït per *Bacteroidetes*, sobretot les espècies *Bacteroides*, *Negativicutes* i algunes espècies *Clostridium*. Uns pocs bacteris poden produir els dos àcids, butirat i propionat i s'ha observat que, sota diferents condicions de creixement, poden variar el tipus d'AGCC produït. *Roseburia inulinivorans* produeix normalment butirat però quan creix amb fructosa com a font d'energia produeix propionat. De la mateixa manera, *Ruminococcus obeum* produeix normalment acetat al créixer amb glucosa, però produeix propionat quan creix amb la presència de fructosa [36]. D'aquesta manera, alternant el contingut de carbohidrats de la dieta es poden alterar els perfils de producció d'AGCC afectant a la composició bacteriana. El butirat és l'AGCC més important ja que és la principal font d'energia dels colonòcits (cèl·lules epitelials colòniques) i aquests l'utilitzen pel seu metabolisme i desenvolupament, jugant un paper important en la modulació del sistema immunitari i en l'enfortiment de la barrera intestinal. A més a més, té l'habilitat d'induir l'apoptosi de les cèl·lules cancerígenes del còlon a banda

d'activar la gluconeogènesis intestinal afectant així la glucosa i l'equilibri energètic [36]. En canvi, el propionat travessa els colonòcits arribant al fetge on representa un substrat per la gluconeogènesis i regula la síntesi del colesterol [45]. Encara que els AGCC absorbits al còlon representin entre un 6 i 10% dels requisits energètics dels humans són molt importants en el balanç energètic. A més a més, algunes cèl·lules com els adipòcits, poden sentir l'augment dels AGCC induint la producció d'hormones com la leptina, la qual envia senyals al cervell per regular la gana i la despesa energètica [46]. Els bacteris també produeixen productes intermediaris a partir de la fermentació com el fumarat, succinat i lactat però aquests normalment es detecten en nivells baixos ja que són ràpidament utilitzats per altres bacteris [36]. Tot i així, en pacients amb CU el lactat es pot detectar en quantitats significativament més elevades i pot servir com un indicador de la malaltia [47].

La microbiota intestinal també presenta la capacitat de modular neurotransmissors. Els nivells de triptòfan, un precursor d'un gran nombre de metabòlits però en especial la serotonina, s'ha vist que pot veure's incrementat per diversos grup bacterians, com els *Bifidobacterium*, suggerint que la microbiota pot alterar els nivells de serotonina i finalment provocar una comunicació entre l'intestí i el cervell [18].

Altres funcions metabòliques són la síntesi de vitamines essencials com la vitamina K i B i la síntesi d'aminoàcids mitjançant la seva activitat proteolítica [9,36]. Un altre paper molt important també es troba en la modulació del metabolisme dels greixos. Per exemple, els àcids biliars, sintetitzats a partir del colesterol al fetge, són metabolitzats més tard per la microbiota del còlon formant àcids biliars secundaris. Els àcids biliars tenen la funció de contribuir al procés d'absorció dels greixos a l'intestí prim degut a la seva naturalesa tensioactiva que els permet ajuntar-se amb molècules de greix i formar micel·les que poden ser absorbides per l'hoste facilitant així el metabolisme de greixos. El 95% dels àcids biliars es reciclen, però el 5% restant arriben al còlon on la microbiota els transforma en àcids biliars secundaris utilitzant enzims hidrolases de sals biliars. Aquest fet és el que envia senyals a diversos receptors per tal de regular la síntesi d'àcids biliars [18,36].

2.2 Funcions protectores

Una de les funcions protectores que presenta la microbiota intestinal és l'estimulació i regulació del sistema immunitari. La barrera intestinal és la primera línia de defensa contra patògens i antígens de l'intestí. S'encarrega de controlar el flux de nutrients i bacteris i de mantenir l'equilibri del sistema immunitari, influint així en la nutrició i la defensa de l'hoste a través de la microbiota intestinal. La barrera intestinal està composta per tres capes: 1) La capa mucosa al lumen intestinal, que evita l'adhesió de microorganismes degut a la seva densitat, mentre que la part més externa és una paret molt dinàmica amb un alt contingut de glicans que utilitzarà la microbiota com a font d'energia per tal

de mantenir la integritat d'aquesta barrera. 2) Les cèl·lules epitelials intestinals, que regulen el transport d'aigua i de nutrients als teixits de l'hoste. 3) La capa interior, anomenada làmina pròpia on es troben les cèl·lules immunitàries i per tant, és on s'organitza la resposta immunitària distingint entre agents patògens i microorganismes comensals. Quan aquesta barrera es troba alterada pot augmentar la permeabilitat intestinal provocant un descontrol en el pas de substàncies des de l'interior de l'intestí i acabar desencadenant una reacció immunitària inadequada així com també una reacció inflamatòria [48]. El manteniment de l'homeòstasi bacteriana, o eubiosi, va lligat amb el sistema immunitari on els microorganismes de la mucosa intestinal han de ser tolerants amb els comensals beneficiosos però en canvi, evitar el creixement excessiu dels patògens residents. Els metabòlits produïts per la microbiota poden enviar senyals essencials per a promoure la síntesi de proteïnes antimicrobianes o Immunoglobulines locals i produir restriccions al pas de la microbiota cap a la circulació, prevenint un sobrecreixement i evitant així una resposta immunitària sistèmica [9]. Si no es regulen aquestes respostes es poden produir patologies que poden anar des de malalties inflamatòries de l'intestí, al·lèrgies o síndromes metabòlics, entre d'altres [49].

L'intestí és la zona del cos on arriben antígens aliens i, per tant, és on trobem un gran òrgan limfoide anomenat teixit limfoide associat a l'intestí amb les sigles amb anglès "GALT" ("gut-associated lymphoid tissue"). És l'estructura més gran de teixits limfoides del cos, organitzat i dispers en la làmina pròpia i l'epiteli intestinal i és el responsable de determinar la localització de la resposta immunitària. Per altre banda, els macròfags reconeixen els antígens i els fagociten però també modulen la resposta immunitària mitjançant la producció de citocines i factors de creixement. D'aquesta manera els bacteris intestinals transmeten senyals a les cèl·lules immunitàries com macròfags i limfòcits mitjançant l'expressió de molècules com poden ser els lipopolisacàrids (LPS), que acabaran d'activar la resposta immunitària i per tant també la inflamatòria [50].

La microbiota també promou el desenvolupament immunològic en la infància ja que s'ha observat que, l'exposició de la microbiota abans i durant la gestació així com també en el moment de néixer, presenta un paper molt important a l'hora de tenir una bona resposta immunitària [51]. També, el calostre i la llet materna que contenen microorganismes vius, metabòlits, immunoglobulines A i citocines defineixen la resposta del sistema immunitari [12].

Dins la funció protectora del sistema immunitari, la microbiota intestinal també presenta un paper antiinflamatori mitjançant l'antagonisme contra bacteris que causen inflamació, millorant la barrera intestinal o interactuant amb els components que produeixen la inflamació. Aquestes tres accions es poden dur a la vegada i s'han estudiat certes soques de *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* com a supressores de la inflamació al igual que certes fibres alimentàries que estimulen selectivament

aquests gèneres [50,52]. La inflamació és la reacció de defensa del cos contra lesions causant un augment de flux sanguini a la zona afectada provocant dolor, inflor, calor, enroigiment i un alliberament de compostos que donen lloc a senyals nervioses per tal d'eliminar l'agent que l'ha provocat. La inflamació es pot donar tant per factors externs com interns. Un potent desencadenant de la inflamació per factors interns és la presència de microorganismes en llocs on no hi haurien de ser presents. Per tant, una reacció immunitària comporta l'activació del sistema de defensa inflamatori per tal de fer arribar una gran quantitat de cèl·lules del sistema immunitari a la zona. A banda de certs bacteris i certes fibres, els polifenols també presenten una activitat antiinflamatòria i antioxidant però tenen una estructura complexa que l'organisme humà no pot aprofitar sense que la microbiota els faci disponibles per a ser absorbits i aleshores, gràcies a l'esmentada activitat, reduir el risc de les malalties intestinals [53].

Una altre funció protectora molt important és la competència que presenta la microbiota intestinal contra organismes patògens. La microbiota es considera un mecanisme de defensa innat de l'organisme degut a que pot evitar la colonització d'aquests patògens mitjançant: 1) L'ocupació dels receptors a les mucoses intestinals abans que ho facin els patògens; 2) Produint compostos (postbiòtics) antimicrobians com poden ser bacteriocines, AGCC, àcid làctic o peròxid d'oxigen, que inhibeixen el creixement; i 3) Coagregant-se amb els potencials patògens [54].

3. Com estudiar la microbiota

El coneixement de l'existència de la microbiota al nostre organisme data de fa molt temps, però no ha sigut fins relativament pocs anys que gràcies a les noves tècniques genotípiques d'identificació ens hem adonat de la gran diversitat i funcionalitat que presentava per l'organisme. La microbiota pot ser estudiada mitjançant tècniques analítiques com la seqüenciació de nova generació, però també s'ha d'entendre gràcies a paràmetres numèrics i estadístics per a la seva interpretació, així com també gràfics. Els models *ex vivo* de fermentació també poden ajudar a entendre la microbiota sense tenir problemes ètics abans d'estudiar la microbiota amb estudis clínics o models *in vivo*.

3.1 Tècniques d'anàlisi

Les primeres tècniques d'estudi de microorganismes van ser el cultiu pur, la microscòpia i les tincions. Durant el s. XVII Antonie van Leeuwenhoek va observar per primera vegada bacteris a través d'un microscopi creat per ell mateix i durant 200 anys els científics van anar observant microorganismes sense ser classificats ni aïllats [55]. El primer cultiu pur va ser obtingut pel micòleg Brefeld quan va aconseguir aïllar espores de fongs i cultivar-les en medi sòlid amb base de gelatina [56]. Aquest mètode no era viable pels bacteris degut al seu petit tamany, així que Lister, el 1878 va realitzar dilucions seriades de cultius mixtes fins aconseguir que només hi hagués una única cèl·lula [57]. Aquesta feina

comportava una tasca molt llarga on només s'aconseguia aïllar les cèl·lules del tipus bacterià més abundant del cultiu original així que Koch, que estudiava bacteris patògens, va utilitzar rodanxes de patata com a substrat sòlid nutritiu sobre el qual podien desenvolupar-se colònies visibles de bacteris i on més tard també hi va afegir caldo de carn i gelatina per millorar el creixement. Poc després es va dissenyar l'agar-agar, un polisacàrid extret d'algues vermelles com agent solidificant del medi a banda del desenvolupament de les primeres plaques de petri [56]. Durant els següents anys i en els inicis del segle XX, es van anar desenvolupant medis selectius, d'enriquiment i diferencials basats en el principi de la selecció natural per afavorir només el creixement de certs tipus de bacteris o poder observar la seva diferenciació a través d'indicadors de pH [58]. L'any 1878, Abbé va desenvolupar l'objectiu en oli d'immersió just quan es van subministrar colorants que permetien fàcilment visualitzar els bacteris al microscopi [59]. Tot i així, només es podien classificar aquells microorganismes que fossin cultivables.

Pocs anys abans, el biòleg Frierich Miescher l'any 1869 va aïllar per primera vegada l'ADN. Durant els següents anys es va estudiar la seva estructura i funció i el 1952 es va descobrir que era la molècula responsable de l'herència. L'any següent Rosalind Franklin, Maurice Wilkins, Francis Crick i James Watson van guanyar el premi Nobel per descobrir l'estructura de doble hèlix del ADN donant lloc a la possibilitat de realitzar còpies d'aquest. A partir del 1970, quan els microbiòlegs van començar a canviar el concepte de la microbiologia clàssica acceptant la idea que existien molts microorganismes que no eren cultivables (un 99.8%), es va afirmar que l'ADN podria ser seqüenciat per un procediment químic, mitjançant el qual era possible determinar l'ordre de la seqüència dels nucleòtids del ADN en només unes hores. Durant aquells anys, la biologia molecular va fer molts canvis en poc temps donant a lloc a descobriments com, els enzims de restricció, la clonació de gens en plàsmids i fags i les tècniques de hibridació en filtre per ADN i ARN (Southern i Northern Blot) [60].

El següent pas molt important va ser el 1983 quan Kary Mullis va desenvolupar una tècnica que va fer possible la síntesi de grans quantitats d'un fragment d'ADN sense haver-lo de clonar, conegut amb el nom de reacció en cadena de la polimerasa, coneguda per PCR per les seves sigles amb anglès. Aquest procés permetia copiar milions de vegades una seqüència determinada dins d'una mescla d'ADN inclús amb només una única molècula d'aquest ADN, en poc temps. A partir de llavors, es van crear equips i reactius per dur-la a terme igual que es van començar a comercialitzar seqüenciadors automàtics que permetien observar fins a 200 parells de bases per mostra i hora. Es van anar millorant els equips fins que el 2003 es va poder obtenir la seqüència sencera del genoma humà [60]. Partint que seqüenciar el genoma humà va costar uns 2.047 milions d'euros i que es va tardar més d'una dècada en finalitzar-se, era obvi que es necessitava una alternativa per a la seqüenciació genètica i així va néixer la Seqüenciació de nova generació (NGS), ultraseqüenciació o tecnologia de seqüenciació massiva. El seu principal fonament és realitzar múltiples seqüències curtes (entre 100 i 300 bp, segons la tecnologia

concreta emprada) de manera paral·lela, produint milions de lectures al mateix temps amb un cost econòmic baix. A diferència de les tecnologies de seqüenciació anteriors, la NGS requereix d'un processament de dades important per identificar seqüències solapants o similars entre els milions de lectures, i per tant es troba íntimament lligada als avenços en potència de càlcul i en els algorismes bioinformàtics. L'aparició de les diferents plataformes de NGS és precisament el que ha permès la realització dels estudis metagenòmics basats en la identificació i caracterització del microbioma. Actualment estan començant a aparèixer seqüenciadors de tercera generació on la seqüenciació és a temps real, però el cost encara és elevat [61–63].

Per tal d'estudiar la microbiota intestinal d'un organisme el primer pas és obtenir una mostra d'aquesta. Una manera ràpida i fàcil és a través de la femta de l'organisme, el qual dona una mostra representativa de la zona del còlon [64] i és la més utilitzada per a realitzar estudis *in vitro* degut a que la presa de mostra s'obté fàcilment, té una densitat microbiana molt elevada i una contaminació genètica humana mínima, la que permet assajar amb diverses tècniques moleculars [8]. Tanmateix, cal tenir present que, tot i ésser les més utilitzades, les mostres de femta no permeten detectar diferències en la distribució de microorganismes al llarg del còlon (còlon ascendent, transvers, descendent o sigmoide) ni en la estratificació de microorganismes en el mucus intestinal, més a prop o més lluny de l'epiteli. Una altre limitació d'utilitzar mostres fecals és que la seva composició es veu influïda pel temps de trànsit intestinal [65]. Després s'aïlla l'ADN de les mostres per tal de poder realitzar l'estudi metagenòmic o la seqüenciació massiva a través de reactius especials. Un cop obtingut el DNA es creen biblioteques de seqüenciació que seran el resultat de moltes seqüències curtes de nucleòtids (lectures) corresponents als genomes de tots els microorganismes presents a la mostra. Aquestes seqüències es poden obtenir generalment de dues maneres 1) Obtenció de seqüències aleatòries obtingudes de la totalitat del material genètic present a la mostra 2) Obtenció de lectures que pertanyen a un gen fix per cada espècie on normalment s'utilitza el gen 16S rRNA [66]. En el primer cas, en l'estudi metagenòmic s'obtingran seqüències de tot el material genètic obtenint tots els genomes de tots els bacteris que hi ha presents a la mostra. Tot i que poden ajudar a comprendre la diversitat taxonòmica i també l'estructura funcional de la comunitat microbiana, més de la meitat de les lectures de seqüenciació procedents d'un metagenoma fecal humà no es pot mapar amb els genomes de referència bacterians existents. Aquesta manca de genomes de referència d'alta qualitat s'ha convertit en un obstacle pels anàlisis d'alta resolució del microbioma intestinal humà [67] i, a més a més el seu procediment és costós.

En canvi, quan s'obtenen les seqüències que pertanyen a un gen en concret, el primer pas és saber amb quin perfil de la comunitat bacteriana es vol treballar. La regió genòmica que codifica l'ARN de la subunitat ribosòmica petita, coneguda com a 16S, és la més utilitzada en estudis metagenòmics. El gen

16S rRNA de la majoria de bacteris és una regió hipervariable i conservada que permet als investigadors poder detectar i identificar bacteris. Aquest gen està comprès en 9 regions hipervariables (V1-V9) que difereixen en llargada, posició i taxonomia i serveixen per detectar aquest gen [68]. Per tal d'identificar aquestes zones s'han designat primers universals específics per les regions hipervariables [69]. Per tant, la majoria d'estudis es basen en seqüències parcials del gen 16S degut a les limitacions que presenten les tecnologies de seqüenciació que permeten detectar 300pb aproximadament, mida que presenta cada regió aproximadament [70]. Alguns autors han detectat que alguns gèneres bacterians no poden ser detectats amb segons quines regions (o primers) i tot i que no hi ha cap regió que pugui identificar tots els gèneres, la regió V4 és generalment la més informativa i per tant la més utilitzada [71,72]. Aquesta regió està recomanada pel projecte Microbioma de la terra (<http://www.earthmicrobiome.org>) i els primers més utilitzats per identificar-la són 515F-806R [73].

Les diverses plataformes de seqüenciació que et permeten detectar el gen 16S difereixen en la debilitat de la lectura, la precisió, el temps de resultat i el rendiment. Les més utilitzades són les tecnologies de les cases Illumina (MiSeq QSeq), Life Technologies (Ion Torrent), Roche i Pacific Bioscience RS II [62].

Amb l'ajuda de la bioinformàtica, a partir de les seqüències obtingudes s'arriba a l'obtenció de dades entenedores per a poder-les analitzar. El primer pas és eliminar aquelles seqüències redundants de baixa qualitat i seqüències d'origen eucariota per tal de poder ensamblar les seqüències obtingudes i obtenir fragments més llargs mitjançant programes bioinformàtics com el QIIME o el Mothur [66]. Les seqüències s'agrupen en unitats taxonòmiques operatives (OTU) segons la similitud de les seqüències obtingudes comparades amb les bases de dades per identificar els microorganismes presents. El terme OTU és la unitat de classificació seleccionada pel propi investigador que l'utilitza sense correspondre a una entitat biològica en particular. Segons el nombre de vegades que s'ha obtingut una seqüència respecte el total de lectures realitzades, s'aconsegueix l'abundància relativa de cada OTU. De totes maneres, el terme OTU no s'utilitza en la seqüenciació de la totalitat del material genètic que se centra en una espècie microbiana en concret.

Una de les grans limitacions de la Metagenòmica és que no dona informació de les funcions biològiques de la comunitat microbiana. És per això que la generació i la integració de lectures conjuntes de metagenoma (gens), metatranscriptoma (canvis en l'expressió gènica), metaboloma (resultats metabòlics) i metaproteoma (proteïnes) permeten una valoració funcional detallada [44].

3.2 Paràmetres numèrics d'interpretació

Les dades obtingudes a partir de la seqüenciació necessiten ser interpretades. Tot i que la informació bàsica mostra els bacteris presents (a tots els nivells taxonòmics) i les seves abundàncies relatives es necessiten anàlisis addicionals per entendre la diversitat de les mostres, la riquesa, les semblances i

diferències que poden presentar varies mostres, inclús comparacions estadístiques per determinar canvis de la microbiota, etc.

Els paràmetres com són l'alfa i la beta diversitat de les mostres són dels primers paràmetres a analitzar. La diversitat es pot entendre dins d'una mateixa mostra, fent referència al que s'anomena alfa-diversitat o entre diferents mostres, la beta-diversitat. Hi ha diferents mesures per descriure-les, la més bàsica és la riquesa, que observa la presència i absència de les OTUs. Altres mesures també tenen en compte l'abundància relativa de les OTUs presents a la mostra (uniformitat) [74,75]. Cada mesura o índex de diversitat presenta la seva fórmula per ser calculada. Per tant, encara que varis índexs observin els mateixos paràmetres (riquesa i uniformitat) no tots presentaran la mateixa importància, donant diferències entre índexs. Les corbes de rarefracció també s'utilitzen per avaluar la riquesa d'espècies en un nombre donat de mostres individuals, on la corba creix quan es van trobant noves OTUs i en canvi la corba es conserva quan a mesura d'observar més mostres ja no es troben noves OTUs [76].

Dins les mesures més utilitzades per estudiar l'alfa diversitat la més bàsica és el recompte total d'OTUs presents (riquesa) i l'índex de Shannon. Aquest últim observa la presència i absència de les OTUs per descriure la incertesa relativa de predir correctament els següents taxons (Taula 2). De totes maneres existeixen altres mesures que inclouen la uniformitat de la mostra com és l'índex de Chao1, que observa aquelles OTUs que contenen una única lectura, estimant que sí continués observant més mostres trobaria noves OTUs i per tant segons la seva fórmula, quantes més OTUs hagi trobat només una única vegada més augmentarà el seu valor. També s'utilitza l'índex de Simpson per descriure l'alfa diversitat, que s'utilitza per comunitats grans ja que expressa la probabilitat que dos individus qualsevols extrets a l'atzar d'una comunitat molt gran pertanyin a la mateixa espècie.

També podem trobar els nombres de Hill, molt utilitzats per caracteritzar la diversitat, que són la unió de diverses famílies d'índexs de diversitat i per tant mostren la relació entre els índexs de riquesa d'espècies i els índexs d'uniformitat. Els nombres de Hill només es diferencien entre si per un exponent i incorporen l'abundància relativa i la riquesa. Un dels nombres de Hill és la riquesa d'OTUs presents a la mostra (Hill 0, $q>0$), el següent nombre de Hill es refereix a les espècies efectives (Hill 1, $q=1$) i es calcula fent l'exponencial de l'índex de Shannon, i el tercer nombre es refereix a l'invers de Simpson (Hill 2, $q=2$) que té en compte les espècies altament efectives (les més abundants) [77].

Els índexs per estudiar la beta-diversitat i observar les similituds entre mostres també poden tenir en compte només la riquesa, com són l'índex de Jaccard i de Sorensen, dos índexs molts semblants que donen un valor de similitud a partir de la comparació de les OTUs presents a les mostres donant la mateixa importància a cada una. En canvi, l'índex de Bray-Curtis o Jensen-Shannon tenen en compte

la abundància relativa de les OTUs presents. També es poden donar correlacions per estudiar la similitud entre mostres com la correlació de Pearson, que mesura l'associació entre dues variables per saber la seva relació lineal trobant si hi ha dependència entre les variables. La correlació de Spearman en canvi, és la versió no paramètrica (on no es fan suposicions sobre cap paràmetre) de Pearson, així agrupa les OTUs per rangs segons l'abundància que presenten. També podem estudiar la distància entre mostres a partir de la mesura de Hellinger, que utilitza l'arrel quadrada de l'abundància i així redueix una mica la importància de les OTUs més abundants però sense arribar a equiparar-les a les menys abundants, o l'índex d'Euclidea que utilitza cada OTU com un vector diferent i calcula la distància entre vectors, i per tant és molt sensible a les OTUs més abundants [78,79]. Per tant, moltes d'aquestes mesures varien segons la importància que donin a l'abundància. En el cas de la correlació de Pearson i Euclidea no funcionen gaire bé degut a la gran importància que donen a les OTUs abundants. Tot i així, més que dir que hi ha mesures millors que d'altres, cal reconèixer que les diferents mesures proporcionen diferents tipus d'informació, o diferents perspectives, i gràcies a aquestes diferències podem entendre les variacions que tenim d'OTUs entre mostres [75]. Per tant, sol resultar convenient emprar més d'una mesura, suficientment diferents entre elles, a fi d'obtenir informació des de diferents perspectives, principalment pel que es refereix al paper de les OTUs més abundants i les menys abundants.

Taula 2. Equacions de les mesures de diversitat emprades en aquesta tesi.

Índex de Shannon	$H = -\sum_{i=1}^s (p_i \ln p_i)$	S = Nombre d'OTUs presents P_i = Abundància relativa per aquella OTU i
Hill 1	$Hill\ 1 = e^H$	H = Índex de Shannon
Índex de Simpson (Hill 2)	$D = \frac{1}{\sum_{i=1}^s p_i^2}$	S = Nombre total d'OTUs P_i = Abundància relativa per aquella OTU i.
Índex de Sorensen	$QS = \frac{2C}{A+B} = \frac{2 A \cap B }{ A + B }$	A i B = Nombre d'OTUs de les mostres A i B, respectivament C = Numero d'OTUs compartides per les dues mostres
Índex de Bray-Curtis	$BC_{ij} = 1 - \frac{2C_{ij}}{S_i + S_j}$	C_{ij} = Suma dels valors menors de les espècies en comú S_i = Numero d'OTUs a cada mostra i, i j, respectivament

Totes aquestes mesures de beta-diversitat s'acompanyen de gràfics que ajuden a entendre les dimensions de les similituds. Per exemple, es pot utilitzar l'anàlisi de coordenades principals (PCoA) que situa les mostres en un espai d'ordenació en funció dels seus perfils de microbiota total. Si totes les OTUs de totes les mostres són compartides de manera uniforme entre les mostres, llavors les mostres es situen a les ordenades 0.0. Així, les mostres més allunyades d'aquest punt són més diferents i les mostres més properes són més semblants entre elles que amb les allunyades. S'utilitza per comparar mostres amb diferents variables d'interès [74]. En canvi no es pot utilitzar l'anàlisi de components principals (PCA) degut a la gran comparació de variables que hi ha entre diferents mostres (diferents OTUs i abundàncies entre mostres). També es pot utilitzar l'escala multidimensional no mètrica (NMDS) que observa les distàncies entre mostres, i permet observar el nivell de similitud de cada una de les mostres dins d'un conjunt de dades (OTUs). A més, permet la reducció de la dimensió no lineal ja que visualitza la informació en una matriu de distància [75].

Per tal d'estudiar la significació de les distàncies obtingudes es pot fer mitjançant la comparació entre les mitjanes de les rèpliques en estudi, creant grups i comparant-los entre ells amb un test *t*-Student que compara mitjanes entre dos conjunts de dades o també amb un anàlisi de variància (ANOVA) que permet comparar mitjanes entre més de dos grups mirant diferències únicament entre grups. Per aquesta raó, quan tenim varis conjunts de mostres, amb moltes abundàncies d'OTU per cada una i altres variables afegides, un ANOVA no és possible i s'utilitzen els anàlisi de similitud (ANOSIM) o anàlisi de variació multivariant permutacional (PERMANOVA). Els dos es basen en la comparació intra i entre grups, però la principal diferència entre ells és l'enfoc a la comparació. L'ANOSIM compara rangs de variacions similars mentre que el PERMANOVA compara els valors de variació estimant la significació amb un mètode de permutació [80]. Per tant l'ANOSIM observa la diferència significativa entre dues o més mostres, comparant els rangs de distàncies entre els objectes de les diferents mostres, amb els rangs de distàncies entre objectes dins de la mateixa mostra, de manera que l'enfocament és molt similar al NMDS, únicament diferenciant-se en que l'ANOSIM treballa amb rangs [75].

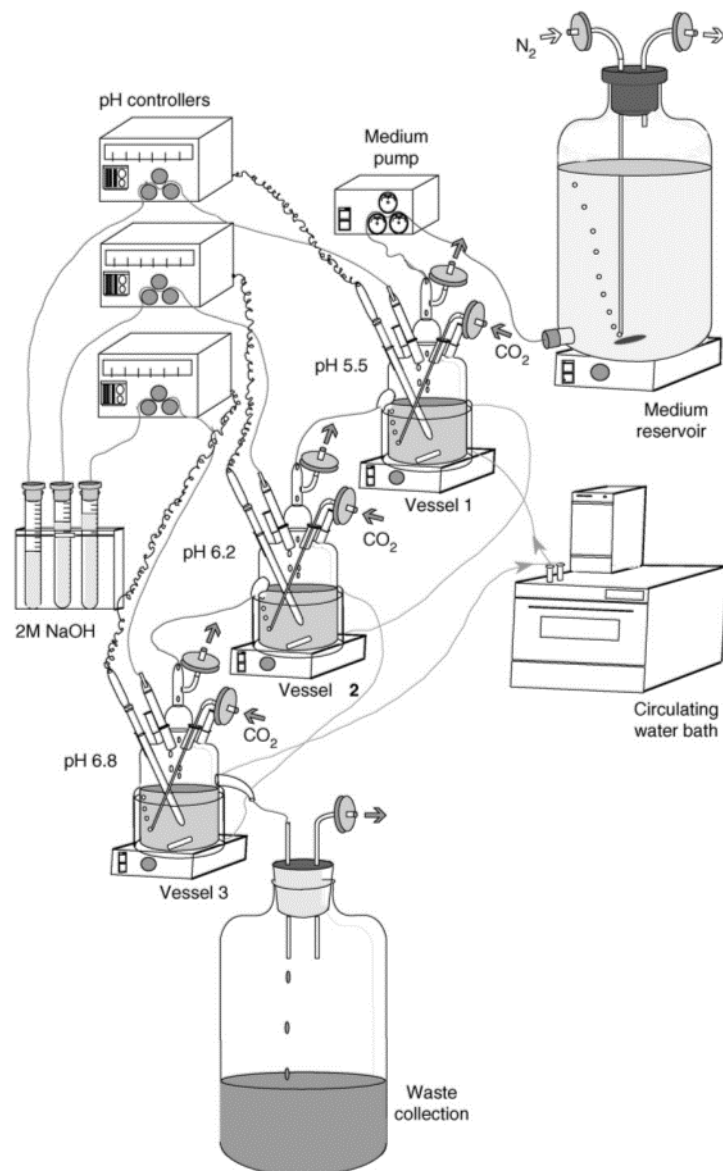
3.3 Estudi de la microbiota per fermentació *ex vivo*

Els models de fermentació *ex vivo* són considerats ideals per a l'estudi de substàncies com són els probiòtics o prebiòtics ja que permeten veure les alteracions causades a la població microbiana sense tenir problemes ètics i permetent un mostreig dinàmic al llarg del temps. Existeixen des de models simples que fan incubacions curtes amb fermentacions estàtiques fins a models complexos continus que inclouen varis reactors, simulant el pas per diferents zones del tracte gastrointestinal.

Els inconvenients dels sistemes estàtics són l'acumulació de metabòlits que inhibeixen l'activitat microbiana i per tant necessiten llargs períodes per a poder fermentar el component d'interès. Serveixen bàsicament per tenir una primera visió dels resultats ja que s'allunyen molt de la realitat en quant a condicions no controlades com pH o potencial redox del fermentador [81]. Per altre banda, la majoria de models dinàmics de fermentació en diverses etapes es basen en el model descrit per Gibson 1988 (Figura 4) [82], un model continu de tres vasos alineats en sèrie de manera que es produeix una alimentació seqüencial del medi de creixement que imita les condicions del còlon proximal, transversal i distal. Les seves condicions es van adaptar per Macfarlane el 1992; és per aquest motiu que el sistema també rep el seu nom. El pH utilitzat a la fermentació per aquest sistema varia segons la zona i es troba detallat a la figura 4. L'etapa proximal simula una alta disponibilitat de substrat i per tant hi ha una elevada taxa de creixement bacterià, en canvi l'última etapa presenta menys disponibilitat de nutrients i per tant la taxa de creixement és més lenta. Gibson també va desenvolupar un medi nutritiu que molts estudis han utilitzat ja que simula molt bé les condicions de l'intestí. Es tracta d'un caldo amb substrats proteics, hidrats de carboni complexos no digeribles i una barreja de sals minerals i vitamines.

Els principals factors a controlar són la contínua reposició de nutrients, el control de la temperatura i les condicions d'anaerobiosis.

Figura 4. Components del sistema de tres etapes en continu de Macfarlane [83]



En canvi, el model més sofisticat és el TIM-2, el que reproduïx la barreja peristàltica del contingut luminal del còlon proximal i també l'absorció d'aigua i la fermentació de productes [84]. Altres models de simulació molt sofisticats són el SHIME[®], de l'empresa ProDigest, que simula tot el pas de la microbiota al tracte gastrointestinal i a diferència del Simulador Gastrointestinal Dinàmic (SIMGI[®]) és un sistema validat [85,86]. El sistema SIMGI presenta les mateixes etapes que el model SHIME però en l'etapa de l'estómac utilitza moviments peristàltics i es troba controlat per un programa informàtic, tot i així és un model desenvolupat recentment i per tant presenta una història curta per a la seva avaluació [87]. Altres models utilitzats són L'EnteroMix de l'empresa Danisco, que permet treballar amb volums molt petits de mostra (entre 6 i 12 mL) [88] o el sistema Lacroix de ETH a Zurich, que utilitza els inòculs fecals amb microbiota immobilitzats en grans de gel d'entre 1-2mm de diàmetre per tal de representar una comunitat bacteriana complexa i està pensat per treballar amb microbiota de

nadons [89]. Les principals diferències entre els models dinàmics més utilitzats es troben representats a la taula 3.

Taula 3. Principals diferències dels models dinàmics més utilitzats de fermentació *ex vivo*

Nom del model	Nº Etapes /vasos	Zona de simulació	pH	Temps d'estabilització del sistema	Temps de retenció
Macfarlane	3	Còlon proximal	5.5	24 hores	27.1 a
		Còlon transvers	6.2		66.7
		Còlon distal	6.8		hores
TIM-2	1	Còlon Proximal	5.8	16 hores	-
SHIME	5	Estómac	2	14 dies	24 a 72
		Intestí prim	6.8		hores
		Còlon ascendent	5.6 - 5.9		
		Còlon transvers	6.15 - 6.4		
		Còlon descendent	6.6 - 6.9		
SIMGI	5	Estómac	2	14 dies	24 a 72
		Intestí prim	6.8		hores
		Còlon ascendent	5.6		
		Còlon transvers	6.3		
		Còlon descendent	6.8		
Enteromix	4	Còlon ascendent	5.5	24 hores	3 a 9
		Còlon transvers	6		hores
		Còlon descendent	6.5		
		Còlon distal	7		
Lacroix	3	Còlon proximal	5.9	14 dies	13 hores
		Còlon transvers	6.2		
		Còlon distal	6.6 - 6.7		

Tot i així el model ideal hauria d'incloure també cèl·lules epitelials, microbiotes intestinals complexes i una capa de mucosa entre d'altres. El model SHIME inclou una variant amb presència de mucosa (M-SHIME®) on hi ha integrat un compartiment mucós a les regions del còlon, permetent que la microbiota s'adhereixi en aquesta capa mostrant efectes més representatius [86].

4. Modulació nutricional de la microbiota

Els moduladors de la microbiota més àmpliament administrats són els probiòtics i el prebiòtics. Els probiòtics se subministren o bé com a complementos alimentaris o bé com a aliments fermentats. Els prebiòtics, per tal d'enriquir les poblacions microbianes beneficioses, s'utilitzen normalment com ingredients alimentaris en galetes, cereals i productes làctics, entre d'altres. Per aquesta raó moltes vegades s'administren probiòtics i prebiòtics de manera conjunta (simbiòtic) per tal que millori la supervivència de la soca probiòtica facilitant el substrat específic que fermentarà. Tant probiòtics com prebiòtics per tant, es donen com aliments suplementaris afectant a la nostra dieta per intentar millorar l'estat nutricional dels consumidors.

Encara que els probiòtics i prebiòtics hagin demostrat efectes beneficiosos més enllà de l'intestí, aquesta tesi se centrarà en els efectes que tenen sobre aquest, al igual que els seus efectes únicament en humans.

4.1 Modulació nutricional de la microbiota amb probiòtics

4.1.1 Història i concepte

A finals del segle XIX es van començar a descobrir els agents causants de diverses malalties infeccioses provocant que els científics presentessin un gran interès per buscar solucions sobre aquestes infeccions i la microbiologia en general. A principis del segle XX es va començar a pensar que hi havia certs bacteris que tenien efectes beneficiosos sobre la salut de l'hoste, com el *Lactobacillus acidophilus* [90]. Elie Metchnikoff, director de l'Institut Pasteur, durant l'epidèmia del còlera de París de 1892, havia descobert que certs bacteris intestinals podien inhibir el creixement del virus que la provocava. Més tard va postular que els bacteris que intervenien en la fermentació dels iogurt (bacteris àcid làctics, BAL) contribuïen al manteniment de la salut i eren capaços de promoure la longevitat i així, va acabar dissenyant una dieta de llet fermentada amb un bacteri que va anomenar "Bacil búlgar" per reemplaçar els bacteris proteolítics que produïen substàncies tòxiques per bacteris útils [91]. Paral·lelament el 1906, el pediatre francès Henry Tissier va descobrir que els nens amb diarrea contenien a les seves femtes menys quantitat de bacteris en forma de Y "bífid" que els seus pacients sans. Més tard, va aïllar un *Bifidobacterium* d'un lactant alimentat amb llet materna per tal de poder-lo administrar als nadons amb diarrea [92].

El 1917, onze anys abans del descobriment de la penicil·lina per Alexander Fleming, el científic Alfred Nissle va aïllar una soca d'*Escherichia coli* no patògena de la femta d'un soldat de la Primera Guerra Mundial que, a diferència dels seus companys, no presentava enterocolitis durant un brot greu per shigel·losi [93]. Aquesta soca avui en dia és un dels pocs probiòtics que no és un BAL i s'anomena

Escherichia coli soca Nissle 1917. Una altre soca comercialitzada avui en dia és el *Lactobacillus casei* aïllat al Japó pel Dr. Minoru Shirota per tal de combatre brots de diarrea. Va entrar al mercat el 1935 i va constituir la base de la companyia Yakult [94].

L'interès pels probiòtics va perdre força degut al descobriment dels antibiòtics. A més a més, en aquell moment les investigacions científiques de qualitat eren limitades, en gran part degut a que la complexitat de la microbiota intestinal era desconeguda i per tant subestimada. No obstant, l'aparició de bacteris resistents als antibiòtics i els seus efectes adversos va provocar anys més tard que l'interès pels probiòtics retornés [40]. Els avenços en la investigació també han portat a la millora de la caracterització de noves soques probiòtiques, millorant així la comprensió dels seus mecanismes d'acció i els seus efectes sobre la salut.

La definició generalment acceptada dels probiòtics va ser proposada per Guarner i Schaafsma el 1998 com "microorganismes vius que, quan s'administren en quantitats adequades, confereixen un benefici a la salut de l'hoste" [95]. Des de llavors, moltes institucions sanitàries com l'Organització Mundial de la Salut (OMS) [96] o l'Organització Mundial de Gastroenterologia (WGO) [97] han adoptat aquesta definició.

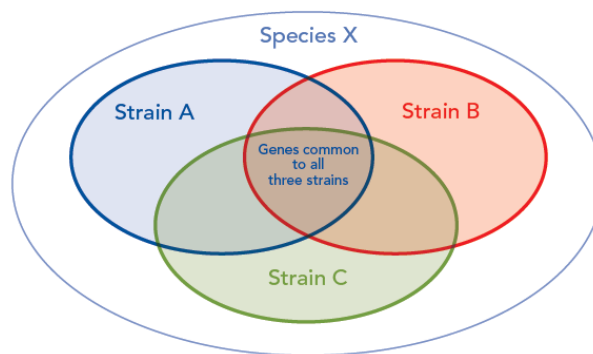
4.1.2 Identificació i selecció de microorganismes probiòtics

Els microorganismes més utilitzats com a probiòtics són les espècies del gènere *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*, però també s'utilitza el llevat com *Saccharomyces boulardii* i algunes espècies de *E. coli*, *Bacillus*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus* i *Propionibacterium* [98].

