



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
FACULTAD DE QUÍMICA
INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD – BIOQUÍMICA CLÍNICA

“IDENTIFICACIÓN DE SUJETOS CON SÍNDROME DE INTESTINO IRRITABLE RESPONDEDORES A UNA DIETA CON BAJO CONTENIDO EN FODMAPS MEDIANTE LA CARACTERIZACIÓN DE LA MICROBIOTA INTESTINAL Y MARCADORES INFLAMATORIOS SÉRICOS.”

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN CLÍNICA EXPERIMENTAL EN SALUD

PRESENTA:
JESSICA FERNANDA VALDEZ PALOMARES

Directora de Tesis
Dra. Berenice Palacios González
Instituto Nacional de Medicina Genómica

Ciudad Universitaria, Ciudad de México. Agosto, 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Vinculación Científica de la Facultad de Medicina UNAM-INMEGEN del Instituto Nacional de Medicina Genómica, México, bajo la dirección de la Dra. Berenice Palacios González.

La alumna fue becaria del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) durante el periodo de Julio de 2017 a Julio de 2019.

AGRADECIMIENTOS

Primero a mi amada madre, quién cuidó mis desvelos antes que los propios, procuró mi educación y puso comida en mi plato, mientras perseguía mis sueños, todo lo que puedo llegar a ser es un reflejo de tu esfuerzo. Segundo a la Dra. Berenice Palacios González, mi tutor y gran ejemplo, quién depositó en mí su confianza para la realización de este proyecto y guió mi camino usando la pasión por la ciencia como una vela en la oscuridad, y me alentó a imprimir el corazón en mi trabajo y todo lo que hago. A la Dra. Noemí Meraz, al Dr. Rafael Nambo y la Dra. María del Carmen García de León, por el apoyo incondicional y haber sido parte indispensable en mi formación académica. A todos los colegas que crucé en mi estancia en el INMEGEN y con quienes trabajé codo a codo, especialmente a Jaime y Melissa, mis hermanos académicos, por el apoyo recibido y los buenos consejos. A mis entrañables amigas Itamar, Fabiana y Laura presentes conmigo a lo largo de este proceso, por su amistad incondicional y por recordarme el valor de mi esfuerzo y sus gratas recompensas. A mi pareja Stephania, porqué en lo adverso en sus brazos recibí motivación y consuelo, pero especialmente porqué ese amor inmenso que nos tenemos ha sido combustible alimentando el motor de mis anhelos. Agradezco al resto de mi familia y amigos, por augurarme buena fortuna en la vida académica. Finalmente agradezco profundamente a mi casa de estudios La Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto Nacional de Medicina Genómica, por haberme brindado la preparación académica, conocimientos y herramientas tecnológicas que me fueron necesarias para la realización de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
3.	MARCO TEÓRICO.....	3
3.1.	Síndrome de Intestino Irritable	3
3.1.1.	Aspectos epidemiológicos.....	4
3.2.	Fisiopatología	5
3.3.	Microbiota intestinal humana.....	6
3.3.1.	Disbiosis intestinal.....	7
3.3.2.	Interacción bacteria-anfitrión.	8
3.3.3.	Gen ribosomal 16S rRNA y su utilidad en la identificación de bacterias y comunidades microbianas.....	9
3.4.	Sistema inmune en el TGI.....	10
3.5.	Inflamación intestinal crónica en pacientes con SII	11
3.6.	Abordaje dieto-terapéutico en el SII.....	13
3.6.1.	FODMAPs	13
3.6.2.	Mecanismo de acción de los FODMAPs	14
3.6.3.	Dieta baja en FODMAPs	16
3.6.4.	Tipo de respuesta a la dieta baja en FODMAPs	18
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
5.	JUSTIFICACIÓN	20
6.	HIPÓTESIS.....	20
7.	OBJETIVO GENERAL.....	20
8.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
9.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
9.1.	Criterios de Inclusión.....	21
9.2.	Criterios de exclusión	21

9.3.	Criterios de eliminación	21
9.4.	Diseño experimental	21
9.5.	Cálculo de la muestra	22
9.6.	Diagrama de flujo	22
10.	ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS	23
10.1.	Química clínica y determinación de citocinas.	23
10.2.	Escala Análoga Visual.	23
10.3.	Evaluación del estado de Nutrición.....	23
10.4.	Análisis de la dieta.....	24
10.5.	Purificación de DNA bacteriano, amplificación y secuenciación.....	24
10.6.	Aspectos éticos.....	25
11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
11.1.	Análisis bioinformático.....	26
11.2.	Análisis estadístico.	27
12.	RESULTADOS	27
12.1.	Características de la muestra	27
12.2.	Análisis de la dieta.....	30
12.2.1.	Ingesta calórica y consumo de macronutrientos	31
12.2.2.	Consumo de micronutrientos en RP y NR antes y después de la DBF.	31
12.3.	Comparación de la microbiota intestinal de los pacientes respondedores y los no respondedores antes de la intervención.	33
12.3.1.	Composición a nivel de Filo.....	34
12.3.2.	Composición a nivel de género	35
12.3.3.	Análisis del tamaño del efecto del LDA (LefSe).....	37
12.4.	Marcadores inflamatorios séricos antes y después de la DBF.	37
12.5.	Análisis de Componentes Principales y Análisis Discriminante Lineal	39
13.	DISCUSIÓN.....	42
14.	CONCLUSIONES	47
15.	LIMITANTES Y PERSPECTIVAS	48
16.	REFERENCIAS.....	49
17.	ANEXOS	56

1. RESUMEN

El síndrome del intestino irritable (SII), es un desorden gastrointestinal (GI), con alta prevalencia en México. El SII se caracteriza por dolor abdominal y alteraciones en la frecuencia y tipo de deposiciones. La etiología del SII es multifactorial. Entre los posibles factores que contribuyen al SII existen, la susceptibilidad genética, los desencadenantes ambientales, el sistema nervioso central, el sistema nervioso entérico (SNE), sistema entero endocrino, el sistema inmune y la microbiota intestinal. Por otro lado, el consumo de una dieta con alto contenido de FODMAPs (por sus siglas en inglés *Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides, and Polyols*), se ha señalado como un factor implicado en el desarrollo de los síntomas del SII. La dieta baja en FODMAPs, ha sido introducida como un tratamiento utilizado con la finalidad de reducir la severidad de los síntomas que caracterizan al síndrome. Sin embargo, aunque la dieta ha demostrado ser efectiva al disminuir la gravedad de los síntomas, existe una proporción de estos pacientes que tiene nula o poca respuesta a dicho tratamiento dieto-terapéutico.

El objetivo de este proyecto fue identificar a pacientes con SII respondedores y no respondedores a una dieta baja en FODMAPs (DBF) de cuatro semanas, mediante la determinación de marcadores inflamatorios séricos y la caracterización de la microbiota intestinal.

Se incluyeron 32 participantes con SII, de los cuales 29 fueron mujeres (90.62%) y 3 hombres (9.37%). Se clasificó a los participantes como respondedores o no respondedores de acuerdo con los valores registrados en una Escala Visual Análoga para SII, al término de la DBF. El 68.75% de los participantes fueron respondedores (RP: n=22) y el 31.25 fueron No Respondedores (NR: n=10). Se evaluó la composición de la microbiota fecal, mediante secuenciación del gen 16S rRNA, usando la metodología de segunda generación de Illumina. Y se determinaron las concentraciones de marcadores inflamatorios séricos mediante un ensayo multiplex con la tecnología de perlas magnéticas de Millipore.

Se encontraron cinco filotipos a nivel de género como posibles biomarcadores que permiten distinguir la microbiota intestinal entre los pacientes RP y NR a la DBF. Cuatro de los filotipos identificados en RP, fueron *Clostridium*, *Haemophilus*, y dos géneros no identificados de las familias Pasteurellaceae y Lachnospiraceae. Por otro lado, en los sujetos NR se identificó al género *Dorea*. Respecto a los marcadores inflamatorios se encontraron diferencias en la concentración de IL-8, la cual fue mayor en el grupo NR respecto al grupo de RP antes de la dieta baja en FODMAPs.

Los resultados indican que la composición de la microbiota intestinal y el medio inflamatorio mediado por citocinas, podría influir potencialmente al tipo de respuesta ante la restricción de FODMAPs en la dieta, y sugieren que la evaluación de la microbiota intestinal podría ser investigada como una herramienta clínica para la identificación de pacientes que respondan al manejo nutricional/nutricio.

2. INTRODUCCIÓN

El síndrome del intestino irritable, (SII) es uno de los desórdenes gastrointestinales (GI) más comunes (1), afecta del 5 al 10% de la población mundial (2) y su prevalencia en México, se encuentra entre 16% y 35% (3). Se caracteriza por dolor abdominal y alteraciones en la frecuencia y tipo de deposiciones (4), se diagnostica según los criterios de Roma IV, actualizados recientemente a partir de los criterios de Roma III (5). Existen tres subtipos descritos: diarrea (SII-D), constipación (SII-C) y mixto (SII-M). El SII se presenta principalmente en adultos jóvenes y se identifica con mayor frecuencia en mujeres (6). Las discrepancias en su diagnóstico y tratamiento se deben a la ausencia de un mecanismo conocido que unifique y explique su etiología y fisiopatología y a la heterogeneidad entre subtipos. Entre los posibles factores que contribuyen a la aparición y mantenimiento del SII existen, la susceptibilidad genética, los desencadenantes ambientales, la relación bidireccional del sistema nervioso central y entérico (SNE), alteraciones del sistema enteroendocrino, del sistema inmune (4) y la microbiota intestinal (1). Para entender el papel de la microbiota intestinal en la fisiopatología del SII, se han propuesto distintos mecanismos, uno de estos señala, que las alteraciones en su composición y actividad metabólica activan la respuesta inmune en la mucosa intestinal, sumándose a la disfunción de la barrera epitelial e incremento en la permeabilidad intestinal (7).

Por otro lado, la interacción entre la dieta, la microbiota intestinal y la biología del anfitrión puede interpretarse como una importante base fisiopatológica para la generación de los síntomas. Los hidratos de carbono de cadena corta fermentables (FODMAPs) que comprenden a los: Fructooligosacáridos, Oligosacáridos, Disacáridos, Monosacáridos y Alcoholes Polihídricos se asocian con la aparición y la severidad de los síntomas del SII, y su restricción con su alivio (8). Se sugiere que los FODMAPs modulan la composición y la actividad metabólica de la microbiota intestinal, mediando cambios en la activación de las células del sistema inmune. Anteriormente se ha pensado que composición de la microbiota intestinal en los pacientes con SII podría estar vinculada al grado de respuesta a la dieta baja en FODMAPs (9).

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Síndrome de Intestino Irritable

El Síndrome de Intestino Irritable (SII) es un Trastorno Intestinal Funcional (TIF), en el que aparece dolor abdominal asociado a la defecación y/o cambios asociados a los hábitos intestinales (10) sin signos de alerta como sangrado en heces o pérdida de peso (11).

El SII es un trastorno intestinal funcional recidivante, definido por criterios diagnósticos basados en síntomas, en ausencia de causas orgánicas detectables. El cuadro sintomático no es específico del SII, ya que sus síntomas pueden aparecer de vez en cuando en casi cualquier individuo, por lo tanto, se ha subrayado la naturaleza crónica y con recaídas del SII, proponiendo criterios diagnósticos basados en la tasa de aparición y duración de los síntomas (10).

Los criterios de Roma para el diagnóstico del SII, con sus cuatro versiones diferentes (Roma I, II, III y IV) han sido ampliamente divulgados. Estos últimos comprenden:

- 1) Aparición de los síntomas 6 meses antes del diagnóstico y estar presentes durante los últimos 3 meses.
- 2) Dolor abdominal recurrente, al menos un día por semana –en promedio- en los últimos 3 meses asociado con dos o más de los siguientes criterios:
 - a) Relacionado con la defecación.
 - b) Relacionado a un cambio en la frecuencia de las heces.
 - c) Asociado a un cambio de la forma (aspecto de las heces).

Para definir los diferentes subtipos de SII, el profesional de la salud debe apoyarse en la Escala de Bristol para la forma de las heces (**ANEXO 1**). Los subtipos definidos con dicha escala comprenden:

- 1) SII con predominio de estreñimiento (SII-E): Más de una cuarta parte (25%) de las deposiciones tienen heces con forma tipo 1 o 2 de Bristol (deposiciones duras), y menos de una cuarta parte, heces con forma 6 o 7 (deposiciones disminuidas en consistencia).
- 2) SII con predominio de diarrea (SII-D): más de una cuarta parte (25%) de las deposiciones tienen heces con forma tipo 6 o 7 de Bristol, y menos de una cuarta parte, heces con forma 1 o 2.
- 3) SII con hábito intestinal mixto (SII-M): más de una cuarta parte (25%) de las deposiciones tienen heces con forma tipo 1 o 2 de Bristol y más de una cuarta parte, heces con forma 6 o 7.

- 4) SII no clasificable (SII-NC): pacientes con SII cuyos hábitos intestinales no satisfacen los criterios para clasificarse dentro de las categorías anteriores (12). Sin embargo, debe recordarse que los pacientes frecuentemente hacen una transición entre los diferentes subtipos. Los síntomas de diarrea y estreñimiento frecuentemente son mal interpretados en los pacientes con SII. Por ende, muchos pacientes con SII que se quejan de “diarrea” se refieren a deposiciones frecuentes de heces formadas, y en la misma población de pacientes “estreñimiento” puede referirse a cualquiera de las variedades de quejas asociadas con intentos de defecación y no simplemente a movimientos intestinales infrecuentes. Además, se deben evaluar los hábitos intestinales sin utilizar antidiarreicos o laxantes.

Teniendo en cuenta el predominio de los síntomas de los pacientes y los factores precipitantes, también se puede subclasificar al SII en:

- SII con disfunción intestinal predominante.
- SII con dolor predominante.
- SII con distensión predominante.
- SII post-infeccioso (SII-PI).
- SII Inducido por alimentos (inducido por las comidas).
- SII Vinculado al estrés.

Sin embargo, con la excepción del SII-PI, que en general está bien caracterizado, la pertinencia de cualquiera de estas clasificaciones sobre el pronóstico o la respuesta al tratamiento con SII sigue siendo indefinido (10).