Per a poder comercialitzar una soca probiòtica es necessita la seva identificació a nivell de gènere, espècie i una designació alfanumèrica que indiqui de quina soca es tracta. Segons la OMS/FAO els fabricants de probiòtics han de registrar les soques en un dipòsit internacional, qui li ofereix una designació alfanumèrica a les soques. Alguns d'aquests dipòsits són la Col·lecció Espanyola de Cultius Tipus (CECT), la Col·lecció de Cultius de Tipus Americana (ATCC), La Col·lecció de l'Institut Pasteur (CIP) o l'Institut Leibniz, la Col·lecció Alemanya de Microorganismes i Cultius Cel·lulars (DSMZ). A més a més, es recomana la realització d'estudis clínics en humans que avalin científicament el benefici d'una soca o combinacions de soques probiòtiques a una dosi eficaç per demostrar els beneficis declarats [99]. El març de 2019, Reid *et al.* suggerien també que totes les soques probiòtiques haurien de tenir el genoma seqüenciat per ser caracteritzat i així assegurar que la designació de la soca és la correcta [100]. L'Associació Científica Internacional de Probiòtics i Prebiòtics (ISAPP) en la Declaració del Consens sobre l'abast i l'ús adequat del terme probiòtic va restringir al nivell taxonòmic de soca les declaracions de propietats saludables (*health claims*) específiques associades als probiòtics en aliments o suplementos [101]. Per tant, és important parlar de soques probiòtiques ja que és on recau l'efecte

beneficis del bacteri o microorganisme (Figura 5). De totes maneres, molts probiòtics poden funcionar de manera similar en quant a la seva capacitat de promoure la resistència a la colonització, regular el trànsit intestinal o normalitzar la microbiota alterada i per tant moltes soques diferents poden aportar un mateix benefici. La identificació a nivell de soca també és molt rellevant ja que permet identificar de la mateixa manera un bacteri en diferents proves o assaigs clínics així com també durant la seva comercialització obtenint uns beneficis únics per aquella soca.

Figura 5. Representació de les característiques comunes que poden presentar tres possibles soques que pertanyen a la mateixa espècie [102]



La majoria de probiòtics són administrats via oral, i per poder dur a terme el seu efecte beneficiós han de sobreviure a les condicions que presenta l'aparell digestiu. El primer efecte antimicrobià que troben és la saliva, seguit per l'acidesa gàstrica, les sals biliars de l'intestí prim, la secreció pancreàtica i fins i tot l'adhesió al mucus intestinal [103]. La supervivència a aquests efectes dependran de les propietats de cada soca i per aquesta raó, a l'hora de seleccionar possibles soques probiòtiques, primer es realitzen estudis *in vitro* per després comprovar els efectes amb estudis clínics de fase 2 i 3. A més a més, una soca que creix bé en condicions de laboratori no necessàriament ho fa en condicions industrials. Per tant, les empreses que comercialitzen probiòtics han d'obtenir una biomassa elevada que sigui econòmicament rentable i que la seva concentració sigui la necessària per obtenir el benefici desitjat mantenint-se fins al final de la seva vida útil.

Les afirmacions que es poden fer d'aquests productes varien segons la supervisió regulatòria de cada país. La descripció d'un producte probiòtic en tots els casos hauria d'incloure la identificació del gènere/s i espècie/s així com la designació de la soca, la dosi mínima d'organismes viables per cada soca al final de la vida útil (expressat en unitats formadores de colònies o UFC), les condicions d'emmagatzematge recomanades, la dosi recomanada (varia segons el producte), els efectes beneficiosos així com els possibles efectes adversos i la manera de contactar amb el servei d'atenció al client.

4.1.3 Seguretat dels probiòtics

L'Autoritat Europea de Seguretat Alimentaria (EFSA) avalua els riscos de les espècies i presenta una llista de les espècies de microorganismes recomanades anomenada llista de Presumpció Qualificada de Seguretat (QPS). L'estat QPS d'una espècie se li atorga quan es conclou que no presenta problemes per a la salut basant-se en proves d'evidència, sense necessitat d'una avaluació completa de seguretat abans de subministrar-se com a suplement alimentari. Algunes d'aquestes espècies QPS són els *Lactobacillus* o el *Bifidobacterium* que des de fa molts anys s'han utilitzat amb seguretat i per tant aquestes espècies només requereixen, a banda de la seva identificació, la detecció de gens transmissibles de resistència a antibiòtics, la producció d'amines biògenes i la presència de gens de virulència [104]. De la mateixa manera que la EFSA atorga l'estat QPS a les espècies a nivell europeu, als Estats Units l'Administració d'Aliments i Fàrmacs (FDA) atorga l'estat Generalment Reconegut Com Segur (GRAS) a aquelles espècies segures [105].

Durant l'ús dels probiòtics han hagut molt pocs casos d'efectes adversos produïts per aquests, pel que es confirma l'escassa patogenicitat que presenten. Tot i així, els probiòtics no només són administrats a individus adults sans, sinó que també a individus sans però amb alguna situació especial com poden ser les embarassades, els nadons o la gent gran o inclús també en població malalta de diferents graus de gravetat. És per això que quan s'avalua la seguretat s'ha de tenir en compte, entre altres factors, el microorganisme en qüestió, la manera d'administració, el nivell d'exposició, l'estat de salut i les funcions fisiològiques que pot portar a terme el probiòtic sobre l'hoste [106]. Tot i així s'ha demostrat la seva seguretat en individus amb VIH, en nens prematurs o individus d'edats molt avançades [107–109].

Alguns dels efectes adversos que poden presentar els probiòtics són la producció de metabòlits no desitjables (com les amines biògenes, o bé un excés d'àcid D-làctic en nadons), possibilitat de transmissió de gens que confereixin resistència a antibiòtics, excessiva immunoestimulació en individus sensibles o infeccions oportunistes en individus immunosuprimits. Per aquesta raó les mesures que es porten a terme per identificar la seguretat de les soques es troben relacionades a prevenir aquests efectes [104]. La seqüència del genoma complet de les soques pot facilitar a trobar gens relacionats amb patogenicitat a aquelles soques que no s'han pogut incloure a la llista QPS com són els *Enterococcus* així com detectar gens de resistències a antibiòtics. La resistència a antibiòtics que poden presentar els microorganismes pot ser intrínseca, i per tant totes les soques d'aquella espècie presentaran la resistència (no transmissible), o bé adquirida, on la resistència normalment es deu a l'adquisició de gens que es troben en elements transmissibles com plàsmids. Per aquesta raó, les soques que presenten una resistència adquirida no són aptes per a la seva comercialització i, per

tant, es recomana observar el patró de resistències als antibiòtics [106]. Per altre banda, alguns microorganismes podrien produir concentracions molt altes d'algunes amines biògenes com són la histamina o la tiramina, les quals poden induir a trastorns digestius, circulatoris i respiratoris [110] i per aquesta raó interessa que no presentin capacitat de sintetitzar-ne.

4.1.4 Mecanismes d'acció dels probiòtics

A grans trets, igual que les funcions de la microbiota intestinal, els principals mecanismes d'acció dels probiòtics són la interferència de creixement o supervivència de microorganismes patògens, millora de la funció de la mucosa en la barrera intestinal, millora del sistema immunitari i per tant també la regulació dels nivells d'inflamació. Però també cal recordar que, els mecanismes d'acció poden ser comuns entre espècies o gèneres però també poden dependre del contingut genètic de cada soca i per tant hi haurà mecanismes d'acció exclusius a nivell de soca [44]. Els principals mecanismes d'acció poden venir donats per l'alliberament d'antimicrobians per part de les soques probiòtiques o degut a algunes estructures que presenten a la paret bacteriana, i es poden classificar de la següent manera:

- Retorn a l'estat de rebiosi microbiana i competència amb patògens

L'efecte més reconegut dels probiòtics és la reducció en la incidència i la gravetat de la diarrea associada al tractament amb antibiòtics [111]. Els antibiòtics causen un estat de disbiosi a l'intestí permetent el creixement de patògens que afecten a la integritat de la barrera intestinal. El principal paper dels probiòtics és antagonitzar contra aquests patògens i així millorar la funció de la barrera intestinal causant la rebiosi [112]. Les competències més estudiades dels probiòtics en front als patògens és la reducció del pH del medi, la competència per les fonts nutricionals i la producció de bacteriocines. Les bacteriocines són uns pèptids d'entre 30 i 60 aminoàcids. Aquests pèptids poden presentar una acció bactericida degut a que formen porus a la membrana dels bacteris susceptibles induint la seva lisis, o també bacteriostàtica podent inhibir la síntesi de la paret cel·lular. A més a més aquestes bacteriocines poden ser específiques provocant una activitat antimicrobiana selectiva. Altres funcions que presenten les bacteriocines és permetre la comunicació entre soques de la mateixa espècie i també interferir en la comunicació d'altres espècies, per exemple perquè no formin biofilms [113]. Tot i així, també hi ha altres antimicrobians alliberats com podria ser la reuterina, causant un desequilibri redox als bacteris susceptibles [114].

- Activitats enzimàtiques

La producció de polifosfats (polímers de fosfats) per part d'un enzim que contenen alguns probiòtics anomenat enzim poli-P quinasa (PPK) sembla estar relacionat amb la capacitat de sobreviure a diversos tipus d'estrès ambiental provocant un efecte beneficiós pel propi bacteri però també causant un

benefici a l'hoste, degut al reforç que provoca a la barrera intestinal [115].

Algunes soques de *Lactobacillus* tenen la capacitat de transformar l'aminoàcid L-triptòfan en indole gràcies a l'enzim aminotransferasa aromàtica. L'exposició de les cèl·lules epitelials a l'indole augmenta l'expressió de proteïnes implicades en el manteniment de la barrera intestinal [113].

Alguns probiòtics també s'ha observat que presenten la capacitat d'hidrolitzar les sals biliars per tal de reduir la toxicitat que aquesta els provoca. D'aquesta manera els àcids biliars no poden ser reabsorbits i van a parar al còlon abans de ser excretats i d'aquesta manera alguns probiòtics poden presentar efectes sobre el metabolisme, millorant la regulació del colesterol en sang o ajudant al manteniment de pes [113].

- Producció d'Àcid Làctic i d'Àcids Grassos de Cadena Curta volàtils (AGCC)

Com és molt conegut, els BAL presenten comunment la capacitat de produir àcid làctic com antimicrobià en front d'enterobacteris patògens com són *E. coli*, *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis* i *Staphylococcus aureus* o llevats com *Candida albicans*, però no tots els BAL el produiran amb la mateixa intensitat produint diferències entre soques [116,117]. L'àcid làctic és el principal antimicrobià produït per espècies com *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* i *Bifidobacterium* i també juga un paper clau en la competència gràcies a la reducció de pH de l'ambient. Els AGCC (acetat, butirat i propionat) són uns dels principals metabòlits produïts per nombrosos bacteris de la microbiota, tant bacteris emprats com a probiòtics (dels gèneres *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*) com bacteris anaerobis estrictes de difícil cultiu (com *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Anaerostipes* o *Eubacterium*). La mucosa intestinal presenta receptors (GPR41, GPR43 i GPR109A) específics pels AGCC que presenten un clar efecte antiinflamatori i protector de la barrera intestinal, essent el butirat el que presenta major efecte anti-inflamatori, mentre que l'acetat té un efecte menor però en canvi estimula la producció d'immunoglobulines A [118].

- Adhesió a les cèl·lules epitelials

Les cèl·lules epitelials de l'intestí produeixen mucina per evitar l'adhesió de microorganismes potencialment patògens. Algunes soques com *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 o *Bifidobacterium breve* UCC2003 presenten un pili, una estructura proteica capaç d'unir-se a la mucosa intestinal i també travessar-la per tal d'adherir-se directament a les cèl·lules epitelials, aconseguint a la vegada suportar les forces d'arrossegament de l'intestí i/o evitar que un patògen s'hi pugui adherir [113,119].

- Modulació del sistema immunitari

La paret cel·lular dels bacteris gram positius i probiòtics es troba composta principalment per

peptidoglicà i àcids lipoteicoics (LTA). Aquests LTA són detectats pels receptors de reconeixement de patrons de les cèl·lules de l'epiteli i del sistema immunitari com poden ser els receptors tipus Toll (TLRs) o tipus NOD (NLRs) de l'hoste [120]. Concretament els TLR2 poden detectar LTA juntament amb la presència de dos co-receptors, TLR1 i TLR6. S'ha descrit que algunes soques probiòtiques promouen els heterodímers de TLR2/TLR6 estimulants així la citocina proinflamatòria IL-6 que a la vegada indueix la IL-10. En canvi, quan l'heterodímer format és TLR2/TLR1 es produeix una reacció proinflamatòria per part de IL-12 i IL-17, reacció que se sol observar amb bacteris patògens però no amb soques probiòtiques [121]. Per tant, alguns components de la membrana dels probiòtics ajuden a modular l'activitat antiinflamatòria de l'hoste. Un altre exemple ben estudiat de proteïnes immunoreguladores són les serpins secretades per *B. longum* de la subespècie *longum* que actuen unint-se i inactivant de forma irreversible dues proteases pro-inflamatòries humanes: la elastasa dels neutròfils i la elastasa pancreàtica. A més, s'han trobat gens homòlegs en algunes altres espècies del gènere *Bifidobacterium*, com *B. breve* [122]. A part, altres receptors com TLR9 poden detectar ADN bacterià augmentant així els nivells de limfòcits T reguladors i per tant modular processos inflamatoris produïts per agents patògens [123]. El gènere *Bifidobacterium* presenta una gran quantitat de guanina i citosina a la seva cadena d'ADN que li permet presentar bones seqüències per unir-se al receptor TLR9 [122]. Els receptors NOD en canvi, detecten canvis de composició en el peptidoglicà de la paret dels gram positius provocant diferències a la capacitat de reducció de la inflamació. A més a més aquestes interaccions també provoquen que les cèl·lules epitelials es trobin més actives davant la presència de patògens provocant que secretin mucina per evitar la seva adhesió [124]. Per altre banda, alguns polímers de carbohidrats com són els exopolisacàrids, sintetitzats i exposats a la superfície del gènere *Bifidobacterium*, també augmenten la producció de citoquines antiinflamatòries presentant un impacte en la funció immunitària [122].

- Cross-feeding

Tant en probiòtics com prebiòtics és important el concepte d'estimulació creuada o *cross-feeding* que es dona quan un organisme X, al metabolitzar un substrat inicial, genera metabòlits que permetran l'alimentació d'un altre organisme Y d'una altra espècie diferent (o de la mateixa) [125]. Aquest concepte és un mecanisme que facilita la coexistència entre diferents organismes com per exemple, els *Bifidobacterium* produeixen glucosidases extracel·lulars amb afinitat per degradar diferents carbohidrats complexos en sucres més simples que a la vegada seran aprofitats per altres *Bifidobacterium*, de la mateixa o de diferent espècie [126]. També s'ha vist que en un cultiu conjunt de *Bifidobacterium* amb prebiòtics tipus fructans o xilooligosacàrids (XOS) aquests bacteris degraden aquests prebiòtics generant lactat i acetat, i que aquests, serveixen per afavorir el creixement de bacteris beneficiosos productors de butirat com són *Faecalibacterium*, *Roseburia* o *Anaerostipes*. A

més a més, combinant el creixement de *Bifidobacterium* amb *Lactobacillus* juntament amb un prebiòtic tipus inulina s'ha aconseguit augmentar la producció de butirat per part d'alguns bacteris, incapaçs de degradar la inulina per ells mateixos [127].

4.2 Modulació nutricional de la microbiota amb prebiòtics

4.2.1 Història i concepte

Els primers estudis que es van realitzar amb prebiòtics van ser als anys 80 quan uns investigadors japonesos van utilitzar femtes humanes per demostrar amb cultius *in vitro* que els fructooligosacàrids (FOS) eren fermentats selectivament pels bifidobacteris i que a més a més, tenien la capacitat d'estimular el seu creixement [128]. Els resultats van ser confirmats per Gibson i Robertfroid els que el 1995 van definir el concepte de prebiòtic com "un ingredient alimentari no digerible que afecta de manera beneficosa a l'hoste estimulant selectivament el creixement o activitat d'un o un nombre limitat de bacteris ja residents al còlon" [129]. Els primers prebiòtics d'ús comercial estimulaven el creixement de *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* especialment, però en canvi bacteris patògens com *E. coli* no. D'aquesta manera el concepte prebiòtic va guanyar l'interès en els camps de l'alimentació, la nutrició i la microbiologia. Des de llavors la seva definició ha anat evolucionant i canviant al llarg del temps. Per exemple, el 2004, va sorgir la definició clàssica de prebiòtic com "un ingredient fermentat selectivament que permet canvis específics, tant en la composició i/o l'activitat de la microflora gastrointestinal que confereix beneficis al benestar i la salut de l'hoste" [130]. D'aquesta manera en el concepte prebiòtic s'inclouïa que aquest havia de tenir la capacitat de resistir el procés de digestió, s'havia de fermentar per microorganismes intestinals, i la selecció que presentaven es trobava associada a bacteris que conferien salut i benestar. L'ISAPP va publicar l'any 2017 una nova definició de prebiòtic indicant que un prebiòtic és "un substrat que s'utilitza selectivament pels microorganismes de l'hoste que li confereixen un benefici a la salut" [131]. Aquesta definició implica l'efecte modulador dels prebiòtics i no es limita necessàriament a la microbiota gastrointestinal, a més a més la definició tampoc es limita a compostos basats en hidrats de carboni, sinó a qualsevol compost que pugui ser utilitzat per la microbiota que confereixi un benefici per a la salut com poden ser polifenols o àcids grassos poliinsaturats.

D'aquesta manera el terme prebiòtic va ser inicialment proposat per donar èmfasis a la importància d'una dieta per a la modulació de la microbiota intestinal i la seva relació amb la salut humana. Tradicionalment el seu concepte s'havia presentat equivalent al de carbohidrats complexos (o fibres), però actualment ni totes les fibres compleixen la definició de prebiòtic, ni tots els prebiòtics han de ser sempre carbohidrats [131].

4.2.2 Selecció de prebiòtics

Les fibres alimentàries bàsicament es poden dividir en fibres insolubles i fibres solubles. Les fibres insolubles no es dissolen en aigua, no poden ser fermentades pels bacteris pel que la seva funció bàsicament és augmentar el volum de les femtes. En canvi, les fibres solubles poden ser fermentades al còlon i alguns dels carbohidrats que s'inclouen són prebiòtics [132]. Els diferents carbohidrats estan compostos per diferents polisacàrids i oligosacàrids generalment compostos per un nombre relativament petit de monosacàrids (principalment glucosa, galactosa, manosa, fructosa i algunes formes d'àcid urònic) [133]. Els prebiòtics més estudiats són els fructans tipus inulines (Inulines i FOS), els galactooligosacàrids (GOS) i la lactulosa ja que es va descobrir que presentaven grans canvis en la composició de la microbiota. En canvi altres de menys estudiats o que encara no presenten suficient evidència científica de la seva modulació en la microbiota intestinal són la pectina, els xilooligosacàrids (XOS) o els beta-glucans [134]. L'estructura que presentin aquests carbohidrats com és la composició de monosacàrids, el tipus d'enllaç i el pes molecular així com també la seva font d'extracció, poden influir en les seves propietats i els fan difícils de caracteritzar [133].

Dins les fibres solubles, aquelles que afecten a la composició de la microbiota però no són utilitzades selectivament per la microbiota de l'hoste i no confereixen un benefici no són considerades prebiòtics. A vegades és difícil classificar les fibres en prebiòtic o fibra alimentària degut a que algunes són prebiòtics en un tipus d'hoste però no a tots, com la cel·lulosa, que es considera un prebiòtic pels remugants però no pels humans. Altres substàncies que tampoc són considerades prebiòtics, tot i modificar la composició de la microbiota, són els antibiòtics, els minerals, les vitamines i els bacteriòfags. En canvi, els AGCC i els polifenols són bons candidats per a ser estudiats com a prebiòtics igual que altres fibres, tot i que calen molts estudis per tenir el nivell d'evidència dels fructans i el GOS [131].

4.2.3 Els prebiòtics fructans tipus inulina

Els fructans tipus inulina són polímers de fructosa units per unions β (2-1) amb una glucosa unida a la part terminal. Les cadenes de fructans poden ser més llargues o més curtes en funció de la quantitat de polímers que s'uneixin donant lloc al grau de polimerització (GP). Les cadenes més llargues s'anomenen inulines, i presenten un GP entre 2 i 60. En canvi, els fructans amb cadenes més curtes s'anomenen FOS, amb un GP entre 2 i 8 [135]. Gràcies als enllaços β (2-1) que presenten entre monòmers poden resistir a la hidròlisi enzimàtica d'enzims digestius salivals, i els de l'intestí prim, arribant intactes al còlon [136]. Alguns fructans només presenten monòmers de fructosa, sense una glucosa a l'extrem, inclús la quantitat de monòmers de glucosa també pot variar. D'aquesta manera existeixen nombroses barreges de molècules que fan variar el GP [136].

La inulina es pot obtenir a partir d'un gran nombre de fruites i verdures com són el blat, la ceba, el plàtan, l'all, el porro, la xicoira, els espàrrecs o la carxofa. En canvi el FOS, s'obté normalment a partir de la hidròlisi enzimàtica de la inulina, tot i que ambdós també poden ser sintetitzats per molècules de sucrosa. Els fructans tipus inulines són els prebiòtics generalment més comercialitzats degut a que hi ha múltiples estudis que demostren que modulen la composició de la microbiota intestinal. Tot i així, s'ha observat que inulines amb un GP menor a 10 són metabolitzades més ràpidament que les inulines amb un GP major a 10 [137] i per tant els grups bacterians que les metabolitzaran poden variar segons el GP que presentin. Tot i les grans variacions que presenten, totes s'engloben dins del grup de prebiòtic tipus d'inulines i per aquesta raó moltes vegades el seu benefici és compartit.

4.2.4 Seguretat dels prebiòtics

En el cas dels prebiòtics ni la EFSA ni la FDA han establert una definició per aquests terme. Tot i així, la inulina, el FOS i el GOS s'han utilitzat a la Unió Europea des de 1997 i són considerats ingredients alimentaris segurs en aquesta regió, a diferència dels altres possibles candidats. A més a més a nivell Europeu, la EFSA ha permès que alguns prebiòtics tinguin declaracions de propietats saludables com la inulina de xicoira amb "La inulina millora la funció intestinal". Als Estats Units els prebiòtics encara no han estat reconeguts per la FDA però també permeten als fabricants afirmar l'estat GRAS als productes etiquetats com a tal [138,139].

Per tenir una bona caracterització dels prebiòtics, s'hauria d'indicar el seu origen i font d'extracció, la seva puresa i també la seva composició per tal de poder relacionar la influència de la seva estructura a una funció prebiòtica en si i no englobar els efectes de manera generalitzada. Els models de fermentació *in vitro* ajuden a estudiar el comportament dels prebiòtics com a moduladors de la microbiota intestinal i també ajuden a observar l'efecte que causen en la producció de compostos beneficiosos com són els AGCC [140]. Altres estudis utilitzats també són els models animals però al igual que els probiòtics també són necessaris els estudis clínics en humans per demostrar la seva eficàcia a dosis concretes. A diferència dels probiòtics, els prebiòtics són més fàcils de ser reconeguts com a segurs ja que són ingredients naturals presents a la dieta.

4.2.5 Mecanismes d'acció dels prebiòtics

Degut que la microbiota pot donar lloc a compostos beneficiosos per a la salut, actualment es busca amb gran interès l'ús de dietes que promoguin el creixement d'aquells bacteris que són beneficiosos per la salut així com també conservar l'equilibri de la microbiota mantenint l'estat d'eubiosi intestinal. Per aquesta raó les funcions dels prebiòtics com ja queda reflectit a la seva definició serà l'estimulació selectiva de bacteris creant un benefici per l'hoste, i a la vegada també disminuir la població de

microorganismes potencialment patògens, el que evitarà un possible estat de disbiosi. A part, de totes les propietats atorgades als probiòtics que estimularan [141].

Tot i que la dieta humana és generalment rica en carbohidrats complexos, el genoma humà codifica menys de 20 glicosidases capaces d'hidrolitzar només la sacarosa, la lactosa i fins un cert punt el midó. Per aquesta raó molts carbohidrats arriben intactes a l'intestí [113]. L'habilitat dels bacteris per utilitzar les fibres depèn del seu contingut genètic per codificar enzims actius de carbohidrats (CAZymes) que contenen la informació per trencar els diferents tipus d'enllaç, a part de les proteïnes que tenen associades com són les proteïnes d'unió o de transport de carbohidrats [133]. Per tant no tots els bacteris poden metabolitzar els mateixos substrats prebiòtics [142].

Gràcies a la seqüenciació del genoma de *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* s'han revelat alguns dels gens involucrats en el catabolisme d'aquests carbohidrats que codifiquen per enzims CAZymes, com les glicosilhidrolases (GHs) que poden ser tant intra com extracel·lulars i per tant també poden codificar per transportadors específics dedicats a la captació de substrats. Normalment, els gens que codifiquen pels transportadors o els enzims ho fan per la mateixa família de substrats, com per exemple un rang de polimerització o monosacàrids similars [125,142]. Per exemple, els bifidobacteris contenen un gran repertori de gens metabolitzadors de diversos sucres, el FOS és fàcilment fermentat per aquests però en canvi, les inulines que presenten una cadena més llarga de polímers no. A més a més, rarament els bifidobacteris contenen enzims extracel·lulars per degradar fructans amb cadena llarga [142]. Les unions que presenten el FOS i el GOS poden ser degradades pels enzims β -fructanosidasa i β -galactosidasa respectivament, i es poden trobar en el gènere *Bifidobacterium*. La llet materna presenta una gran quantitat de GOS, presentant un paper important en la colonització microbiana en la primera infància i es troba degradat principalment per *B. infantis* [131]. La selectivitat no necessàriament es refereix a l'efecte sobre un grup bacterià sinó que també pot afectar a varis grups. Augmentant diversos grups bacterians permeten augmentar la diversitat microbiana de l'hoste o ajudar en el manteniment de la homeòstasi bacteriana, impedit així un estat de disbiosi. Estudis de poblacions humanes revelen que una major aportació de prebiòtics com la polidextrosa està associada a una major diversitat microbiana gastrointestinal [132].

Per altre banda, La soca *Lactobacillus paracasei* W20, conté un enzim extracel·lular GH32 que és capaç de metabolitzar parcialment la inulina llarga, donant lloc a productes d'inulina de llargada intermèdia que seran utilitzats per altres soques probiòtiques com a font de carboni i d'energia [125] demostrant novament la importància de l'alimentació creuada entre espècies.

A banda dels carbohidrats, també poden ser considerats prebiòtics altres substàncies com l'acetat, com ja s'ha vist anteriorment. Així, un estudi va observar una conversió d'acetat a butirat per part de

la microbiota del còlon en un 24% [143]. *Faecalibacterium prausnitzii* utilitza la vitamina B2 (riboflavina) com a transportador d'electrons extracel·lulars, el que li permet tolerar quantitats limitants d'oxigen [144]; un estudi amb homes adults sans ha demostrat que la riboflavina augmenta els nivells de *F. prausnitzii* a les femtes [145]. A banda, també s'ha observat que augmenta els nivells d'altres anaerobis com *Roseburia* i que disminueix espècies com *E. coli*, indicant una millora de les condicions anaeròbiques i l'estat redox a l'intestí i suggerint que podria ser un nou prebiòtic [145]. Els polifenols que conté el vi negre també s'ha demostrat que augmenten els gèneres *Bacteroides* i *Bifidobacterium* en humans selectivament, i aquests polifenols redueixen els nivells de triglicèrids i colesterol produint un benefici cardiovascular a l'hoste [146]. Finalment, alguns estudis han vist que la suplementació amb àcids grassos poliinsaturats omega-3 (PUFA) poden modificar la microbiota intestinal. Una de les modificacions que s'ha observat és un augment en l'abundància dels gèneres *Bifidobacterium*, *Roseburia*, i *Lactobacillus* durant la suplementació amb PUFA [147]. Un altre estudi amb dones de mitjana edat i edat avançada va determinar que la suplementació amb PUFA es trobava associada amb una major diversitat microbiana i amb una major abundància relativa de bacteris de la família *Lachnospiraceae*, productors d'AGCC [148]. Pel que la cerca de nous prebiòtics és un camí poc explorat amb moltes oportunitats.

4.2 Altres moduladors de la microbiota

En els últims anys han sorgit els conceptes de parabiòtic i postbiòtic que impliquen la no viabilitat dels probiòtics però produint efectes beneficiosos igualment sobre l'hoste. Els parabiòtics "probiòtics no viables" es refereixen a cèl·lules microbianes inactivades que quan són administrades en la suficient quantitat, confereixen beneficis al consumidor, proporcionant la capacitat a les cèl·lules immunes humanes de reconèixer components bacterians específics i subproductes que generaran un efecte immunomodulador. Tot i que els probiòtics han demostrat tenir molts beneficis, les cèl·lules inactivades d'aquests poden presentar avantatges sobre la seguretat dels consumidors, sobretot en aquells que siguin immunocompromesos i també reduir costos per les empreses per no haver de mantenir l'estabilitat de les soques durant la vida útil [149]. El terme postbiòtic, també conegut com a metabiòtic, biogènics o metabòlits simples són factors solubles (productes o subproductes) que són secretats pels bacteris vius o alliberats després de la lisi bacteriana i que ofereixen un benefici per a l'hoste donant una bioactivitat addicional. L'exemple més clar del que inclou el terme postbiòtic són els AGCC que produeixen alguns bacteris. De totes maneres, la nova definició de prebiòtic inclou qualsevol compost que sigui utilitzat per la microbiota per a donar un benefici a la salut, de manera que en alguns casos els postbiòtics es podrien incloure dins la nova definició de prebiòtic [113,131].

Alguns antibiòtics com la Rifaximina que presenta una baixa absorció sistèmica i presenta un ampli espectre d'activitat contra gram positius i negatius, així com també bacteris aeròbics o enterobacteris anaeròbics, són utilitzats per intentar arribar a un equilibri microbià a l'intestí, per tant millorar l'estat de disbiosi en pacients amb IBS, evitant que hi hagi sobrecreixement d'espècies en comptes d'atacar una infecció bacteriana com s'utilitzaria en altres circumstàncies [150].

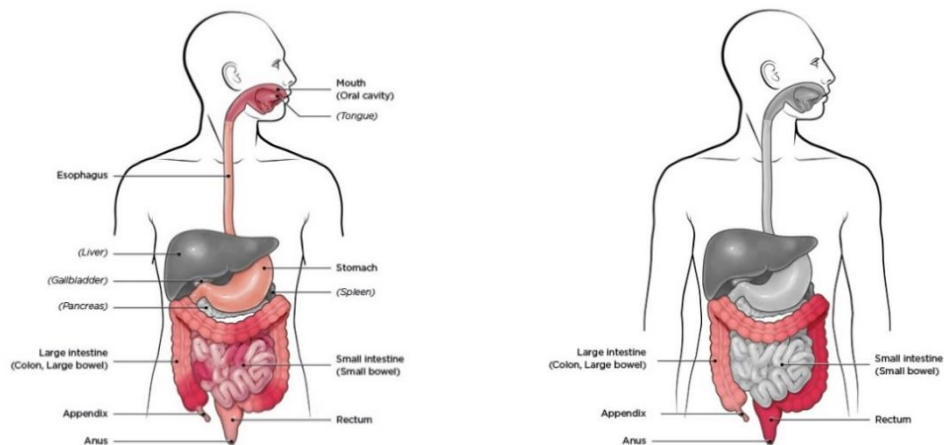
Per tal de restablir la homeòstasi microbiana en pacients greus de CU però sobretot pacients amb infecció per *Clostridium difficile*, una alternativa de tractament és el transplantament fecal. Aquests consisteix en transferir la comunitat bacteriana d'un pacient sa als intestins del pacient malalt per tal d'eliminar l'estat de disbiosi i restablir l'estat d'equilibri. Tot i així la seva eficàcia encara no és del tot clara i no està recomanat per pacients amb MII o SII [151,152].

5. La malaltia inflamatòria intestinal

Les malalties inflamatòries intestinals més comuns són la malaltia de Crohn i la CU. Aquestes malalties es basen en la presència de inflamació i dany de manera crònica al tracte gastrointestinal. D'aquesta manera el tracte digestiu no pot realitzar les seves funcions correctament com digerir aliments, absorbir nutrients i eliminar residus donant símptomes com la diarrea persistent, el dolor abdominal, l'hemorràgia rectal, la pèrdua de pes i la fatiga (<https://www.crohnscolitisfoundation.org/>). S'estima que afecten entre 2,5 i 3 milions d'Europeus, dels quals aproximadament 2/3 correspondrien a CU i 1/3 a malaltia de Crohn, i amb un cost sanitari directe d'uns 5 bilions d'euros [153]. A nivell mundial, la incidència sembla força estable a Europa i Amèrica del Nord, però està augmentant a l'Àfrica, Àsia i Sud Amèrica, fet que s'associa als canvis d'estil de vida [154].

La inflamació en la malaltia de Crohn pot afectar a qualsevol part del tracte gastrointestinal (de la boca a l'anús), tot i que freqüentment afecta al final de l'intestí prim. La malaltia apareix en forma de úlceres aïllades unes de les altres i la inflamació es pot estendre a través de tot el gruix de la paret de intestinal. En canvi, en la CU la inflamació només es dona a l'intestí gros (còlon) i al recte. La inflamació només es dona a la capa més interna del revestiment de l'intestí i la malaltia generalment s'inicia al recte on es va estenent contínuament al llarg del còlon (Figura 6) (<https://www.cdc.gov/>).

Figura 6. Interpretació de les zones afectades per la malaltia de Crohn (esquerra) i la colitis ulcerosa (dreta) (<https://www.cdc.gov/>).

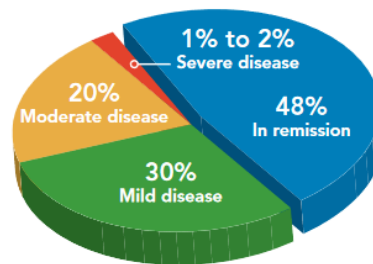


La microbiota a l'intestí presenta un mecanisme immunoregulator molt important, i per tant impedeix que s'activi el sistema immunitari contra antígens que no són nocius, inclosos els antígens generats per la pròpia microbiota. Quan aquests mecanismes no funcionen correctament poden donar lloc a inflamacions cròniques com la malaltia inflamatòria intestinal. Tot i així, la causa de les malalties inflamatòries intestinals és desconeguda i es creu que hi ha una relació entre la genètica, el sistema immunitari i els factors ambientals com és la microbiota. Partint d'uns gens que fan que la persona sigui susceptible a patir la malaltia, juntament amb factors ambientals que desencadenen aquesta resposta immunitària és el que provoca la inflamació [155]. Alguns d'aquests gens descrits que provoquen la susceptibilitat d'algunes persones a concebre MII són crítics pel manteniment de la barrera intestinal i la regulació de resposta del sistema immunitari [49]. Per altre banda, estudis de microbiota en persones amb MII han demostrat que aquestes malalties es troben associades a una reducció de la complexitat microbiana (baixa diversitat) i desequilibris en la seva composició, com un augment de *Enterobacteris* a la mucosa intestinal i una reducció de la classe *Clostridia* [49]. Altres estudis també han observat una reducció de l'abundància de bacteris productors de butirat, de *Bacteroidetes* i *Firmicutes*, *Ruminococcoaceae*, *Bifidobacterium* i *Lactobacillus* mentre que s'han vist augmentats els *Gammaproteobacteria* alterant així les funcions de la microbiota intestinal, com és la reducció de la producció d'àcids grassos de cadena curta i de la síntesi d'aminoàcids, l'augment d'estrès oxidatiu i la secreció de toxines [155,156].

5.1 La Colitis Ulcerosa

Els símptomes que presenten els malalts amb CU poden variar entre individus, però també varien en quant a gravetat. Aquests símptomes apareixen en forma de brots que s'alternen amb fases d'inactivitat (remissió) on el pacient no presenta símptomes o en presenta molt pocs. S'ha calculat que aproximadament, si es defineix l'estat de tots els pacients amb CU en un moment determinat, el 48% dels pacients es troben en remissió (Figura 7). Dins del 52% dels pacients actius (amb símptomes), un 30% presenta la malaltia de manera lleu, un 20% de manera moderada i entre 1-2% presenta símptomes greus. Per diagnosticar la CU normalment abans es descarten altres possibles causes dels símptomes i signes de la malaltia. Així, per ajudar al diagnòstic es realitza un anàlisi de sang, es recullen mostres de femtes, es realitza una colonoscòpia, una sigmoidoscòpia flexible o inclús una radiografia (<https://www.crohnscolitisfoundation.org/>).

Figura 7. Representació en percentatge de l'estat dels pacients amb colitis ulcerosa. (<https://www.crohnscolitisfoundation.org/>)



5.1.1 Valoració de la malaltia

Per determinar si els pacients amb colitis ulcerosa es troben en estat de remissió o avaluar l'estat de la malaltia s'utilitzen diferents escales, tot i que actualment no hi ha cap acord internacional sobre aquests sistemes de puntuació i per tant cada un mesura l'activitat de la malaltia de manera diferent, sense haver-hi una definició clara de l'estat de remissió [157,158]. Les més utilitzades són l'índex d'activitat de la malaltia colitis ulcerosa (UCDAI) i el Mayo, també anomenat índex d'activitat de malaltia (DAI) (Taula 4) [159,160]. Les dues escales incorporen una puntuació que té en compte la freqüència de deposicions, el sagnat rectal, els resultats endoscòpics i l'activitat de la malaltia segons l'avaluació del metge (dolor abdominal, manifestacions extraintestinals com febre o taquicàrdia, l'estat funcional, i l'estat global del pacient) [161]. Aquesta puntuació va de 0 a 12 punts, entenen la remissió quan la puntuació és inferior o igual a 2, una activitat moderada entre 3 i 9, mentre que per sobre de 9 la malaltia es considera greu [162].

Taula 4. Puntuacions donades als índexs de DAI o Mayo i UCDAI per determinar l'estat dels pacients amb colitis ulcerosa.

	DAI o Mayo	UCDAI
Freqüència de deposicions	0 = Normal pel pacient 1 = 1-2 més del normal 2 = 3-4 més del normal 3 = 5 o més	0 = Normal 1 = 1-2 al dia 2 = 3-4 al dia 3 = > 4 al dia
Sagnat rectal	0 = No s'observa 1 = Visible en menys de la meitat de temps 2 = Visible la meitat o més de temps 3 = La sang surt sola	0 = No s'observa 1 = Ratlles de sang 2 = Evidència de sang 3 = Sobretot presència de sang
Aparença de la mucosa segons l'endoscòpia	0 = Normal, malaltia inactiva 1 = Malaltia lleugera (eritema, disminució del patró vascular, friabilitat suau) 2 = Malaltia moderada (eritema marcat, patró vascular absent, friabilitat, erosions) 3 = Malaltia greu (sagnat espontani, ulceració)	0 = Normal 1 = Friabilitat suau 2 = Friabilitat moderada 3 = Exsudació, sagnat espontani
Valoració mèdica de la malaltia	0 = Normal 1 = Lleugera 2 = Moderada 3 = Greu	0 = Normal 1 = Lleugera 2 = Moderada 3 = Greu

Aquestes escales presenten limitacions degut a que molts d'aquests punts són molt subjectius i poden variar entre punts de vista de la persona que l'apliqui. Per exemple, la freqüència de deposicions i el sagnat rectal són segons el punt de vista del pacient, en comptes d'un número absolut. El mateix passa amb l'avaluació del metge segons entengui l'estat de benestar del pacient. Tot i tenir algunes limitacions la FDA recomana utilitzar aquestes escales per a determinar la remissió en pacients amb CU [159].

Altres escales utilitzades per determinar la remissió dels pacients com l'Índex d'Activitat Clínica (CAI), l'Índex de Colitis Clínic Simple (SCCAI) o l'Índex de Lichtiger CAI també han sigut utilitzats en els últims anys (Taula 5) [163–165]. Per exemple, l'escala CAI presenta una puntuació de 0 a 23 tenint en compte els mateixos paràmetres que UCDAI i DAI, tot i que amb puntuacions diferents a cada nivell, també avalua directament el dolor abdominal, l'estat general del pacient, altres característiques no gastrointestinals, la febre, l'anèmia o la taxa de sedimentació dels eritròcits [166]. L'índex SCCAI a diferència de les escales recomanades per la FDA no realitza endoscòpia però considera la urgència en depositar dels pacients i altres afectacions extraintestinals, a banda de puntuar de diferent manera les observacions que miren les altres dues escales, arribant a una puntuació de fins a 20 punts. Per altre banda, l'índex de Lichtiger CAI puntuava de 0 a 21, considera la forma de les femtes i la urgència en depositar, el dolor abdominal, l'estat general del pacient però tampoc té en compte l'observació endoscòpica [166].