3.1.1 Aspectos epidemiológicos

El cuadro general de la prevalencia del SII dista de ser completo, al existir varias regiones del mundo en las que no se dispone de datos epidemiológicos. A menudo es problemático hacer comparaciones entre las regiones debido al uso de diferentes criterios diagnósticos. Además de otros factores como la selección de la población, exclusión o inclusión de procesos comórbidos y acceso a la atención médica. Sin embargo, estudios poblacionales estiman la prevalencia mundial entre 10-20% y la incidencia anual entre 1-2% (2). La prevalencia del SII en Europa y América del Norte está estimada en 10-15%. La prevalencia informada del SII en México varía del 4.4 al 35%. Esta amplia variación en los resultados epidemiológicos en nuestro país podría explicarse fundamentalmente, por los criterios empleados para definir la presencia del SII. Algunos estudios han señalado que los

cuestionarios de Roma III en la comunidad parecen tener una baja sensibilidad para identificar casos de SII (13-15). Acorde con lo anterior, se ha informado una prevalencia del 4.4% utilizando los criterios de Roma III, que contrasta con prevalencias de 16% a 35% en estudios que usaron los criterios Roma II. Sin embargo, los datos disponibles sugieren que la prevalencia es bastante similar en muchos países, pese a importantes diferencias en el estilo de vida. En un estudio multicéntrico en medicina particular, se estimó la prevalencia de los diferentes subtipos de SII y sus características clínicas. Concluyeron que, en México, de acuerdo con Roma III, el subtipo más frecuente es el SII-M (48.4%) y se asocia con síntomas dispépticos, seguido del SII-E (43.0%) con síntomas del tracto de salida, mientras que el menos frecuente es el SII-D (5.6%) con síntomas de incontinencia fecal, este último con mayor probabilidad que los demás, de presentarse en hombres. Finalmente, llama la atención que en este estudio las mujeres constituyeron 76.8%, para una relación de 3.3:1 respecto a los hombres (16). La primera presentación de pacientes a un médico habitualmente es en el grupo etario de 30–50 años. La prevalencia es mayor en mujeres (10).

3.2. Fisiopatología

El SII es un desorden de patogénesis y fenotipo clínico heterogéneo en el que múltiples factores conllevan al riesgo de desarrollar o perpetuar el síndrome. Teorías tradicionales relacionadas a la fisiopatología del síndrome lo consideraban una anomalía en las interacciones del eje cerebro-intestino y lo visualizan como un complejo de tres partes, compuesto por alteraciones de la motilidad gastrointestinal, hiperalgesia o hipersensibilidad visceral y psicopatología o estresores psicológicos (17). Sin embargo, evidencia reciente implica otro grupo de factores como potencialmente importantes para el desarrollo del SII, incluyendo, alteraciones en la activación inmune, incremento en la permeabilidad intestinal y a la microbiota intestinal (18).

Actualmente, se ha demostrado que la interacción entre la microbiota intestinal y el anfitrión tiene influencia sobre la manifestación de los síntomas (9) y podría ser un importante factor implicado en la etiología del SII (11). La evidencia más sólida se deriva de observaciones clínicas y epidemiológicas donde un número sustancial de pacientes con SII informan del inicio de sus síntomas gastrointestinales crónicos después de un episodio de gastroenteritis. Por otro lado, se han reportado diferencias claras en la composición de la microbiota intestinal entre pacientes con SII y controles sanos, caracterizadas por aumento en los taxones asociados con Firmicutes y una disminución en los taxones asociados con Bacteroidetes (19).

Teniendo en cuenta la complejidad del tracto gastrointestinal (TGI), padecimientos como el SII son probablemente afecciones multifactoriales y no son causadas por un solo mecanismo (Figura 1), lo que podría explicar por qué se ha avanzado poco en revelar la etiología y la patología de esta enfermedad y el desarrollo de opciones terapéuticas para el SII.

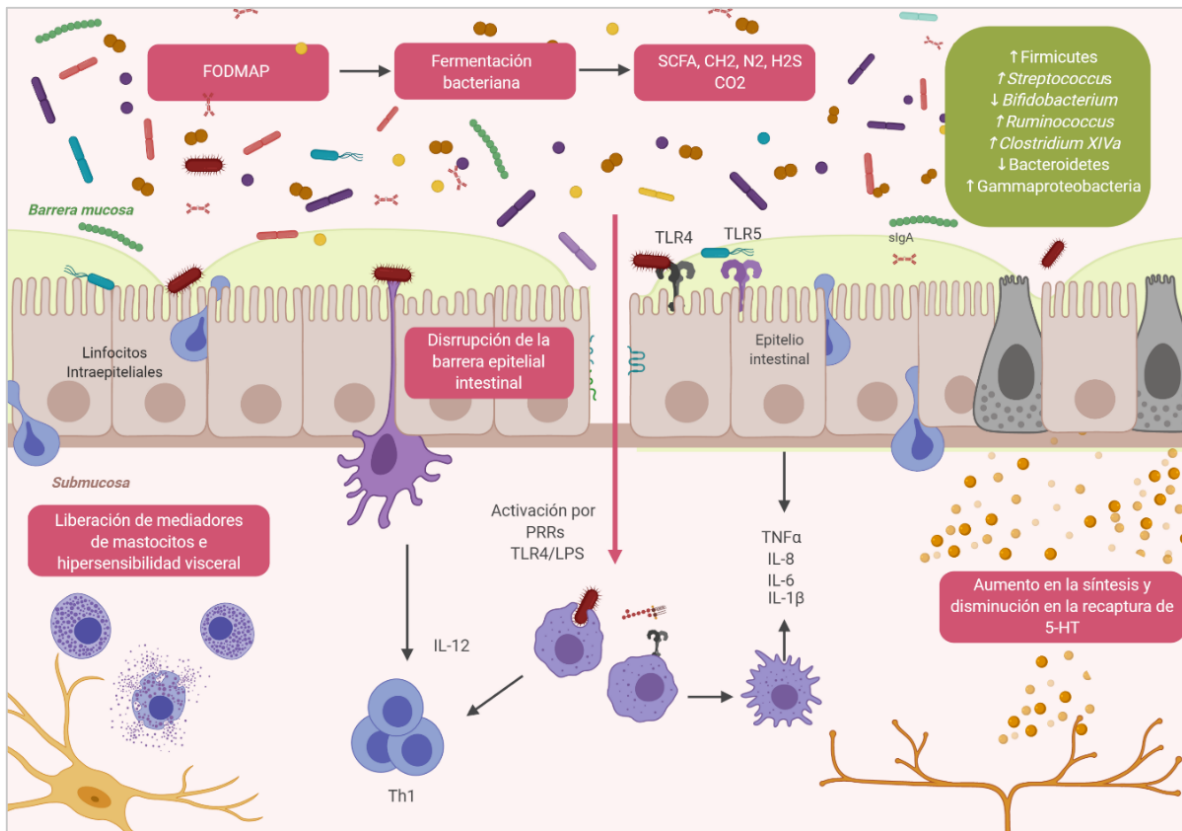


Figura 1. Factores periféricos involucrados en la fisiopatología del SII. Varios factores, como la alteración de la composición de la microbiota intestinal, junto con el aumento de la permeabilidad intestinal, un cambio en el equilibrio del sistema entero endócrino y el sistema inmunitario en el intestino, contribuyen al desarrollo del SII. Alteraciones en la composición de microbiota intestinal podrían conducir al desequilibrio de la barrera intestinal, y de los sistemas entero endócrino e inmunitario, que, a través de las interacciones con el sistema nervioso, pueden conducir a la generación de síntomas. Abreviaturas: TLR: Toll Like Receptor; LPS Lipopolisacárido; Treg: Linfocito T regulador. SCFA Short Chain Fatty Acids 5-HT, 5-hidroxitriptamina; sigA, inmunoglobulina

3.3. Microbiota intestinal humana

La palabra "microbioma" fue acuñada por primera vez por el biólogo molecular, Dr. Joshua Lederberg, para referirse a la comunidad ambiental y biológica de microorganismos comensales, simbióticos y patógenos que comparten el espacio del cuerpo humano (20).

La microbiota consiste en una comunidad microbiana de múltiples especies, que viven en un nicho particular, en mutua sinergia con el organismo anfitrión. Además de las bacterias, la microbiota incluye hongos, arqueas y protozoos, a los que se agregan bacteriófagos y virus, que parecen ser incluso más numerosos que las células bacterianas. La microbiota intestinal se compone principalmente de los filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria, Verrucomicrobia, y Proteobacteria (21).