Taula 5. Principals índexs utilitzats amb el coneguts noms dels seus autors

Autor	Nom de l'escala	Referència
Schroeder	Escala Mayo/DAI	[167]
Sutherland	UCDAI	[168]
Rachmilewitz	CAI	[169]
Walmsley	SCCAI	[170]

Tot i que algunes escales coincideixen en les observacions realitzades, no tots puntuen de la mateixa manera. A més a més, també hi ha altres escales per determinar la remissió que només es basen en l'endoscòpia o la histologia de les biòpsies que recullen dels pacients. Els estudis clínics trobats de moduladors de la microbiota per tractar la CU utilitzen diferents escales, creant d'aquesta manera una gran heterogeneïtat que es manifesta en les metanàlisis que estudien l'efecte global d'aquests tractaments [171–173]. A més, aquesta heterogeneïtat pot condicionar la detecció de l'efecte d'un tractament per exemple, si un tractament millora significativament l'estat de la mucosa però no tant la freqüència de deposicions, semblarà menys eficaç si s'avaluen els pacients amb una escala que no tingui en compte els resultats de la endoscòpia.

5.1.2 Tractaments actuals

El tractament de la malaltia normalment és amb medicació per tal de reduir els símptomes i aconseguir l'estat de remissió o bé per mantenir aquest estat i així millorar la qualitat de vida dels pacients però, no hi ha cap pauta a l'hora de receptar un tractament o un altre sinó que s'adapta segons l'individu

depenent de la severitat dels símptomes, la ubicació dels danys, la resposta anterior a la medicació, els efectes secundaris o comorbiditats (altres malalties o condicions mèdiques del pacient). Les principals medicacions s'indiquen a la taula següent (Taula 6) [174,175].

Taula 6. Principals tractaments utilitzats per a la colitis ulcerosa

Tractament	Medicació	Ús	Comentaris
<u>Aminosalicilats</u> (antiinflamatoris amb àcid 5-aminosalicílic)	Sulfasalacina, Balsalazida, Mesalamina Olsalazina	Administrat de manera oral o rectal per disminuir la inflamació a la paret de l'intestí	Efectes adversos poc freqüents però greus com fallo renal o pancreatitis aguda
<u>Corticoesteroids</u>	Prednisona, Prednisolona Budesonida	Afectar la capacitat del cos per a començar i mantenir un procés inflamatori	Efectiu a curt termini però amb molts efectes secundaris
Immunomoduladors	Azathioprina 6-mercaptopuri a Metotrexat	Modificar l'activitat del sistema immunitari impedit que causi inflamació de manera continuada	En 1 de cada 3 pacients no són efectius, i també comporten efectes secundaris importants deguts a la immunosupressió
Teràpies biològiques (anticossos monoclonals)	Adalimumab Certolizumab Pegol Golimumab Infliximab Natalizumab Vedolizumab	Bloquejar la proteïna inflamatòria Factor de necrosis tumoral (TNF α) o bloquejar glòbuls blancs per tal que no arribin als teixits inflamats. S'està estudiant també el bloqueig de la interleukina 6 (IL-6)	Indicats per severitat moderada i alta que no han respòs bé a altres teràpies

Tot i així els casos més greus s'han d'intervenir amb cirurgia [176].

5.1.3 Microbiota en la colitis ulcerosa

Trobem moltes evidències científiques on la microbiota intestinal es troba alterada en els pacients que presenten colitis ulcerosa activa contribuint així en la inflamació intestinal. Els estudis metagenòmics que han comparat la microbiota de pacients amb MII respecte individus sans han demostrat que hi ha un desequilibri microbià i una baixa diversitat bacteriana d'aproximadament en un 25% respecte als pacients sans [177–181]. En condicions de bona salut, la majoria de microorganismes presents a l'intestí són anaeròbics o anaeròbics facultatius amb una gran capacitat d'adhesió a la profunditat de les cèl·lules epitelials mucoses per tal de realitzar funcions en simbiosis amb l'hoste i jugant un paper fonamental en la nutrició i la regulació del sistema immunitari [177]. Altres bacteris que no són dominants a l'intestí són els bacteris aeròbics facultatius on s'hi troben els possibles patògens que en condicions d'equilibri són inofensius però sota certes condicions poden ser perjudicials. I a banda, podem trobar bacteris patògens, aquells que són molt estranys a l'intestí però que igual que els patògens condicionals quan la microbiota es troba en desequilibri poden causar una malaltia [177].

En la CU, els bacteris que normalment dominen a l'intestí es troben disminuïts i en canvi, el nombre de patògens incrementat però a més a més, les proporcions de les soques normalment dominants tampoc es troben en equilibri [177,178] pel que qualsevol modulador que pugui controlar el sobrecreixement excessiu dels patògens o millorar l'estat de disbiosi del pacient pot ser clau en el tractament de la malaltia. La disminució de les funcions intestinals i l'augment de soques patògenes provoca un augment en els nivells d'enterotoxines a l'intestí, pel que hi ha un augment de la permeabilitat intestinal que provoca una mala funció del sistema immunitari i per tant acabarà danyant les cèl·lules epitelials [177].

La pèrdua de diversitat s'ha observat en tots els pacients amb CU, tant el que es trobaven en estat de remissió com els que presentaven la malaltia activa, tot i que en aquests últim cas la pèrdua de diversitat era més gran [182].

Alguns bacteris patògens s'han pogut trobar relacionats amb la inflamació dels pacients amb CU, tot i que la seva patogenicitat no està clara. Alguns d'aquests bacteris són *Mycobacterium avium paratuberculosis*, Enterohemorràgic *Escherichia coli* (EHEC), *Clostridium difficile*, *Helicobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Fusobacterium norovirus*, *Listeria* o *Campylobacter* [177,179]. En concret els Enterobacteris, enriquits en la microbiota dels pacients amb CU, s'ha observat que causen la inflamació al còlon presentant una gran adhesió a les cèl·lules epitelials [179]. Alguns estudis també han mostrat que l'augment de productors de sulfat com *Desulfovibrio* es poden trobar associats a la malaltia degut a que els pacients amb CU presenten més quantitat d'aquests bacteris i també més nivells de sulfurs que els pacients sans [183].

Roseburia, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia* i *Bifidobacterium* s'han trobat relacionats amb un bon estat de salut [139]. *Roseburia* i *F. Prausnitzii* són dos grans productors de butirat que ajuden a reduir els nivells d'inflamació. Aquests bacteris pertanyen a la família de *Lachnospiraceae*, també coneguda amb el nom de clúster *Clostridium* XIVa, i al clúster *Clostridium* IV, respectivament i tant els dos clústers com els dos gèneres s'han observat reduïts en els pacients amb CU activa. També s'ha observat que en l'estat de remissió *F. Prausnitzii* torna a augmentar els seus nivells, suggerint que aquest pugui tenir un paper vital en el tractament de CU [177,180]. *Akkermansia muciniphila*, és dels bacteris més abundants de l'intestí amb una presència d'entre 1-5% dels bacteris intestinals i es també s'ha trobat disminuït en pacients amb CU [177]. A més a més, en un estudi on s'analitzaven mostres fecals de pacients amb CU, els bacteris antiinflamatoris com *Lactobacillus salivarius* i *Pediococcus acidilactici* no es van observar en els pacients amb la malaltia activa, mentre que al retornar a l'estat de remissió els bacteris tornaven a ser presents [184]. En canvi, els nivells de *Lactobacillus spp.* no s'han observat modificats en aquests pacients mentre que els nivells de *Bifidobacterium spp.* s'han observat disminuïts en l'estat actiu de la malaltia [184].

5.1.4 Probiòtics i Prebiòtics en la Colitis Ulcerosa

Degut a que s'ha observat que la composició de la microbiota intestinal en els pacients amb CU es troba en desequilibri comparant amb individus sans i que els tractaments actuals poden presentar efectes adversos, s'han proposat altres alternatives com són els probiòtics i els prebiòtics per tal de restablir l'homeòstasi bacteriana (eubiosi) a l'intestí o millorar els símptomes regulant el procés inflamatori, incrementant el nombre d'espècies "protectores" i disminuint el nombre de patògens. El desequilibri microbià porta als pacients amb CU a un dèficit nutricional degut a la mala absorció dels nutrients i per tant la dieta juga un paper clau en aquests pacients. Els aliments funcionals poden ajudar a l'absorció de la dieta per mantenir el bon estat de salut dels pacients, per tant la seva combinació és interessant per poder mantenir els pacients en estat de remissió [185].

Les dietes pels pacients amb CU bàsicament es basen en l'alta ingesta de fibres, especialment de fruites i vegetals i evitar la ingesta d'àcids grassos poliinsaturats i transinsaturats. Altres recomanacions també són el consum de productes làctics (si són ben tolerats), evitar el consum de carbohidrats refinats, especialment les begudes ensucrades i els refrescs i limitar el consum de carn vermella i carn processada. A banda d'aquestes recomanacions generals existeixen altres dietes opcionals com és la dieta FODMAP, utilitzada per reduir els símptomes dels pacients amb IBS, o també la dieta mediterrània [185]. Per desgràcia molts pacients varien la seva dieta per tal de controlar els símptomes i sovint segueixen dietes inapropiades o massa restrictives que no presenten els mínims nutricionals necessaris. Així que, encara que les dietes ajudin a millorar l'estat dels pacients, seguir-les

correctament és difícil i per tant, alguns complements alimentaris com són probiòtics o prebiòtics poden ajudar aportant millores nutricionals.

L'evidència científica dels probiòtics per la malaltia de Crohn presenta resultats contradictoris, en canvi per la CU hi ha una evidència més clara. La gran majoria dels estudis clínics en humans per determinar l'eficàcia dels probiòtics en pacients amb CU observen sí el tractament aconsegueix que els pacients o bé entrin en estat de remissió, o bé aconsegueixin mantenir-s'hi en comparació amb un grup control. En diverses metanàlisis el probiòtic que ha demostrat més eficàcia en induir la remissió en pacients amb CU activa és el VSL#3 [171,172,186]. Es tracta d'una barreja de vuit soques (*Lactobacillus acidophilus* SD512, *Lactobacillus casei* SD5218, *Lactobacillus bulgaricus* SD5210, *Lactobacillus plantarum* SD5209, *Bifidobacterium longum* SD5219, *Bifidobacterium infantis* SD5220, *Bifidobacterium breve* SD5206 i *Streptococcus thermophilus* SD5207). En canvi, el probiòtic que ha presentat més eficàcia en el manteniment de l'estat de remissió és el Mutaflor® amb la soca probiòtica *Escherichia coli* Nissle 1917 [187]. Les últimes metanàlisis suggereixen un efecte beneficiós tot i que en la majoria de casos, l'heterogeneïtat dels estudis com ara l'ús de diferents soques, les diferències entre dosis i les diferències en el disseny provoquen limitacions a l'hora de treure conclusions, així com també les diferents escales utilitzades per determinar quan els pacients es troben en estat de remissió [188]. Altres probiòtics utilitzats amb menys evidència són l'Ultra Levura® amb la soca *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745, i el LGG® amb la soca *Lactobacillus rhamnosus* ATCC53103 [172].

Actualment s'han realitzat pocs estudis per avaluar l'eficàcia dels prebiòtics en la CU, i per tant encara no hi ha una evidència clara del seu possible ús. Tot i així alguns estudis segueixen intentant identificar possibles evidències degut a l'efecte que poden causar aquests en la reducció de la inflamació i l'augment de diversitat [132]. Per exemple, dos estudis que comparen la dieta occidental amb la dieta rural africana troben que la dieta rica en fibres de la població africana causa una proporció més gran de *Bacteroides* respecte *Firmicutes*, i un augment de la concentració de butirat a les femtes a part d'una reducció dels nivells d'inflamació en els adults, fent èmfasi en la importància de preservar la diversitat microbiana en les comunitats a l'hora de prevenir malalties gastrointestinals [189,190]. Una metanàlisis amb 64 estudis aleatoritzats i controlats, amb diferents tipus de fibra, demostra que l'efecte principal de la intervenció amb fibres és l'augment de *Lactobacillus* i especialment *Bifidobacterium*. També destaca l'heterogeneïtat d'aquestes fibres on l'efecte prebiòtic es dona sobretot en inulines, FOS i GOS [191].

JUSTIFICACIÓ I OBJECTIUS

Com s'ha comentat a la introducció, la microbiota intestinal juga un paper important en la salut humana. De fet, el desequilibri de la microbiota intestinal sembla estar íntimament lligat i amb un paper causal amb les recaigudes inflamatòries de la CU, una malaltia crònica que es considera incurable, i en la que es busca mantenir els pacients lliures de rebrots el major temps possible. Els tractaments actuals no sempre aconsegueixen induir la remissió dels símptomes, i quan ho fan, la durada de la remissió és variable, raó per la qual cal estudiar nous tractaments. L'observació que els pacients amb CU tenen una microbiota alterada respecte dels individus sans, i que les pèrdues de diversitat de la microbiota precedeixen els rebrots de la malaltia, ha portat a plantejar la modulació de la microbiota mitjançant probiòtics o prebiòtics com una estratègia per facilitar la remissió i/o allargar la remissió dels pacients amb CU. Els probiòtics inclouen principalment dos grans grups de bacteris amb molt poca relació genètica entre ells (els gèneres *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*), i dins d'aquests hi ha espècies i soques amb característiques microbiològiques diferents, pel que podríem esperar heterogeneïtats importants en la seva eficàcia en el maneig de la CU. D'altra banda, els prebiòtics més estudiats fins ara i que presenten evidència sobre els efectes moduladors de la microbiota són els fructans tipus inulines. Tanmateix, en microbiologia és ben sabut que canvis en el grau de polimerització d'una molècula poden afectar la seva utilitat com a substrat d'un bacteri. Això aplicaria per tant als prebiòtics, però els estudis són escassos, normalment amb espècies bacterianes aïllades (és a dir, no amb un ecosistema de microbiota complert), i sempre de curta durada. Finalment, cal considerar que intervencions amb probiòtics o prebiòtics no tenen perquè impactar totes les característiques i símptomes d'una malaltia complexa com la CU per igual. Donat que existeixen diferents escales per avaluar la CU, hi ha la possibilitat que l'ús d'una o altra escala pugui condicionar la detecció d'una eficàcia clínica.

D'aquesta manera els objectius d'aquesta tesi són:

1. Determinar el grau d'evidència que hi ha de l'eficàcia de probiòtics, prebiòtics tipus fructans, i la seva combinació (simbiòtics) en la millora de pacients que presenten colitis ulcerosa, realitzant una revisió sistemàtica i una metanàlisi, i determinar si hi ha diferències en funció del tipus de probiòtic (si conté *Bifidobacterium* o no) i del tipus d'escala utilitzada per avaluar la CU.
2. Estudiar l'efecte del grau de polimerització dels fructans sobre la seva capacitat de modular la microbiota intestinal humana, en un sistema de fermentació *ex vivo* de llarga durada que reproduïx les condicions fisicoquímiques del còlon humà amb una microbiota complerta que pateix un pèrdua inicial de diversitat (a imitació del que succeeix abans dels rebrots de CU).

OBJECTIU 1

**Eficàcia de probiòtics, prebiòtics fructans tipus inulines i simbiòtics en pacients amb colitis
ulcerosa, revisió sistemàtica i metanàlisis**

1. Justificació de l'objectiu

Els estudis de probiòtics, prebiòtics tipus fructans i simbiòtics pel tractament de la colitis ulcerosa mostren una heterogeneïtat en la metodologia utilitzada i també sobre els resultats obtinguts de la seva eficàcia. Els factors d'heterogeneïtat dels estudis es troben en l'escala utilitzada per determinar si els pacients es troben en l'estat de remissió o en l'estat actiu de la malaltia segons els símptomes que presenten els pacients i les diferències entre tractaments utilitzats, a banda de les variacions de dosis i durada dels tractaments. Per tal d'obtenir una evidència més clara és necessari recollir tots els estudis de qualitat i trobar un efecte global en quant a efectivitat del tractament, tenint en compte aquests factors d'heterogeneïtat.

Hi ha més d'una escala per avaluar l'estat del pacient amb CU. Les diferents escales observen aspectes i símptomes diferents de la malaltia pel que les seves puntuacions per avaluar l'estat del pacient varien i per tant, l'estat de remissió no s'entén de la mateixa manera per totes elles podent donar diferències en la determinació d'aquest estat. D'aquesta manera volem estudiar l'efecte que presenten els tractaments en funció de l'escala utilitzada per determinar l'estat de remissió.

D'altra banda, com hem comentat anteriorment, l'efecte beneficiós d'un probiòtic pot venir donat per un gènere, una espècie, o bé per una soca determinada, i l'efectivitat dels prebiòtics segons la selectivitat que presentin per ser metabolitzats on ja hem vist que dins d'una mateixa família hi ha diferències segons l'estructura que els conforma, com és el grau de polimerització. D'aquesta manera, en el cas dels probiòtics, a banda d'estudiar cada producte comercial de manera independent és interessant observar l'efectivitat en funció dels gèneres bacterians que el componen o d'algun gènere en concret com és el *Bifidobacterium*. Es creu que el gènere *Bifidobacterium* és especialment important en l'hoste on modula activitats metabòliques i immunes, i a més es troba disminuït en pacients amb CU, pel que resulta interessant estudiar l'impacte de la seva presència en la composició dels probiòtics en el tractament de la CU.

2. Resum dels resultats

Segons els criteris establerts i eliminant els articles duplicats, es van identificar un total de 38 articles per a la seva revisió dels 298 articles generats en la recerca. D'aquests 38, 20 van ser exclosos per no presentar una qualitat suficient. Els 18 articles restants (n pacients = 1491) presentaven heterogeneïtat pel que fa al disseny i les variables mesurades, dels quals 16 estudiaven l'eficàcia dels probiòtics mentre que només un estudiava un simbiòtic, i un altre els prebiòtics tipus fructans.

En la revisió sistemàtica, 2 dels 18 articles mesuraven les quantitats de AGCC (n=80) generats per la microbiota en pacients inactius (en remissió). Només es va observar una diferència significativa en la

relació dels nivells de butirat/acetat sent menor en els pacients que s'havien mantingut en remissió i en canvi, en pacients actius es va observar un augment significatiu de les concentracions totals d'AGCC després de la suplementació amb probiòtic. Cinc estudis (n=127) van analitzar els nivells d'inflamació, confirmant la reducció significativa de marcadors com TNF- α , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, calprotectina o la proteïna C reactiva (CRP). Tres estudis (n= 230) observaven la composició de la microbiota fecal després de l'administració d'un probiòtic que contenia com a mínim una soca del gènere *Bifidobacterium*, un d'ells no va observar canvis, un altre va determinar el descens significatiu dels nivells d'aquests gènere abans de patir una recaiguda, i l'altre va observar un augment de determinades espècies d'aquest mateix gènere en el grup probiòtic, fet que dificulta extreure'n una conclusió global. Finalment, 17 estudiaven la inducció o el manteniment de la remissió dels pacients i d'aquests, es van poder utilitzar 15 estudis per dur a terme la metanàlisi sobre l'eficàcia dels probiòtics en la CU.

En la metanàlisi realitzada, 12 estudis (n=886) comparaven l'efecte dels probiòtics en vers un grup placebo, i aquests estudis es van diferenciar segons si a l'inici de l'estudi els pacients es trobaven en estat actiu o en estat de remissió (9 i 3 estudis, respectivament). En canvi, els altres 3 estudis (n=513) comparaven els probiòtics amb un grup control de mesalazina per estudiar únicament el manteniment de la remissió.

Dels 12 articles de probiòtic vers control presents a la metanàlisi, 9 estudis (n=602) tractaven pacients amb CU activa, on no es van trobar diferències significatives entre tractaments una però si una gran heterogeneïtat entre estudis ($I^2 = 71\%$). L'heterogeneïtat va disminuir marcadament al realitzar un subgrup utilitzant únicament els 6 estudis (n=503) que havien determinat l'estat de remissió segons les escales recomanades per la FDA, l'UCDAI i el DAI, i en aquests es van observar diferències significatives entre el grup probiòtic i el placebo, amb un Risc Relatiu (RR) de 1.55 (CI95% 1.13–2.15, p-valor = 0.007, $I^2 = 29\%$). En canvi, els resultats no van ser significatius quan es metanalitzaven els 3 estudis restants que van determinar la remissió amb altres escales, tot i que no es va poder fer cap subgrup amb cap altra escala concreta degut a la poca quantitat d'estudis.

A banda de les escales, els estudis analitzats van utilitzar diferents probiòtics per provar l'eficàcia d'aconseguir l'estat de remissió. Es va determinar l'eficàcia d'aquells probiòtics que contenien alguna espècie del gènere *Bifidobacterium* en un total de 6 estudis (n=424) suggerint que aquest gènere era efectiu per induir la remissió en pacients amb CU activa amb un RR de 1.73 (CI95% 1.23–2.43, p-valor = 0.002, $I^2 = 35\%$). En canvi, 2 estudis (n=138) que contenien el probiòtic Mutaflor amb la soca *E. coli* Nissle 1917 no van mostrar diferències significatives al igual que quan es va afegir un estudi addicional que tampoc contenia el gènere *Bifidobacterium*. Per altre banda, 4 estudis (n=348) que utilitzaven el

probiòtic VSL#3 (el més utilitzat), inclosos en l'estudi del gènere de *Bifidobacterium*, també van mostrar diferències significatives entre el grup probiòtic i el placebo amb un RR de 1.99 (CI95% 1.25–3.15, p-valor = 0.003, $I^2 = 49\%$). Un dels estudis de pacients actius també va determinar la quantitat de pacients que després d'entrar en remissió presentaven una recaiguda, pel que també es troba analitzat en els resultats de pacients en remissió. Així, 4 estudis (n=313) dels 12 inclosos a la metanàlisi van determinar l'eficàcia dels probiòtics per mantenir l'estat de remissió dels pacients tot i que no es van observar diferències significatives amb el grup placebo o control amb un RR de 1.38 (CI95% 0.86–2.21, p-valor = 0.18, $I^2 = 56\%$).

Els darrers 3 estudis que van comparar el probiòtic Mutaflor (*E. coli* Nissle 1917) amb la mesalazina només van estudiar el manteniment de la remissió sense observar diferències significatives, suggerint que aquest probiòtic és igual d'eficaç que la mesalazina, tractament habitual pel manteniment de la remissió en CU amb un RR de 0.92 (CI95% 0.82–1.04, p-valor = 0.18).

Finalment, no es va poder realitzar una metanàlisi dels estudis sobre prebiòtics ni simbiòtics degut a no disposar de suficients estudis de qualitat.

Review

The Efficacy of Probiotics, Prebiotic Inulin-Type Fructans, and Synbiotics in Human Ulcerative Colitis: A Systematic Review and Meta-Analysis

Erola Astó ¹, Iago Méndez ¹, Sergi Audivert ¹, Andreu Farran-Codina ^{2,*}  and Jordi Espadaler ¹ 

¹ AB-Biotics, S.A., ESADE Creapolis, Av. Torre Blanca, 57, Sant Cugat del Vallès, E-08172 Barcelona, Spain; asto@ab-biotics.com (E.A.); mendez@ab-biotics.com (I.M.); sergi@ab-biotics.com (S.A.); espadaler@ab-biotics.com (J.E.)

² Department of Nutrition, Food Science, and Gastronomy, XaRTA – INSA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Campus de l'Alimentació de Torribera, Av. Prat de la Riba, 171, Santa Coloma de Gramenet, E-08921 Barcelona, Spain

* Correspondence: afarran@ub.edu; Tel.: +34-934031896

Received: 21 December 2018; Accepted: 29 January 2019; Published: 30 January 2019



Abstract: Studies of probiotics, fructan-type prebiotics, and synbiotics in patients with ulcerative colitis (UC) show significant heterogeneity in methodology and results. Here, we study the efficacy of such interventions and the reasons for the heterogeneity of their results. Eligible random controlled trials were collected from the PUBMED and SCOPUS databases. A total of 18 placebo-controlled and active treatment-controlled (i.e., mesalazine) studies were selected with a Jadad score ≥ 3 , including 1491 patients with UC. Data for prebiotics and synbiotics were sparse and consequently these studies were excluded from the meta-analysis. The UC remission efficacy of probiotics was measured in terms of relative risk (RR) and odds ratio (OR). Significant effects were observed in patients with active UC whenever probiotics containing bifidobacteria were used, or when adopting the US Food and Drug Administration (FDA)-recommended scales (UC Disease Activity Index and Disease Activity Index). By the FDA recommended scales, the RR was 1.55 (CI95%: 1.13–2.15, p -value = 0.007, $I^2 = 29\%$); for bifidobacteria-containing probiotics, the RR was 1.73 (CI95%: 1.23–2.43, p -value = 0.002, $I^2 = 35\%$). No significant effects were observed on the maintenance of remission for placebo-controlled or mesalazine-controlled studies. We conclude that a validated scale is necessary to determine the state of patients with UC. However, probiotics containing bifidobacteria are promising for the treatment of active UC.

Keywords: ulcerative colitis; remission; probiotic; prebiotic; synbiotic

1. Introduction

The worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel diseases (IBDs) have been increasing over the last few decades [1]. Along with Crohn's disease (CD), ulcerative colitis (UC) is one of the two major types of IBDs. Unlike CD, which can affect any part of the gastrointestinal tract, from the mouth to the anus, UC characteristically only affects the inner lining of the large bowel [2].

Although the etiology of UC is still unclear, one of the main hypotheses is that it is caused by an excessive immune response to endogenous bacteria in genetically predisposed individuals [3,4]. Therefore, manipulation of the mucosal microbiota to reduce the inflammatory potential of colonizing bacteria is an attractive therapeutic option for UC. Most conventional UC therapies, including the use of compounds containing 5-aminosalicylic acid (5-ASA), corticosteroids, immunosuppressant agents, and anti-tumor necrosis factor (TNF) monoclonal antibodies, suppress intestinal inflammation. However, a subpopulation of patients is refractory to these therapies, or intolerant because of their

significant side effects [5]. Also, UC patients can experience frequent relapses. Therefore, treatments that directly modulate the gut microbiota have been studied as adjunctive therapies, or as alternatives to conventional drug therapies [6].

Bacterial microbiota alterations have been well documented in patients with active disease [7]. Metagenomic studies have demonstrated that microbial diversity and intestinal microbiota stability decrease in IBD patients, compared to individuals without IBDs [8]. A recent study identified the microorganisms that invade the terminal ileum and colon of UC-affected individuals as the pro-inflammatory bacteria Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) and *Campylobacter*, which are both members of the *Enterobacteriaceae* family [8]. A recent meta-analysis identified lower amounts of bacteria from *Clostridium* clusters XIVa and IV in patients with active IBDs [9]. Meanwhile, during active UC, anti-inflammatory *Lactobacillus* and *Pediococcus acidilactici* were absent in fecal samples that were analyzed by fluorescence in situ hybridization. However, with UC in remission, these strains reappeared [7]. Decreased numbers of *Bifidobacterium* spp. were observed in both inflamed UC and CD, while *Lactobacillus* spp. were unchanged during active UC [7]. In addition, a significant decrease in the diversity and richness of the microbiota has been observed in patients with UC in remission, compared with controls, and a further decrease in diversity was observed at relapse [10]. As the composition of the microbiota in UC patients appears to be remarkably unstable [11], there is particular interest in providing such patients with solutions that address their gut dysbiosis to achieve stability, diversity, and optimal abundance of bacterial groups, as observed in healthy controls.

The use of probiotics in IBDs is a potential aid to current conventional therapies. Several studies have focused on the effects of blends of probiotics on enteral microbiota, especially in cases of dysbiosis when the normal concentration of beneficial bacterial flora is reduced due to the presence of pathogenic bacteria [2]. Currently, the standard UC treatment relies on initial managed treatment with corticosteroids and anti-inflammatory agents, such as mesalazine, in conjunction with symptomatic treatment with antidiarrheal agents and rehydration [12].

Probiotics contain viable microorganisms, sufficient amounts of which reach the intestine in an active state for them to exert positive health effects [13]. They mostly include lactic acid-producing bacteria, such as bifidobacteria and lactobacilli; but other organisms, such as *Escherichia coli* and the yeast *Saccharomyces boulardii*, have been reported to have beneficial effects via prolonging remission in patients with IBDs. Although their mechanisms of action have not been established, some studies suggest that these probiotics modulate membrane permeability and the mucosal immune system [6,14]. Among other substances released by bacteria, short-chain fatty acids (SCFAs) have strong immunomodulatory effects and are involved in anti-inflammatory gene regulation processes. Acetic acid, butyric acid, and propionic acid are the most abundant SCFAs [15], and the production of SCFAs seems to play an important role in the maintenance of the gut barrier function [16,17].

Other substances that could potentially be used to treat UC are prebiotics and synbiotics. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics states that a prebiotic is “a substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit” [18]. It further states, however, that beneficial effects on health must be confirmed in the host that is the target for the intended use and these should always be mediated by the microbiota. Synbiotics are prebiotics combined with probiotic bacteria. Ishikawa (2011) studied the effects of bifidobacterial strains plus GOS synbiotics on patients with UC and concluded that the treatment group significantly improved, showing marked improvements in colonoscopy scores and significant decreases in inflammatory markers [19].

Other meta-analyses of the efficacy of probiotics at treating UC did not analyze subgroups considering the different scales, to determine remission in UC patients [20,21]. This may have led to the identification of a high degree of heterogeneity among studies involving the effects of probiotics, due to the wide variety of scales used to determine UC remission, since patients' states are observed and scored in different manners according to the differing scales. To avoid this problem of heterogeneity when assessing patients, a study is needed in which the probiotic effect is observed according to the

scale that is used to determine the remission state. In addition to the remission scale problems, other meta-analyses have shown that the probiotic VSL#3[®] (VSL Pharmaceuticals Inc., Ft. Lauderdale, FL, USA) is an effective treatment against active UC [20]. However, it is still unknown whether this is due to the combination of strains presents in the product or the presence of any of its strains or species in particular. Considering that patients with UC exhibit lower concentrations of bifidobacteria than the healthy population, it is possible that their inclusion in VSL#3 makes an effective inducer of remission. Other papers [21,22] report the effects of treatment with bifidobacteria alone or in a mixture, in patients with UC. Thus, the effect of bifidobacteria was another point of interest in our study.

Taking all the foregoing into consideration, in the present systematic review, we consider the efficacy of probiotics as well as inulin-type fructans, prebiotics, and synbiotics with inulin-type fructans in UC patients. Moreover, we performed meta-analysis when the number of studies included allowed this.

2. Materials and Methods

This systematic review and the corresponding meta-analysis were performed following the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines [23].

2.1. Data Sources and Searches

The search was performed in PUBMED, SCOPUS, and the Cochrane database, for controlled trials with no restrictions regarding age, sex, year of publication, or the duration of the study. The search terms included “ulcerative colitis” or “inflammatory bowel disease” with the following combined text: “probiotic”, “prebiotic”, “inulin”, “fructo-oligosaccharides”, “FOS”, and “synbiotic” (see full search strategy in Supplementary Data S1). The search focused on human clinical trials referring to treatments with probiotics, prebiotics, or synbiotics in UC patients, and was limited to publications in Spanish or English.

The literature cited in the reviews retrieved was scrutinized to locate additional candidate studies to be included in the systematic review. The titles and abstracts of the papers identified in the initial search were evaluated by two independent reviewers, to ensure their appropriateness for the study.

2.2. Study Selection and Data Extraction

Studies duplicated in different databases or searches were included only once. The eligibility of the remaining hits was evaluated by examining titles, abstracts, and full text sequentially. The eligibility criteria were: (1) randomized controlled trials, (2) samples composed of adults or children with active or inactive UC, (3) studies that compared probiotics, prebiotics, or synbiotics with placebos or mesalazine (5-ASA).

Data was extracted by two independent reviewers (EA and AF) onto a Microsoft Excel spreadsheet (Microsoft Corp, Redmond, WA, USA). The data were collected based on study information such as the authors' names, year of publication, sample size, age of patients, type of medication used, dosage, duration, and outcome. Once the data had been collected, their Jadad score was used to assess the quality of the clinical trials and those with a score of 3 or greater were included in the analyses [24]. In addition, the following clinical data were extracted: the gender of trial participants, the type of probiotic administration, initial states of patients (active or inactive UC), the number of drop-outs and their causes, and the remission scale used. Data were extracted as an intention to-treat (ITT) analysis; patients who did not complete were assumed to be treatment failures (i.e., failed to achieve remission in active UC trials or disease activity relapsed in inactive UC trials) wherever trial reporting allowed for this.

2.3. Risk of Bias in Individual Studies

Two investigators (EA and AF) independently evaluated the risk of bias in the studies included using the Cochrane risk-of-bias tool [23]. This evaluates the risk of bias due to random sequence

generation, concealment of allocation, blinding, incomplete outcome data, selective reporting, and other sources of bias.

2.4. Data Synthesis and Quantitative Synthesis (Meta-Analysis)

The impact of probiotics compared with mesalazine (5-ASA) or a placebo was expressed in terms of RR and OR with 95% confidence intervals (CI95%) in trials of therapy for active UC or no relapse of disease activity in trials of inactive UC. An inverse variance weighting method with random effects modeling was used to compare the RR and OR values between studies. Tables and forest plots with calculated ORs are provided as Supplementary Material, to facilitate comparison with other studies that chose to use ORs as the measure of association.

The heterogeneity between studies was assessed using the χ^2 test and the I^2 statistic, with a cut off of $\geq 50\%$ being the definition for a substantial to considerable degree of heterogeneity [25].

The use of subgroup analysis for the meta-analysis was dependent on the clinical score, remission status, study designs, and species of probiotics. More precisely, we performed sensitivity analyses by estimating the RR and ORs with ITT analysis, active and inactive remission of patients, the Ulcerative Colitis Disease Activity Index (UCDAI) and Disease Activity Index (DAI)/Mayo scores, and different probiotics, to evaluate the stability and reduce the heterogeneity of the meta-analysis results. The statistical analysis and calculation of fail-safe numbers [26] were conducted with STATA 14.2 (STATA Corp, College Station, TX, USA) using the command “mar” [27]. Forest plots were generated by Review Manager 5.3 software (The Nordic Cochrane Centre, Copenhagen, Denmark).

3. Results

3.1. Literature Search and Selected Studies

The search strategy generated a total of 298 hits, corresponding to papers published between 1991 and 2018, of which 64 were excluded as repeats (Figure 1). A total of 196 papers were excluded after screening because they reported no probiotic, prebiotic, and synbiotic treatment, or did not focus on a UC clinical trial. The remaining 38 papers were read in full, and 20 were excluded because their Jadad score was lower than 3 [2,28–46].

We finally analyzed 18 papers [6,47–63], which are summarized in Table 1. Sixteen studied the efficacy of probiotics; while one looked into the efficacy of synbiotics, and one that of prebiotics.

Overall, the studies involved 1491 subjects, with sample sizes ranging from 18 to 327 individuals. Sixteen papers reported data for adults, with a total of 1422 subjects; the other two, data for children and adolescents, with a total of 69 subjects. Moreover, 13 papers focused on active UC; five on inactive UC subjects. However, there were two studies where the initial status of the patients was active and the primary outcome was the induction of remission (delay in outbursts), but in which the maintenance of remission was also studied [57,61]. The papers selected were published between 1997 and 2018; no differences were observed among the percentages of men and women in the studies.

Mutaflor[®] (Ardeypharm GmbH, Herdecke, Germany) was the most commonly reported treatment, appearing in five papers; followed by VSL#3 which appeared in four papers. The products or probiotics that only appeared in a single paper were *Bifidobacterium longum* 536, Bio-Three[®] (Toa Pharmaceutical Co., Ltd., Toyama, Japan), *Bifidobacterium infantis* 35624, *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730, Probio-Tec AB-25[®] (Chr. Hansen A/S, Hoersholm Denmark), a composite of *Bifidobacterium breve* Yakult, *Bifidobacterium bifidum* Yakult and *Lactobacillus acidophilus*, and, finally, a mix of *Bifidobacterium breve* Yakult plus *Lactobacillus acidophilus*. There was only one trial that studied a synbiotic product: a mixture of *B. longum* and Synergy 1[®] (Orafti, Tienen, Belgium). Finally, one paper studied the prebiotic Synergy 1[®] alone (Table 1).

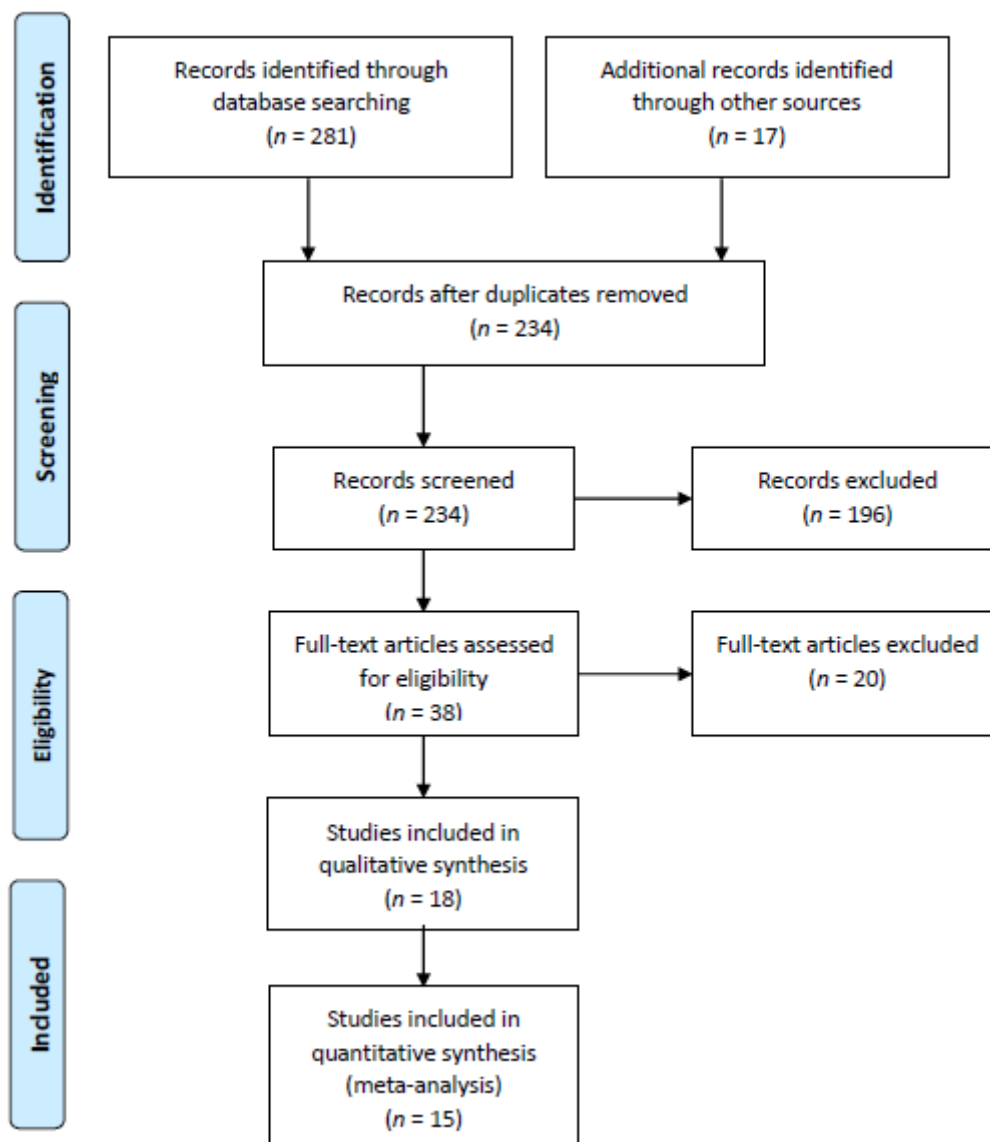


Figure 1. Flow diagram of the selection of studies for systematic review and meta-analysis.