En el estudio del ecosistema microbiano en el intestino, se acepta universalmente que para alcanzar un estado de salud adecuado es necesario tener también una microbiota «sana». Los cambios en la abundancia relativa de diversos microorganismos que residen en el intestino, tanto comensales, como los que se consideran patógenos, se han asociado con una gran variedad de enfermedades (22). Existe un número creciente de asociaciones entre el desequilibrio de la microbiota y diversas enfermedades, desde infecciones por patógenos, hasta desequilibrios más difíciles de encontrar en el contexto de enfermedades inflamatorias del intestino, síndrome metabólico y SII (22).

3.3.1. Disbiosis intestinal.

La forma en la que la microbiota intestinal interactúa con el anfitrión humano es mutualista. La literatura biomédica usualmente describe a los miembros del microbioma bacteriano intestinal como comensales; sin embargo, esta relación resulta más compleja. Esta simbiosis es mutualista en su mayoría (23), el anfitrión proporciona a las bacterias un nicho para crecer y a cambio, el ecosistema bacteriano contribuye al mantenimiento de la homeostasis dentro el anfitrión, modulando diversas funciones fisiológicas como la respuesta inmunológica y la resistencia a patógenos, el control energético y metabolismo lipídico, así como el desarrollo intestinal y procesamiento de nutrimentos (24), esto ocurre cuando en las comunidades en la microbiota existe balance inter-especies, a lo que se le conoce como eubiosis (25, 26). En el TGI numerosos factores pueden llevar al colapso de la estructura y función de la comunidad microbiana. La perturbación desfavorable conocida como disbiosis, se ha asociado con diversas enfermedades, y entre estas, trastornos gastrointestinales, incluido el SII (1).

Continuamente estamos expuestos a factores que pueden influir en la composición de la microbiota. El nivel de estos cambios viene definido no solo por la naturaleza, la fuerza y la duración de la alteración, sino también por la composición y la estabilidad de cada microbiota, asumiendo que cada una es única para cada persona.

Infecciones bacterianas, uso de antibióticos y la dieta son factores que pueden alterar la composición de la microbiota intestinal (9). En algunas ocasiones, la naturaleza de la perturbación es tan fuerte que condiciona alteraciones en su composición o en su funcionamiento alcanzando un estado de disbiosis. La disbiosis puede producirse en cuestión de días, particularmente tras la ingesta de antibióticos, pero también puede ser consecuencia de otras acciones a más largo plazo, fundamentalmente relacionadas con la dieta (27). Cuando existe, se afecta la inmunotolerancia y el sistema inmune puede reaccionar contra componentes propios, o variar en intensidad de su respuesta, siendo esta exacerbada o deficiente (25).

La disbiosis puede conducir potencialmente al desarrollo de enfermedades infecciosas y no infecciosas, cada una con firmas específicas en su microbiota, que puede desencadenar eventos fisiopatológicos en diferentes órganos (25).

3.3.2. Interacción bacteria-anfitrión.

Desde el nacimiento existe una relación simbiótica entre la microbiota y las células del anfitrión humano, que evoluciona y se adapta a lo largo del tiempo. Por su capacidad metabólica, se ha considerado a la microbiota como imprescindible para la vida (28)

Dentro de las funciones metabólicas de las bacterias intestinales se encuentra la síntesis de ácidos grasos de cadena corta (SCFA, por sus siglas en inglés Short Chain Fatty Acids), proveniente de la fermentación en gran parte de los hidratos de carbono y en menor medida de las proteínas que si bien contribuye parcialmente en la producción de SCFA, este proceso libera una mayor variedad de productos finales como hidrógeno, dióxido de carbono, amoníaco, tioles, aminas, indoles y fenoles, y muchas de estas sustancias son consideradas tóxicas y con efectos cancerígenos (29).

Los tres principales SCFA encontrados en el cuerpo son butirato, propionato y acetato, en una proporción aproximada de 1: 1: 3. Aproximadamente el 95% -99% de los SCFA producidos en el intestino son absorbidos (30). El butirato, representa una fuente vital de energía para los colonocitos, y hasta el 70% de sus necesidades energéticas pueden satisfacerse a través de los productos de la fermentación (31). Los SCFA contribuyen sustancialmente al suministro de energía, sin embargo, además de ser fuentes de energía desempeñan un papel en el sistema inmunológico y la respuesta inflamatoria.

3.3.3. *Gen ribosomal 16S rRNA y su utilidad en la identificación de bacterias y comunidades microbianas*

La identificación de las comunidades microbianas es una importante tarea para microbiología y la exploración de diversos ecosistemas. Sin embargo, nuestra comprensión sobre el reino de las bacterias sigue siendo limitada debido a que muchas de ellas no se pueden aislar o cultivar en condiciones de laboratorio. En las últimas décadas, se han utilizado diversas técnicas para el estudio de las comunidades bacterianas, dentro de estas se encuentran la electroforesis en gel de gradiente desnaturalizante (DGGE), el polimorfismo de longitud de fragmento de restricción terminal (T-RFLP) (32), la hibridación *in situ* fluorescente (FISH), Genechips y la secuenciación de alto rendimiento (33). Recientemente, los métodos metagenómicos han facilitado la expansión del conocimiento con respecto a las bacterias no cultivables. La secuencia del gen 16S rRNA utilizada por primera vez en 1985, contiene regiones altamente conservadas para el diseño de cebadores, y regiones hipervariables para identificar las características filogenéticas de las bacterias. Su secuencia tiene una longitud de aproximadamente 1550 pb, siendo lo suficientemente largo para discriminar entre distintas especies y cuenta con suficientes polimorfismos interespecíficos para proporcionar mediciones distintivas y estadísticamente válidas (34).

La elección de cebadores para flanquear ciertas regiones del gen 16S rRNA es crucial para la obtención del perfil taxonómico bacteriano. Se ha encontrado una mayor diversidad α y riqueza revelada por los cebadores V3-V4 y V4 y se ha indicado un inmenso impacto de los cebadores con respecto a la amplificación de los taxones bacterianos (35).

El uso de secuencias del gen 16S rRNA para estudiar la filogenia bacteriana y la taxonomía ha sido el marcador genético más comúnmente utilizado por varias razones. Incluyendo: 1) Su presencia en casi todas las bacterias, donde existe a menudo como una familia multigénica u operones; 2) Su función se ha mantenido a lo largo del tiempo, lo que sugiere que los cambios de secuencia aleatorios son una medida más precisa de cambios evolutivos dados en función del tiempo; y 3) el gen 16S rRNA (1,500 pb) es lo suficientemente grande para fines informáticos (36). El aumento en el número de taxones reconocidos a través del 16S rRNA es directamente atribuible a la facilidad en el desempeño de los estudios de secuenciación del gen (37).

Los métodos basados en cultivo, a pesar de ser rápidos, sensibles y específicos, difícilmente detectan desequilibrios de la microbiota intestinal, es decir, proporciones o cocientes aberrantes de múltiples microorganismos no patógenos asociados a la salud en el contexto de enfermedades crónicas. Por

tanto, se ha propuesto que, para diagnosticar con mayor precisión las condiciones de salud, los médicos podrían beneficiarse de ensayos moleculares independientes de cultivo, para la cuantificación de estos microorganismos en el contexto de un rango de referencia saludable.

3.4. Sistema inmune en el TGI.

El TGI realiza la digestión y captación de nutrimentos a la par que se encarga del mantenimiento de la homeostasis inmunológica, al estar densamente habitado por microorganismos y expuesto a una contundente carga de antígenos microbianos y dietarios diariamente.

Esto es posible por la presencia de una barrera mucosa, que se divide físicamente en; 1) barrera epitelial intestinal, 2) Lámina Propia (LP) y 3) Tejido Linfoide Asociado al Intestino (TLAI), que a su vez se compone de; 1) las Placas de Peyer (PP), 2) Folículos Linfáticos Aislados (FLA) y 3) Ganglios Linfáticos Mesentéricos (GLM), juntos componen el órgano linfático más extenso del organismo (38) (Figura 2).