Outcomes considered in this systematic review were the effects on SCFAs (two papers out of the 18), inflammation levels (five papers), composition of fecal microbiota (three studies) and UC remission (17 papers). We then performed meta-analysis of the papers that studied UC remission with probiotics treatment (15 papers). The three remaining papers were excluded from the meta-analysis because one study did not report the induction or maintenance of UC remission after probiotic treatment [50]; and two studies did not treat patients with probiotics, but with prebiotics [63] or synbiotics [58]. The 15 papers in the meta-analysis include 12 on the efficacy of probiotics in remission, which were placebo-controlled. We differentiated active and inactive patients to study efficacy at inducing or maintaining UC remission. The three remaining papers compared probiotics with mesalazine to study efficacy at maintaining remission.

Table 1. Main characteristics of randomized controlled trials of probiotics versus placebo or mesalazine in inducing or maintaining remission.

Study	Sample/Initial State	Age	Ulcerative Colitis Remission Score	Comparison	Therapy Used	Control Used
* Matsuoka et al. 2018 [47]	192/Inactive	≥18	DAI	Probiotic vs. control ^a	<i>B. breve</i> Yakult and <i>L. acidophilus</i> ^b	Placebo
* Tamaki et al. 2016 [6]	56/Active	≥18	UCDAI	Probiotic vs. control ^a	BB536 ^b	Placebo
* Yoshimatsu et al. 2015 [48]	60/Inactive	≥18	UCDAI	Probiotic vs. control ^a	Bio-Three	Placebo
* Petersen et al. 2014 [49]	50/Active	≥18	CAI	Probiotic vs. control ^a	Mutaflor	Placebo
Groeger et al. 2013 [50]	22/Active	≥18	Not assessed	Probiotic vs. control	<i>B. infantis</i> 35624 ^b	Placebo
* Oliva et al. 2012 [51]	40/Active	6–18	DAI	Probiotic vs. control (both with mesalazine)	<i>L. reuteri</i> ATCC 55730	Placebo
* Wildt et al. 2011 [52]	32/Inactive	≥18	SCCAI	Probiotic vs. control	Probio-Tec AB-25 ^b	Placebo
* Tursi et al. 2010 [53]	144/Active	≥18	UCDAI	Probiotic vs. control ^a	VSL#3 ^b	Placebo
* Matthes et al. 2010 [54]	88/Active	≥18	DAI	Probiotic vs. control ^a	Mutaflor	Placebo
* Ng et al. 2010 [55]	28/Active	≥18	UCDAI	Probiotic vs. control ^a	VSL#3 ^b	Placebo
* Sood et al. 2009 [56]	147/Active	≥18	UCDAI	Probiotic vs. control ^a	VSL#3 ^b	Placebo
* Miele et al. 2009 [57]	29/Active	8–16	Lichtiger CAI	Probiotic vs. control (both with mesalazine)	VSL#3 ^b	Placebo
Casellas et al. 2007 [63]	19/Active	≥18	CAI	Prebiotic vs. control (both with mesalazine)	Synergy 1	Placebo
Furrie et al. 2005 [58]	18/Active	≥18	CAI	Synbiotic vs. control	<i>B. longum</i> /Synergy1 ^b	Placebo
* Kato et al. 2004 [59]	20/Active	≥18	CAI	Probiotic vs. control ^a	<i>B. breve</i> Yakult, <i>B. bifidum</i> Yakult and <i>L. acidophilus</i> ^b	Placebo
* Kruis et al. 2004 [60]	327/Inactive	≥18	CAI	Probiotic vs. mesalazine	Mutaflor	Mesalazine
* Rembacken et al. 1999 [61]	116/Active	≥18	CAI	Probiotic vs. mesalazine	Mutaflor	Mesalazine
* Kruis et al. 1997 [62]	103/Inactive	≥18	CAI	Probiotic vs. mesalazine	Mutaflor	Mesalazine

UCDAI: ulcerative colitis disease activity index; DAI: disease activity index; CAI: clinical activity index; SCCAI: simple clinical colitis activity index. * Studies included in the meta-analysis; ^a Therapy and Control allowed concomitant medication; ^b Probiotics that contain *Bifidobacterium* strains.

3.2. Risk of Bias and Quality Assessment

The risk of bias was assessed across the 18 studies included (Supplementary Table S1). Evidence of random sequence generation, allocation concealment, and selective reporting was unclear in most studies. As to blinding (participants and personnel), there was a low risk of bias across the included studies, and only one paper was shown to have an unclear risk of bias. No study, except for Matsuoka 2018, showed evidence of maintaining blinding throughout the study, and so (except for Matsuoka 2018) were analyzed as having an unclear risk of bias. The amount of incomplete outcome data was low in most of the studies (10/18), and there was a low risk of other sources of bias in all.

3.3. Effect of Probiotics on SCFAs

There were two placebo-controlled trials involving 80 patients that reported the fecal concentrations of SCFAs and the efficacy of probiotics versus placebo [48,59]. One trial reported efficacy in terms of preventing relapse in inactive UC; the other, in terms of inducing remission in active UC cases. In trials on inactive UC patients, the fecal concentration of SCFAs did not differ significantly between the probiotic and placebo groups at any time during treatment. However, the butyrate/acetate ratio at each of the sampling times was significantly higher in fecal samples obtained from patients who had relapsed within six months of fecal collection than in those obtained from patients who remained in remission [48]. In trials with active UC patients, the total SCFA concentration

and the butyric and propionic acid concentrations in stools significantly increased after probiotic supplementation [59].

3.4. Effect of Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics on Gut Inflammation

There were five papers involving 127 patients with active UC that reported the effectiveness of probiotics, prebiotics, or synbiotics versus a placebo on inflammation levels. Systemic inflammatory biomarkers were observed, such as C-reactive protein (CRP) levels, TNF- α , I1- α , IL-6, IL-8, IL-10, and calprotectin, among others. The level of inflammation was assessed in comparison with the control group. All studies reported a significant reduction in inflammation, regardless of whether the study was performed with probiotic, prebiotic, or synbiotic therapy [50,51,55,58,63]. However, two studies assessed probiotics versus placebo treatment in an adult population, but they did not assay the same probiotics [50,55]. Another study assessed probiotics versus placebo treatment, but used a synbiotic therapy based on a *Bifidobacterium longum* probiotic with Synergy 1[®] prebiotics in adult patients [58]. The results of two studies, one that included prebiotics in an adult population and one in children and young individuals, suggested that probiotics and prebiotics can improve the response to mesalazine by mitigating intestinal inflammation [51,63].

3.5. Effect of Probiotics and Synbiotics on Microbiota Composition

Three studies, including a total of 230 patients, studied changes in microbiota composition after probiotic or synbiotic treatment. Matsuoka et al. [47] administered a probiotic to inactive UC patients, and revealed a significant decrease in *Bifidobacterium* species in fecal samples ($p = 0.006$) before relapse, although no effects were detected in the intestinal microbiota. Kato et al. [59] observed that the numbers of fecal *B. breve* and *B. pseudocatenulatum* among bifidobacterial species significantly increased in the probiotic group ($p < 0.05$) but not in the placebo group after administering a probiotic containing bifidobacteria to active UC patients. Other *Bifidobacterium* species and *Bacteroides* species were not significantly changed in either group. Finally, Furrie et al. [58] detected higher numbers of total bifidobacteria on the mucosal surface in active UC patients fed a synbiotic formula that contained *B. longum* and Synergy 1[®], than in those taking a placebo.

3.6. Meta-Analysis of Efficacy of Probiotics at Inducing/Maintaining Remission (Probiotic versus Control)

The meta-analysis finally included 12 placebo-controlled trials, involving a total of 886 individuals. Together, the clinical trials examined the effects of administration (oral or rectal) of probiotics versus placebo or active treatment of UC to induce remission in active UC patients or to maintain remission in inactive UC patients. Detailed study characteristics are provided in Table 1.

Patients were allowed to take concomitant medications such as mesalazine (Supplementary Table S2) in nine out of 12 studies; while in two additional studies all patients took mesalazine in addition to the probiotics or placebo. There was just one study in which patients only took probiotics or a placebo, with no other medication allowed. Matthes et al. [54] compared three different doses of probiotics to a single placebo group. As there were no significant differences between doses on the effect, we performed our analysis using figures calculated by pooling all probiotic doses in one group.

3.6.1. Efficacy of Probiotics in Active UC Patients

Nine papers included 602 active UC patients, and the results showed no significant differences between probiotic and control groups (Figure 2). There was substantial heterogeneity between the studies ($I^2 = 71\%$), and because the p -value was 0.09 and the number of studies was sufficiently high, subanalyses were performed to study possible sources of this heterogeneity.

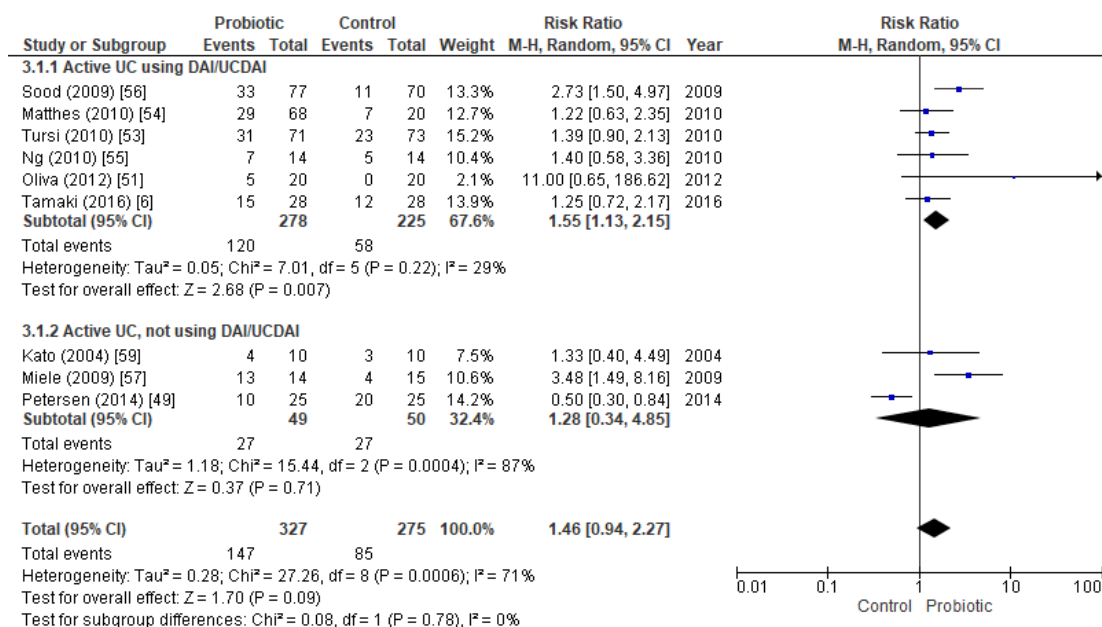


Figure 2. Forest plot of randomized controlled trials assessing remission in active UC patients, assessed with UCDAI or DAI scores (above), or using other scores (below).

The heterogeneity disappeared when only trials using the UCDAI and DAI indices were included ($I^2 = 29\%$). Meta-analysis of these six trials, totaling 503 individuals, assessing remission with the UCDAI or DAI score found a statistically significant difference between the probiotic and the placebo groups. The RR was 1.55 (CI95% 1.13–2.15, p -value = 0.007, $I^2 = 29\%$), and the OR was 2.12 (CI95% 1.36–3.31, p -value = 0.000, $I^2 = 12\%$) (Supplementary Figure S1). Other scores (SCCAI, Lichtiger CAI and CAI) were not studied separately as the number of studies that included them was insufficient; but the three studies that did not assess remission with UCDAI or DAI score were analyzed together and the results showed no significant differences between intervention and placebo groups (Figure 2).

Following the method proposed by Rosenthal [26], we estimated the fail-safe number (fsN): the number of studies with non-significant results that would have to be added to change the results of the meta-analysis from significant ($p < 0.05$) to non-significant. The result for the subgroup of studies with active UC patients that used DAI/UCDAI scales was: fsN = 27. As fsN < 5N + 10, where N is the number of case studies in our dataset, we cannot verify the robustness of results against publication bias.

Because different probiotics were used to induce remission in active UC patients (Table 1), we also studied the efficacy of Mutaflor, VSL#3, and other probiotics that included *Bifidobacterium* strains, separately (Figure 3). Six studies (424 patients) that used bifidobacteria-containing probiotics were analyzed, and the results suggested that such probiotics were effective in inducing remission in active UC patients. The results were as follows: RR = 1.73 (CI95% 1.23–2.43, p -value = 0.002, $I^2 = 35\%$) and OR = 2.50 (CI95% = 1.33–4.70, p -value = 0.005, $I^2 = 44\%$) (Supplementary Figure S2). We also calculated fsN for this subgroup and the value obtained (fsN = 36) is less than 5N + 10, so robustness against publication bias is low. Conversely, three studies without bifidobacteria, totaling 168 patients, showed no significant differences between treatment and control groups (Figure 3). VSL#3, when added to conventional therapy at a daily dose of 3.6×10^{12} colony-forming unit (CFU/day), effectively induced remission. Four studies (348 patients) that used VSL#3 showed statistically significant differences between the probiotic and the control group, with an RR of 1.99 (CI95% 1.25–3.15, p -value = 0.003, $I^2 = 49\%$), and an OR of 3.21 (CI95% 1.31–7.90, p -value = 0.01, $I^2 = 62\%$) (Supplementary Figure S2). In this case, fsN = 30 indicating a low robustness against publication bias. Finally, two aggregated Mutaflor studies (138 patients) could not demonstrate that this treatment promotes remission in active UC patients (Figure 3).

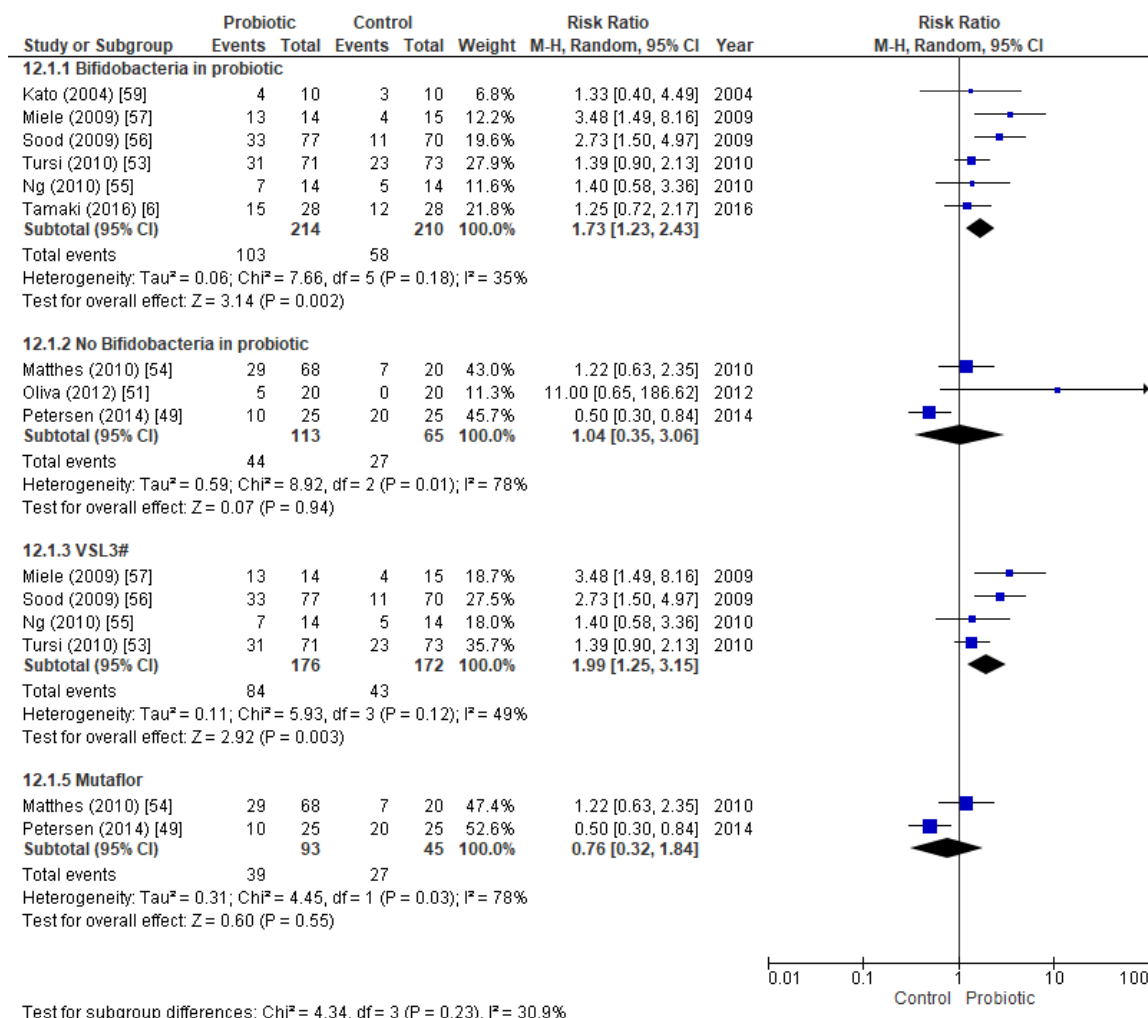


Figure 3. Forest plot of randomized controlled trials in which remission was achieved by active UC patients. Comparison of treatment with VSL#3, Mutaflor, or other probiotics containing bifidobacteria strains as well as those not containing bifidobacteria, all versus a placebo.

3.6.2. Efficacy of Probiotics in Inactive UC Patients

Four trials that included 313 inactive UC patients attempted to determine the efficacy of probiotics at maintaining remission, but no statistically significant differences were detected between the probiotic and control groups (Figure 4) (Supplementary Figure S3). One of these papers studied the remission rate in active UC patients, but also assessed the maintenance of remission until the end of the study [57].

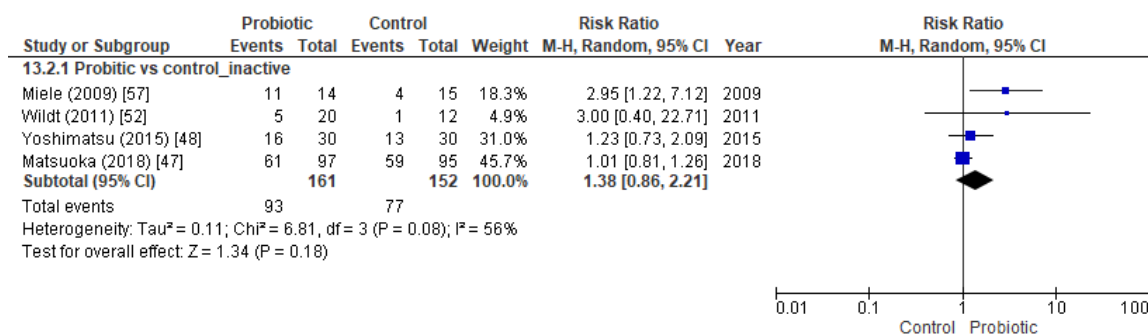


Figure 4. Forest plot of randomized controlled trials focused on the maintenance of remission in inactive UC patients.

3.7. Efficacy of Probiotics at Maintaining Remission (Probiotics versus Mesalazine)

To compare probiotics against mesalazine in maintaining remission in UC patients, the meta-analysis included three papers involving a total of 513 individuals. One of these papers studied both the remission rate in active UC patients and the maintenance of remission at follow-up, and it was the only study that permitted concomitant medication (Supplementary Table S2) [61]. Together, the clinical trials examined the effect of oral administration of the probiotic Mutaflor against mesalazine, at maintaining remission in inactive UC patients. However, the results showed no significant differences between probiotic and control groups, suggesting that the probiotic was equally as effective as mesalazine at maintaining UC remission (Figure 5) (Supplementary Figure S4).

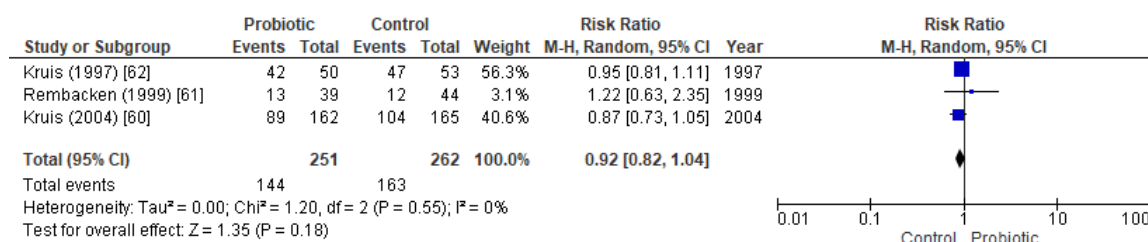


Figure 5. Forest plot of randomized controlled trials regarding the maintenance of remission in inactive UC patients when comparing the probiotic Mutaflor with mesalazine.

4. Discussion

Guidelines and recommendations from scientific experts and institutions support the safety of probiotics, and state that some are at least as effective as conventional therapy at achieving remission in UC patients in both adult and pediatric populations [13]. Therapy with probiotics, prebiotics, and synbiotics has been proposed to increase the production of SCFAs [18]. SCFAs, in combination with bifidobacteria, are involved in the reduction of inflammation [18,64], and are recognized as having mechanistic links to health outcomes [18,65].

Our analysis also suggests that probiotics effectively help to achieve remission in active UC cases, as this effect seems to be statistically significant. When a subanalysis was performed only on the papers that compared probiotics against a placebo and patient remission was determined with only the UCDAI and DAI scales, the lowest heterogeneity among studies was achieved.

Both the UCDAI and DAI (total score of 0 to 12) incorporate scores for stool frequency, rectal bleeding, endoscopic findings, and clinical assessment of disease activity [66]. Conversely, CAI (0–23), SCCAI (0–20), and Lichtiger CAI (0–21) also include more general items, such as general well-being, extra-intestinal features, fever, anemia, and the erythrocyte sedimentation rate (ESR) [66]. Thus, these latter scales include more general extra-intestinal features, where probiotics would seem less likely to have an effect. Moreover, laboratory markers, which are more objective, cannot be replaced by the other parameters [67], and signs and symptoms are best assessed by a patient-reported outcome instrument, as opposed to clinician-reported outcome instruments [68]. Furthermore, the treatment effect was statistically significant in studies that used the UCDAI and DAI scales, but not in those that used other scales, with heterogeneity considerably higher in the latter case. This may mean that the use of the same method to determine remission is an aid in understanding the effects of probiotics in patients with UC.

The most commonly used disease activity scales among the trials in this study were the UCDAI and the DAI. In our meta-analysis, we considered that both scales were similar enough to be considered to measure the same construct in different studies [69]. Although significant results were observed when using studies that identified remission with UCDAI or DAI, there is not yet a validated scale for determining remission in patients with UC [70]. Thus, the use of either the UCDAI or DAI scale, instead of other scales, cannot be justified based on these observations.

Nonetheless, probiotics containing bifidobacteria were demonstrated to promote remission in patients with active UC, while probiotics not containing bifidobacteria did not have a beneficial effect. Heterogeneity was not observed among the bifidobacteria studies, but was greater than that observed in the meta-analysis of trials that determined remission with the UCDAI and DAI scales. Duranti et al. (2016) [71] suggest that patients with UC have reduced levels of bifidobacteria (as assessed by 16S ribosomal RNA (rRNA) compared to the healthy population. It, therefore, seems logical that the use of a probiotic treatment containing bifidobacteria would improve patient health; and this suggests potential therapeutic roles for this genus and probiotics containing these bacteria.

VSL#3 was shown to be an effective probiotic for achieving remission in active UC patients. It has previously been shown that VSL#3 is effective in UC and that it is capable of controlling inflammation, and lengthening the remission period [72]. Although our meta-analysis includes a limited number of studies showing the efficacy of the probiotic VSL#3, administration was found to be effective in patients with active UC. Other authors report similar results, and have showed that VSL#3 can effectively induce and maintain remission in UC patients [21,22,73]. The efficacy of VSL#3 could be due to the variety of bacteria it contains, or specifically to the presence of one bifidobacteria strain. In our meta-analysis, the reduction in heterogeneity between studies was higher when treatments with probiotics that contained bifidobacteria were compared to studies using VSL#3. Shen et al. 2014 [22], in their meta-analysis, found no beneficial effects of probiotics with bifidobacteria; but unlike us, they included the Furrie et al. 2005 [58] study, where the treatment was synbiotic. Additionally, they did not include as many studies; for example, they excluded studies that performed VSL#3 treatments. In our meta-analysis, we did not include studies with synbiotics, because, in such studies, it is not fully known whether the effect is due to the probiotic or prebiotic.

A previous systematic review and meta-analysis of six trials evaluated the EcN 1917 probiotic against mesalazine treatment, and determined that EcN is equivalent to mesalazine in preventing disease relapse [73]. Our study suggests similar effects of the EcN 1917 probiotic on maintaining remission as those of mesalazine treatment (RR = 0.92, CI95% 0.82–1.04, *p*-value = 0.18). The difference in the number of studies was due to the fact that our subanalysis only included probiotics versus placebo studies. This implied that two studies were excluded because they compared a probiotic-plus-mesalazine to placebo-plus-mesalazine. Additionally, one study included in that review [73] was also excluded from ours because it obtained a Jadad scale score < 3.

Our systematic review has revealed a scarcity of reliable data for prebiotics and synbiotics. There were not enough studies to perform meta-analysis of the effect of prebiotics or synbiotics, so the decision was made to exclude these from our meta-analysis. They are not included in our prebiotics meta-analysis because they are different treatments.

While the results of the present review and meta-analysis suggest a beneficial effect of probiotic treatment in active UC patients, there were some limitations when comparing the different studies. The clinical trials differed in terms of their inclusion and exclusion criteria, regarding, for example, treatment, concomitant medications, diversity in the probiotic strains used, and the probiotic schedules and concentrations. Moreover, most of the studies included had few participants, some had many drop-outs and, most importantly, a variety of scales was used to define remission status.

Although there is no ideal or validated scale to define remission status, the FDA has indicated that while this is the case, the UCDAI and DAI are the most commonly used scales and are recommended [66,68]. In addition, a systematic review containing 153 trials, of which 116 used the UCDAI scale, evaluated the definition and evidence for remission endpoints in UC from the point of view of two particular scales (UCEIS and UCDAI), and recommended that an international consensus of remission should be sought as a matter of urgency before establishing a gold standard for outcome measurement. This would lead towards standardization of clinical trial protocols and advance in patient care [74]. Thus, presently, it is difficult to determine the best possible outcomes due to a lack of homogeneity of the clinical trial protocols.

Therefore, we still do not know the necessary doses or the duration of the probiotic treatments that are needed to obtain an optimal effect. It could be that by using the same scale to define the remission state, beneficial remission effects occur in patients with UC treated with more commercial probiotic strains. Thus, we suggest that more studies involving prebiotics or synbiotics are needed. A few studies have shown that inulin increases bifidobacteria levels, having a beneficial effect on the gut [75]. Thus, this genus could play an important therapeutic role. However, further studies are needed to determine the effects of probiotics on SCFA production, gut inflammation, and microbiota composition. These factors should also be studied for prebiotics and synbiotics, in order to gauge their effects in UC treatment. Other interesting alternatives for the treatment of ulcerative colitis, such as fecal microbiota transplantation (FMT), are currently being studied [76]. A Cochrane systematic review suggests that FMT may increase the proportion of UC patients achieving clinical remission [77]. However, not many controlled or randomized studies have been published using FMT for indications other than *C. difficile* infection, so more studies are also needed before recommending FMT for the treatment of ulcerative colitis.

Finally, the definition of the term “probiotic” is very generic and lacks specificity; and we must stress the importance of adequate doses and the determination of probiotics or strains that cause beneficial effects. Larger sample sizes and dose-finding randomized controlled clinical trials are probably needed to clarify the role of probiotics in the treatment of UC.

5. Conclusions

In conclusion, our meta-analysis shows that the use of probiotics seems to be beneficial in terms of reaching remission in patients with UC, but this observation depends strongly on the UC scale adopted. More precisely, the significant effect is only observed with the UCDAI and DAI scales, which are those recommended by the FDA for UC clinical trials with pharmaceuticals; not with other scales. Probiotic composition also seems to play a relevant role, with bifidobacteria-containing probiotics seemingly being most beneficial.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/2/293/s1>, Data S1: Search strategy, Table S1: Risk of bias in selected studies, Table S2: Concomitant medication in the studies, Figure S1: Forest plot with ORs of randomized controlled trials assessing remission in active UC patients, assessed with UCDAI or DAI scales, or using other scales, Figure S2: Forest plot with ORs of randomized controlled trials of remission in active UC patients, when comparing VSL#3, Mutaflor, or other probiotics containing *Bifidobacterium* strains or not, all versus placebo, Figure S3: Forest plot with ORs of randomized controlled trials of maintaining remission in inactive UC patients, Figure S4: Forest plot with ORs of randomized controlled trials in maintaining remission in inactive UC patients when comparing the probiotic Mutaflor with mesalazine.

Author Contributions: Conceptualization and investigation: E.A., I.M., S.A., J.E., and A.F.-C.; research design: E.A., I.M., and J.E.; data collection: E.A., and A.F.-C.; analysis and writing of the manuscript: E.A., I.M., J.E., and A.F.-C. All the authors approved the final version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Universities and Research Secretariat of the Department of Economy and Knowledge of the *Generalitat de Catalunya* regional authorities (award no.: 2014 DI 073).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest regarding the publication of this paper.

References

1. Da Silva, B.C.; Lyra, A.C.; Rocha, R.; Santana, G.O. Epidemiology, demographic characteristics and prognostic predictors of ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 9458–9467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Palumbo, V.D.; Romeo, M.; Marino Gammazza, A.; Carini, F.; Damiani, P.; Damiano, G.; Buscemi, S.; Ignazio, A.; Monte, L.; Gerges-Geagea, A.; et al. The long-term effects of probiotics in the therapy of ulcerative colitis: A clinical study. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* **2016**, *160*, 372–377. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Monteleone, G.; Caruso, R.; Pallone, F. Targets for new immunomodulation strategies in inflammatory bowel disease. *Autoimmun. Rev.* **2014**, *13*, 11–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

4. Ahluwalia, B.; Moraes, L.; Magnusson, M.K.; Öhman, L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand. J. Gastroenterol.* **2018**, *53*, 379–389. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chudy-Onwugaje, K.O.; Christian, K.E.; Farraye, F.A.; Cross, R.K. A State-of-the-Art Review of New and Emerging Therapies for the Treatment of IBD. *Inflamm. Bowel Dis.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Tamaki, H.; Nakase, H.; Inoue, S.; Kawanami, C.; Itani, T.; Ohana, M.; Kusaka, T.; Uose, S.; Hisatsune, H.; Tojo, M.; et al. Efficacy of probiotic treatment with *Bifidobacterium longum* 536 for induction of remission in active ulcerative colitis: A randomized, double-blinded, placebo-controlled multicenter trial. *Dig. Endosc.* **2016**, *28*, 67–74. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Sasaki, M.; Klapproth, J.-M.A. The Role of Bacteria in the Pathogenesis of Ulcerative Colitis. *J. Signal Transduct.* **2012**, *2012*, 1–6. [[CrossRef](#)]
8. Zhang, M.; Sun, K.; Wu, Y.; Yang, Y.; Tso, P.; Wu, Z. Interactions between Intestinal microbiota and host immune response in inflammatory bowel disease. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1–13. [[CrossRef](#)]
9. Prosberg, M.; Bendtsen, F.; Vind, I.; Petersen, A.M.; Gluud, L.L. The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: A systematic review and meta-analysis. *Scand. J. Gastroenterol.* **2016**, *51*, 1407–1415. [[CrossRef](#)]
10. Ott, S.J.; Plamondon, S.; Hart, A.; Begun, A.; Rehman, A.; Kamm, M.A.; Schreiber, S. Dynamics of the mucosa-associated flora in ulcerative colitis patients during remission and clinical relapse. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 3510–3513. [[CrossRef](#)]
11. Jonkers, D.; Penders, J.; Masclee, A.; Pierik, M. Probiotics in the management of inflammatory bowel disease: A systematic review of intervention studies in adult patients. *Drugs* **2012**, *72*, 803–823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Laurell, A.; Sjöberg, K. Prebiotics and synbiotics in ulcerative colitis. *Scand. J. Gastroenterol.* **2017**, *52*, 477–485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Guarner, F.; Sanders, M.E.; Eliakim, R.; Fedorak, R.; Gangl, A.; Garisch, J.; Kaufmann, P.; Karakan, T.; Khan, A.G.; Kim, N.; et al. Probiotics and prebiotics. *WGO Glob. Guidel.* **2017**, *80*, 113–117. [[CrossRef](#)]
14. Lorenzo-Zúñiga, V.; Llop, E.; Suárez, C.; Álvarez, B.; Abreu, L.; Espadaler, J.; Serra, J. I.31, a new combination of probiotics, improves irritable bowel syndrome-related quality of life. *World J. Gastroenterol.* **2014**, *20*, 8709–8716. [[CrossRef](#)]
15. Shen, Z.-H.; Zhu, C.-X.; Quan, Y.-S.; Yang, Z.-Y.; Wu, S.; Luo, W.-W.; Tan, B.; Wang, X.-Y. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 5–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Ríos-Covián, D.; Ruas-Madiedo, P.; Margolles, A.; Gueimonde, M.; De los Reyes-Gavilán, C.G.; Salazar, N. Intestinal short chain fatty acids and their link with diet and human health. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1–9. [[CrossRef](#)]
17. LeBlanc, J.G.; Chain, F.; Martín, R.; Bermúdez-Humarán, L.G.; Courau, S.; Langella, P. Beneficial effects on host energy metabolism of short-chain fatty acids and vitamins produced by commensal and probiotic bacteria. *Microb. Cell Fact.* **2017**, *16*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D.; et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Ishikawa, H.; Matsumoto, S.; Ohashi, Y.; Imaoka, A.; Setoyama, H.; Umesaki, Y.; Tanaka, R.; Otani, T. Beneficial effects of probiotic *Bifidobacterium* and galacto-oligosaccharide in patients with ulcerative colitis: A randomized controlled study. *Digestion* **2011**, *84*, 128–133. [[CrossRef](#)]
20. Derwa, Y.; Gracie, D.J.; Hamlin, P.J.; Ford, A.C. Systematic review with meta-analysis: The efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2017**, *46*, 389–400. [[CrossRef](#)]
21. Ganji-Arjenaki, M.; Rafieian-Kopaei, M. Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta analysis and systematic review. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 2091–2103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Shen, J.; Zuo, Z.-X.; Mao, A.-P. Effect of Probiotics on Inducing Remission and Maintaining Therapy in Ulcerative Colitis, Crohn's Disease, and Pouchitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2014**, *20*, 21–35. [[CrossRef](#)]
23. Higgins, J.P.T.; Altman, D.G.; Gøtzsche, P.C.; Jüni, P.; Moher, D.; Oxman, A.D.; Savović, J.; Schulz, K.F.; Weeks, L.; Sterne, J.A.C.; et al. The Cochrane Collaboration's tool for assessing risk of bias in randomised trials. *BMJ* **2011**, *343*. [[CrossRef](#)]

24. Jadad, A.R.; Moore, R.A.; Carroll, D.; Jenkinson, C.; Reynolds, D.J.M.; Gavaghan, D.J.; McQuay, H.J. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: Is blinding necessary? *Control. Clin. Trials* **1996**, *17*, 1–12. [[CrossRef](#)]
25. Higgins, J.P.T.; Green, S.; Sally, E.; Cochrane Collaboration. *Cochrane Handbook for Systematic Reviews of Interventions*; Wiley-Blackwell: Chichester, UK, 2008; ISBN 9780470712184.
26. Rosenthal, R. *Meta-Analytic Procedures for Social Research*; Sage Publications: Beverly Hills, CA, USA, 1991; ISBN 9780803942455.
27. *Meta-Analysis OR, RR, RD, IR, ID, B, MD & R Combined: User-Written Command Mar for Stata*, version 1.3.6.; Graunt21: Barcelona, Spain, 2017.
28. Henker, J.; Müller, S.; Laass, M.W.; Schreiner, A.; Schulze, J. Probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN) for successful remission maintenance of ulcerative colitis in children and adolescents: An open-label pilot study. *Z. Gastroenterol.* **2008**, *46*, 874–875. [[CrossRef](#)]
29. Huynh, H.Q.; deBruyn, J.; Guari, L.; Diaz, H.; Li, M.; Girgis, S.; Turner, J.; Fedorak, R.; Madsen, K. Probiotic preparation VSL#3 induces remission in children with mild to moderate acute ulcerative colitis: A pilot study. *Inflamm. Bowel Dis.* **2009**, *15*, 760–768. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Federico, A.; Tuccillo, C.; Grossi, E.; Abbiati, R.; Garbagna, N.; Romano, M.; Tiso, A.; Blanco, C.D.V.; Loguercio, C. The effect of a new symbiotic formulation on plasma levels and peripheral blood mononuclear cell expression of some pro-inflammatory cytokines in patients with ulcerative colitis: A pilot study. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **2009**, *13*, 285–293. [[PubMed](#)]
31. Krag, A.; Israelsen, H.; Von Ryberg, B.; Andersen, K.K.; Bendtsen, F. Safety and efficacy of Profermin[®] to induce remission in ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* **2012**, *18*, 1773–1780. [[CrossRef](#)]
32. Santana Porbén, S. Influencia de una combinación de lactobacilos + bifidobacterias sobre la actividad de la enfermedad, el hábito defecatorio y el estado nutricional de pacientes con colitis ulcerosa. *Nutr. Hosp.* **2010**, *25*, 971–983.
33. Hegazy, S.K.; El-Bedewy, M.M. Effect of probiotics on pro-inflammatory cytokines and NF-kappaB activation in ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* **2010**, *16*, 4145–4151. [[CrossRef](#)]
34. D'Incà, R.; Barollo, M.; Scarpa, M.; Grillo, A.R.; Brun, P.; Vettorato, M.G.; Castagliuolo, I.; Sturniolo, G.C. Rectal administration of *Lactobacillus casei* DG modifies flora composition and toll-like receptor expression in colonic mucosa of patients with mild ulcerative colitis. *Dig. Dis. Sci.* **2011**, *56*, 1178–1187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Fujimori, S.; Gudis, K.; Mitsui, K.; Seo, T.; Yonezawa, M.; Tanaka, S.; Tatsuguchi, A.; Sakamoto, C. A randomized controlled trial on the efficacy of synbiotic versus probiotic or prebiotic treatment to improve the quality of life in patients with ulcerative colitis. *Nutrition* **2009**, *25*, 520–525. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Takeda, Y.; Nakase, H.; Namba, K.; Inoue, S.; Ueno, S.; Uza, N.; Chiba, T. Upregulation of T-bet and tight junction molecules by *Bifidobacterium longum* improves colonic inflammation of ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2009**, *15*, 1617–1618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Tsuda, Y.; Yoshimatsu, Y.; Aoki, H.; Nakamura, K.; Irie, M.; Fukuda, K.; Hosoe, N.; Takada, N.; Shirai, K.; Suzuki, Y. Clinical effectiveness of probiotics therapy (BIO-THREE) in patients with ulcerative colitis refractory to conventional therapy. *Scand. J. Gastroenterol.* **2007**, *42*, 1306–1311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Zocco, M.A.; Dal Verme, L.Z.; Cremonini, F.; Piscaglia, A.C.; Nista, E.C.; Candelli, M.; Novi, M.; Rigante, D.; Cazzato, I.A.; Ojetti, V.; et al. Efficacy of Lactobacillus GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2006**, *23*, 1567–1574. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Bibiloni, R.; Fedorak, R.N.; Tannock, G.W.; Madsen, K.L.; Gionchetti, P.; Campieri, M.; De Simone, C.; Sartor, R.B. VSL#3 probiotic-mixture induces remission in patients with active ulcerative colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **2005**, *100*, 1539–1546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Tursi, A.; Brandimarte, G.; Giorgetti, G.M.; Forti, G.; Modeo, M.E.; Gigliobianco, A. Low-dose balsalazide plus a high-potency probiotic preparation is more effective than balsalazide alone or mesalazine in the treatment of acute mild-to-moderate ulcerative colitis. *Med. Sci. Monit.* **2004**, *10*, PI126–PI131.
41. Cui, H.-H.; Chen, C.-L.; Wang, J.-D.; Yang, Y.-J.; Cun, Y.; Wu, J.-B.; Liu, Y.-H.; Dan, H.-L.; Jian, Y.-T.; Chen, X.-Q. Effects of probiotic on intestinal mucosa of patients with ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* **2004**, *10*, 1521–1525. [[CrossRef](#)]
42. Guslandi, M.; Giollo, P.; Testoni, P.A. A pilot trial of *Saccharomyces boulardii* in ulcerative colitis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2003**, *15*, 697. [[CrossRef](#)]