La capa sencilla de Células Epiteliales Intestinales (CEI), que comprenden enterocitos, células membranosas o micropliegues (células M), células caliciformes (células de globet) y células de Paneth (39), se organiza en criptas y villi (40) formando una barrera física y bioquímica entre el lumen y la LP. Las CEI forman una línea de defensa, que es a la vez selectivamente permeable para permitir la absorción de nutrimentos, cuya selectividad se mantiene por una red de proteínas de unión estrecha, que vinculan a las células epiteliales adyacentes y sellan los espacios intercelulares (41).

Las células caliciformes y de Paneth, regulan la producción de mucina y la producción de Péptidos Anti-Microbianos (PAMs), incluyendo defensinas, catelicidinas, fosfolipasa secretora A2 y lisosomas, teniendo acción disruptiva sobre las paredes celulares bacterianas (42).

Existen linfocitos intraepiteliales (LIE) dispersos entre las células epiteliales adyacentes a lo largo del TGI, en inmediata proximidad a los antígenos intestinales, son esencialmente células T, pertenecientes a los linajes TCR $\gamma\delta$ (predominantes en el intestino humano) y TCR $\alpha\beta$, y deben su retención en el epitelio intestinal a la interacción de la integrina $\alpha E\beta 7$ (también CD103), con la E-caderina expresada en la superficie basolateral de células epiteliales (43).

La LP es la capa de tejido conectivo bajo el epitelio, cuenta con irrigación sanguínea, drenaje linfático, sistema nervioso para la mucosa y representa un importante sitio efector de la respuesta inmune, pues allí residen la mayoría de las células inmunes intestinales, que se comprenden

poblaciones de linfocitos T CD4+, CD8+ y reguladores (Treg) y células plasmáticas, productoras de Inmunoglobulina A polimérica (pIgA) (44) y poblaciones de células inmunes innatas, incluyendo Células Dendríticas (CDs), macrófagos, células cebadas, eosinófilos y Células Linfoides Innatas (CLIs) (45), (44).

Las PP en el íleon distal, se consideran el sitio inductor primario para la respuesta inmune en la mucosa, no están encapsuladas y carecen de linfáticos aferentes y son ricas en folículos de células B, con pequeñas áreas de células T CD4+ y CD8+ interpuestas en domos sub-epiteliales (DSE), separados del lumen por una capa Epitelio Asociado a los Folículos (44) con pocas enzimas digestivas, dónde las células M regulan la captura y transporte de antígenos lumbinales y microorganismos, dirigiéndolos a Células Presentadoras de Antígenos (CPAs) como DCs, (46). Otro sitio inductor son los GLM, son ricos en linfocitos y macrófagos y son los ganglios linfáticos más extensos del cuerpo, filtran la linfa del intestino y ahí se inician las respuestas inmunes contra antígenos circulantes o transportados por CPAs provenientes de la LP, que interactúan con linfocitos vírgenes y de memoria para iniciar su activación y diferenciación (44).}

3.5. Inflamación intestinal crónica en pacientes con SII

Para entender la función de la microbiota en la fisiopatología del SII, se han propuesto distintos mecanismos, dentro de estos uno señala que las alteraciones en su composición y actividad metabólica, activan la respuesta inmune en la mucosa intestinal, creciente evidencia implica que la inflamación de bajo grado y disfunción del sistema inmune innato, ocasionan disfunción de la barrera epitelial e incremento en la permeabilidad (7). Aunque algunos resultados son contradictorios, mastocitos (MC), eosinófilos y otras células inmunes clave, y sus mediadores parecen jugar un papel importante en subgrupos de pacientes con SII. Desequilibrio de citocinas en la circulación sistémica y en la mucosa intestinal también caracterizan al SII y los receptores tipo Toll (TLRs) y su papel en el reconocimiento de patógenos también han destacado recientemente, ya que se ha informado que existe desregulación en pacientes con SII (47). Se ha informado que del 12% a 50% de los pacientes con SII tienen alteraciones de la permeabilidad intestinal. Mecanismos subyacentes al aumento de la permeabilidad en el SII no se han establecido completamente, aunque se cree que la alteración en las uniones epiteliales cerradas y las proteínas asociadas a la unión de adherencia están involucradas en el incremento en la permeabilidad. Por ejemplo, se ha observado menor

expresión de la proteína de unión estrecha zónula ocludina 1 (TJP1) y E-caderina en pacientes SII-D, lo que se ha asociado con dolor abdominal en este subgrupo de pacientes (48, 49).

Por otro lado, los pacientes con SII tienen una mayor densidad de células T de la lámina propia, linfocitos intraepiteliales, mastocitos de la mucosa y células enteroendocrinas, que promueven un medio proinflamatorio a través de la producción de mediadores solubles (50, 51). La histamina y la triptasa como mediadores de MC, pueden alterar la función nerviosa sensorial visceral nociceptiva y causar estimulación e hipersensibilidad. Además, la triptasa puede disminuir la expresión de la unión molécula de adhesión-A (JAM-A) in vitro y, por lo tanto, aumentar la permeabilidad del epitelio permeabilidad en el SII (47). Secreción aumentada de triptasa e histamina ha sido documentada en biopsias de duodenal, colon de recto en algunos estudios de SII que se yuxtapone a los nervios entéricos, contribuye a la hipersensibilidad visceral y se asocia al agravamiento de los síntomas (51). La infiltración de leucocitos, se acompaña de la generación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, otro factor que amplifica la disbiosis, promoviendo el crecimiento de taxones bacterianos específicos, disminuyendo la diversidad y ejerciendo una acción antimicrobiana contra bacterias estrictamente anaeróbicas, susceptibles a la intoxicación por oxígeno (24).

La activación de TLRs, receptores tipo NOD (NLRs) y otros receptores de Reconocimiento de Patrones (PRRs) ocurren a través de su interacción con Patrones Moleculares Asociados a Patógenos (PAMPs) (52). Un número no regulado de bacterias podrían activar continuamente los TLRs e inducir la expresión de citocinas proinflamatorias, conduciendo a una inflamación intestinal crónica y daño epitelial (24). Se ha demostrado que la expresión de los TLRs 2, 4 y 5, está aumentada en la mucosa colónica, y a su vez, su presencia correlaciona positivamente con el tiempo de progresión del síndrome. TLR2 y TLR4 censan la presencia de bacterias Gram + y Gram - respectivamente y la unión a sus ligandos puede desencadenar activación de señales intracelulares llevando a la producción de citocinas proinflamatorias. Entre las diferencias encontradas en pacientes con SII, comparados con sujetos sanos se encuentran concentraciones elevadas en suero de IL-1 β , IL-6, IL-8, IFN- γ y TNF α (53) incremento de las quimiocinas CCL2, MIP-1 β y CXCL16 y disminución de la citocina antiinflamatoria IL-10 (54). Un estudio transversal realizado en pacientes mexicanos con SII, reveló que la disminución de esta última interleucina es un biomarcador candidato, reflejo de la alteración en la regulación inmune (55).

3.6. Abordaje dieto-terapéutico en el SII

Las intervenciones dietéticas forman parte de las opciones básicas para el tratamiento del SII. Basado en las recomendaciones dietéticas del *National Institute for Health and Care Excellence* (NICE) y la Asociación Dietética Británica, el plan de alimentación recomendado para los pacientes con SII, promueve comidas regulares y porciones reducidas, bajas en grasas y cafeína, sugiere evitar el alto consumo de fibra, bebidas gasificadas y alimentos inductores de gas como la cebolla, los frijoles y el brócoli y limita el consumo de tabaco (9).