43. Ishikawa, H.; Akedo, I.; Umesaki, Y.; Tanaka, R.; Imaoka, A.; Otani, T. Randomized controlled trial of the effect of bifidobacteria-fermented milk on ulcerative colitis. *J. Am. Coll. Nutr.* **2003**, *22*, 56–63. [[CrossRef](#)]
44. Venturi, A.; Gionchetti, P.; Rizzello, F.; Johansson, R.; Zucconi, E.; Brigidi, P.; Matteuzzi, D.; Campieri, M. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: Preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1999**, *13*, 1103–1108. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Ellegard, L.; Andersson, H.; Bosaeus, I. Inulin and oligofructose do not influence the absorption of cholesterol, or the excretion of cholesterol, Ca, Mg, Zn, Fe, or bile acids but increases energy excretion in ileostomy subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* **1997**, *51*, 1–5. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Haskey, N.; Dahl, W.J. Synbiotic Therapy Improves Quality of Life and Reduces Symptoms in Pediatric Ulcerative Colitis. *Infant. Child Adolesc. Nutr.* **2009**, *1*, 88–93. [[CrossRef](#)]
47. Matsuoka, K.; Uemura, Y.; Kanai, T.; Kunisaki, R.; Suzuki, Y.; Yokoyama, K.; Yoshimura, N.; Hibi, T. Efficacy of *Bifidobacterium breve* Fermented Milk in Maintaining Remission of Ulcerative Colitis. *Dig. Dis. Sci.* **2018**, *63*, 1910–1919. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Yoshimatsu, Y.; Yamada, A.; Furukawa, R.; Sono, K.; Osamura, A.; Nakamura, K.; Aoki, H.; Tsuda, Y.; Hosoe, N.; Takada, N.; et al. Effectiveness of probiotic therapy for the prevention of relapse in patients with inactive ulcerative colitis. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 5985–5994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Petersen, A.M.; Mirsepasi, H.; Halkjær, S.I.; Mortensen, E.M.; Nordgaard-Lassen, I.; Krogfelt, K.A. Ciprofloxacin and probiotic *Escherichia coli* Nissle add-on treatment in active ulcerative colitis: A double-blind randomized placebo controlled clinical trial. *J. Crohn's Colitis* **2014**, *8*, 1498–1505. [[CrossRef](#)]
50. Groeger, D.; O'Mahony, L.; Murphy, E.F.; Bourke, J.F.; Dinan, T.G.; Kiely, B.; Shanahan, F.; Quigley, E.M.M. *Bifidobacterium infantis* 35624 modulates host inflammatory processes beyond the gut. *Gut Microbes* **2013**, *4*, 325–339. [[CrossRef](#)]
51. Oliva, S.; Di Nardo, G.; Ferrari, F.; Mallardo, S.; Rossi, P.; Patrizi, G.; Cucchiara, S.; Stronati, L. Randomised clinical trial: The effectiveness of *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730 rectal enema in children with active distal ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2012**, *35*, 327–334. [[CrossRef](#)]
52. Wildt, S.; Nordgaard, I.; Hansen, U.; Brockmann, E.; Rumessen, J.J. A randomised double-blind placebo-controlled trial with *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 for maintenance of remission in ulcerative colitis. *J. Crohn's Colitis* **2011**, *5*, 115–121. [[CrossRef](#)]
53. Tursi, A.; Brandimarte, G.; Papa, A.; Giglio, A.; Elisei, W.; Giorgetti, G.M.; Forti, G.; Morini, S.; Hassan, C.; Pistoia, M.A.; et al. Treatment of Relapsing Mild-to-Moderate Ulcerative Colitis With the Probiotic VSL#3 as Adjunctive to a Standard Pharmaceutical Treatment: A Double-Blind, Randomized, Placebo-Controlled Study. *Am. J. Gastroenterol.* **2010**, *105*, 2218–2227. [[CrossRef](#)]
54. Matthes, H.; Krummnerl, T.; Giensch, M.; Wolff, C.; Schulze, J. Clinical trial: Probiotic treatment of acute distal ulcerative colitis with rectally administered *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN). *BMC Complement. Altern. Med.* **2010**, *10*, 13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Ng, S.C.; Plamondon, S.; Kamm, M.A.; Hart, A.L.; Al-Hassi, H.O.; Guenther, T.; Stagg, A.J.; Knight, S.C. Immunosuppressive effects via human intestinal dendritic cells of probiotic bacteria and steroids in the treatment of acute ulcerative colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2010**, *16*, 1286–1298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Sood, A.; Midha, V.; Makharia, G.K.; Ahuja, V.; Singal, D.; Goswami, P.; Tandon, R.K. The Probiotic Preparation, VSL#3 Induces Remission in Patients With Mild-to-Moderately Active Ulcerative Colitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *7*. [[CrossRef](#)]
57. Miele, E.; Pascarella, F.; Giannetti, E.; Quaglietta, L.; Baldassano, R.N.; Staiano, A. Effect of a Probiotic Preparation (VSL#3) on Induction and Maintenance of Remission in Children With Ulcerative Colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **2009**, *104*, 437–443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Furrie, E. Synbiotic therapy (*Bifidobacterium longum*/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: A randomised controlled pilot trial. *Gut* **2005**, *54*, 242–249. [[CrossRef](#)]
59. Kato, K.; Mizuno, S.; Umesaki, Y.; Ishii, Y.; Sugitani, M.; Imaoka, A.; Otsuka, M.; Hasunuma, O.; Kurihara, R.; Iwasaki, A.; et al. Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2004**, *20*, 1133–1141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Kruis, W. Maintaining remission of ulcerative colitis with the probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 is as effective as with standard mesalazine. *Gut* **2004**, *53*, 1617–1623. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

61. Rembacken, B.J.; Snelling, A.M.; Hawkey, P.M.; Chalmers, D.M.; Axon, A.T.R. Non-pathogenic *Escherichia coli* versus mesalazine for the treatment of ulcerative colitis: A randomised trial. *Lancet* **1999**, *354*, 635–639. [[CrossRef](#)]
62. Kruis, W.; Schütz, E.; Fric, P.; Fixa, B.; Judmaier, G.; Stolte, M. Double-blind comparison of an oral *Escherichia coli* preparation and mesalazine in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **1997**, *11*, 853–858. [[CrossRef](#)]
63. Casellas, F.; Borruel, N.; Torrejón, A.; Varela, E.; Antolin, M.; Guarner, F.; Malagelada, J.R. Oral oligofructose-enriched inulin supplementation in acute ulcerative colitis is well tolerated and associated with lowered faecal calprotectin. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2007**, *25*, 1061–1067. [[CrossRef](#)]
64. Jandhyala, S.M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Reddy, D.N. Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 8836–8847. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Macfarlane, S.; Furrer, E.; Kennedy, A.; Cummings, J.H.; Macfarlane, G.T. Mucosal bacteria in ulcerative colitis. *Br. J. Nutr.* **2005**, *93*, S67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Cooney, R.M.; Warren, B.F.; Altman, D.G.; Abreu, M.T.; Travis, S.P. Outcome measurement in clinical trials for ulcerative colitis: Towards standardisation. *Trials* **2007**, *8*, 17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Vermeire, S.; Van Assche, G.; Rutgeerts, P. Laboratory markers in IBD: Useful, magic, or unnecessary toys? *Gut* **2006**, *55*, 426–431. [[CrossRef](#)]
68. Food and Drug Administration Ulcerative Colitis: Clinical Trial Endpoints. 2016; pp. 1–19. Available online: <https://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM515143.pdf> (accessed on 5 February 2018).
69. Su, C.; Lewis, J.D.; Goldberg, B.; Brensinger, C.; Lichtenstein, G.R. A Meta-Analysis of the Placebo Rates of Remission and Response in Clinical Trials of Active Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 516–526. [[CrossRef](#)]
70. Mohammed Vashist, N.; Samaan, M.; Mosli, M.H.; Parker, C.E.; MacDonald, J.K.; Nelson, S.A.; Zou, G.Y.; Feagan, B.G.; Khanna, R.; Jairath, V. Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Duranti, S.; Gaiani, F.; Mancabelli, L.; Milani, C.; Grandi, A.; Bolchi, A.; Santoni, A.; Lugli, G.A.; Ferrario, C.; Mangifesta, M.; et al. Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: Bifidobacteria as novel microbial biomarkers. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, *92*, 1–12. [[CrossRef](#)]
72. Mardini, H.E.; Grigorian, A.Y. Probiotic mix VSL#3 is effective adjunctive therapy for mild to moderately active ulcerative colitis: A meta-analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2014**, *20*, 1562–1567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Losurdo, G.; Iannone, A.; Contaldo, A.; Ierardi, E.; Di Leo, A.; Principi, M. *Escherichia coli* Nissle 1917 in ulcerative colitis treatment: Systematic review and meta-analysis. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **2015**, *24*, 499–505. [[CrossRef](#)]
74. Jitsumura, M.; Kokelaar, R.F.; Harris, D.A. Remission endpoints in ulcerative colitis: A systematic review. *World J. Meta-Analysis* **2017**, *5*, 85. [[CrossRef](#)]
75. So, D.; Whelan, K.; Rossi, M.; Morrison, M.; Holtmann, G.; Kelly, J.T.; Shanahan, E.R.; Staudacher, H.M.; Campbell, K.L. Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: A systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2018**, *107*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Ishikawa, D.; Sasaki, T.; Osada, T.; Kuwahara-Arai, K.; Haga, K.; Shibuya, T.; Hiramatsu, K.; Watanabe, S. Changes in Intestinal Microbiota Following Combination Therapy with Fecal Microbial Transplantation and Antibiotics for Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2017**, *23*, 116–125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Imdad, A.; Nicholsn, M.R.; Tanner-Smith, E.E.; Zackular, J.P.; Gomez-Duarte, O.G.; Beaulieu, D.B.; Acra, S. Fecal transplantation for treatment of inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *2017*, CD012774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



OBJECTIU 2

Efecte del grau de polimerització dels fructans sobre la microbiota intestinal humana en un sistema de fermentació *ex vivo*

1. Justificació de l'objectiu

Les persones sanes presenten una microbiota intestinal en equilibri que s'adapta a diferents canvis que la poden influir, com és la composició de la dieta, però algunes situacions provoquen la pèrdua de diversitat microbiana donant lloc a l'estat de disbiosi intestinal relacionat amb problemes de salut com és la malaltia inflamatòria intestinal. Tot i que hi ha poca informació clínica sobre prebiòtics en el cas concret de la CU, s'ha estudiat que els pacients amb aquesta malaltia presenten els nivells del gènere *Bifidobacterium* i d'altres bacteris reduïts, i una baixa diversitat de la microbiota, sobretot quan es troben en estat de recaiguda. La suplementació amb fibres ha demostrat en alguns casos l'augment de la diversitat intestinal pel que podria ser una opció per tractar persones amb baixa diversitat microbiana. Tot i així, les fibres prebiòtiques presenten estructures molt diverses i encara falta molta investigació per determinar l'efecte que causen cada una d'elles. S'ha observat que el gènere *Bifidobacterium* no utilitza inulines d'alt grau de polimerització, sinó només de baix grau, fet que exemplifica que la selectivitat dels prebiòtics ve donada per la seva estructura. Aquesta selectivitat de les inulines no només es troba en aquest gènere bacterià, sinó també d'altres com *Anaerostipes* i *Bilophila*. Si diferents bacteris tenen preferències o són capaços d'utilitzar exclusivament fructans amb un cert grau de polimerització, segurament la diversitat microbiana també es podrà trobar influïda segons el tipus de fructà que s'administri. Per tant, la baixa diversitat microbiana que presenten els individus amb CU, i que podria ésser d'utilitat per altres malalties en què s'observa una baixa diversitat de la microbiota intestinal, com al·lèrgies, diabetis tipus 2 o autisme, entre d'altres, podria ser modificada de diferent manera segons els graus de polimerització de les inulines tipus fructans.

Els models *ex vivo* de fermentació es poden utilitzar per estudiar els efectes que provoquen els prebiòtics en la microbiota intestinal. Normalment el propòsit d'aquestes fermentacions és cultivar una microbiota intestinal complexa, com és el material d'una mostra fecal de pacients sans, sota condicions controlades que simulin l'intestí i així observar la seva modulació durant un temps determinat.

És per aquesta raó que hem volgut comparar l'efecte que presenten tres inulines tipus fructans, amb un grau de polimerització diferent cada una, mitjançant un sistema de fermentació *ex vivo* simulant el còlon humà a partir de mostres fecals humanes de donants sans, per determinar la comparació en els canvis de composició de microbiota a partir de la seqüenciació metagenòmica del gen 16S rRNA després de 2, 7 i 14 dies de fermentació.

2. Resum dels resultats

Les tres mostres fecals obtingudes pels donants van pertànyer a l'enterotip firmicutes, pel que es va utilitzar una mescla 1:1:1 de les tres mostres per dur a terme els experiments (inòcul). Les classes dominants observades a les mostres al llarg dels 14 dies de fermentació van ser *Actinobacteria* i *Coriobacteriia* (pertanyents al filum *Actinobacteria*), *Bacteroidia* (pertanyent al filum *Bacteroidetes*), *Bacilli*, *Clostridia* i *Erysipelotrichi* (pertanyent al filum *Firmicutes*) i *Betaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria* i *Gammaproteobacteria* (pertanyent al filum *Proteobacteria*), totes elles habituals en una microbiota humana normal.

A temps inicial els tres inòculs presentaven un domini de les classes *Bacteroidia* i *Clostridia*, i la abundància d'aquests els identificaria com a pertanyents a un enterotip de tipus firmicutes. El tractament control (sense prebiòtic) va ser el tractament amb més creixement de *Bacteroidia* al llarg del temps (per tant una possible evolució cap a un enterotip diferent, totalment dominat per Bacteroides), mentre que la suplementació del fermentador amb la inulina d'alt grau de polimerització (HPDI) va ser la que va mostrar una estabilitat més gran al llarg del temps de la classe *Clostridia* (classe dominant en un enterotip tipus firmicutes). D'altre banda, la resta de classes més abundants es van trobar augmentades o reduïdes de manera semblant per tots els tractaments.

Per determinar l'alfa diversitat de les mostres a nivell de gènere, es va utilitzar l'índex exponencial de Shannon i l'índex de Simpson invers. Per ambdós índexs i per tots els tractaments, es va observar una remarcable reducció de la diversitat a dia 2, mentre que a partir del dia 7 la diversitat semblava, en general, recuperar-se una mica i estabilitzar-se tot i no arribar als nivells inicials. El tractament que va aconseguir una major diversitat al final de la fermentació va ser la HPDI, recuperant quasi bé als nivells inicials per l'índex de Simpson. Va anar seguida per la inulina de baix grau de polimerització (LPDI), el FOS i finalment el control (sense prebiòtic). De fet, l'HPDI respecte el control pel dia 14 va ser l'única comparació amb diferència significativa que sobrevivia a la correcció de Bonferroni ($p < 0.05$).

L'estabilitat de les microbiotes al llarg del temps es va estudiar comparant la beta diversitat entre dies, dins d'un mateix tractament, amb els índexs de Sorensen i de Bray-Curtis. L'observació més clara va ser que a dia 14 es van trobar més similituds respecte el dia anterior per tots els tractaments, per tant la composició de la microbiota va ser més estable com més avançava la fermentació, independentment de l'índex utilitzat. Tot i així, es va observar més estabilitat (més similituds) amb l'índex de Sorensen, indicant que els gèneres més abundants presentaven un paper important en les diferències entre tractaments. Aquest índex també va mostrar que el FOS a dia 2 era el que menys estabilitat presentava respecte l'inòcul ($p < 0.05$ amb la correcció Bonferroni) comparant amb tots els altres tractaments, mentre que a dia 7 i 14 no hi havia diferències pels diferents tractaments. En canvi, segons l'índex Bray-

Curtis, l'estabilitat assolida a dia 14 per l'HPDI va ésser inferior a la de tots els altres tractaments (Bonferroni $p < 0.05$ respecte la resta de tractaments), cosa que indicaria que els gèneres més abundants és possible que encara no estiguessin estabilitzats. La resta de comparacions dels tractaments no van donar diferències significatives.

Arran d'aquests resultats, on es veia clarament que les mostres a dia 2 eren les més divergents (procés d'estabilització), es van comparar els efectes del tractament amb fructans de diferent grau de polimerització sobre la composició de la microbiota (beta diversitat entre tractaments) a dies 7 i 14. La metodologia emprada va ésser l'anàlisi NMDS amb els índex de Sorensen i de Bray-Curtis, i com a referència es va utilitzar la composició de les 3 mostres originals dels donants. Les tres mostres dels donants van demostrar una clara proximitat entre elles, i una clara separació amb la resta de tractaments pels dies 7 i 14. Segons Sorensen, l'HPDI i l'LPDI quedaven agrupades, i separades de la resta de tractaments. En canvi, per l'índex Bray-Curtis les mostres dels diferents tractaments quedaven més separades, indicant de nou que els gèneres més abundants eren els que provocaven les diferències en aquest tractament.

Mitjançant l'anàlisi ANOSIM de dos factors (temps i tractament) es van observar diferències significatives en la composició de la microbiota amb l'índex de Sorensen ($p \leq 0.0001$ tant per tractament com per temps) i Bray-Curtis ($p = 0,0045$ i $p \leq 0,0001$ pel tractament i el temps, respectivament) en els dies 7 i 14. La composició de la microbiota entre HPDI i LPDI no van ser significativament diferent, mentre que la resta de comparacions van donar nominalment significatives. Es van observar més diferències amb l'índex de Sorensen que amb el de Bray-Curtis però globalment els resultats eren semblants, tot i que les significances no es van mantenir una vegada aplicada la correcció Bonferroni.

Finalment es va determinar la producció neta d'àcid per part de les diferents microbiotes, com a primera aproximació per detectar diferències globals en la activitat metabòlica. Això es va fer quantificant el consum de NaOH i HCl pel sistema per tal de mantenir el fermentador al pH correcte de 6.2. Es va observar una clara producció d'àcid amb tots els tractaments al llarg del temps ($p < 0.0001$), però amb diferències significatives entre tractaments ($p = 0.0012$). No es van observar diferències d'acidificació entre HPDI i LPDI, però les dues van produir més acidificació que el control i el FOS ($p < 0.01$ pels dies 7 i 14 amb correcció de Bonferroni), mentre que l'acidificació del FOS va ésser fins hi tot significativament inferior al control ($p < 0.05$ amb correcció de Bonferroni). Per tant queda demostrat que el grau de polimerització influeix en la diversitat total (HPDI > LPDI \geq FOS \geq control), composició (HPDI \approx LPDI \neq FOS \neq control) i en la activitat metabòlica acidificant de la microbiota (HPDI \approx LPDI > control > FOS).

Article

Effect of the Degree of Polymerization of Fructans on Ex Vivo Fermented Human Gut Microbiome

Erola Astó ^{1,2}, Iago Méndez ¹, Maria Rodríguez-Prado ³, Jordi Cuñé ^{1,†}, Jordi Espadaler ^{1,*} and Andreu Farran-Codina ² 

¹ AB-Biotics, S.A, ESADE Creapolis, Av. Torre Blanca, 57, E-08172 Sant Cugat del Vallès (Barcelona), Spain; asto@ab-biotics.com (E.A.); mendez@ab-biotics.com (I.M.); jordicune@gmail.com (J.C.)

² Department of Nutrition, Food Science, and Gastronomy, XaRTA—INSA, Faculty of Pharmacy, University of Barcelona, Campus de l'Alimentació de Torribera, Av. Prat de la Riba, 171, E-08921 Santa Coloma de Gramenet, Spain; afarran@ub.edu

³ Animal Nutrition and Welfare Service (SNIBA), Building V. Office V0-308, Autonomous University of Barcelona, C/ Travessera dels Turons s/n, E-08193 Bellaterra (Barcelona), Spain; maria.rodriguez.prado@uab.cat

* Correspondence: espadaler@ab-biotics.com; Tel.: +34-935-800-236

† Present address: Devicare, S.A, Eureka Building, UAB Research Park, Av. Can Domènec s/n, E-8193 Cerdanyola del Vallès (Barcelona), Spain.

Received: 28 April 2019; Accepted: 4 June 2019; Published: 7 June 2019



Abstract: Prebiotic supplements are used to promote gastrointestinal health by stimulating beneficial bacteria. The aim of this study was to compare the potential prebiotic effects of fructans with increasing degrees of polymerization, namely fructooligosaccharides (FOS) and inulins with a low and high polymerization degree (LPDI and HPDI, respectively), using an ex vivo fermentation system to simulate the colonic environment. The system was inoculated with pooled feces from three healthy donors with the same baseline enterotype. Changes in microbiota composition were measured by 16S metagenomic sequencing after 2, 7, and 14 days of fermentation, and acid production was measured throughout the experiment. Alpha-diversity decreased upon inoculation of the ex vivo fermentation under all treatments. Composition changed significantly across both treatments and time (ANOSIM $p < 0.005$ for both factors). HPDI and LPDI seemed to be similar to each other regarding composition and acidification activity, but different from the control and FOS. FOS differed from the control in terms of composition but not acidification. HPDI restored alpha-diversity on day 14 as compared to the control (Bonferroni $p < 0.05$). In conclusion, the prebiotic activity of fructans appears to depend on the degree of polymerization, with LPDI and especially HPDI having a greater effect than FOS.

Keywords: prebiotic; inulin-type fructan; fructooligosaccharide; polymerization degree; metagenomics; microbiome

1. Introduction

It is generally accepted that the bacterial community in the human gastrointestinal tract has a great impact on intestinal functionality and human health. The colon is the most colonized region within the gastrointestinal tract, where 10^{11} – 10^{12} cells/mL have been detected [1,2]. The microbes in our bodies have been estimated to encode 100-fold more unique genes than our own genome [3,4]. High-quality data from the US Human Microbiome Project (HMP) [5], European Metagenomics of the Human Intestinal Tract (MetaHIT) [6] and several other studies have now demonstrated the beneficial role of the normal gut microbiota in health down to the genetic level [6,7]. Most bacterial species colonizing the human gastrointestinal tract belong to the phyla Firmicutes and Bacteroidetes, while species of the phyla Actinobacteria, Proteobacteria, and Verrucomicrobia exist in lower numbers. The

number of bacterial species within the human intestinal microbiota has often been estimated to be in the range of 500 to over 1000 species [8]. In a healthy state, they contribute nutrients and energy to the host via the fermentation of nondigestible dietary components in the large intestine, and a balance is maintained with the host's metabolism and immune system [9,10].

The prebiotic concept was first defined in 1995 as a "non-digestible food ingredient that beneficially affects the host by selectively stimulating the growth and/or activity of one or a limited number of bacteria already resident in the colon" [11]. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) recently published a consensus statement to update the definition and scope of prebiotics. The statement defines a prebiotic as "a substrate that is selectively utilized by host microorganisms conferring a health benefit" [12]. The scope of this updated definition is therefore wider, as it implies that the modulatory effect of prebiotics is not necessarily limited to gastrointestinal microbiota (i.e., it can be administered to microbiota-colonized sites other than the gut). Furthermore, the ISAPP consensus statement emphasizes that the definition of prebiotics should not be limited to carbohydrate-based compounds, but should apply to any compound that can be used by the microbiota to confer a health benefit. Some examples are polyphenols and polyunsaturated fatty acids. The document also addresses the difficulties involved in providing definitive proof of causality when assessing the beneficial effects of a prebiotic. Still, it states that the health benefits of a prebiotic must be confirmed in the target host for its intended use and should always be mediated by the microbiota.

Inulin-type fructans (ITF) are the best-documented oligosaccharides for their effect on intestinal *Bifidobacteria* and are considered to be important prebiotic substrates [13]. Fructans can also be described by their polymerization degree (PD). Inulin-type fructans consisting of DP ≥ 10 units are considered long chain, while inulin-type fructans with a DP of < 10 are considered short chain [14]. Nutritional studies have recommended a combination of inulins with different chain lengths in order to maximize their fermentative and prebiotic effects [13]. Beneficial effects of inulin and/or oligofructose on the intestinal microbiota, have been demonstrated in adults, such as increasing *Bifidobacteria* and *Lactobacilli*, as well as increasing butyrate production [15–17]. Moreover, the prebiotic activity of inulin and oligofructose seems to translate into beneficial health effects such as improved glycemic control, reduced plasma triglycerides, improved barrier function, and decreased oxidative stress [14]. However, not all fructans seem to produce the same effects on the gut microbiota [18–20].

Ex vivo fermentation models are considered reliable tools to assess how microbial populations are altered by gastrointestinal environments such as prebiotics [21]. The common purpose of ex vivo gut fermentation models is to cultivate a complex intestinal microbiota under controlled environmental conditions with the aim of carrying out microbial modulation and metabolism studies. Although there are several well-studied and validated complex in vitro models of human microbiota (e.g., the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) [22,23], the TNO Gastrointestinal Model (TIM-2) [24] and the Three-Stage Compound Continuous Culture System [25], we were interested in performing a simpler continuous culture system with one single stage.

Several studies have classified the human intestinal microbiota into three enterotypes in order to reduce the complexity and facilitate the identification of microbiota compositional patterns [26,27]: enterotype 1, which has *Bacteroides* as its best indicator; enterotype 2, which is driven by *Prevotella*, a genus whose abundance is inversely correlated with *Bacteroides*; and enterotype 3, which is distinguished by a significant presence of Firmicutes especially of the *Ruminococcus* genus [26–28]. However, this classification should be treated with caution, as some authors have suggested that microbiota could be divided into two enterotypes, where *Bacteroides* enterotype was fused with the less well distinguished Firmicutes enterotype while other authors have proposed four enterotypes, two of them resembling previously the described *Bacteroides* and *Prevotella* enterotypes, while the other two are a more complex mixture with lower levels of *Bacteroides*, one dominated by a variety of populations affiliated within the Firmicutes phylum and the other combining higher levels of *Faecalibacterium* and *Ruminococcaceae* (both belonging to the Firmicutes phylum) with *Alistipes* (which belongs to the Bacteroidetes phylum) [28,29].

The objective of the study was to evaluate how the polymerization degree influences the prebiotic effect of various fructans (FOS and two inulins with differing degrees of polymerization) in an ex vivo fermented human microbiome, under conditions that simulated the transverse colon, taken from the Macfarlane model [25,30].

2. Materials and Methods

2.1. Fructans Analyzed

Three commercial fructans with differing average fructosyl chain lengths (i.e., degree of polymerization) were chosen for this study.

1. Oligofructose (FOS): **Orafti® P95** (BENEO-Orafti S.A., Tienen, Belgium), a short-chain inulin obtained through partial enzymatic hydrolysis and consisting of fructose units joined by $\beta(2-1)$ linkages, with an end-standing glucose unit and an average polymerization degree of two to eight units.
2. Low-polymerization-degree inulin (LPDI): **Orafti® GR** (BENEO-Orafti S.A., Tienen, Belgium), a granulated powder extracted primarily from chicory and consisting of fructose units joined by $\beta(2-1)$ linkages, with an end-standing glucose unit and an average polymerization degree of ≥ 10 .
3. High-polymerization-degree inulin (HPDI): **Orafti® HPX** (BENEO-Orafti S.A., Tienen, Belgium), a high-performance inulin derived from chicory and consisting of fructose units joined by $\beta(2-1)$ linkages, with an end-standing glucose unit and an average polymerization degree of ≥ 23 .

The concentration of each prebiotic in each fermentation vessel was 12 g/L.

2.2. Donor Information

Inclusion criteria of volunteers were as follows: healthy young adults aged 18–30 years, a BMI of between 19 to 29.9 kg/m², and type-3 or type-4 stools over the previous 72 h, as per the Bristol stool scale [31]. Exclusion criteria were as follows: infectious diseases in the three months prior to fecal donation, antibiotic consumption in the three months prior to donation, blood in the donation, and alcohol intake 72 h prior to donation. Participants were asked to fill out a 72 h dietary recall form and a food frequency questionnaire (Supplementary Table S1). Donors were required to consume a varied diet rich in fruit and vegetables (with a minimum of three portions of vegetables and two portions of fruit per day).

All subjects gave their informed consent for inclusion before they participated in the study. The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Barcelona (IRB00003099).

2.3. Fecal Sample Collection and Inoculum Preparation

Fecal samples were collected (a minimum of 150 g from each donor) and kept in anaerobic conditions with Oxoid AnaeroGen (Thermo Scientific). The samples were homogenized by dissolution in glycerol/PBS (10% *w/v*) directly after collection to maximize preservation for the subsequent stages. The samples were frozen at -20°C and stored in ready-to-use aliquots in the ex vivo fermentation [32,33]. Prior to fermentation, one aliquot from each donor was incubated for 1 h at 37°C .

2.4. Fermentation

Fermentation was carried out in a single-flow in vitro digestion system that simulated the transverse colon conditions defined previously [25,30]. The system consisted of eight independent units (500 mL amber glass jars), in which the fermentation conditions were monitored and controlled. The pH of the culture medium was maintained at 6.2 ± 0.2 by means of a pH meter (model PH 28, Crison Instruments S.A., Barcelona, Spain) connected to two peristaltic minipumps (8 RPM, 100 series pump; Williamson, Southwick, UK) to regulate the addition of HCl 2N or NaOH 3N. Temperature

was monitored with a probe connected to a digital temperature controller (Autonics, Busan, South Korea) and maintained at $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0.5$ with a circulating water bath (PolyScience, Niles, IL, USA). Anaerobic fermentation conditions were achieved by constant flushing of O_2 -free N_2 gas. Liquid retention time was 48 h (2.083%/h dilution rate) by means of two precision peristaltic pumps, one for the culture medium input and one for the fermentation medium output (Masterflex Digital Console Drive; Cole-Parmer, Vernon Hills, IL, USA). All equipment and consumables used in the fermentation process were sterilized before the experiment and sampling started.

The artificial colon simulator was fed a complex mixture of nutrients defined by Macfarlane and widely used in the literature [25,34,35]. This mixture was used as our basal medium, either supplemented with the fructans or alone as a control. The potentially interesting fructans were tested after being added to the Macfarlane composition, while the basal medium alone was used as a control treatment. An aliquot of 60 mL of the prepared fecal inoculum was added to each fermenter, together with 340 mL of the basal medium. The experiments were carried out in parallel in eight anaerobic jars (two replicas for each treatment with the basal medium or the basal medium plus fructans).

2.5. Metagenomics Analysis

2.5.1. DNA Extraction

Bacterial DNA was extracted from 0.2 g of each sample using the PowerFecal™ DNA isolation kit (MO BIO, Carlsbad, CA, USA), in accordance with manufacturer's instructions. DNA samples (100 μL) were stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until further processing. To assess for contamination from the laboratory or reagents, blank samples were processed at the same time. Samples obtained from the fermenters were processed for DNA extraction upon collection.

2.5.2. PCR Amplification and Massive Sequencing

The V4 region of the 16S rRNA gene was amplified with the widely used primer pair F515 (5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3') and R806 (5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3'). Both primers included sequencing adaptors at the 5' end and forward primers were tagged with different barcodes to pool samples in the same sequencing reaction. The PCR mixture (25 μL) contained 2 μL of DNA template (5 ng), 5 μL of 5 \times Phusion® High-Fidelity Buffer, 2.5 μL of dNTPs (2 mM), 0.2 μM of each primer and 0.5 U of Phusion® Hot Start II Taq Polymerase (Thermo Fisher, Waltham, MA, USA).

The PCR thermal profile consisted of an initial denaturation at $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 30 s, followed by 30 cycles at $98\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 s, $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 15 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ at 20 s and a final step at $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 7 min. To assess possible reagent contamination, each PCR reaction included a no template control (NTC) sample. For each amplicon, the quality and quantity were assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer and a Qubit™ fluorometer, respectively.

Each sequencing pool included 40 barcoded samples that were sequenced on an Ion Torrent Personal Genome Machine (PGM) with the Ion 318 Chip Kit v2 and the Ion PGM™ Sequencing 400 Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), in accordance with manufacturer's instructions.

2.5.3. Quality Control of the Sequences and OTU Picking

Raw sequencing reads were demultiplexed and quality filtered using QIIME 1.9.1 [36]. The reads included presented: a length greater than 225 bp; a mean quality score above 25 in a sliding window of 50 nucleotides; no mismatches on the primer; and default values for other quality parameters. The quality-filtered reads were subsequently processed with VSEARCH v1.1 pipeline [37]. An initial dereplication step was applied, then the reads were clustered into operational taxonomic units (OTUs) at 97% similarity with a de novo approach and, finally, de novo chimera checking was performed with the Uchime function. The raw OTU table was transferred into QIIME 1.9.1 and the taxonomic assignment of representative OTUs was performed using the Ribosomal Database Project (RDP) Classifier [38] against the Greengenes v13.8 database [39]. The sequences were aligned with PyNAST [40]. We sequentially

applied some extra filtering steps in the aligned and taxonomy-assigned OTU table to filter out sequences belonging to chloroplasts and those belonging to the *Shewanellaceae* and *Halomonadaceae* families, which were represented in the NTC and considered as contamination due to the reagents.

2.5.4. Data Analysis

Data obtained from relative abundance and reads for each sample were organized at the phylum, class, order, family, and genus levels. The alpha-diversity (within a given sample) was calculated at the genus level using two indexes: the exponential Shannon index [41] (i.e., the number of effective OTUs, or Hill number of order 1) and the inverse Simpson index [42] (i.e., the number of highly effective OTUs, or Hill number of order 2). Two-way analysis of variance (ANOVA) was used to assess the effect of treatment and time on alpha diversity, community stabilization (i.e., beta-diversity compared to the previous day) and acidification activity, with the Bonferroni post-test for pairwise analyses at each time point. The ANOVA was performed and the graphs generated with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc, San Diego, CA, USA). Beta-diversity (among samples, either from the same or a different treatment) was studied using two types of multivariate analysis at the genus level: non-metric multidimensional scaling (NMDS) for visual grouping, and analysis of similarities (ANOSIM) for statistical significance. More precisely, the significance of the effect of the treatment and time factors was evaluated with two-way ANOSIM, while pairwise differences between treatments on days 7–14 were evaluated with one-way ANOSIM. This procedure was performed with both the Sorensen [43] and Bray–Curtis [44] beta-diversity indexes, using the PAST 3.0 program [45].

3. Results

3.1. Relative Abundance

The samples from the three donors (two females and one male aged between 25 and 27) belonged to the Firmicutes-predominant enterotype according to the MetaHit classifier, and a 1:1:1 mixture was therefore prepared as an inoculum for all ex vivo experiments.

As expected, the bacterial communities were dominated by the classes Bacilli, Clostridia, and Erysipelotrichia (all three of which belong to the Firmicutes phylum), Bacteroidia (the Bacteroidetes phylum), Actinobacteria, and Coriobacteriia (the Actinobacteria phylum) and Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, and Gammaproteobacteria (Proteobacteria phylum) (Figure 1); Clostridia and Bacteroidia were the two most abundant classes in the inoculum (Figure 1A).

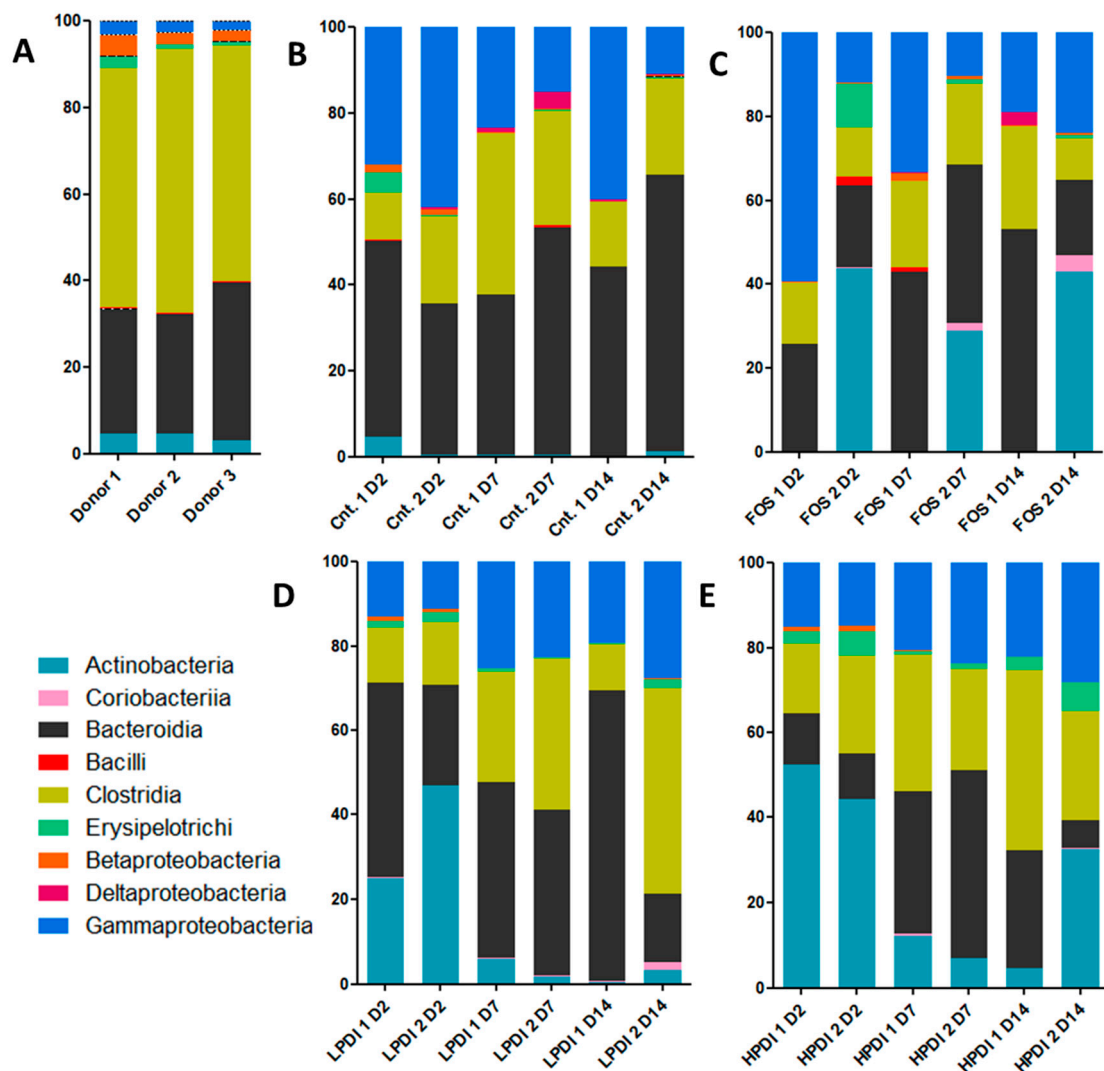


Figure 1. Representation of relative abundance to the class level from the initial time, day 2 (D2), day 7 (D7), and day 14 (D14). Assays were: (A) Sample donors; (B) Controls (Cnt.); (C) Fructooligosaccharides (FOS); (D) Low-polymerization-degree inulin (LPDI); and (E) High-polymerization-degree inulin (HPDI). Each assay was performed in duplicate.