La mayoría de los pacientes con SII (70% -89%) informan que alimentos específicos (ej., que contienen leche o trigo) (56) exacerban los síntomas y, en consecuencia, muchos pacientes limitan o excluyen algunos alimentos de su dieta habitual.

3.6.1. FODMAPs

Recientemente, el consumo de hidratos de carbono fermentables de cadena corta, o bien oligosacáridos, disacáridos, monosacáridos y polioles fermentables (FODMAPs) han sido sugeridos como factor generador de los síntomas en pacientes con SII (9).

Hace mucho tiempo se reconoció que HC específicos (p. ej., fructosa, lactosa) y posteriormente que los FODMAPs pueden provocar una exacerbación de los síntomas gastrointestinales en sujetos con SII (57-59).

Los FODMAPs se pueden encontrar en una amplia variedad de alimentos, principalmente aquellos provenientes del trigo, leguminosas, algunas verduras, frutas, lácteos y derivados, productos industrializados con alto contenido de fructosa, y productos con edulcorantes no calóricos que contengan alcoholes polihídricos (**ANEXO 2**).

La digestibilidad de los hidratos de carbono (HC) varía debido a la ausencia o disminución de enzimas hidrolasas para su digestión. Los HC no digeribles incluyen polisacáridos no almidón (PNA), almidones resistentes, oligosacáridos y algunos polioles (60). Además de estos HC, algunos disacáridos y monosacáridos no se absorben completamente en el intestino delgado. Se sabe que aproximadamente 40g/día de HC no digeribles y/o no absorbidos ingresan al colon (61) y los polisacáridos de cadena larga que incluyen, PNA como celulosa, hemicelulosas y pectina, psilio y almidones resistentes contribuyen sustancialmente a estos HC.

En el colon, los HC con un alto número de monómeros (grado de polimerización, DP > 10, ej., inulina) se fermentan más lentamente y producen un volumen de gas menor que aquellos con menos monómeros (DP < 10, por ejemplo, oligofructosa) (62).

3.6.2. Mecanismo de acción de los FODMAPs

Los FODMAPs cuentan con tres características: 1) Son mal absorbidos en el intestino delgado; 2) Fermentados rápidamente por bacterias colónicas y; 3) Su alta actividad osmótica aumenta el contenido de agua en el lumen intestinal (Figura 3). Estas características han sido asociadas a la promoción de la sintomatología del SII.

Uno de los mecanismos propuestos por los cuáles los FODMAPs pueden provocar los síntomas en el SII es el aumento del agua en el intestino delgado. El aumento en el agua luminal puede inducir dolor abdominal e hinchazón en aquellos con hipersensibilidad visceral (63). También se ha planteado que el agua adicional del intestino delgado contribuye a deposiciones sueltas y diarrea (56).

Por otro lado, el aumento en la disponibilidad y fermentación colónica de HC de cadena corta no digeribles conduce a la acumulación de gas, incluido el hidrógeno y el metano, lo que conduce a la distensión luminal y a la exacerbación de síntomas, específicamente en aquellos con hipersensibilidad visceral (pacientes) (56). Específicamente, la inulina conduce a una producción posterior y en general casi el doble de la producción total de gas en comparación con la fructosa (64).

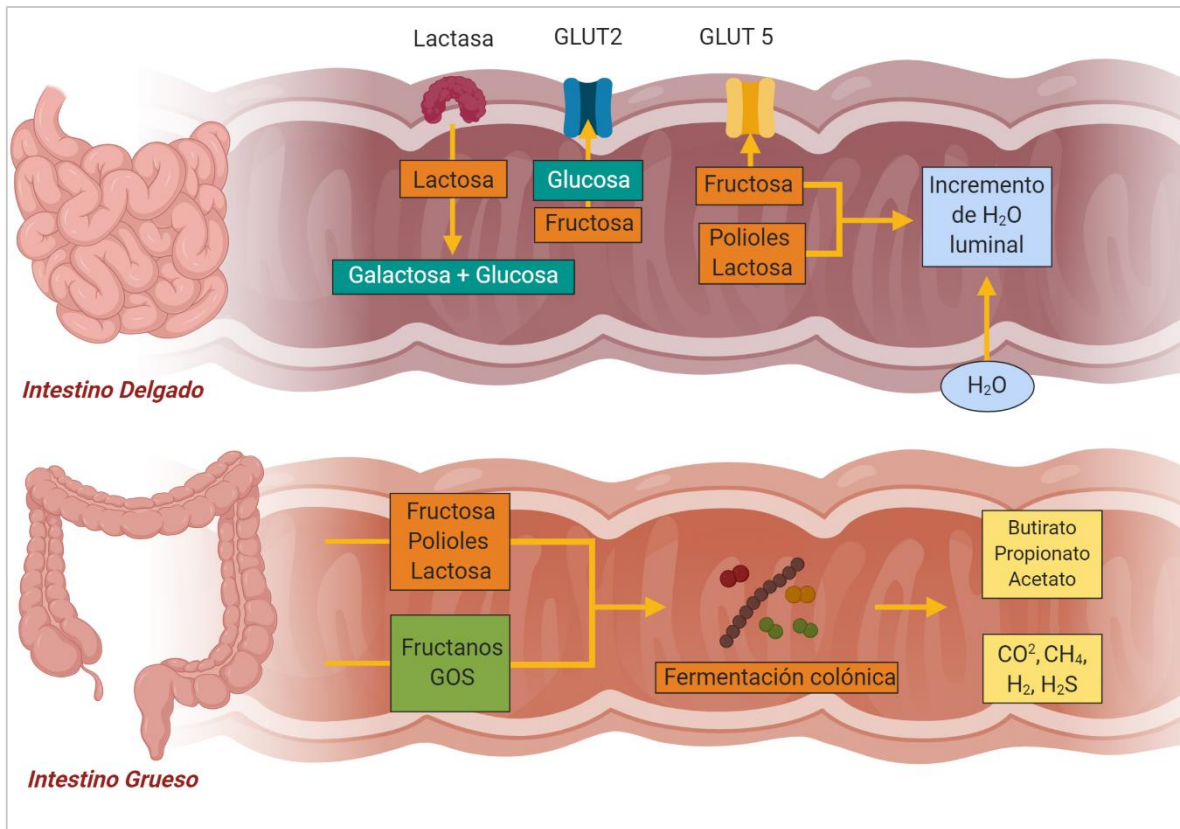


Figura 2. Mecanismos por los cuales los carbohidratos fermentables de cadena corta pueden inducir síntomas en el SII. Algunos carbohidratos fermentables de cadena corta son absorbidos. Por ejemplo, la fructosa se puede absorber a través de los transportadores GLUT2 o GLUT5 y la lactosa se puede absorber si se hidroliza con lactasa. La fructosa no absorbida, los polioles y la lactosa conducen a cambios osmóticos en el íleon. Los carbohidratos fermentables no absorbidos se fermentan en el colon, lo que lleva a la producción de gas luminal. En el contexto de la hipersensibilidad visceral y el funcionamiento colónico alterado, la distensión luminal resultante produce una exacerbación de los síntomas. Abreviaturas: CH₄, metano; CO₂, dióxido de carbono; FODMAPs, oligosacáridos fermentables, disacáridos, monosacáridos y polioles; GOS, galacto-oligosacáridos; H₂, hidrógeno; H₂O, agua.