Under all experimental conditions, Gammaproteobacteria were increased, Clostridia were moderately reduced, and Betaproteobacteria were markedly reduced. Coriobacteria, Erysipelotrichia, Bacilli, and Deltaproteobacteria had minor fluctuations over time, except Erysipelotrichia, that were moderately increased with HPDI. Actinobacteria and Bacteroidia continued to be present throughout the fermentation time, but presented considerable fluctuations even among replicates. The control treatment (Macfarlane medium without prebiotic) resulted in the most consistent growth of Bacteroidia, while supplementation with HPDI resulted in the most stable abundance of Clostridia, albeit somewhat reduced compared to the donors’ original microbiotas (Figure 1).

3.2. Alpha-Diversity

Two indexes to determine diversity were calculated: the exponential Shannon index and the inverse Simpson index, which correspond to Hill numbers 1 and 2, respectively. Broadly similar trends were observed in both indexes (Figure 2). Diversity was markedly reduced on day 2, but tended to stabilization thereafter for most treatments. At the end of the experiment (day 14), HPDI achieved greater recovery of alpha-diversity, given that it almost reached the initial levels as per the inverse

Simpson index. LPDI and FOS had lower alpha-diversity, and the control treatment (no prebiotic) resulted in the lowest alpha-diversity on day 14. A two-way ANOVA analysis with Bonferroni correction indicated that the only significant pairwise difference was that of HPDI against the control on day 14 ($p < 0.05$), while all other pairwise comparisons between groups and days were nonsignificant.

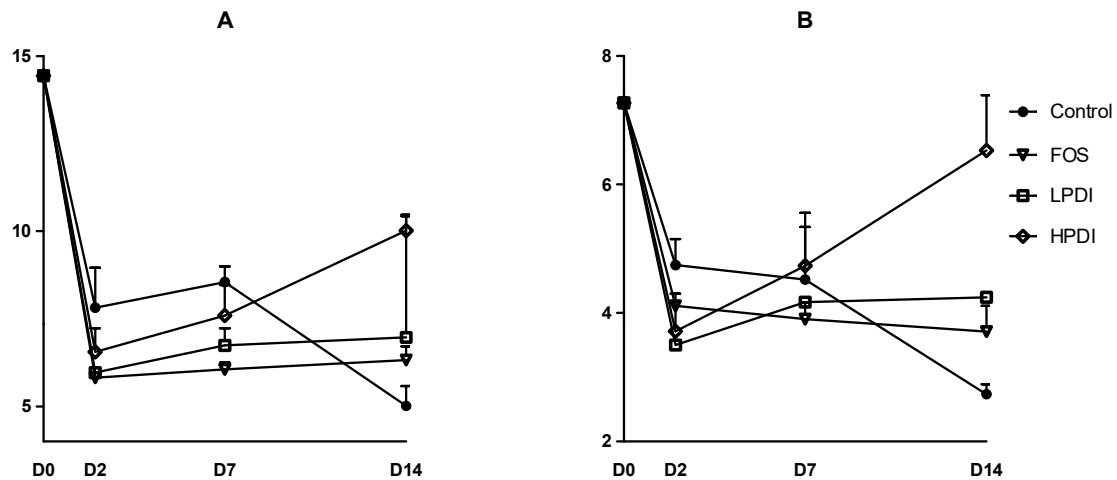


Figure 2. Alpha-diversity at the genus level as per (A) the exponential Shannon index (Hill number 1); and (B) the inverse Simpson index (Hill number 2).

3.3. Stabilization of the System

Microbiota changes at the genus level over time and within each treatment were studied with the Sorensen and Bray–Curtis beta-diversity indexes. In general, similarities with respect to the previous time point increased over time, thus indicating a more stable composition (Figure 3). The lowest similarity was observed between days 0 and 2, thereby indicating a marked compositional departure from the inoculum. Greater stability was observed for the Sorensen index than for the Bray–Curtis index, especially on days 2 and 7, thus indicating that the more abundant genera played a more significant role in the differences within each treatment over time, as the Bray–Curtis index gives greater weight to these genera compared to the Sorensen index. The similarity between days 7 and 14 was the highest for all treatments, which would suggest that the microbial community composition stabilized, yet a plateau was not observed within the experimental timeframe. A two-way ANOVA analysis with Bonferroni correction indicated that treatment with FOS resulted in the lowest stability on day 2 (i.e., the largest departure from the inoculum), as per the Sorensen index, compared to all other treatments (Bonferroni $p < 0.05$ for the comparison vs control, HPDI and LPDI). Conversely, HPDI had a lower stability than all other treatments on day 14, as per the Bray–Curtis index (Bonferroni $p < 0.05$ for the comparisons vs control, FOS and LPDI), thereby suggesting that the more abundant genera had perhaps not yet stabilized. All other pairwise comparisons between groups and days were nonsignificant.

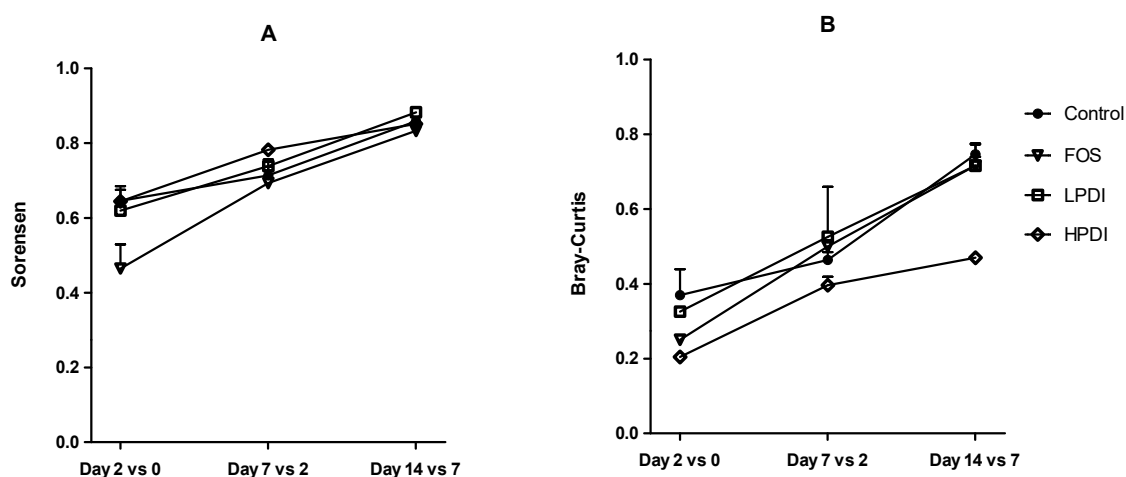


Figure 3. Composition stability, measured as the similarity at the genus level between contiguous sampling days, according to: (A) the Sorensen index; and (B) the Bray–Curtis index.

3.4. Similarity Between Treatments

The NMDS analysis revealed a clear closeness between individual donor samples (subsequently pooled as inoculum), but a clear separation between the samples and the microbiotas at days 7 and 14 of *ex vivo* fermentation, as per both the Sorensen and Bray–Curtis indexes (Figure 4). The Sorensen index clustered together the microbiotas fermented with both the LPDI and HPDI, which were clearly separated from those fermented with FOS or the control medium (no fructan). Conversely, with the Bray–Curtis index, the microbiotas fermented with FOS remained separated, but the LPDI separated further from the HPDI, while becoming closer to the control condition. It is worth noting that sample separation within HPDI in NMDS analysis was markedly larger with the Bray–Curtis index than with the Sorensen one, thus indicating that the variability within HPDI seem to be mostly due to few highly abundant genera.

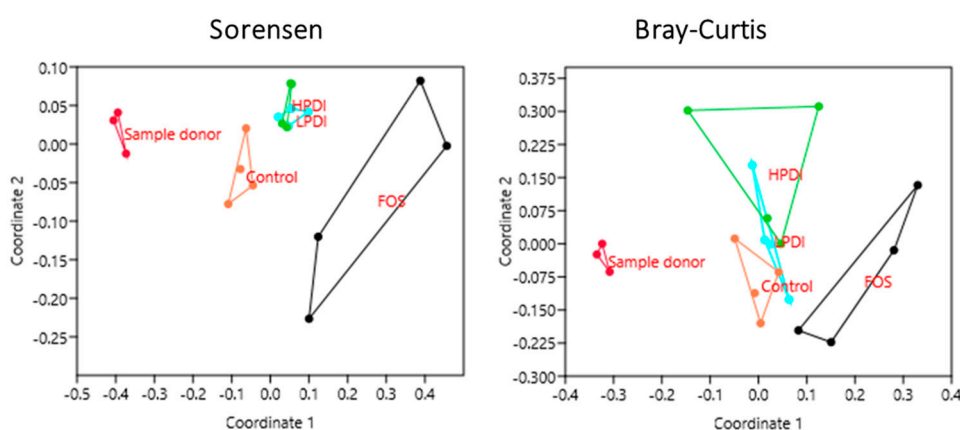


Figure 4. Clustering of samples based on nonmetric multidimensional scaling (NMDS) using the Sorensen and Bray–Curtis indexes at the genus level.

Microbial composition varied significantly both over time and among treatments, as significant differences were observed upon two-way ANOSIM analysis for the time and treatment factors with both the Sorensen ($p \leq 0.0001$ for both treatment and time) and Bray–Curtis indexes ($p = 0.0045$ and $p \leq 0.0001$ for treatment and time, respectively). A pairwise comparison between treatments in the period between days 7 and 14 indicated that the community structure of microbiotas resulting from fermentation with HPDI or LPDI did not differ significantly from one another, while almost all other pairwise comparisons resulted in nominally significant differences. More differences were noted with

the Sorensen index than with the Bray–Curtis index, although none of these significances survived the Bonferroni correction (Table 1). Of note, NMDS stress factor was below 0.2 both for Bray–Curtis and Sorensen, indicating that treatment-based clustering was nonrandom.

Table 1. Significance of the differences between treatments based on pooled data from days 7 and 14, one-way ANOSIM using the Sorensen and Bray–Curtis indexes at the genus level. Reported *p*-values are nominal, and none of them held after the Bonferroni correction was applied. vs.—versus.

Sample	Sorensen Index (<i>p</i> -Value)	Bray–Curtis Index (<i>p</i> -Value)
Sample Donor vs. Control	0.0261	0.0296
Sample Donor vs. FOS	0.0286	0.0285
Sample Donor vs. LPDI	0.0259	0.0301
Sample Donor vs. HPDI	0.0303	0.0290
Control vs. FOS	0.0274	0.0282
Control vs. LPDI	0.0298	0.1477
Control vs. HPDI	0.0283	0.0284
FOS vs. LPDI	0.0308	0.0283
FOS vs. HPDI	0.0282	0.0818
LPDI vs. HPDI	0.2602	0.1952

3.5. pH Variation

Analysis of the differential amount of NaOH and HCl consumed to maintain the fermenter in the correct pH range (Figure 5) showed that all treatments induced acidification over time ($p < 0.0001$), with significant differences among the treatments ($p = 0.0012$). LPDI and HPDI did not differ from one another, but clearly produced more acidification than either the control or FOS on days 7 and 14 (Bonferroni post-test *p*-value < 0.01 for all pairwise comparisons). Note that acidification with FOS was in fact found to be lower than the control on day 14 (Bonferroni $p < 0.05$).

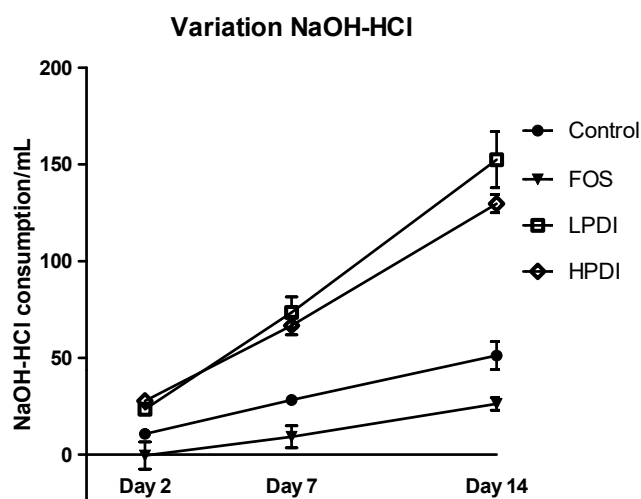


Figure 5. Total acidification activity, expressed as the difference in mL of the consumption of NaOH and HCl required to keep the system's pH stable, for the different fructans (FOS, LPDI, and HPDI) and the control treatment.

4. Discussion

The health benefits of prebiotics are widely accepted [46], and the present study provides further evidence that fructan-type prebiotics can modify the human intestinal microbiota. However, fructans with differing degrees of polymerization (FOS, LPDI, and HPDI) had different impacts on the evolution of the microbial community.

Our study used a simple system to simulate average colonic conditions and test the effects of fructans with different degrees of polymerization in the human gut microbiota. More precisely, our system corresponded to the transverse colon (middle stage), based on a system developed by Macfarlane, with pH and retention time conditions similar to the transverse colon conditions in the SHIME [21]. Conversely, Lacroix [47], with three stages, used a shorter retention time because it simulated the digestive tract of children. The fermenters were inoculated with pooled fecal material from three donors belonging to the same Firmicutes enterotype, which has been reported to be the most common in the population [26]. Moreover, the relative abundances of the microbial communities in the inocula were similar to those described in the literature for healthy patients [8,26].

This study showed that all alpha-diversity indexes initially decreased in all treatments. Recent studies that compared the effect of three commercial apple varieties (grated with the skin) versus inulin and cellulose [48], and the effects of FOS, GOS, XOS, and beta-glucan [49], also showed decreased alpha-diversity over time for all treatments. This could be a common effect of ex vivo simulation compared to the real human gut. The results of So et al. 2018 [17] also support the selectivity criteria of the prebiotic concept, in which the host microorganisms selectively utilize the prebiotic as substrates. It could be hypothesized that the loss in diversity is due to fructans stimulating just a few bacterial groups, but our results showed that the control without prebiotic brought about the same behavior, which would rule out fructans as the cause of diversity loss. The metabolization of dietary polysaccharides by the gastrointestinal bacteria is an example of the symbiotic relationship between the host and the microbiota. Furthermore, this relationship provides an avenue for dietary modulation of the microbiota, because microbial growth and metabolism depend on substrate availability, e.g., the type of dietary fiber or prebiotic consumed by the host [20]. The Simpson index (i.e., number of highly effective OTUs) gives more weight to abundant OTUs, compared to the inverse Shannon index (i.e., the number of effective OTUs). Our system showed that diversity decreased with both indexes and, consequently, in both abundant and rare OTUs. Differences among these two indexes showed that fructans with a higher degree of polymerization (HDPI) produced more diversity towards the end of the experiment, and that this effect was statistically significant against controls when more weight was attached to the more abundant (or “highly effective”) OTUs.

Results obtained with our ex vivo fermentation system suggest that the microbiota stabilized from day 7 of fermentation, as the similarity between days 7 and 14 was found to be high, although a plateau was not yet reached or not detected. Macfarlane reported that his system stabilized in 24 h, but only nine bacterial groups were checked with PCR [25]. Conversely, the SHIME takes up to two weeks to stabilize when 130 different bacterial groups are considered [23], a result much more consistent with our findings. Greater stability was observed with the Sorensen index compared to Bray–Curtis index, thus indicating that low-abundance OTUs stabilized faster than highly abundant OTUs, akin to the behavior of alpha-diversity indexes. Moreover, stability after 14 days of highly abundant OTUs was significantly lower for long-chain fructans (HPDI) than for all other treatments. Together with the higher alpha-diversity attained compared to controls, we hypothesize that, given more time, HDPI could produce an even greater increase in alpha diversity.

As expected, differences in the specific microbiota composition were found among treatment groups. However, Bonferroni-corrected statistical significance was not attained in pairwise comparisons, probably owing to the large number of between-group comparisons (six) and the limited number of replicas.

Taken together, our results show that fructans with a polymerization degree of above 10 (HPDI and LPDI) result in similar microbiota compositions, especially with respect to low-abundant OTUs, and in similarly high acidification activity, compared to the control condition (no fructans). Moreover, the fructan with the highest degree of polymerization (HPDI) restored alpha-diversity to baseline levels compared to the control when more weight was given to highly abundant OTUs (inverse Simpson index). These highly abundant OTUs were *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Acidaminococcus*, *Megasphaera*, *Catenibacterium*, *Citrobacter*, and three undefined genera

belonging to the families *Enterobacteriaceae*, *Lachnospiraceae*, and *Eubacteriaceae*. Our observations also highlight the importance of using different diversity indexes to reveal the differences between more abundant and less abundant OTUs under a given study factor. Moreover, our experiment showed that FOS (polymerization degree 2 to 8) promoted a different microbial composition than longer-chain inulins, and failed to stimulate acidification activity compared to control fermentation without fructans.

Numerous reports link a decreased diversity of the gut microbiota to a declined health status, including conditions such as inflammatory bowel diseases (ulcerative colitis and Crohn's disease), coeliac disease, allergies, and obesity [50]. Recent simulation studies support a causative role of microbiota diversity in health status [51], and drops in diversity have been associated to a higher risk of subsequent recurrence both in ulcerative colitis [52,53] and Crohn's disease [54,55]. Previous studies in inflammatory bowel disease have used mixtures of low and medium length inulin-type fructans (i.e., FOS and LDPI) [56]. However, based on our results, HDPI seems a better candidate to promote microbiota diversity to help prevent recurrence in inflammatory bowel disease, and deserves further testing in clinical trials.

One of the limitations of our ex vivo model was our use of a single stage of colonic conditions, corresponding to the transverse colon, rather than multiple stages to simulate the functionality of different locations in the gut. As fibers are normally degraded in the gut, this factor could introduce additional differences not observed in this study. A second limitation of our study was the small number of replicates performed for each treatment, which reduced the statistical power in some analyses. A third limitation was the fact that the effects of the polymerization degree of fructans were tested on a microbiota with the Firmicutes-predominant enterotype, and future studies on other enterotypes are required to compare the results. Any future research should also measure the production of individual short-chain fatty acids in order to gain further information on the effect of the polymerization degree on the metabolic activity of the microbiota, which in our study was limited to total acidification activity. Such research could reveal additional similarities or differences between different fructans. Finally, it would be especially interesting to study the effect of the degree of polymerization when different fructans are combined, or even when other types of fiber such as beta-glucans, polydextrose, acacia gum, pectin, and partially hydrolyzed guar gum are added. The combination of different fibers could be important to avoid feeding a few bacterial groups, and thus promote a more diverse microbiota [20].

5. Conclusions

In conclusion, the ex vivo system used in our study allowed us to observe the effect of the degree of polymerization of fructans on the intestinal microbiota. The degree of polymerization of fructans seems to impact their prebiotic effect, resulting in microbiotas with different compositions. Higher polymerization seems to facilitate greater diversity and acidification activity compared to lower polymerization (i.e., FOS), suggesting that inulins of different degree of polymerization produce different effects on the gut microbiota, both at the compositional and metabolic level. Ultimately, adequately powered clinical trials should be conducted to confirm these effects in humans.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6643/11/6/1293/s1>, Table S1: Dietary Questionnaire.

Author Contributions: Conceptualization: E.A., I.M. and J.C.; investigation: E.A., I.M., M.R.-P. and J.C.; research design: E.A., I.M. and J.E.; data curation: E.A. and J.E.; analysis and writing of the manuscript: E.A., A.F.-C. and J.E. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Secretary for Universities and Research under the Ministry of Economy and Knowledge of the Generalitat de Catalunya (award no.: 2014 DI 073).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest regarding the publication of this paper.

References

1. Salminen, S.; Bouley, C.; Boutron, M.-C.; Cummings, J.H.; Franck, A.; Gibson, G.R.; Isolauri, E.; Moreau, M.-C.; Roberfroid, M.; Rowland, I. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br. J. Nutr.* **1998**, *80*, S147–S171. [[CrossRef](#)]
2. Ley, R.E.; Peterson, D.A.; Gordon, J.I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* **2006**, *124*, 837–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Gilbert, J.A.; Blaser, M.J.; Caporaso, J.G.; Jansson, J.K.; Lynch, S.V.; Knight, R. Current understanding of the human microbiome. *Nat. Med.* **2018**, *24*, 392–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Backhed, F. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Science* **2005**, *307*, 1915–1920. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Huttenhower, C.; Gevers, D.; Knight, R.; Abubucker, S.; Badger, J.H.; Chinwalla, A.T.; Creasy, H.H.; Earl, A.M.; Fitzgerald, M.G.; Fulton, R.S.; et al. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **2012**, *486*, 207–214. [[CrossRef](#)]
6. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Yamada, T.; Mende, D.R.; et al. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature* **2010**, *464*, 59–65. [[CrossRef](#)]
7. Zeevi, D.; Korem, T.; Godneva, A.; Bar, N.; Kurilshikov, A.; Lotan-Pompan, M.; Weinberger, A.; Fu, J.; Wijnemga, C.; Zhernakova, A.; et al. Structural variation in the gut microbiome associates with host health. *Nature* **2019**, *568*, 43–48. [[CrossRef](#)]
8. Eckburg, P.B.; Bik, E.M.; Berstein, C.N.; Purdom, E.; Dethlefsen, L.; Sargent, M.; Gill, S.R.; Nelson, K.E.; Relman, D.A. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* **2005**, *308*, 1635–1638. [[CrossRef](#)]
9. Rowland, I.; Gibson, G.; Heinken, A.; Scott, K.; Swann, J.; Thiele, I.; Tuohy, K. Gut microbiota functions: Metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* **2018**, *57*, 1–24. [[CrossRef](#)]
10. Flint, H.J.; Scott, K.P.; Louis, P.; Duncan, S.H. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2012**, *9*, 577–589. [[CrossRef](#)]
11. Gibson, G.R.; Roberfroid, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 1401–1412. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Gibson, G.R.; Hutkins, R.; Sanders, M.E.; Prescott, S.L.; Reimer, R.A.; Salminen, S.J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K.S.; Cani, P.D.; et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 491–502. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. De Vrese, M.; Schrezenmeir, J. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **2008**, *111*, 1–66. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Kelly, G. Inulin-Type Prebiotics—A Review: Part 1. *Altern. Med. Rev.* **2008**, *13*, 315–329. [[PubMed](#)]
15. Gibson, G.R.; Beatty, E.R.; Wang, X.I.N.; Cummings, J.H. Selective Stimulation of Bifidobacteria in the Human Colon by Oligofructose and Inulin. *Gastroenterology* **1995**, *108*, 975–982. [[CrossRef](#)]
16. Gibson, G.R.; Wang, X. Bifidogenic properties of different types of fructo-oligosaccharides. *Food Microbiol.* **1994**, *11*, 491–498. [[CrossRef](#)]
17. So, D.; Whelan, K.; Rossi, M.; Morrison, M.; Holtmann, G.; Kelly, J.T.; Shanahan, E.R.; Staudacher, H.M.; Campbell, K.L. Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: A systematic review and meta-analysis. *Am. J. Clin. Nutr.* **2018**, *107*, 965–983. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Scott, K.P.; Martin, J.C.; Duncan, S.H.; Flint, H.J. Prebiotic stimulation of human colonic butyrate-producing bacteria and bifidobacteria, in vitro. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2014**, *87*, 30–40. [[CrossRef](#)]
19. Poeker, S.A.; Geirnaert, A.; Berchtold, L.; Greppi, A.; Krych, L.; Steinert, R.E.; De Wouters, T.; Lacroix, C. Understanding the prebiotic potential of different dietary fibers using an in vitro continuous adult fermentation model (PolyFermS). *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 4318. [[CrossRef](#)]
20. Holscher, H.D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes* **2017**, *8*, 172–184. [[CrossRef](#)]
21. Venema, K.; Van Den Abbeele, P. Experimental models of the gut microbiome. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2013**, *27*, 115–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

22. Molly, K.; Woestyne, M.V.; Smet, I.D.; Verstraete, W. Validation of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) Reactor Using Microorganism-associated Activities. *Microb. Ecol. Health Dis.* **1994**, *7*, 191–200. [[CrossRef](#)]
23. Van Den Abbeele, P.; Grootaert, C.; Marzorati, M.; Possemiers, S.; Verstraete, W.; Gérard, P.; Rabot, S.; Bruneau, A.; Aidy Ei, S.; Derrien, M.; et al. Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for bacteroidetes and Clostridium cluster IX. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 5237–5246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Minekus, M.; Smeets-Peeters, M.; Bernalier, A.; Marol-Bonnin, S.; Havenaar, R.; Marteau, P.; Alric, M.; Fonty, G. A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1999**, *53*, 108–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Macfarlane, G.T.; Macfarlane, S.; Gibson, G.R. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microb. Ecol.* **1998**, *35*, 180–187. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Costea, P.I.; Hildebrand, F.; Manimozhayan, A.; Bäckhed, F.; Blaser, M.J.; Bushman, F.D.; de Vos, W.M.; Ehrlich, S.D.; Fraser, C.M.; Hattori, M.; et al. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 8–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D.R.; Fernandes, G.R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J.M.; et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **2011**, *473*, 174–180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ding, T.; Schloss, P.D. Dynamics & Associations of Microbial Organism Types Across the Human Body. *Nature* **2014**, *509*, 357–360. [[CrossRef](#)]
29. Wu, G.D.; Chen, J.; Hoffmann, C.; Bittinger, K.; Chen, Y.; Keilbaugh, S.A.; Bewtra, M.; Knights, D.; Walters, W.A.; Knight, R.; et al. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science* **2011**, *334*, 105–109. [[CrossRef](#)]
30. Macfarlane, G.T.; Macfarlane, S. Models for intestinal fermentation: Association between food components, delivery systems, bioavailability and functional interactions in the gut. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 156–162. [[CrossRef](#)]
31. Riegler, G.; Espopito, I. Bristol scale stool form. A still valid help in medical practice and clinical research. *Tech. Coloproctol.* **2001**, *5*, 163–164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Aguirre, M.; Ramiro-Garcia, J.; Koenen, M.E.; Venema, K. To pool or not to pool? Impact of the use of individual and pooled fecal samples for in vitro fermentation studies. *J. Microbiol. Methods* **2014**, *107*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Aguirre, M.; Eck, A.; Koenen, M.E.; Savelkoul, P.H.M.; Budding, A.E.; Venema, K. Evaluation of an optimal preparation of human standardized fecal inocula for in vitro fermentation studies. *J. Microbiol. Methods* **2015**, *117*, 78–84. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Gibson, G.R.; Cummings, J.H.; Macfarlane, G.T. Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by Use of a Three-Stage Continuous Culture System To Study the Effect of Mucin on Dissimilatory Sulfate Reduction and Methano. *Appl. Environ. Microbiol.* **1988**, *54*, 2750–2755. [[PubMed](#)]
35. Steed, H.; MacFarlane, G.T.; Blackett, K.L.; Bahrami, B.; Reynolds, N.; Walsh, S.V.; Cummings, J.H.; MacFarlane, S. Clinical trial: The microbiological and immunological effects of synbiotic consumption - A randomized double-blind placebo-controlled study in active Crohn's disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2010**, *32*, 872–883. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Caporaso, J.G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Costello, E.K.; Fierer, N.; Peña, A.G.; Goodrich, J.K.; Gordon, J.I.; et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 335–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Rognes, T.; Flouri, T.; Nichols, B.; Quince, C.; Mahé, F. VSEARCH: A versatile open source tool for metagenomics. *PeerJ* **2016**, *4*, e2584. [[CrossRef](#)]
38. Wang, Q.; Garrity, G.M.; Tiedje, J.M.; Cole, J.R. Navie Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **2007**, *73*, 5261–5267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

39. DeSantis, T.Z.; Hugenholtz, P.; Larsen, N.; Rojas, M.; Brodie, E.L.; Keller, K.; Huber, T.; Dalevi, D.; Hu, P.; Andersen, G.L. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB. *Appl. Environ. Microbiol.* **2006**, *72*, 5069–5072. [[CrossRef](#)]
40. Caporaso, J.G.; Bittinger, K.; Bushman, F.D.; Desantis, T.Z.; Andersen, G.L.; Knight, R. PyNAST: A flexible tool for aligning sequences to a template alignment. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 266–267. [[CrossRef](#)]
41. Shannon, C.E. A Mathematical Theory of Communication. *Bell Syst. Tech. J.* **1948**, *27*, 379–423. [[CrossRef](#)]
42. Simpson, E.H. Measurement of Diversity. *Nature* **1949**, *163*, 688. [[CrossRef](#)]
43. Sorensen, T. A Method of Establishing Groups of Equal Amplitude in Plant Sociology Based on Similarity of Species and Its Application to Analyses of the Vegetation on Danish Commons. *Biol. Skr.* **1948**, *5*, 1–34.
44. Bray, J.R.; Curtis, J.T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* **1957**, *27*, 325–349. [[CrossRef](#)]
45. Hammer, Ø.; Harper, D.; Ryan, P. Past: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontol. Electron.* **2001**, *4*, 9. [[CrossRef](#)]
46. Carlson, J.L.; Erickson, J.M.; Hess, J.M.; Gould, T.J.; Slavin, J.L. Prebiotic dietary fiber and gut health: Comparing the in vitro fermentations of beta-glucan, inulin and xylooligosaccharide. *Nutrients* **2017**, *9*, 1361. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Cinquin, C.; Le Blay, G.; Fliss, I.; Lacroix, C. New three-stage in vitro model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006**, *57*, 324–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Koutsos, A.; Lima, M.; Conterno, L.; Gasperotti, M.; iBanchi, M.; Fava, F.; Vrhovsek, U.; Lovegrove, J.A.; Tuohy, K.M. Effects of commercial apple varieties on human gut microbiota composition and metabolic output using an in vitro colonic model. *Nutrients* **2017**, *9*, 533. [[CrossRef](#)]
49. Fehlbauer, S.; Prudence, K.; Kieboom, J.; Heerikhuisen, M.; van den Broek, T.; Schuren, F.H.J.; Steinert, R.E.; Raederstorff, D. In vitro fermentation of selected prebiotics and their effects on the composition and activity of the adult gut microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 3097. [[CrossRef](#)]
50. Mosca, A.; Leclerc, M.; Hugot, J.P. Gut microbiota diversity and human diseases: Should we reintroduce key predators in our ecosystem? *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1–12. [[CrossRef](#)]
51. Larsen, O.F.A.; Claassen, E. The mechanistic link between health and gut microbiota diversity. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Ott, S.J.; Plamondon, S.; Hart, A.; Begun, A.; Rehman, A.; Kamm, M.A.; Schreiber, S. Dynamics of the mucosa-associated flora in ulcerative colitis patients during remission and clinical relapse. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 3510–3513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Shen, Z.-H.; Zhu, C.-X.; Quan, Y.-S.; Yang, Z.-Y.; Wu, S.; Luo, W.-W.; Tan, B.; Wang, X.-Y. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 5–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Dey, N.; Soergel, D.A.W.; Repo, S.; Brenner, S.E. Association of gut microbiota with post-operative clinical course in Crohn’s disease. *BMC Gastroenterol.* **2013**, *13*, 131. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Pascal, V.; Pozuelo, M.; Borruel, N.; Casellas, F.; Campos, D.; Santiago, A.; Martinez, X.; Varela, E.; Sarrabayrouse, G.; Machiels, K.; et al. A microbial signature for Crohn’s disease. *Gut* **2017**, *66*, 813–822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Rasmussen, H.E.; Hamaker, B.R. Prebiotics and Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterol. Clin.* **2017**, *46*, 783–795. [[CrossRef](#)]



DISCUSSIÓ

Són molts els estudis que demostren que l'administració de moduladors de la microbiota com els probiòtics i els prebiòtics poden influir aquesta, per beneficiar la salut humana. Amb el treball de recerca exposat en la present tesi doctoral s'ha volgut contribuir al coneixement de l'efecte d'aquestes dues estratègies nutricionals encarades a la modulació de la microbiota.

Escala utilitzada

El primer objectiu va consistir a examinar mitjançant una revisió sistemàtica de la literatura i un metaanàlisi, els efectes de l'administració de probiòtics, prebiòtics tipus fructans i simbiòtics en pacients amb CU. Per la revisió sistemàtica únicament es va poder aconseguir 1 article de prebiòtics i 1 de simbiòtics que fossin de suficient qualitat, fent-se evident que és necessari millorar la qualitat dels estudis al respecte. En canvi, es va poder realitzar una metaanàlisi amb els estudis de probiòtics, els resultats de la qual suggerien que el tractament amb probiòtics sembla beneficiar els pacients amb CU aconseguint que arribin a l'estat de remissió. De totes maneres, el que anomenem "estat de remissió" no disposa encara avui en dia d'una definició clara, raó per la qual els articles trobats en aquest estudi utilitzaven diferents escales per determinar aquest estat, provocant una gran heterogeneïtat entre els estudis. Per aquest motiu, a diferència del realitzat en altres metaanàlisis, es van estudiar els subgrups d'estudis segons les escales utilitzades. Les escales més utilitzades en els estudis analitzats van ser l'UCDAI i l'escala DAI, donant una puntuació a la malaltia de 0 a 12 segons els símptomes diagnosticats. Les dues escales es fixen en els mateixos símptomes i puntuen de manera similar pel que es van utilitzar com a un únic índex, igual que han fet altres autors [161]. L'heterogeneïtat entre els estudis més baixa es va aconseguir al determinar l'eficàcia dels probiòtics únicament amb els estudis que determinaven la remissió amb aquestes dues escales. De totes maneres, aquestes escales incorporen mesures que són interpretades de manera subjectiva ja sigui pel propi pacient, com és la freqüència de deposicions i el sagnat rectal en l'índex DAI, o les valoracions del metge per determinar l'estat general del pacient en ambdós índexs [166]. Aquest fet pot aportar diferències a l'hora de determinar la remissió. Tot i així, en el nostre estudi, a banda d'una reducció de l'heterogeneïtat, també es va obtenir una significació estadística al utilitzar els estudis amb aquestes escales i en canvi, no es va aconseguir ni una baixa heterogeneïtat ni una significació estadística amb la resta d'escales trobades. Aquests altres escales incorporen l'observació de paràmetres extraintestinals, pel que tot i la modulació de la microbiota que provoqui el probiòtic, pot no afectar sobre aquestes observacions o tenir-hi menys efecte. El que està clar és que la determinació de la remissió d'una manera única pot ajudar a entendre els efectes que presenten els tractaments alternatius en pacients amb CU, i tot i que hem vist que de moment no hi ha una escala ideal per definir la remissió, la FDA indica que l'UCDAI i el DAI són les més utilitzades i les recomanades [159,166]. Una revisió sistemàtica que resumia la definició actual de remissió segons els punts que avaluaven els estudis clínics en la CU, recomanava urgentment un

consens internacional de remissió abans de mesurar l'efectivitat dels tractaments, el que comportaria una estandardització dels protocols en els estudis clínics per obtenir una homogeneïtat en els estudis i determinar d'una manera més eficaç l'eficiència dels tractaments [173].

Especificitat de probiòtics

Com hem observat, a l'hora de seleccionar probiòtics o prebiòtics per un tractament concret aquests s'haurien de caracteritzar correctament abans del seu ús en estudis clínics per poder portar una traçabilitat dels estudis a posteriori. Quan probiòtics o prebiòtics no es troben ben qualificats el seu efecte s'entén de manera generalitzada. Per exemple, per totes les soques d'una espècie o gènere bacterià, i és més difícil portar el seguiment dels mecanismes d'acció que duen a terme. En un estudi de probiòtics és interessant publicar el nom de la soca analitzada i no només l'espècie a la qual pertany degut a que una espècie pot compartir funcions amb les soques que la conformen però també una soca pot dur a terme funcions concretes. Per aquesta raó, en la nostra metanàlisi es va analitzar l'efecte general dels probiòtics per mantenir o induir la remissió en els pacients amb CU, però també l'efecte concret dels productes més utilitzats en els estudis.

Dins la revisió sistemàtica es van incloure estudis que assajaven soques pertanyents a les espècies de *Bifidobacterium breve*, *B. longum*, *B. infantis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *Lactobacillus acidophilus*, *L. reuteri*, *L. plantarum*, *L. paracasei*, *L. delbrueckii*, *Escherichia coli*, *Streptococcus faecalis*, *S. salivarius*, *Clostridium butyricum* i *Bacillus mesentericus*. Tot i existir altres soques d'altres espècies estudiades per la CU i els seus beneficis com són *Lactobacillus rhamnosus* GG [192] i *Saccharomyces boulardii* CNCM I-745 [193] entre d'altres, els seus estudis no presentaven suficient qualitat segons l'escala de Jadad per formar part de la revisió sistemàtica.

Un estudi que comparava la microbiota dels pacients amb CU amb la dels pacients sans, havia suggerit anteriorment que els pacients amb CU presenten menys nivells del gènere *Bifidobacterium* [155,184,194]. Per tant, l'administració d'un tractament que inclogui aquests bacteris podria millorar l'estat dels pacients amb CU.

En la metanàlisi d'aquesta tesi es van agrupar tots els estudis que presentaven alguna espècie del gènere *Bifidobacterium* en el probiòtic aconseguint un efecte beneficiós per arribar a l'estat de remissió en pacients actius, i que compraven l'efecte respecte a un tractament amb placebo. Dins d'aquests estudis es van contemplar aquells que utilitzaven el VSL#3, ja que conté 3 espècies de *Bifidobacterium*, aconseguint efectes significatius. Shen *et al.* 2014 [182], en la seva metanàlisi no van trobar un efecte beneficiós del gènere *Bifidobacterium* pels pacients amb CU, però a diferència de la nostre metanàlisi aquesta no va utilitzar el VSL#3 i en canvi, va utilitzar l'estudi d'en Furrie *et al.* 2005

[195], que contenia un simbiòtic. Aquest darrer estudi es va decidir no incloure'l en el nostre metanàlisi.

Per altre banda, el producte VSL#3 va ser el més utilitzat en la nostra metanàlisi, demostrant la seva eficàcia per induir la remissió en pacients amb la malaltia activa, i justament els seus estudis no especificaven el nom de les 8 soques que conté, sinó només els noms de les espècies. Altres estudis van demostrar que el VSL#3 és eficaç per la CU ja que és capaç de controlar la inflamació i allargar el període de remissió dels pacients [186]. Altres estudis també han demostrat que el VSL#3 pot induir eficaçment i mantenir la remissió en aquests pacients [172,182,187]. És probable que, un probiòtic amb moltes soques presenti beneficis per a la salut, ja que presentar moltes soques contribueix a un augment de la diversitat. Per tant, el benefici del VSL#3 podria venir donat per la gran quantitat de soques que presenta i les possibles accions sinèrgiques entre elles, però també podria venir donat per l'acció d'una soca o un gènere en concret com es el *Bifidobacterium*. Al observar per separat el RR dels estudis que contenen el gènere *Bifidobacterium* en pacients actius es pot observar que aquells que no utilitzaven el VSL#3 però sí que contenien el gènere *Bifidobacterium* no presentaven efectes significatius. Però també que, la meitat dels estudis que sí que tractaven amb VSL#3 presenten un efecte sense significació semblant als altres, pel que no es pot afirmar que l'efecte significatiu trobat en els estudis del VSL#3 provingui del producte i no del gènere *Bifidobacterium*. A més a més l'heterogeneïtat va ser menor entre els estudis que contenien *Bifidobacterium* que entre aquells que només tractaven amb VSL#3.

Amb un dels primers probiòtics descoberts, la soca *E. coli* Nissle 1907 [93], vam determinar l'efecte per mantenir l'estat de remissió, evitant la recaiguda dels pacients amb CU. El seu efecte només es va poder analitzar envers a la mesalazina amb tres estudis trobats, i van suggerir que ambdós tenen el mateix efecte en el manteniment dels pacients, o sigui allargant l'interval entre brots (RR = 0.92, CI95% 0.82–1.04, p-valor = 0.18). Un article previ, havia estudiat l'efecte d'aquesta soca pel manteniment de la remissió però amb 6 estudis (3 més que en el nostre metaanàlisi) arribant a la mateixa conclusió [187]. Comparant amb l'estudi previ, dos dels estudis addicionals els trobàvem en la nostra metanàlisi però no van ser inclosos en el present subanàlisi degut a que comparaven l'efecte d'un grup probiòtic envers un grup placebo on ambdós grups prenen mesalazina com a medicació concomitant, pel que es va creure que eren diferents a la resta d'estudis on el grup probiòtic no tenia permesa la mesalazina. El tercer estudi que ens diferenciava va ser inclòs en la primera revisió, però va ser eliminat posteriorment per no presentar suficient qualitat segons l'escala de Jadad [196].

Algunes de les soques i espècies trobades en altres articles que no es van poder incloure en la revisió sistemàtica podrien presentar mecanismes d'acció interessant i amb els anys és possible que hi hagi

articles de qualitat que ajudin a entendre la seva eficàcia. La comercialització de soques de *Lactobacillus* i *Bifidobacterium* són les més esteses degut a que existeixen estudis que suporten la seva seguretat pel seu consum durant llargs períodes de temps [104]. Tot i així, altres espècies relacionades amb un estat saludable són *Faecalibacterium prausnitzii*, *Akkermansia muciniphila* i espècies productores de butirats del gènere *Roseburia*, pel que podrien ser nous probiòtics que algun dia entrin a formar part de l'estat QPS de la EFSA o GRAS en la FDA [139]. De totes maneres aquests gèneres són difícils de cultivar i, per tant, difícils de comercialitzar, pel que no és un repte fàcil [197].

Grau de polimerització

El segon objectiu de la tesi va consistir en observar les diferències que causaven diferents graus de polimerització dels fructans tipus inulines en un sistema de fermentació *ex vivo* sobre una microbiota complexa. Igual que la caracterització dels probiòtics és molt important, també ho és en els prebiòtics i, per tant, aquests haurien d'indicar l'estructura que presenten per diferenciar els efectes que poden causar. El sistema de fermentació utilitzat en aquests estudi va servir per observar diferències en la composició microbiana provocada pel fructans tipus inulines amb diferents graus de polimerització respecte un control sense prebiòtic al llarg de 14 dies. El sistema corresponia a l'etapa del mig, que simula el còlon transvers, del model de fermentació validat de Macfarlane [83] i té un pH i un temps de retenció similar a la del model SHIME [140]. El sistema s'inicia amb una microbiota fecal, la manera més utilitzada per aconseguir microbiota intestinal complexa, ja que la mostra s'obté fàcilment i conté prou densitat microbiana per ser estudiada [64].

Els gèneres més abundants van ser *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Faecalibacterium*, *Roseburia*, *Acidaminococcus*, *Megasphaera*, *Catenibacterium*, *Citrobacter* i tres que pertanyien a la família *Enterobacteriaceae*, *Lachnospiraceae* i *Eubacteriaceae*. No es va observar presència del gènere *Akkermansia*, potser degut a que aquests es troba més relacionat amb el mucus intestinal i no al lumen i per tant, és probable que si s'haguessin agafat biòpsies del mucus intestinal en comptes de femta s'hagués pogut observar la seva presència [10].

Per altra banda, els enterotips trobats en les tres mostres fecals dels donants sans van correspondre al de firmicutes i van presentar una alfa diversitat elevada. Tot i així, l'estudi va demostrar que aquesta diversitat disminuïa per tots els tractaments al llarg de la fermentació. Un estudi que comparava l'efecte de tres varietats diferents de pomes respecte la inulina i la cel·lulosa, i un altre estudi que comparava l'efecte de FOS, GOS, XOS i beta glucans també van observar una disminució de l'alfa diversitat al llarg de l'experiment [198]. Aquest fet fa pensar que podria ser un efecte comú dels experiments *ex vivo* comparat amb les condicions que es donarien a l'intestí humà de manera *in vivo*. Per altra banda, la pèrdua de diversitat també podria venir donada pels fructans, degut a que aquests

estimulen únicament a uns grups bacterians, segons explica So *et al.* 2018, però de totes maneres els nostres resultats han demostrat que el control sense prebiòtic presenta el mateix comportament perdent alfa diversitat de la mateixa manera, així que la teoria de la selectivitat dels fructans per la pèrdua de diversitat es perd [191].

Gràcies a la utilització de diversos índexs per calcular la diversitat es poden observar diferències interessants en la composició de la microbiota. En l'alfa diversitat, l'índex de Simpson dona més pes a les OTUs abundants (més efectives) comparat amb l'índex invers de Shannon [199,200]. La diversitat en el nostre estudi es va observar reduïda pels dos índexs i, en conseqüència, per les OTUs abundants i també les poc freqüents. Tot i així, amb el tractament HPDI, el fructà amb més grau de polimerització, es va observar un augment de l'alfa diversitat a dia 14. Aquest tractament a dia 14, va produir significativament més alfa diversitat en comparació al control quan se li va donar més importància a les OTUs abundants, arribant casi bé als nivells inicials. A la literatura, la pèrdua de diversitat s'ha observat en els pacients amb CU, tant aquells que la presentaven en estat actiu com els que es trobaven en estat de remissió, tot i que en aquests últim cas la pèrdua de diversitat era més gran [182]. D'aquesta manera si busquem un tractament per augmentar la diversitat, sembla que els fructans amb més grau de polimerització presentin més efecte. Una revisió sistemàtica que estudiava les fibres de cereals va suggerir que les fibres més complertes semblaven augmentar la diversitat, però de totes maneres les dosis de fibres administrades eren molt altres i no serien ben tolerades per pacients amb IBD [201].

Al observar les diferències de composició microbiana per les diferents mostres respecte els dies anteriors, el nostre sistema va suggerir que la microbiota s'estabilitzava a partir del dia 7 de fermentació, on la similitud entre els dies 7 i 14 era la major. De totes maneres no es va observar o detectar una fase plató en cap dels tractaments. El model Macfarlane va observar la seva estabilització al cap de 24h de fermentació però només va considerar 9 grups bacterians per PCR [83]. En canvi, el sistema SHIME va necessitar dues setmanes per estabilitzar-se quan considerava 130 grups bacterians diferents, el que coincidiria més amb el nostre estudi [202]. Es va observar una estabilitat més gran segons l'índex de Sorensen que amb el de Bray-Curtis on hi havia menys similitud, indicant que les OTUs poc abundants s'estabilitzaven més ràpid que les més abundants. La similitud observada respecte els dies previs amb l'índex de beta diversitat de Bray-Curtis (OTUs efectives) per la inulina HPDI va ser la que menys similitud va presentar per tots els dies, amb una diferència significativa respecte els altres tractaments, el que és possible que donant més temps de fermentació a la HPDI aquesta encara podria haver presentat una alfa diversitat major.

Es van observar diferències en la composició específica de la microbiota entre parells de grups de tractament però probablement a causa de la gran quantitat de comparacions entre grups i el nombre limitat de rèpliques la significació estadística no es va aconseguir al utilitzar la correcció Bonferroni. Tot i així, segons NMDS els fructans amb un grau de polimerització major de 10 (LPDI, HPDI) semblaven proporcionar composicions microbianes similars, especialment per aquelles OTUs poc abundants. A més a més també presentaven una activitat d'acidificació major en comparació amb el control suggerint que, l'alt grau de polimerització produeix un efecte a la microbiota intestinal no només a nivell composicional (diversitat) sinó també a nivell metabòlic (acidificació). El nostre experiment va demostrar que el FOS, que presenta un grau de polimerització entre 2 i 8, va promoure una composició microbiana diferent a les inulines, i no va estimular l'activitat d'acidificació del medi, en comparació amb el control sense fructans. Un estudi va observar que les espècies trobades al lumen intestinal de l'intestí gros degraden més les inulines que els FOS, perquè aquest ja s'ha consumit molt a l'intestí prim [126], i Robertfroid el 1998, ja suggeria que les inulines amb un grau de polimerització menor a 10 eren metabolitzades més ràpidament que les que presentaven un grau major de 10 [137]. En el nostre estudi es va distingir addicionalment l'efecte que provocava una inulina curta i una de llarga a banda dels FOS. Com se sap, els FOS són fàcilment fermentats pel gènere *Bifidobacterium*, en canvi aquest gènere no presenta els enzims necessaris per degradar les inulines de cadena llarga [142]. Tant mateix, amb l'alimentació creuada d'alguns bacteris, aquests poden metabolitzar les inulines més llargues donant lloc a productes d'inulines més curtes que poden acabar sent metabolitzades, per exemple, pel gènere *Bifidobacterium* [125]. Inicialment en el nostre estudi, es presentaven pocs nivells del gènere *Bifidobacterium* (3.92%) als inòculs, mentre que a dia 14 es va observar un augment d'aquests pel tractament amb FOS i inulina de cadena llarga, mentre que per la inulina de cadena curta es van observar lleugerament reduïts (1.86%). Estudis que han mirat l'efecte de la inulina en l'estimulació de *Bifidobacterium* han vist que quan els nivells inicials d'aquest gènere són elevats la resposta es veu reduïda i per tant, la suplementació amb inulina té un efecte més marcat quan les concentracions inicials de *Bifidobacterium* són baixes [141]. Un estudi suggeria que les alteracions del metabolisme de la microbiota intestinal són més importants que els canvis en la seva composició al tractar amb Synergy 1, un producte que combina FOS i inulina en pacients amb CU [203].

Les estratègies alternatives pel tractament de la CU pretenen evitar l'estat actiu de la malaltia com a prevenció per presentar un brot, o millorar els símptomes perquè els pacients passin d'un estat actiu a un d'inactiu. Mentre que els resultats de la metanàlisis van suggerir efectes beneficiosos pel tractament de pacients amb CU activa, es va observar que les grans limitacions quan comparàvem diversos estudis eren les diferències entre tractaments, medicaments concomitants, diversitat en les soques i les dosis utilitzades així com la llargada dels tractaments. A més a més, els estudis presentaven

pocs participants i algun d'ells molts abandonaments. Però sobretot la limitació més important, com hem comentat anteriorment, era la gran varietat d'escala utilitzades per definir l'estat de remissió. Per altre banda, les limitacions que trobàvem al nostre sistema de fermentació va ser la utilització d'un model *ex vivo* simulant únicament una única etapa, en comparació a altres sistemes que simulen les diferents zones de l'intestí, observant diferències entre elles. Aquest tipus d'estudis utilitzen poques rèpliques de cada mostra, el que redueix la potència estadística dels anàlisis. I per últim, la microbiota utilitzada provenia de donants amb l'enterotip Firmicutes, pel que no sabem què passaria amb altres enterotips o amb pacients amb CU per comparar els resultats.

Al llarg dels anys han millorat les tecnologies com l'aparició de la seqüenciació massiva, que ha permès conèixer millor la diversitat microbiana intestinal així com les seves funcions. Tot i així, s'han identificat més de 1,000 espècies diferents en la microbiota intestinal humana, tot i que no totes es troben presents en tots els individus i per tant existeix una gran variabilitat interindividual, el que dificulta que es pugui establir una descripció de la microbiota normal o sana a banda dels canvis de diversitat que trobem a les diferents etapes de la vida humana [204]. Tot i que la disbiosi no hagi estat demostrada com a causa directa de moltes malalties, cada vegada és més atractiu utilitzar estratègies que modulin la composició i la funció de la microbiota intestinal [205].

Actualment hi ha molts probiòtics i prebiòtics de venda al públic però no tots presenten suficient evidència sobre alguna patologia. Tot i així, el fet que siguin segurs per a la salut provoca que siguin fàcils de comercialitzar. De la mateixa manera que no tots els productes probiòtics comercials contenen el nom de les soques ni la quantitat que contenen de cada microorganisme, els prebiòtics no informen de la seva estructura química i per tant encara fa falta un grau més elevat de regulació per evitar-ho. Per tant, encara desconeixem la durada dels tractaments amb prebiòtics i probiòtics i les dosis necessàries per aconseguir un efecte òptim. Pel que suggerim que es necessiten més estudis *in vivo* de probiòtics, però sobretot de prebiòtics i simbiòtics de qualitat, on s'utilitzi la mateixa escala per definir l'estat de remissió dels pacients amb CU. Alguns estudis *ex vivo* han demostrat que els fructans augmenten els nivells del gènere *Bifidobacterium*, els quals tenen un efecte beneficiós sobre l'intestí i pel que aquest gènere podria tenir un paper terapèutic important. Són necessaris més estudis per determinar els efectes d'aquests moduladors sobre la producció d'AGCC, la inflamació intestinal i la composició de la microbiota, observant diferències pels diversos graus de polimerització en el cas de prebiòtics. De la mateixa manera que un probiòtic podria ser beneficiós al presentar una combinació de soques, seria interessant estudiar l'efecte del grau de polimerització quan es combinen diferents fructans, o fins i tot quan s'afegeixen altres tipus de fibra. La combinació de diferents fibres podria ser important per evitar l'alimentació d'alguns grups bacterians i, per tant, promoure una microbiota més diversa.

CONCLUSIONS

Dels dos estudis realitzats en aquest treball de tesi doctoral es poden extreure les següents conclusions:

1. L'ús de probiòtics sembla beneficiar als pacients amb colitis ulcerosa activa per aconseguir l'estat de remissió millorant la simptomatologia.
2. L'efecte dels probiòtics és significativament beneficiós únicament quan s'avalua l'estat del pacient utilitzant les escales recomanades per la FDA per determinar la remissió, en canvi no s'observa benefici en aquell grup d'estudis que utilitzen altres escales.
3. Per poder comparar i agregar els resultats dels diferents estudis sobre l'efecte dels diferents tractaments amb probiòtics, prebiòtics o simbiòtics sobre la Colitis Ulcerosa és imprescindible un consens per acordar una única escala d'avaluació de l'estat dels pacients amb colitis ulcerosa que pugui ésser validada.
4. La composició del probiòtic presenta un paper important, on els probiòtics que contenen el gènere *Bifidobacterium* semblarien ésser els més beneficiosos.
5. El sistema de fermentació *ex vivo* utilitzat, basat en l'etapa del mig del model Macfarlane, permet observar diferències de microbiota entre prebiòtics.
6. El grau de polimerització dels fructans sembla tenir un impacte diferent sobre la microbiota, i per tant sobre el seu efecte prebiòtic. Un alt grau de polimerització sembla facilitar l'augment de la diversitat i l'activitat d'acidificació presentant un efecte sobre la microbiota intestinal a nivell composicional i metabòlic.
7. Calen més estudis tant a nivell *in vivo* com *ex vivo* que avaluïn l'efecte de les diferents dosis i els tractaments d'aquests moduladors de la microbiota en pacients amb colitis ulcerosa, no només a nivell de canvis en la composició de la microbiota intestinal sinó també en la producció d'àcids grassos de cadena curta així com dels nivells d'inflamació i símptomes clínics.

BIBLIOGRAFIA

1. Ron Sender; Shain Fuchs; Ron Milo Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol* **2016**, *14*, doi:10.1371/journal.pbio.1002533.
2. Ley, R. E.; Peterson, D. A.; Gordon, J. I. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* **2006**, *124*, 837–848, doi:10.1016/j.cell.2006.02.017.
3. Chen, Y. E.; Fischbach, M. A.; Belkaid, Y. Skin microbiota–host interactions. *Nature* **2018**, *553*, 427, doi:10.1038/nature25177.Skin.
4. Zhang, Y.; Wang, X.; Li, H.; Ni, C.; Du, Z.; Yan, F. Human oral microbiota and its modulation for oral health. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *99*, 883–893, doi:10.1016/j.biopha.2018.01.146.
5. Nardone, G.; Compare, D. The human gastric microbiota: Is it time to rethink the pathogenesis of stomach diseases? *United Eur. Gastroenterol. J.* **2015**, *3*, 255–260, doi:10.1177/2050640614566846.
6. Amabebe, E.; Anumba, D. O. C. The Vaginal Microenvironment: The Physiologic Role of Lactobacilli. *Front. Med.* **2018**, *5*, 1–11, doi:10.3389/fmed.2018.00181.
7. Dickson, R. P.; Erb-Downward, J. R.; Martinez, F. J.; Huffnagle, G. B. The Microbiome and the Respiratory Tract. *Annu. Rev. Physiol.* **2016**, *78*, 481, doi:10.1146/ANNUREV-PHYSIOL-021115-105238.
8. Huttenhower, C.; Gevers, D.; Knight, R.; Abubucker, S.; Badger, J. H.; Chinwalla, A. T.; Creasy, H. H.; Earl, A. M.; Fitzgerald, M. G.; Fulton, R. S.; Giglio, M. G.; Hallsworth-Pepin, K.; Lobos, E. A.; Madupu, R.; Magrini, V.; Martin, J. C.; Mitreva, M.; Muzny, D. M.; Sodergren, E. J.; Versalovic, J.; Wollam, A. M.; Worley, K. C.; Wortman, J. R.; Young, S. K.; Zeng, Q.; Aagaard, K. M.; Abolude, O. O.; Allen-Vercoe, E.; Alm, E. J.; Alvarado, L.; Andersen, G. L.; Anderson, S.; Appelbaum, E.; Arachchi, H. M.; Armitage, G.; Arze, C. A.; Ayvaz, T.; Baker, C. C.; Begg, L.; Belachew, T.; Bhonagiri, V.; Bihan, M.; Blaser, M. J.; Bloom, T.; Bonazzi, V.; Paul Brooks, J.; Buck, G. A.; Buhay, C. J.; Busam, D. A.; Campbell, J. L.; Canon, S. R.; Cantarel, B. L.; Chain, P. S. G.; Chen, I. M. A.; Chen, L.; Chhibba, S.; Chu, K.; Ciulla, D. M.; Clemente, J. C.; Clifton, S. W.; Conlan, S.; Crabtree, J.; Cutting, M. A.; Davidovics, N. J.; Davis, C. C.; Desantis, T. Z.; Deal, C.; Delehaunty, K. D.; Dewhurst, F. E.; Deych, E.; Ding, Y.; Dooling, D. J.; Dugan, S. P.; Michael Dunne, W.; Scott Durkin, A.; Edgar, R. C.; Erlich, R. L.; Farmer, C. N.; Farrell, R. M.; Faust, K.; Feldgarden, M.; Felix, V. M.; Fisher, S.; Fodor, A. A.; Forney, L. J.; Foster, L.; Di Francesco, V.; Friedman, J.; Friedrich, D. C.; Fronick, C. C.; Fulton, L. L.; Gao, H.; Garcia, N.; Giannoukos, G.; Giblin, C.; Giovanni, M. Y.; Goldberg, J. M.; Goll, J.; Gonzalez, A.; Griggs, A.; Gujja, S.; Kinder Haake, S.; Haas, B. J.; Hamilton, H. A.; Harris, E. L.; Hepburn, T. A.; Herter, B.; Hoffmann, D. E.; Holder, M. E.; Howarth, C.; Huang, K. H.; Huse, S. M.; Izard, J.; Jansson, J. K.; Jiang, H.; Jordan, C.; Joshi, V.; Katancik, J. A.; Keitel, W. A.; Kelley, S. T.; Kells, C.; King, N. B.; Knights, D.; Kong, H. H.; Koren, O.; Koren, S.; Kota, K. C.; Kovar, C. L.; Kyrpides, N. C.; La Rosa, P. S.; Lee, S. L.; Lemon, K. P.; Lennon, N.; Lewis, C. M.; Lewis, L.; Ley, R. E.; Li, K.; Liolios, K.; Liu, B.; Liu, Y.; Lo, C. C.; Lozupone, C. A.; Dwayne Lunsford, R.; Madden, T.; Mahurkar, A. A.; Mannon, P. J.; Mardis, E. R.; Markowitz, V. M.; Mavromatis, K.; McCorrison, J. M.; McDonald, D.; McEwen, J.; McGuire, A. L.; McInnes, P.; Mehta, T.; Mihindukulasuriya, K. A.; Miller, J. R.; Minx, P. J.; Newsham, I.; Nusbaum, C.; Ogloughlin, M.; Orvis, J.; Pagani, I.; Palaniappan, K.; Patel, S. M.; Pearson, M.; Peterson, J.; Podar, M.; Pohl, C.; Pollard, K. S.; Pop, M.; Priest, M. E.; Proctor, L. M.; Qin, X.; Raes, J.; Ravel, J.; Reid, J. G.; Rho, M.; Rhodes, R.; Riehle, K. P.; Rivera, M. C.; Rodriguez-Mueller, B.; Rogers, Y. H.; Ross, M. C.; Russ, C.; Sanka, R. K.; Sankar, P.; Fah Sathirapongsasuti, J.; Schloss, J. A.; Schloss, P. D.; Schmidt, T. M.; Scholz,

- M.; Schriml, L.; Schubert, A. M.; Segata, N.; Segre, J. A.; Shannon, W. D.; Sharp, R. R.; Sharpton, T. J.; Shenoy, N.; Sheth, N. U.; Simone, G. A.; Singh, I.; Smillie, C. S.; Sobel, J. D.; Sommer, D. D.; Spicer, P.; Sutton, G. G.; Sykes, S. M.; Tabbaa, D. G.; Thiagarajan, M.; Tomlinson, C. M.; Torralba, M.; Treangen, T. J.; Truty, R. M.; Vishnivetskaya, T. A.; Walker, J.; Wang, L.; Wang, Z.; Ward, D. V.; Warren, W.; Watson, M. A.; Wellington, C.; Wetterstrand, K. A.; White, J. R.; Wilczek-Boney, K.; Wu, Y.; Wylie, K. M.; Wylie, T.; Yandava, C.; Ye, L.; Ye, Y.; Yooseph, S.; Youmans, B. P.; Zhang, L.; Zhou, Y.; Zhu, Y.; Zoloth, L.; Zucker, J. D.; Birren, B. W.; Gibbs, R. A.; Highlander, S. K.; Methé, B. A.; Nelson, K. E.; Petrosino, J. F.; Weinstock, G. M.; Wilson, R. K.; White, O. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* **2012**, *486*, 207–214, doi:10.1038/nature11234.
9. Jandhyala, S. M.; Talukdar, R.; Subramanyam, C.; Vuyyuru, H.; Sasikala, M.; Reddy, D. N. Role of the normal gut microbiota. *World J. Gastroenterol.* **2015**, *21*, 8836–8847, doi:10.3748/wjg.v21.i29.8787.
 10. Donaldson, G. P.; Lee, S. M.; Mazmanian, S. K. Gut biogeography of the bacterial microbiota. *Nat. Rev. Microbiol.* **2016**, *14*, 20–32, doi:10.1038/nrmicro3552.
 11. Costello, E. K.; Lauber, C. L.; Micah, H.; Fierer, N.; Gordon, J. I.; Knight, R. Bacterial Community Variation in Human Body Habitats Across Space and Time. *Science (80-)*. **2009**, *46*, 183–210, doi:10.1126/science.1177486.Bacterial.
 12. Fernández, L.; Langa, S.; Martín, V.; Maldonado, A.; Jiménez, E.; Martín, R.; Rodríguez, J. M. The human milk microbiota: Origin and potential roles in health and disease. *Pharmacol. Res.* **2013**, *69*, 1–10, doi:10.1016/j.phrs.2012.09.001.
 13. Backhed, F. Host-Bacterial Mutualism in the Human Intestine. *Sci. (New York, NY)* **2005**, *307*, 1915–1920, doi:10.1126/science.1104816.
 14. Mathieu, E.; Escribano-Vazquez, U.; Descamps, D.; Cherbuy, C.; Langella, P.; Riffault, S.; Remot, A.; Thomas, M. Paradigms of Lung Microbiota Functions in Health and Disease, Particularly, in Asthma. *Front. Physiol.* **2018**, *9*, 1168, doi:10.3389/fphys.2018.01168.
 15. O’Hanlon, D. E.; Moench, T. R.; Cone, R. A. In vaginal fluid, bacteria associated with bacterial vaginosis can be suppressed with lactic acid but not hydrogen peroxide. *BMC Infect. Dis.* **2011**, *11*, 200, doi:10.1186/1471-2334-11-200.
 16. Cresci, G. A.; Bawden, E. Gut microbiome: What we do and don’t know. *Nutr. Clin. Pract.* **2015**, *30*, 734–746, doi:10.1177/0884533615609899.
 17. Baquero, F.; Nombela, C. The microbiome as a human organ. *Clin. Microbiol. Infect.* **2012**, *18*, 2–4, doi:10.1111/j.1469-0691.2012.03916.x.
 18. Evans, J. M.; Morris, L. S.; Marchesi, J. R. The gut microbiome: the role of a virtual organ in the endocrinology of the host. *J. Endocrinol.* **2013**, *218*, R37–R47, doi:10.1530/joe-13-0131.
 19. Kraichak, E.; Crespo, A.; Divakar, P. K.; Leavitt, S. D.; Lumbsch, H. T. A temporal banding approach for consistent taxonomic ranking above the species level. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 2297, doi:10.1038/s41598-017-02477-7.
 20. Lapage, S.; Sneath, P.; Lessel, E.; Skerman, V.; Seeliger, H.; Clark, W. Rules of Nomenclature with Recommendations. **1992**.
 21. Thursby, E.; Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* **2017**, *474*, 1823–1836, doi:10.1042/BCJ20160510.

22. Arumugam, M.; Raes, J.; Pelletier, E.; Le Paslier, D.; Yamada, T.; Mende, D. R.; Fernandes, G. R.; Tap, J.; Bruls, T.; Batto, J. M.; Bertalan, M.; Borruel, N.; Casellas, F.; Fernandez, L.; Gautier, L.; Hansen, T.; Hattori, M.; Hayashi, T.; Kleerebezem, M.; Kurokawa, K.; Leclerc, M.; Levenez, F.; Manichanh, C.; Nielsen, H. B.; Nielsen, T.; Pons, N.; Poulain, J.; Qin, J.; Sicheritz-Ponten, T.; Tims, S.; Torrents, D.; Ugarte, E.; Zoetendal, E. G.; Wang, J.; Guarner, F.; Pedersen, O.; De Vos, W. M.; Brunak, S.; Doré, J.; Weissenbach, J.; Ehrlich, S. D.; Bork, P. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* **2011**, *473*, 174–180, doi:10.1038/nature09944.
23. Wong, C.; Harris, P. J.; Ferguson, L. R. Potential benefits of dietary fibre intervention in inflammatory bowel disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2016**, *17*, doi:10.3390/ijms17060919.
24. Mosca, A.; Leclerc, M.; Hugot, J. P. Gut microbiota diversity and human diseases: Should we reintroduce key predators in our ecosystem? *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1–12, doi:10.3389/fmicb.2016.00455.
25. Costea, P. I.; Hildebrand, F.; Manimozhayan, A.; Bäckhed, F.; Blaser, M. J.; Bushman, F. D.; de Vos, W. M.; Ehrlich, S. D.; Fraser, C. M.; Hattori, M.; Huttenhower, C.; Jeffery, I. B.; Knights, D.; Lewis, J. D.; Ley, R. E.; Ochman, H.; O'Toole, P. W.; Quince, C.; Relman, D. A.; Shanahan, F.; Sunagawa, S.; Wang, J.; Weinstock, G. M.; Wu, G. D.; Zeller, G.; Zhao, L.; Raes, J.; Knight, R.; Bork, P. Enterotypes in the landscape of gut microbial community composition. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 8–16, doi:10.1038/s41564-017-0072-8.
26. Nagpal, R.; Tsuji, H.; Takahashi, T.; Kawashima, K.; Nagata, S.; Nomoto, K.; Yamashiro, Y. Sensitive quantitative analysis of the meconium bacterial microbiota in healthy term infants born vaginally or by cesarean section. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 1–9, doi:10.3389/fmicb.2016.01997.
27. Ottman, N.; Smidt, H.; de Vos, W. M.; Belzer, C. The function of our microbiota: who is out there and what do they do? *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2012**, *2*, 1–11, doi:10.3389/fcimb.2012.00104.
28. Koenig, J. E.; Spor, A.; Scalfone, N.; Fricker, A. D.; Stombaugh, J.; Knight, R.; Angenent, L. T.; Ley, R. E. Succession of microbial consortia in the developing infant gut microbiome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2011**, *108*, 4578–4585, doi:10.1073/pnas.1000081107.
29. Qin, J.; Li, R.; Raes, J.; Arumugam, M.; Burgdorf, S.; Manichanh, C.; Nielsen, T.; Pons, N.; Yamada, T.; Mende, D. R.; Li, J.; Xu, J.; Li, S.; Li, D.; Cao, J.; Wang, B.; Liang, H.; Zheng, H.; Xie, Y.; Tap, J.; Lepage, P.; Bertalan, M.; Batto, J.; Hansen, T.; Paslier, D. Le; Linneberg, A.; Nielsen, H. B.; Pelletier, E.; Renault, P.; Zhou, Y.; Li, Y.; Zhang, X.; Li, S.; Qin, N.; Yang, H. A human gut microbial gene catalog established by metagenomic sequencing. *Nature* **2010**, *464*, 59–65, doi:10.1038/nature08821.A.
30. Dethlefsen, L.; Eckburg, P. B.; Bik, E. M.; Relman, D. A. Assembly of the human intestinal microbiota. *Trends Ecol. Evol.* **2006**, *21*, 517–523, doi:10.1016/j.tree.2006.06.013.
31. Wu, G. D.; Chen, J.; Hoffmann, C.; Bittinger, K.; Chen, Y.; Keilbaugh, S. A.; Bewtra, M.; Knights, D.; Walters, W. A.; Knight, R.; Sinha, R.; Gilroy, E.; Gupta, K.; Baldassano, R.; Nessel, L.; Li, H. Linking Long-Term Dietary Patterns with Gut Microbial Enterotypes. *Science (80-.).* **2011**, *334*, 105–109, doi:10.1126/science.1208344.
32. Ercolini, D.; Fogliano, V. Food Design to Feed the Human Gut Microbiota. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 3754–3758, doi:10.1021/acs.jafc.8b00456.
33. David, L. A.; Maurice, C. F.; Carmody, R. N.; Gootenberg, D. B.; Button, J. E.; Wolfe, B. E.; Ling, A. V.; Devlin, A. S.; Varma, Y.; Fischbach, M. A.; Biddinger, S. B.; Dutton, R. J.;

- Turnbaugh, P. J. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* **2014**, *505*, 559–563, doi:10.1038/nature12820.
34. De Filippo, C.; Di Paola, M.; Ramazzotti, M.; Albanese, D.; Pieraccini, G.; Banci, E.; Miglietta, F.; Cavalieri, D.; Lionetti, P. Diet, Environments, and Gut Microbiota. A Preliminary Investigation in Children Living in Rural and Urban Burkina Faso and Italy. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1979, doi:10.3389/fmicb.2017.01979.
 35. Halmos, E. P.; Christophersen, C. T.; Bird, A. R.; Shepherd, S. J.; Gibson, P. R.; Muir, J. G. Diets that differ in their FODMAP content alter the colonic luminal microenvironment. *Gut* **2015**, *64*, 93–100, doi:10.1136/gutjnl-2014-307264.
 36. Rowland, I.; Gibson, G.; Heinken, A.; Scott, K.; Swann, J.; Thiele, I.; Tuohy, K. Gut microbiota functions: metabolism of nutrients and other food components. *Eur. J. Nutr.* **2018**, *57*, 1–24, doi:10.1007/s00394-017-1445-8.
 37. Chumpitazi, B. P.; Cope, J. L.; Hollister, E. B.; Tsai, C. M.; McMeans, A. R.; Luna, R. A.; Versalovic, J.; Shulman, R. J. Randomised clinical trial: gut microbiome biomarkers are associated with clinical response to a low FODMAP diet in children with the irritable bowel syndrome. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2015**, *42*, 418–427, doi:10.1111/APT.13286.
 38. Altobelli, E.; Del Negro, V.; Angeletti, P.; Latella, G. Low-FODMAP Diet Improves Irritable Bowel Syndrome Symptoms: A Meta-Analysis. *Nutrients* **2017**, *9*, 940, doi:10.3390/nu9090940.
 39. Gibson, P. R. Use of the low-FODMAP diet in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *32*, 40–42, doi:10.1111/jgh.13695.
 40. Dudek-Wicher, R. K.; Junka, A.; Bartoszewicz, M. The influence of antibiotics and dietary components on gut microbiota. *Prz. Gastroenterol.* **2018**, *13*, 85–92, doi:10.5114/pg.2018.76005.
 41. Pérez-Cobas, A. E.; Gosalbes, M. J.; Friedrichs, A.; Knecht, H.; Artacho, A.; Eismann, K.; Otto, W.; Rojo, D.; Bargiela, R.; Bergen, M. von; Neulinger, S. C.; Däumer, C.; Femke-An Gut microbiota disturbance during antibiotic therapy: A multi-omic approach. *Gut Microbes* **2014**, *5*, 64–70, doi:10.4161/gmic.27128.
 42. Kronman, M. P.; Zaoutis, T. E.; Haynes, K.; Feng, R.; Coffin, S. E. Antibiotic Exposure and IBD Development Among Children: A Population-Based Cohort Study. *Pediatrics* **2012**, *130*, e794, doi:10.1542/PEDS.2011-3886.
 43. Azad, M. B.; Moossavi, S.; Owora, A.; Sepehri, S. Early-Life Antibiotic Exposure, Gut Microbiota Development, and Predisposition to Obesity. In: 2017; pp. 67–79.
 44. Heintz-Buschart, A.; Wilmes, P. Human Gut Microbiome: Function Matters. *Trends Microbiol.* **2018**, *26*, 563–574, doi:10.1016/j.tim.2017.11.002.
 45. den Besten, G.; van Eunen, K.; Groen, A. K.; Venema, K.; Reijngoud, D.-J.; Bakker, B. M. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J. Lipid Res.* **2013**, *54*, 2325–40, doi:10.1194/jlr.R036012.
 46. Krajmalnik-Brown, R.; Ilhan, Z.-E.; Kang, D.-W.; DiBaise, J. J. Effects of Gut Microbes on Nutrient Absorption and Energy Regulation. **2012**, *27*, 201–214, doi:10.1177/0884533611436116.
 47. Bjerrum, J. T.; Wang, Y.; Hao, F.; Coskun, M.; Ludwig, C.; Günther, U.; Nielsen, O. H. Metabonomics of human fecal extracts characterize ulcerative colitis, Crohn's disease

- and healthy individuals. *Metabolomics* **2014**, *11*, 122–133, doi:10.1007/s11306-014-0677-3.
48. Odenwald, M. A.; Turner, J. R. The intestinal epithelial barrier: A therapeutic target? *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 9–21, doi:10.1038/nrgastro.2016.169.
 49. Belkaid, Yasmine and Hand, T. Role of the Microbiota in Immunity and inflammation. **2014**, *157*, 121–141, doi:10.1016/j.cell.2014.03.011.
 50. Hakansson, A.; Molin, G. Gut microbiota and inflammation. *Nutrients* **2011**, *3*, 637–687, doi:10.3390/nu3060637.
 51. JL, K.; HN, S.; WA, W. The role of microbes in developmental immunologic programming. *Pediatr Res* **2AD**, *69*, 465–472.
 52. Forsythe, P.; Bienenstock, J. Immunomodulation by commensal and probiotic bacteria. *Immunol. Invest.* **2010**, *39*, 429–448, doi:10.3109/08820131003667978.
 53. Santino, A.; Scarano, A.; De Santis, S.; De Benedictis, M.; Giovinazzo, G.; Chieppa, M. Gut Microbiota Modulation and Anti-Inflammatory Properties of Dietary Polyphenols in IBD: New and Consolidated Perspectives. *Curr. Pharm. Des.* **2017**, *23*, 2344–2351, doi:10.2174/1381612823666170207145420.
 54. Ubeda, C.; Djukovic, A.; Isaac, S. Roles of the intestinal microbiota in pathogen protection. *Clin. Transl. Immunol.* **2017**, *6*, e128, doi:10.1038/cti.2017.2.
 55. Gest, H. The discovery of microorganisms by Robert Hooke and Antoni van Leeuwenhoek, Fellows of The Royal Society. *Notes Rec. R. Soc. Lond.* **2004**, *58*, 187–201, doi:10.1098/rsnr.2004.0055.
 56. Bull, A. T.; Quayle, J. R. New Dimensions in Microbiology: An Introduction. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 1982, *297*, 447–457.
 57. Santer, M. Joseph Lister: first use of a bacterium as a ‘model organism’ to illustrate the cause of infectious disease of humans. *Notes Rec. R. Soc.* **2010**, *64*, 59–65, doi:10.1098/rsnr.2009.0029.
 58. Stolp, H.; Starr, M. P. Principles of Isolation, Cultivation, and Conservation of Bacteria. In *The Prokaryotes*; Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, 1981; pp. 135–175.
 59. Hwang, S.-U.; Lee, Y.-G. Simulation of an oil immersion objective lens: a simplified ray-optics model considering Abbe’s sine condition. *Opt. Express* **2008**, *16*, 21170–83.
 60. Dahm, R. Friedrich Miescher and the discovery of DNA. *Dev. Biol.* **2005**, *278*, 274–288, doi:10.1016/J.YDBIO.2004.11.028.
 61. Aguiar-Pulido, V.; Huang, W.; Suarez-ulloa, V.; Cickovski, T.; Mathee, K.; Narasimhan, G. Approaches for Microbiome Analysis. *Lib. Acad.* **2016**, *12*, 5–16, doi:10.4137/EBO.S36436.TYPE.
 62. Buermans, H. P. J.; den Dunnen, J. T. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **2014**, *1842*, 1932–1941, doi:10.1016/j.bbadis.2014.06.015.
 63. Goodwin, S.; McPherson, J. D.; McCombie, W. R. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17*, 333–351, doi:10.1038/nrg.2016.49.
 64. Yasuda, K.; Oh, K.; Ren, B.; Tickle, T. L.; Franzosa, E. A.; Wachtman, L. M.; Miller, A. D.;

- Westmoreland, S. V.; Keith, G.; Vallender, E. J.; Miller, G. M.; Rowlett, J. K.; Gevers, D.; Huttenhower, C.; Morgan, X. C.; Primate, E. Biogeography of the Intestinal Mucosal and Lumenal Microbiome in the Rhesus Macaque. *Cell Host Microbe* **2015**, *17*, 385–391, doi:10.1016/j.chom.2015.01.015.Biogeography.
65. Falony, G.; Vieira-Silva, S.; Raes, J. Richness and ecosystem development across faecal snapshots of the gut microbiota. *Nat. Microbiol.* **2018**, *3*, 526–528, doi:10.1038/s41564-018-0143-5.
 66. Ashton, J. J.; Beattie, R. M.; Ennis, S.; Cleary, D. W. Analysis and Interpretation of the Human Microbiome. **2016**, doi:10.1097/MIB.0000000000000809.
 67. Zou, Y.; Xue, W.; Luo, G.; Deng, Z.; Qin, P.; Guo, R.; Sun, H.; Xia, Y.; Liang, S.; Dai, Y.; Wan, D.; Jiang, R.; Su, L.; Feng, Q.; Jie, Z.; Guo, T.; Xia, Z.; Liu, C.; Yu, J.; Lin, Y.; Tang, S.; Huo, G.; Xu, X.; Hou, Y.; Liu, X.; Wang, J.; Yang, H.; Kristiansen, K.; Li, J.; Jia, H.; Xiao, L. 1,520 Reference Genomes From Cultivated Human Gut Bacteria Enable Functional Microbiome Analyses. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 179–185, doi:10.1038/s41587-018-0008-8.
 68. Cao, Y.; Fanning, S.; Proos, S.; Jordan, K.; Srikumar, S. A Review on the Applications of Next Generation Sequencing Technologies as Applied to Food-Related Microbiome Studies. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1829, doi:10.3389/fmicb.2017.01829.
 69. Klindworth, A.; Pruesse, E.; Schweer, T.; Peplies, J.; Quast, C.; Horn, M.; Glöckner, F. O. Evaluation of general 16S ribosomal RNA gene PCR primers for classical and next-generation sequencing-based diversity studies. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41*, e1–e11, doi:10.1093/nar/gks808.
 70. Yang, B.; Wang, Y.; Qian, P.-Y. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics* **2016**, *17*, 135, doi:10.1186/s12859-016-0992-y.
 71. Soergel, D. A. W.; Dey, N.; Knight, R.; Brenner, S. E. Selection of primers for optimal taxonomic classification of environmental 16S rRNA gene sequences. *ISME J.* **2012**, *6*, 1440–1444, doi:10.1038/ismej.2011.208.
 72. Rintala, A.; Pietilä, S.; Munukka, E.; Eerola, E.; Pursiheimo, J.-P.; Laiho, A.; Pekkala, S.; Huovinen, P. Gut Microbiota Analysis Results Are Highly Dependent on the 16S rRNA Gene Target Region, Whereas the Impact of DNA Extraction Is Minor. *J. Biomol. Tech.* **2017**, *28*, jbt.17-2801-003, doi:10.7171/jbt.17-2801-003.
 73. Caporaso, J. G.; Kuczynski, J.; Stombaugh, J.; Bittinger, K.; Bushman, F. D.; Costello, E. K.; Fierer, N.; Peña, A. G.; Goodrich, J. K.; Gordon, J. I.; Huttley, G. A.; Kelley, S. T.; Knights, D.; Koenig, J. E.; Ley, R. E.; Lozupone, C. A.; McDonald, D.; Muegge, B. D.; Pirrung, M.; Reeder, J.; Sevinsky, J. R.; Turnbaugh, P. J.; Walters, W. A.; Widmann, J.; Yatsunenko, T.; Zaneveld, J.; Knight, R. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat. Methods* **2010**, *7*, 335–6, doi:10.1038/nmeth.f.303.
 74. Zalewski, S.; Stewart, C. J.; Embleton, N. D.; Berrington, J. E. Brief guide to the analysis, interpretation and presentation of microbiota data. *Arch. Dis. Child. Educ. Pract. Ed.* **2017**, 327–330, doi:10.1136/archdischild-2017-313838.
 75. Paliy, O. and; Shankar, V. Application of multivariate statistical techniques in microbial ecology. *Mol. Ecol.* **2016**, *25*, 1032–1057, doi:10.1111/mec.13536.Application.
 76. Li, K.; Bihan, M.; Yooseph, S.; Methé, B. A. Analyses of the microbial diversity across the human microbiome. *PLoS One* **2012**, *7*, e32118, doi:10.1371/journal.pone.0032118.