Se ha reportado que la dieta baja en FODMAPs por 3 semanas, reduce el hidrógeno en el aliento después de un desafío con lactulosa en comparación con una dieta alta en FODMAPs (65), lo que sugiere que conduce cambios en el patrón de fermentación del colon independiente de la ingesta aguda de HC fermentables, probablemente mediado por alteraciones en la composición de la microbiota. Sin embargo, una investigación reciente reportó que tanto el hidrógeno en el aliento como la cinética del volumen colónico, fueron casi idénticos en pacientes con SII en comparación con individuos sanos, sugiriendo que la hipersensibilidad visceral a la distensión luminal, en lugar de una distensión luminal aumentada *per se*, puede ser clave para la provocación de los síntomas (63).

Existe evidencia de otros mecanismos por los cuales los FODMAP pueden inducir síntomas en el SII, como el aumento en la motilidad gastrointestinal inducido por fructosa y manitol (66), lo que reduce aún más la oportunidad de absorción del intestino delgado y aumenta la disponibilidad para la fermentación colónica.

3.6.3. Dieta baja en FODMAPs

La restricción dietética de FODMAPs es relativamente reciente en el manejo de la dieta en el SII e implica la restricción de múltiples oligosacáridos fermentables (fructanos, galacto-oligosacáridos), disacáridos (lactosa), monosacáridos (fructosa) y polioles (p. ej., sorbitol, manitol). Su implementación clínica implica un asesoramiento dietético en profundidad sobre la restricción de FODMAP, seguido de la exclusión dietética de FODMAPs durante 4 a 8 semanas para probar la respuesta a la dieta. Cuando se ha logrado una respuesta sintomática, estos HC se reintroducen en la dieta a tolerancia mientras se monitorean los síntomas, con el objetivo final de lograr una dieta diversa y nutricionalmente adecuada junto con el control de los síntomas a largo plazo.

Un aspecto relacionado a la dieta baja en FODMAPs es que puede reducir la producción de Ácidos Grasos de Cadena corta (Short Chain Fatty Acids o SCFA). Esto resulta relevante, ya que el incremento de su concentración en heces se ha asociado con la hipersensibilidad visceral en pacientes con SII (67). Aunque, dicha concentración puede no ser una medida precisa de la producción de SCFA *in vivo*, debido al efecto del tiempo de tránsito del colon en su absorción y el volumen de heces en la dilución de SCFA (68), lo que puede llevar a variaciones a través de los subtipos de SII (69). Su principal sitio de producción en el colon ascendente, por lo que su evaluación requiere técnicas invasivas (70), volviendo difícil confirmar la interacción entre la DBF, la producción de SCFA y la inducción de los síntomas en el SII.

Se ha descrito que los SCFA pueden inducir hipersensibilidad visceral (67), lo que sugiere un mecanismo por el cual la dieta baja en FODMAPs lleva a cabo su efecto sobre la sintomatología, sin embargo, este mecanismo aún no se ha estudiado exhaustivamente, y los hallazgos son inconsistentes (56, 71). La reducción en la concentración de SCFAs es probablemente el resultado de: 1) la reducción considerable en la ingesta de FOS y GOS (72), y por lo tanto una reducción considerable en el sustrato disponible para la fermentación colónica, lo que podría alterar la composición y el funcionamiento de la microbiota y 2) cambios en la abundancia de taxones involucrados en la producción de SCFA y/o reacciones de alimentación cruzada. Existe evidencia

reportando que el cumplimiento de una dieta baja en FODMAP lleva a cambios en la microbiota gastrointestinal y su producción metabólica.

Dentro de dichos hallazgos, utilizando técnicas de hibridación *in situ* con fluorescencia y PCR cuantitativa se ha demostrado que la dieta baja en FODMAPs ocasiona reducción en la abundancia relativa de Bifidobacteria (73),(68) y de la carga bacteriana total. A través de métodos de secuenciación, no se han encontrado cambios en la diversidad α o β después del consumo una dieta baja en FODMAPs. Sin embargo, se ha observado aumento en la abundancia de Clostridiales XIII *Incertae sedis spp* y *Porphyromonas spp* y disminución en Propionibacteriaceae (65). Al compararse una dieta baja en FODMAPs de 3 semanas con una dieta alta en FODMAPs, se informó mayor abundancia del género fijador de nitrógeno Adlercreutzia en el grupo bajo en FODMAPs, posiblemente contribuyendo a la reducción de los síntomas por la disminución de la respuesta al hidrógeno (65). Además, en este estudio el análisis metabólico de la orina fue capaz de discriminar los grupos en función de tres metabolitos urinarios, incluida la histamina, un modulador de la inflamación y la función inmune. También se encontraron varias asociaciones entre la abundancia de varios taxones, el metaboloma y los síntomas clínicos, lo que sugiere que los cambios observados inducidos por la dieta en la microbiota y el metaboloma pueden ser en parte responsables de los resultados clínicos. A través de ensayos clínicos experimentales, donde pacientes con SII consumieron una dieta baja en FODMAPs durante 4 a 6 semanas se ha reportado mejoría en la sintomatología que caracteriza al síndrome (74). Un estudio cegado con placebo indicó que el 70% de los sujetos que consumieron una dieta baja en FODMAPs por 21 días tuvieron mejoría en los síntomas gastrointestinales (68). En otro estudio, se reportó la reducción en la escala de puntuación de gravedad (*Irritable Bowel Syndrome Severity Sympton Score o IBS-SSS*) en un grupo que consumió una dieta baja en FODMAPs en comparación con los pacientes que solo recibieron asesoramiento dietético (72). Aún hay mucho que entender sobre el impacto de la dieta baja en FODMAPs sobre la microbiota y la salud gastrointestinal. Por ejemplo, se desconoce el cómo la dieta baja en FODMAPs y su influencia en el metabolismo y la proliferación de grupos bacterianos específicos, que pudieran verse afectados o beneficiados por la restricción dietética podrían tener efectos en la estructura y actividad de toda la comunidad microbiana o bien, sus posibles efectos perjudiciales en la mucosa intestinal y la salud del colon, se desconoce el efecto definitivo sobre la concentración de SCFA y el pH luminal en el colon proximal, o si hay un momento crítico en el que las alteraciones de la microbiota podrían tener consecuencias funcionales afectando la salud a corto o largo plazo. Se cree

que la restricción de FODMAPs combinada con suplementos probióticos o prebióticos y la reintroducción de FODMAPs a tolerancia pueden revertir estos posibles cambios.

3.6.4. *Tipo de respuesta a la dieta baja en FODMAPs*

Actualmente, al menos 10 ensayos controlados aleatorios o ensayos comparativos reportan que la dieta baja en FODMAPs conduce a la respuesta clínica de los pacientes con SII, particularmente mejoras en hinchazón, flatulencia, diarrea y síntomas globales en un 50%-80% de los pacientes (56). Sin embargo, se desconoce el por qué sólo una proporción de los pacientes con SII responden favorablemente a la dieta baja en FODMAPs (75), mientras el resto parece tener mínima o nula respuesta al tratamiento dieto-terapéutico (76).

Una propuesta interesante es emplear el análisis cuantitativo de la microbiota como un predictor de respuesta a la dieta baja en FODMAPs. Dicha propuesta ha sido evaluada en un número limitado de estudios. En un estudio, la abundancia inicial de taxones como *Bacteroides*, *Ruminococcaceae* y *F. prausnizi* predijo la respuesta a una dieta baja en FODMAPs de 2 días en niños, donde la respuesta se basó en la frecuencia del dolor (77). Este fue un estudio cruzado de alimentación, y la respuesta a los síntomas se produjo solo en el 24% de los pacientes, pero se reportó que los respondedores se enriquecieron al inicio del estudio, en taxones con una mayor capacidad metabólica sacarolítica conocida (por ejemplo, *Bacteroides*, *Ruminococcaceae*, *Faecalibacterium prausnitzii*) y tres genes ortólogos de la Enciclopedia de Genes y Genomas de Kyoto (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* o *KEGG*), dos de los cuales se relacionan con el metabolismo de los HC. En resumen, sugirió que los pacientes con una mayor abundancia de microbiota sacarolítica o bien microbiota fermentadora de HC, pueden beneficiarse más de una reducción en los sustratos fermentables en la dieta.