77. Chao, A.; Gotelli, N. J.; Hsieh, T. C.; Sander, E. L.; Ma, K. H.; Colwell, R. K.; Ellison, A. M. *Rarefaction and extrapolation with Hill numbers: a framework for sampling and estimation in species diversity studies*; 2014; Vol. 84;.
78. Sorensen, T. *A method of establishing groups of equal amplitude in plant sociology based on similarity of species and its application to analyses of the vegetation on Danish commons.*; Biol. Skr.; 1948;
79. Bray, J. R.; Curtis, J. T. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* **1957**, *27*, 325–349, doi:10.2307/1942268.
80. Odintsova, V.; Tyakht, A.; Alexeev, D. Guidelines to Statistical Analysis of Microbial Composition Data Inferred from Metagenomic Sequencing., doi:10.21775/cimb.024.017.
81. Aura, A.-M.; Maukonen, J. One Compartment Fermentation Model. In *The Impact of Food Bioactives on Health*; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp. 281–292.
82. Gibson, G. R.; Cummings, J. H.; Macfarlane, G. T. Use of a three-stage continuous culture system to study the effect of mucin on dissimilatory sulfate reduction and methanogenesis by Use of a Three-Stage Continuous Culture System To Study the Effect of Mucin on Dissimilatory Sulfate Reduction and Methano. **1988**, *54*, 2750–2755.
83. Macfarlane, G. T.; Macfarlane, S.; Gibson, G. R. Validation of a three-stage compound continuous culture system for investigating the effect of retention time on the ecology and metabolism of bacteria in the human colon. *Microb. Ecol.* **1998**, *35*, 180–187, doi:10.1007/s002489900072.
84. Minekus, M.; Smeets-Peeters, M.; Havenaar, R.; Bernalier, A.; Fonty, G.; Marol-Bonnin, S.; Alric, M.; Marteau, P.; Huis Veld, J. H. J. in 't A computer-controlled system to simulate conditions of the large intestine with peristaltic mixing, water absorption and absorption of fermentation products. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **1**, *53*, 108-114 **1999**.
85. Molly, K, Woestyne. M. V, S. I. D. and V. W. Validation of the Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME) Reactor Using Microorganism-associated Activities. *Microb. Ecol. Health Dis.* **1994**, *7*, 191–200.
86. Van de Wiele, T.; Van den Abbeele, P.; Ossieur, W.; Possemiers, S.; Marzorati, M. The Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem (SHIME®). In *The Impact of Food Bioactives on Health*; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp. 305–317.
87. Barroso, E.; Cueva, C.; Peláez, C.; Martínez-Cuesta, M. C.; Requena, T. The Computer-Controlled Multicompartmental Dynamic Model of the Gastrointestinal System SIMGI. In *The Impact of Food Bioactives on Health*; Springer International Publishing: Cham, 2015; pp. 319–327.
88. Makivuokko, H.; Nurmi, J.; Nurminen, P.; Stowell, J.; Rautonen, N. In Vitro Effects on Polydextrose by Colonic Bacteria and Caco-2 Cell Cyclooxygenase Gene Expression. *Nutr. Cancer* **2005**, *52*, 94–104, doi:10.1207/s15327914nc5201_12.
89. Cinquin, C.; Le Blay, G.; Fliss, I.; Lacroix, C. New three-stage in vitro model for infant colonic fermentation with immobilized fecal microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2006**, *57*, 324–336, doi:10.1111/j.1574-6941.2006.00117.x.
90. Weirich, A.; Hoffmann, Æ. G. F. Ernst Moro (1874 – 1951)— A great pediatric career started at the rise of university-based pediatric research but was curtailed in the shadows of Nazi laws. *Eur J Pediatr* **2005**, *164*, 599–606, doi:10.1007/s00431-005-1703-2.

91. Mackowiak, P. A. Recycling Metchnikoff : probiotics , the intestinal microbiome and the quest for long life. *Front. public Heal.* **2013**, *1*, 1–3, doi:10.3389/fpubh.2013.00052.
92. Francisco Guarner, Mary Ellen Sanders, Rami Eliakim, Richard Fedorak, Alfred Gangl , James Garisch, Pedro Kaufmann , Tarkan Karakan; Aamir G. Khan, Nayoung Kim, Juan Andrés De Paula, Balakrishnan Ramakrishna, Fergus Shanahan, Hania Szajewska, Alan Thomson, A. L. M. Probiotics and prebiotics. *WGO Glob. Guidel.* **2017**, *80*, 113–117, doi:10.1094/CCHEM.2003.80.2.113.
93. Sonnenborn, U. Escherichia coli strain Nissle 1917-from bench to bedside and back: History of a special Escherichia coli strain with probiotic properties. *FEMS Microbiol. Lett.* **2016**, *363*, 1–6, doi:10.1093/femsle/fnw212.
94. SUR, D.; MANNA, B.; NIYOGI, S. K.; RAMAMURTHY, T.; PALIT, A.; NOMOTO, K.; TAKAHASHI, T.; SHIMA, T.; TSUJI, H.; KURAKAWA, T.; TAKEDA, Y.; NAIR, G. B.; BHATTACHARYA, S. K. Role of probiotic in preventing acute diarrhoea in children: a community-based, randomized, double-blind placebo-controlled field trial in an urban slum. *Epidemiol. Infect.* **2011**, *139*, 919–926, doi:10.1017/S0950268810001780.
95. Guarner, F.; Schaafsma, G. J. Probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **1998**, *39*, 237–238, doi:10.1016/S0168-1605(97)00136-0.
96. FAO; WHO Guidelines for the evaluation of probiotics in food. **2002**, 1–11.
97. Guarner, F.; Sanders, M. E.; Eliakim, R.; Fedorak, R.; Gangl, A.; Garisch, J.; Kaufmann, P.; Karakan, T.; Khan, A. G.; Kim, N.; Paula, J. A. De; Ramakrishna, B.; Shanahan, F.; Szajewska, H.; Thomson, A.; Mair, A. Le WGO Global Guideline: Probiotics and prebiotics. **2017**, 1–36, doi:10.1002/9781118982907.ch30.
98. Fijan, S. Microorganisms with claimed probiotic properties: an overview of recent literature. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2014**, *11*, 4745–67, doi:10.3390/ijerph110504745.
99. FAO and WHO Probiotics in food. *Food Nutr. Pap.* **2001**, *85*, 71.
100. Reid, G.; Gadir, A. A.; Dhir, R. Probiotics: Reiterating What They Are and What They Are Not. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 1–6, doi:10.3389/fmicb.2019.00424.
101. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G. R.; Merenstein, D. J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R. B.; Flint, H. J.; Salminen, S.; Calder, P. C.; Sanders, M. E. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 9, doi:10.1038/nrgastro.2014.66.
102. Hill, A. *Ilsi Europe Concise Monograph Series*; 2006; ISBN 907863703X.
103. Jacobsen, C. N.; Rosenfeldt Nielsen, V.; Hayford, A. E.; Møller, P. L.; Michaelsen, K. F.; Paerregaard, A.; Sandström, B.; Tvede, M.; Jakobsen, M. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of Lactobacillus spp. by in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. *Appl. Environ. Microbiol.* **1999**, *65*, 4949–56.
104. Rychen, G.; Aquilina, G.; Azimonti, G.; Bampidis, V.; Bastos, M. de L.; Bories, G.; Chesson, A.; Cocconcelli, P. S.; Flachowsky, G.; Gropp, J.; Kolar, B.; Kouba, M.; López-Alonso, M.; López Puente, S.; Mantovani, A.; Mayo, B.; Ramos, F.; Saarela, M.; Villa, R. E.; Wallace, R. J.; Wester, P.; Glandorf, B.; Herman, L.; Kärenlampi, S.; Aguilera, J.; Anguita, M.; Brozzi, R.; Galobart, J. Guidance on the characterisation of microorganisms used as feed

- additives or as production organisms. *EFSA J.* **2018**, *16*, 1–24, doi:10.2903/j.efsa.2018.5206.
105. Mattia, A.; Merker, R. Regulation of Probiotic Substances as Ingredients in Foods: Premarket Approval or “Generally Recognized as Safe” Notification. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46*, S115–S118, doi:10.1086/523329.
 106. Sanders, M. E.; Akkermans, L. M. A.; Haller, D.; Hammerman, C.; Heimbach, J.; Hörmannspenger, G.; Huys, G.; Levy, D. D.; Lutgendorff, F.; Mack, D.; Phothirath, P. Safety assessment of probiotics for human use. **2010**, *1*, 164–185.
 107. Trois, L.; Cardoso, E. M.; Miura, E. Use of Probiotics in HIV-infected Children: A Randomized Double-blind Controlled Study. *J. Trop. Pediatr.* **2007**, *54*, 19–24, doi:10.1093/tropej/fmm066.
 108. Anabrees, J.; Indrio, F.; Paes, B.; AlFaleh, K. Probiotics for infantile colic: a systematic review. *BMC Pediatr.* **2013**, *13*, 186, doi:10.1186/1471-2431-13-186.
 109. Snyderman, D. R. The Safety of Probiotics. *Clin. Infect. Dis.* **2008**, *46*, S104–S111, doi:10.1086/523331.
 110. Pessione, E.; Cirrincione, S. Bioactive Molecules Released in Food by Lactic Acid Bacteria: Encrypted Peptides and Biogenic Amines. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, doi:10.3389/FMICB.2016.00876.
 111. Guandalini, S. Probiotics for Prevention and Treatment of Diarrhea. *J. Clin. Gastroenterol.* **2011**, *45*, S149–S153, doi:10.1097/MCG.0b013e3182257e98.
 112. Kleerebezem, M.; Binda, S.; Bron, P. A.; Gross, G.; Hill, C.; van Hylckama Vlieg, J. E.; Lebeer, S.; Satokari, R.; Ouwehand, A. C. Understanding mode of action can drive the translational pipeline towards more reliable health benefits for probiotics. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2019**, *56*, 55–60, doi:10.1016/j.copbio.2018.09.007.
 113. Plaza-Diaz, J.; Ruiz-Ojeda, F. J.; Gil-Campos, M.; Gil, A. Mechanisms of Action of Probiotics. *Adv. Nutr.* **2019**, *10*, S49–S66, doi:10.1093/advances/nmy063.
 114. Vollenweider, S.; Evers, S.; Zurbriggen, K.; Lacroix, C. Unraveling the Hydroxypropionaldehyde (HPA) System: An Active Antimicrobial Agent against Human Pathogens. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 10315–10322, doi:10.1021/jf1010897.
 115. Alcántara, C.; Coll-Marqués, J. M.; Jadán-Piedra, C.; Vélez, D.; Devesa, V.; Zúñiga, M.; Monedero, V. Polyphosphate in *Lactobacillus* and Its Link to Stress Tolerance and Probiotic Properties. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1944, doi:10.3389/fmicb.2018.01944.
 116. Amrutha, B.; Sundar, K.; Shetty, P. H. Effect of organic acids on biofilm formation and quorum signaling of pathogens from fresh fruits and vegetables. *Microb. Pathog.* **2017**, *111*, 156–162, doi:10.1016/j.micpath.2017.08.042.
 117. Stanojević-Nikolić, S.; Dimić, G.; Mojović, L.; Pejin, J.; Djukić-Vuković, A.; Kocić-Tanackov, S. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Against Pathogen and Spoilage Microorganisms. *J. Food Process. Preserv.* **2016**, *40*, 990–998, doi:10.1111/jfpp.12679.
 118. Tedelind, S.; Westberg, F.; Kjerrulf, M.; Vidal, A. Anti-inflammatory properties of the short-chain fatty acids acetate and propionate: a study with relevance to inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* **2007**, *13*, 2826–32.
 119. Westermann, C.; Gleinser, M.; Corr, S. C.; Riedel, C. U. A Critical Evaluation of Bifidobacterial Adhesion to the Host Tissue. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*,

doi:10.3389/FMICB.2016.01220.

120. Chapot-Chartier, M.-P.; Kulakauskas, S. Cell wall structure and function in lactic acid bacteria. *Microb. Cell Fact.* **2014**, *13*, S9, doi:10.1186/1475-2859-13-S1-S9.
121. Ren, C.; Zhang, Q.; de Haan, B. J.; Zhang, H.; Faas, M. M.; de Vos, P. Identification of TLR2/TLR6 signalling lactic acid bacteria for supporting immune regulation. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 34561, doi:10.1038/srep34561.
122. Ruiz, L.; Delgado, S.; Ruas-Madiedo, P.; Sánchez, B.; Margolles, A. Bifidobacteria and Their Molecular Communication with the Immune System. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2345, doi:10.3389/fmicb.2017.02345.
123. Bouladoux, N.; Hall, J. A.; Grainger, J. R.; dos Santos, L. M.; Kann, M. G.; Nagarajan, V.; Verthelyi, D.; Belkaid, Y. Regulatory role of suppressive motifs from commensal DNA. *Mucosal Immunol.* **2012**, *5*, 623–634, doi:10.1038/mi.2012.36.
124. Zhong, Y.; Kinio, A.; Saleh, M. Functions of NOD-Like Receptors in Human Diseases. *Front. Immunol.* **2013**, *4*, 333, doi:10.3389/fimmu.2013.00333.
125. Boger, M. C. L.; Lammerts van Bueren, A.; Dijkhuizen, L. Cross-Feeding among Probiotic Bacterial Strains on Prebiotic Inulin Involves the Extracellular *exo* -Inulinase of *Lactobacillus paracasei* Strain W20. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84*, doi:10.1128/AEM.01539-18.
126. Selak, M.; Rivière, A.; Moens, F.; Van den Abbeele, P.; Geirnaert, A.; Rogelj, I.; Leroy, F.; De Vuyst, L. Inulin-type fructan fermentation by bifidobacteria depends on the strain rather than the species and region in the human intestine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2016**, *100*, 4097–4107, doi:10.1007/s00253-016-7351-9.
127. Moens, F.; Verce, M.; De Vuyst, L. Lactate- and acetate-based cross-feeding interactions between selected strains of lactobacilli, bifidobacteria and colon bacteria in the presence of inulin-type fructans. *Int. J. Food Microbiol.* **2017**, *241*, 225–236, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.10.019.
128. Tamura, Z. *Nutrition of Bifidobacteria*; 1983; Vol. 2;.
129. Gibson, G. R.; Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 1401–1412, doi:10.1079/NRR200479.
130. Hill, C.; Guarner, F.; Reid, G.; Gibson, G. R.; Merenstein, D. J.; Pot, B.; Morelli, L.; Canani, R. B.; Flint, H. J.; Salminen, S.; Calder, P. C.; Sanders, M. E. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2014**, *11*, 506–514, doi:10.1038/nrgastro.2014.66.
131. Gibson, G. R.; Hutkins, R.; Sanders, M. E.; Prescott, S. L.; Reimer, R. A.; Salminen, S. J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K. S.; Cani, P. D.; Verbeke, K.; Reid, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 491–502, doi:10.1038/nrgastro.2017.75.
132. Holscher, H. D. Dietary fiber and prebiotics and the gastrointestinal microbiota. *Gut Microbes* **2017**, *8*, 172–184, doi:10.1080/19490976.2017.1290756.
133. Hamaker, B. R.; Tuncil, Y. E. A perspective on the complexity of dietary fiber structures

- and their potential effect on the gut microbiota. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 3838–3850, doi:10.1016/j.jmb.2014.07.028.
134. Poeker, S. A.; Geirnaert, A.; Berchtold, L.; Greppi, A.; Krych, L.; Steinert, R. E.; De Wouters, T.; Lacroix, C. Understanding the prebiotic potential of different dietary fibers using an in vitro continuous adult fermentation model (PolyFermS). *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1–12, doi:10.1038/s41598-018-22438-y.
 135. de Vrese, M.; Schrezenmeir, J. *Probiotics, prebiotics, and synbiotics.*; 2008; Vol. 111; ISBN 978-0-12-802189-7.
 136. Kelly, G. *Inulin-Type Prebiotics – A Review: Part 1*; 2008; Vol. 13;.
 137. Roberfroid, M. B.; Van Loo, J. A. E.; Gibson, G. R. The Bifidogenic Nature of Chicory Inulin and Its Hydrolysis Products. *J. Nutr.* **1998**, *128*, 11–19, doi:10.1093/jn/128.1.11.
 138. Hutkins, R. W.; Krumbeck, J. A.; Bindels, L. B.; Cani, P. D.; Fahey, G.; Jr.; Goh, Y. J.; Hamaker, B.; Martens, E. C.; Mills, D. A.; Rastal, R. A.; Vaughan, E.; Sanders, M. E. Prebiotics: why definitions matter. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *37*, 1, doi:10.1016/J.COPBIO.2015.09.001.
 139. Gibson, G. R.; Hutkins, R.; Sanders, M. E.; Prescott, S. L.; Reimer, R. A.; Salminen, S. J.; Scott, K.; Stanton, C.; Swanson, K. S.; Cani, P. D.; Verbeke, K.; Reid, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *14*, 491–502, doi:10.1038/nrgastro.2017.75.
 140. Venema, K.; Van Den Abbeele, P. Experimental models of the gut microbiome. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2013**, *27*, 115–126, doi:10.1016/j.bpg.2013.03.002.
 141. Wilson, B.; Whelan, K. Prebiotic inulin-type fructans and galacto-oligosaccharides: definition, specificity, function, and application in gastrointestinal disorders. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **2017**, *32*, 64–68, doi:10.1111/jgh.13700.
 142. Goh, Y. J.; Klaenhammer, T. R. Genetic Mechanisms of Prebiotic Oligosaccharide Metabolism in Probiotic Microbes. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.* **2014**, *6*, 137–156, doi:10.1146/annurev-food-022814-015706.
 143. La Fata, G.; Rastall, R. A.; Lacroix, C.; Harmsen, H. J. M.; Mohajeri, M. H.; Weber, P.; Steinert, R. E. Recent Development of Prebiotic Research-Statement from an Expert Workshop. *Nutrients* **2017**, *9*, doi:10.3390/nu9121376.
 144. Khan, M. T.; Duncan, S. H.; Stams, A. J. M.; van Dijk, J. M.; Flint, H. J.; Harmsen, H. J. M. The gut anaerobe *Faecalibacterium prausnitzii* uses an extracellular electron shuttle to grow at oxic–anoxic interphases. *ISME J.* **2012**, *6*, 1578–1585, doi:10.1038/ismej.2012.5.
 145. Steinert, R. E.; Sadaghian Sadabad, M.; Harmsen, H. J. M.; Weber, P. The prebiotic concept and human health: a changing landscape with riboflavin as a novel prebiotic candidate? *Eur. J. Clin. Nutr.* **2016**, *70*, 1348–1353, doi:10.1038/ejcn.2016.119.
 146. Queipo-Ortuño, M. I.; Boto-Ordóñez, M.; Murri, M.; Gomez-Zumaquero, J. M.; Clemente-Postigo, M.; Estruch, R.; Cardona Diaz, F.; Andrés-Lacueva, C.; Tinahones, F. J. Influence of red wine polyphenols and ethanol on the gut microbiota ecology and biochemical biomarkers. *Am. J. Clin. Nutr.* **2012**, *95*, 1323–1334, doi:10.3945/ajcn.111.027847.
 147. Watson, H.; Mitra, S.; Croden, F. C.; Taylor, M.; Wood, H. M.; Perry, S. L.; Spencer, J. A.; Quirke, P.; Toogood, G. J.; Lawton, C. L.; Dye, L.; Loadman, P. M.; Hull, M. A. A randomised

- trial of the effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid supplements on the human intestinal microbiota. *Gut* **2018**, *67*, 1974–1983, doi:10.1136/gutjnl-2017-314968.
148. Menni, C.; Zierer, J.; Pallister, T.; Jackson, M. A.; Long, T.; Mohney, R. P.; Steves, C. J.; Spector, T. D.; Valdes, A. M. Omega-3 fatty acids correlate with gut microbiome diversity and production of N-carbamylglutamate in middle aged and elderly women. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 11079, doi:10.1038/s41598-017-10382-2.
 149. Ditu, L. M.; Chifiriuc, M. C.; Bezirtzoglou, E.; Marutescu, L.; Bleotu, C.; Pelinescu, D.; Mihaescu, G.; Lazar, V. Immunomodulatory effect of non-viable components of probiotic culture stimulated with heat-inactivated *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* on holoxenic mice. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2014**, *25*, doi:10.3402/mehd.v25.23239.
 150. Soldi, S.; Vasileiadis, S.; Uggeri, F.; Campanale, M.; Morelli, L.; Fogli, M. V.; Calanni, F.; Grimaldi, M.; Gasbarrini, A. Modulation of the gut microbiota composition by rifaximin in non-constipated irritable bowel syndrome patients: a molecular approach. *Clin. Exp. Gastroenterol.* **2015**, *8*, 309–25, doi:10.2147/CEG.S89999.
 151. Ishikawa, D.; Sasaki, T.; Osada, T.; Kuwahara-Arai, K.; Haga, K.; Shibuya, T.; Hiramatsu, K.; Watanabe, S. Changes in Intestinal Microbiota Following Combination Therapy with Fecal Microbial Transplantation and Antibiotics for Ulcerative Colitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2017**, *23*, 116–125, doi:10.1097/MIB.0000000000000975.
 152. Imdad A, Nicholns MR, Tanner-Smith EE, Zackular JP, Gomez-Duarte OG, Beaulieu DB, A. S. Fecal transplantation for treatment of inflammatory bowel disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, *2017*, CD012774, doi:http://dx.doi.org/10.1002/14651858.CD012774.
 153. Burisch, J.; Jess, T.; Martinato, M.; Lakatos, P. L.; ECCO -EpiCom The burden of inflammatory bowel disease in Europe. *J. Crohn's Colitis* **2013**, *7*, 322–337, doi:10.1016/j.crohns.2013.01.010.
 154. Ng, S. C.; Shi, H. Y.; Hamidi, N.; Underwood, F. E.; Tang, W.; Benchimol, E. I.; Panaccione, R.; Ghosh, S.; Wu, J. C. Y.; Chan, F. K. L.; Sung, J. J. Y.; Kaplan, G. G. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies. *Lancet (London, England)* **2018**, *390*, 2769–2778, doi:10.1016/S0140-6736(17)32448-0.
 155. Kostic, Aleksandar D., Xavier J. Ramink, G. D. The Microbiome in Inflammatory Bowel Diseases: Current Status and the Future Ahead. **2014**, *146*, 1489–1499, doi:10.1053/j.gastro.2014.02.009.The.
 156. Machiels, K.; Joossens, M.; Sabino, J.; De Preter, V.; Arijis, I.; Eeckhaut, V.; Ballet, V.; Claes, K.; Van Immerseel, F.; Verbeke, K.; Ferrante, M.; Verhaegen, J.; Rutgeerts, P.; Vermeire, S. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* **2014**, *63*, 1275–1283, doi:10.1136/gutjnl-2013-304833.
 157. Mohammed Vashist N, Samaan M, Mosli MH, Parker CE, MacDonald JK, Nelson SA, Zou GY, Feagan BG, Khanna R, J. V Endoscopic scoring indices for evaluation of disease activity in ulcerative colitis. *Cochrane Database Syst. Rev.* **2018**, doi:10.1002/14651858.CD010642.pub2.www.cochranelibrary.com.
 158. Travis, S. P. L.; Higgins, P. D. R.; Orchard, T.; Van Der Woude, C. J.; Panaccione, R.; Bitton, A.; O'Morain, C.; Panés, J.; Sturm, A.; Reinisch, W.; Kamm, M. A.; D'Haens, G. Review article: defining remission in ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2011**, *34*, 113–

124, doi:10.1111/j.1365-2036.2011.04701.x.

159. Food and Drug Administration Ulcerative Colitis: Clinical Trial Endpoints. **2016**, 1–19.
160. Ma, C.; Panaccione, R.; Fedorak, R. N.; Parker, C. E.; Nguyen, T. M.; Khanna, R.; Siegel, C. A.; Peyrin-Biroulet, L.; D’Haens, G.; Sandborn, W. J.; Feagan, B. G.; Jairath, V. Heterogeneity in Definitions of Endpoints for Clinical Trials of Ulcerative Colitis: A Systematic Review for Development of a Core Outcome Set. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *16*, 637–647.e13, doi:10.1016/j.cgh.2017.08.025.
161. Su, C.; Lewis, J. D.; Goldberg, B.; Brensinger, C.; Lichtenstein, G. R. A Meta-Analysis of the Placebo Rates of Remission and Response in Clinical Trials of Active Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* **2007**, *132*, 516–526, doi:10.1053/j.gastro.2006.12.037.
162. Sood, A.; Midha, V.; Makharia, G. K.; Ahuja, V.; Singal, D.; Goswami, P.; Tandon, R. K. The Probiotic Preparation, VSL#3 Induces Remission in Patients With Mild-to-Moderately Active Ulcerative Colitis. *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* **2009**, *7*, 1202–1209.e1, doi:10.1016/j.cgh.2009.07.016.
163. Huynh, H. Q.; deBruyn, J.; Guari, L.; Diaz, H.; Li, M.; Girgis, S.; Turner, J.; Fedorak, R.; Madsen, K. Probiotic preparation VSL#3 induces remission in children with mild to moderate acute ulcerative colitis: A pilot study. *Inflamm. Bowel Dis.* **2009**, *15*, 760–768, doi:10.1002/ibd.20816.
164. Miele, E.; Pascarella, F.; Giannetti, E.; Quaglietta, L.; Baldassano, R. N.; Staiano, A. Effect of a Probiotic Preparation (VSL#3) on Induction and Maintenance of Remission in Children With Ulcerative Colitis. *Am. J. Gastroenterol.* **2009**, *104*, 437–443, doi:10.1038/ajg.2008.118.
165. Petersen, A. M.; Mirsepasi, H.; Halkjær, S. I.; Mortensen, E. M.; Nordgaard-Lassen, I.; Kroghfelt, K. A. Ciprofloxacin and probiotic *Escherichia coli* Nissle add-on treatment in active ulcerative colitis: A double-blind randomized placebo controlled clinical trial. *J. Crohn’s Colitis* **2014**, *8*, 1498–1505, doi:10.1016/j.crohns.2014.06.001.
166. Cooney, R. M.; Warren, B. F.; Altman, D. G.; Abreu, M. T.; Travis, S. P. Outcome measurement in clinical trials for ulcerative colitis: towards standardisation. *Trials* **2007**, *8*, 17, doi:10.1186/1745-6215-8-17.
167. Schroeder, K. W.; Tremaine, W. J.; Ilstrup, D. M. Coated Oral 5-Aminosalicylic Acid Therapy for Mildly to Moderately Active Ulcerative Colitis. *N. Engl. J. Med.* **1987**, *317*, 1625–1629, doi:10.1056/NEJM198712243172603.
168. Sutherland, L. R.; Martin, F.; Greer, S.; Robinson, M.; Greenberger, N.; Saibil, F.; Martin, T.; Sparr, J.; Prokipchuk, E.; Borgen, L. 5-Aminosalicylic acid enema in the treatment of distal ulcerative colitis, proctosigmoiditis, and proctitis. *Gastroenterology* **1987**, *92*, 1894–1898, doi:S0016508587001811 [pii].
169. Rachmilewitz, D. Coated mesalazine (5-aminosalicylic acid) versus sulphasalazine in the treatment of active ulcerative colitis: a randomised trial. *BMJ* **1989**, *298*, 82–86, doi:10.1136/bmj.298.6666.82.
170. Walmsley, R. S.; Ayres, R. C.; Pounder, R. E.; Allan, R. N. A simple clinical colitis activity index. *Gut* **1998**, *43*, 29–32, doi:10.1136/gut.43.1.29.
171. Derwa, Y.; Gracie, D. J.; Hamlin, P. J.; Ford, A. C. Systematic review with meta-analysis: the efficacy of probiotics in inflammatory bowel disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2017**, *46*, 389–400, doi:10.1111/apt.14203.

172. Ganji-Arjenaki, M.; Rafieian-Kopaei, M. Probiotics are a good choice in remission of inflammatory bowel diseases: A meta analysis and systematic review. *J. Cell. Physiol.* **2018**, *233*, 2091–2103, doi:10.1002/jcp.25911.
173. Jitsumura, M.; Kokelaar, R. F.; Harris, D. A. Remission endpoints in ulcerative colitis: A systematic review. *World J. Meta-Analysis* **2017**, *5*, 85, doi:10.13105/wjma.v5.i4.85.
174. Triantafillidis, J. K.; Merikas, E.; Georgopoulos, F. Current and emerging drugs for the treatment of inflammatory bowel disease. *Drug Des. Devel. Ther.* **2011**, *5*, 185–210, doi:10.2147/DDDT.S11290.
175. Ahluwalia, B.; Moraes, L.; Magnusson, M. K.; Öhman, L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand. J. Gastroenterol.* **2018**, *53*, 379–389, doi:10.1080/00365521.2018.1447597.
176. Longobardi, T.; Jacobs, P.; Bernstein, C. N. Utilization of health care resources by individuals with inflammatory bowel disease in the United States: a profile of time since diagnosis. *Am. J. Gastroenterol.* **2004**, *99*, 650–5, doi:10.1111/j.1572-0241.2004.04132.x.
177. Shen, Z.-H.; Zhu, C.-X.; Quan, Y.-S.; Yang, Z.-Y.; Wu, S.; Luo, W.-W.; Tan, B.; Wang, X.-Y. Relationship between intestinal microbiota and ulcerative colitis: Mechanisms and clinical application of probiotics and fecal microbiota transplantation. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *24*, 5–14, doi:10.3748/wjg.v24.i1.5.
178. Ohkusa, T.; Koido, S. Intestinal microbiota and ulcerative colitis. *J. Infect. Chemother.* **2015**, *21*, 761–768, doi:10.1016/j.jiac.2015.07.010.
179. Zhang, M.; Sun, K.; Wu, Y.; Yang, Y.; Tso, P.; Wu, Z. Interactions between Intestinal microbiota and host immune response in inflammatory bowel disease. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1–13, doi:10.3389/fimmu.2017.00942.
180. Prosberg, M.; Bendtsen, F.; Vind, I.; Petersen, A. M.; Gluud, L. L. The association between the gut microbiota and the inflammatory bowel disease activity: a systematic review and meta-analysis. *Scand. J. Gastroenterol.* **2016**, *51*, 1407–1415, doi:10.1080/00365521.2016.1216587.
181. S.J., O.; S., P.; A., H.; A., B.; A., R.; M.A., K.; S., S. Dynamics of the mucosa-associated flora in ulcerative colitis patients during remission and clinical relapse. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 3510–3513, doi:10.1128/JCM.01512-08.
182. Shen, J.; Zuo, Z.-X.; Mao, A.-P. Effect of Probiotics on Inducing Remission and Maintaining Therapy in Ulcerative Colitis, Crohn's Disease, and Pouchitis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2014**, *20*, 21–35, doi:10.1097/O1.MIB.0000437495.30052.be.
183. Rowan, F.; Docherty, N. G.; Murphy, M.; Murphy, B.; Coffey, J. C.; O'Connell, P. R. Desulfovibrio Bacterial Species Are Increased in Ulcerative Colitis. *Dis. Colon Rectum* **2010**, *53*, 1530–1536, doi:10.1007/DCR.0b013e3181f1e620.
184. Sasaki, M.; Klapproth, J.-M. A. The Role of Bacteria in the Pathogenesis of Ulcerative Colitis. *J. Signal Transduct.* **2012**, *2012*, 1–6, doi:10.1155/2012/704953.
185. Haskey, N.; Gibson, D. L. An Examination of Diet for the Maintenance of Remission in Inflammatory Bowel Disease. *Nutrients* **2017**, *9*, doi:10.3390/nu9030259.
186. Mardini, H. E.; Grigorian, A. Y. Probiotic mix VSL#3 is effective adjunctive therapy for mild to moderately active ulcerative colitis: A meta-analysis. *Inflamm. Bowel Dis.* **2014**, *20*, 1562–1567, doi:10.1097/MIB.0000000000000084.

187. Losurdo, G.; Iannone, A.; Contaldo, A.; Ierardi, E.; Leo, A. Di; Principi, M. Escherichia coli Nissle 1917 in ulcerative colitis treatment: Systematic review and meta-analysis. *J. Gastrointest. Liver Dis.* **2015**, *24*, 499–505, doi:10.15403/jgld.2014.1121.244.ecn.
188. McFarland, L. V.; Evans, C. T.; Goldstein, E. J. C. Strain-Specificity and Disease-Specificity of Probiotic Efficacy: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front. Med.* **2018**, *5*, 124, doi:10.3389/fmed.2018.00124.
189. De Filippo, C.; Cavalieri, D.; Di Paola, M.; Ramazzotti, M.; Poullet, J. B.; Massart, S.; Collini, S.; Pieraccini, G.; Lionetti, P. 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.* **2010**, *107*, 14691–6, doi:10.1073/pnas.1005963107.
190. O’Keefe, S. J. D.; Li, J. V.; Lahti, L.; Ou, J.; Carbonero, F.; Mohammed, K.; Posma, J. M.; Kinross, J.; Wahl, E.; Ruder, E.; Vipperla, K.; Naidoo, V.; Mtshali, L.; Tims, S.; Puylaert, P. G. B.; DeLany, J.; Krasinskas, A.; Benefiel, A. C.; Kaseb, H. O.; Newton, K.; Nicholson, J. K.; de Vos, W. M.; Gaskins, H. R.; Zoetendal, E. G. Fat, fibre and cancer risk in African Americans and rural Africans. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6342, doi:10.1038/ncomms7342.
191. So, D.; Whelan, K.; Rossi, M.; Morrison, M.; Holtmann, G.; Kelly, J. T.; Shanahan, E. R.; Staudacher, H. M.; Campbell, K. L. Dietary fiber intervention on gut microbiota composition in healthy adults: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* **2018**, *107*, 1–19, doi:10.1093/ajcn/nqy041.
192. Zocco, M. A.; Dal Verme, L. Z.; Cremonini, F.; Piscaglia, A. C.; Nista, E. C.; Candelli, M.; Novi, M.; Rigante, D.; Cazzato, I. A.; Ojetti, V.; Armuzzi, A.; Gasbarrini, G.; Gasbarrini, A. Efficacy of Lactobacillus GG in maintaining remission of ulcerative colitis. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **2006**, *23*, 1567–1574, doi:10.1111/j.1365-2036.2006.02927.x.
193. Guslandi, M.; Giollo, P.; Testoni, P. a. A pilot trial of Saccharomyces boulardii in ulcerative colitis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* **2003**, *15*, 697, doi:10.1097/01.meg.0000059138.68845.06.
194. Duranti, S.; Gaiani, F.; Mancabelli, L.; Milani, C.; Grandi, A.; Bolchi, A.; Santoni, A.; Lugli, G. A.; Ferrario, C.; Mangifesta, M.; Viappiani, A.; Bertoni, S.; Vivo, V.; Serafini, F.; Barbaro, M. R.; Fugazza, A.; Barbara, G.; Gioiosa, L.; Palanza, P.; Cantoni, A. M.; de’ Angelis, G. L.; Barocelli, E.; de’ Angelis, N.; van Sinderen, D.; Ventura, M.; Turrone, F. Elucidating the gut microbiome of ulcerative colitis: Bifidobacteria as novel microbial biomarkers. *FEMS Microbiol. Ecol.* **2016**, *92*, 1–12, doi:10.1093/femsec-fiw191.
195. Furrie, E. Synbiotic therapy (Bifidobacterium longum/Synergy 1) initiates resolution of inflammation in patients with active ulcerative colitis: a randomised controlled pilot trial. *Gut* **2005**, *54*, 242–249, doi:10.1136/gut.2004.044834.
196. Jadad, A. R.; Moore, R. A.; Carroll, D.; Jenkinson, C.; Reynolds, D. J. M.; Gavaghan, D. J.; McQuay, H. J. Assessing the quality of reports of randomized clinical trials: Is blinding necessary? *Control. Clin. Trials* **1996**, *17*, 1–12, doi:10.1016/0197-2456(95)00134-4.
197. El Hage, R.; Hernandez-Sanabria, E.; Van de Wiele, T. Emerging Trends in “Smart Probiotics”: Functional Consideration for the Development of Novel Health and Industrial Applications. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 1889, doi:10.3389/fmicb.2017.01889.
198. Fehlbaum, S.; Prudence, K.; Kieboom, J.; Heerikhuisen, M.; van den Broek, T.; Schuren, F. H. J.; Steinert, R. E.; Raederstorff, D. In vitro fermentation of selected prebiotics and their effects on the composition and activity of the adult gut microbiota. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19103097.

199. SIMPSON, E. H. Measurement of Diversity. *Nature* **1949**, *163*, 688–688, doi:10.1038/163688a0.
200. Shannon, C. E. A Mathematical Theory of Communication. *Bell Syst. Tech. J.* **1948**, *27*, 379–423.
201. Jefferson, A.; Adolphus, K. The Effects of Intact Cereal Grain Fibers, Including Wheat Bran on the Gut Microbiota Composition of Healthy Adults: A Systematic Review. *Front. Nutr.* **2019**, *6*, doi:10.3389/fnut.2019.00033.
202. Van Den Abbeele, P.; Grootaert, C.; Marzorati, M.; Possemiers, S.; Verstraete, W.; Gérard, P.; Rabot, S.; Bruneau, A.; Aidy Ei, S.; Derrien, M.; Zoetendal, E.; Kleerebezem, M.; Smidt, H.; Van De Wiele, T. Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for bacteroidetes and Clostridium cluster IX. *Appl. Environ. Microbiol.* **2010**, *76*, 5237–5246, doi:10.1128/AEM.00759-10.
203. Valcheva, R.; Koleva, P.; Martínez, I.; Walter, J.; Gänzle, M. G.; Dieleman, L. A. Inulin-type fructans improve active ulcerative colitis associated with microbiota changes and increased short-chain fatty acids levels. *Gut Microbes* **2019**, *10*, 334–357, doi:10.1080/19490976.2018.1526583.
204. Rodríguez, J. M.; Murphy, K.; Stanton, C.; Ross, R. P.; Kober, O. I.; Juge, N.; Avershina, E.; Rudi, K.; Narbad, A.; Jenmalm, M. C.; Marchesi, J. R.; Collado, M. C. The composition of the gut microbiota throughout life, with an emphasis on early life. *Microb. Ecol. Heal. Dis.* **2015**, *26*, 26050, doi:10.3402/mehd.v26.26050.
205. Carding, S.; Verbeke, K.; Vipond, D. T.; Corfe, B. M.; Owen, L. J. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2015**, *26*, 26191, doi:10.3402/mehd.v26.26191.