Otro estudio mostró que los perfiles bacterianos intestinales podrían usarse para predecir la capacidad de respuesta a la dieta baja en FODMAPs en el SII (76). Donde, el perfil bacteriano intestinal de pacientes adultos con SII respondedores a una dieta baja en FODMAPs, difieren de los que no responden antes de comenzar la intervención. *Streptococcus*, *Dorea* y *Ruminococcus gnavus* tendieron a ser más abundantes en los no respondedores solo antes de la intervención. Además, *Bacteroides stercoris*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* y el género anaeróbico reductor de azufre *Desulfitispora* fueron más abundantes en no respondedores, tanto antes como después de la intervención. Finalmente, reportaron que todos los pacientes que siguieron la dieta baja en

FODMAPs, reflejaron menor abundancia de Bifidobacteria y el filo Actinobacteria, que usan FODMAPs para su metabolismo (56). Para evaluar si la dieta baja en FODMAPs se asociaba con cambios en los perfiles bacterianos de pacientes con SII. Se usó la prueba GA-map Dysbiosis. Esta prueba tiene limitaciones, pues determina la abundancia de secuencias pre-identificadas y tiene un proceso sencillo que se traduce en un entorno clínico, creando perfiles bacterianos estandarizados de pacientes. Si bien, el Índice de Disbiosis (*Dysbiosis Index* o DI) que proporciona el test, ofrece un puntaje sobre la composición de un perfil bacteriano en relación con la de los sujetos sanos, no es en sí una herramienta para identificar cambios en bacterias específicas. Idealmente, se necesitan otros medios para identificar la disbiosis intestinal, como a través de la secuenciación bacteriana del 16SrRNA, que también proporciona valores de α y β de diversidad, además se desconocen las dietas del grupo de referencia de control sano nórdico (noruego y sueco) utilizado para la creación de dicha prueba. Sin embargo, este estudio señaló la utilidad de técnicas estadísticas multivariadas para predecir la capacidad de respuesta a la Dieta Baja en FODMAPs, valiéndose únicamente de taxones bacterianos, sin embargo, el SII representa una entidad heterogénea dónde se manifiestan en conjunto, alteraciones en la composición y actividad de la microbiota e inflamación de bajo grado en la mucosa intestinal. Sabiendo que la microbiota intestinal y el sistema inmune están estrechamente relacionados y mutuamente influenciados, la utilización de taxones bacterianos y marcadores inflamatorios séricos para predecir la respuesta a la Dieta Baja en FODMAPs, parecería viable, al brindar información sobre la estructura de las comunidades microbianas y, a su vez sobre el anfitrión humano, pudiendo ser de gran utilidad para discriminar a los sujetos que responderán favorablemente a la dieta baja en FODMAPs de aquellos con nula o poca respuesta.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El SII es un trastorno funcional digestivo asociado a los patrones de alimentación con una alta prevalencia a nivel nacional. Se ha reportado que la restricción de FODMAPs en la dieta puede; disminuir la severidad de los síntomas que caracterizan al SII, modificar la composición de la microbiota intestinal y las concentraciones séricas de citocinas proinflamatorias. Sin embargo, aunque la dieta ha demostrado ser efectiva al disminuir la gravedad de los síntomas, existe una proporción de estos pacientes que tiene nula o poca respuesta a dicho tratamiento dieto-terapéutico.

5. JUSTIFICACIÓN

La dieta con bajo contenido en FODMAPs ha demostrado ser efectiva al reducir la severidad de los síntomas y modificar la composición de la microbiota intestinal en los pacientes con SII. Sin embargo, sólo una proporción de los pacientes con SII responden adecuadamente al tratamiento dietético, algunos de ellos pueden, por el contrario, experimentar el agravamiento de sus síntomas, además, se desconoce la profundidad de su influencia en el metabolismo y la proliferación de grupos bacterianos específicos, y sus posibles efectos perjudiciales a salud del colon, por lo que resulta necesario identificar a los sujetos respondedores de los no respondedores a un plan de alimentación bajo en FODMAPs, para brindar una terapia dirigida, distinguiendo a los pacientes con SII que podrán beneficiarse del tratamiento dieto-terapéutico.

6. HIPÓTESIS

La abundancia de bacterias fermentadoras de hidratos de carbono en la microbiota intestinal y las concentraciones séricas de marcadores inflamatorios discriminarán a los pacientes con SII no respondedores de los respondedores a una dieta con bajo contenido en FODMAPs antes de la intervención dietética.

7. OBJETIVO GENERAL

Identificar bacterias fermentadoras de hidratos de carbono y marcadores inflamatorios séricos que discriminen a los pacientes con SII no respondedores de los respondedores a una dieta con bajo contenido en FODMAPs.

8. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Clasificar a los participantes que se sometan a una dieta baja en FODMAPs en respondedores y no respondedores, de acuerdo con los valores reportados en la Escala Análoga Visual para SII (VAS-IBS) al término de la intervención.

En sujetos respondedores y no respondedores antes de la Dieta Baja en FODMAPs:

- Comparar la abundancia de bacterias fermentadoras de HC en la microbiota intestinal.
- Comparar los marcadores inflamatorios séricos.
- Generar una función lineal que discrimine a los pacientes con SII por su tipo de respuesta a la dieta baja en FODMAPs.

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1. Criterios de Inclusión

- Hombres y mujeres con diagnóstico de SII de acuerdo con los criterios ROMA III.
- Mayores de 18 y menores de 60 años.
- Libre participación en el estudio mediante la firma del consentimiento informado.

9.2. Criterios de exclusión

- Uso de antibióticos tres meses previos al tratamiento.
- Enfermedades concomitantes crónicas no transmisibles, inflamatorias o de tipo autoinmune.

9.3. Criterios de eliminación

- Falta de apego al tratamiento dieto-terapéutico.
- Uso de antibióticos durante el tratamiento.
- Uso de prebióticos y/o probióticos durante el tratamiento.

9.4. Diseño experimental

Los participantes fueron captados en la Clínica de Medicina Familiar ISSSTE Cuitláhuac localizado en la alcaldía Azcapotzalco, en la Ciudad de México. Los pacientes de la clínica fueron atendidos por un nutriólogo y un gastroenterólogo, dónde aquellos que cumplieran los entonces vigentes, criterios diagnósticos ROMA III para SII, eran seleccionados e invitados a participar en el estudio. Los pacientes con diagnóstico de SII que aceptaron participar en el estudio fueron citados y evaluados quincenalmente en el Instituto Nacional de Medicina Genómica. En la primera visita se realizó un historial clínico dietético para cada participante, considerando parámetros antropométricos, bioquímicos, clínicos y dietéticos. En esta misma visita, personal de nutrición brindó a los pacientes educación nutricional, dónde se les dio a conocer listados de alimentos altos en FODMAPs a evitar durante la intervención y se les entregó a los participantes un plan de alimentación individualizado, isocalórico con bajo contenido en FODMAPs y un listado de alimentos equivalentes “permitidos” **(ANEXO 3)**, con un menú ejemplo. De forma semanal los pacientes fueron contactados vía correo electrónico, para ofrecer asesoría y aclarar dudas respecto al tratamiento. En cada consulta se evaluó la sintomatología mediante la VAS-IBS. Al inicio y al término del tratamiento, se obtuvo una muestra de sangre venosa periférica y una muestra de materia fecal. El suero derivado de la sangre y las heces fueron almacenados a -70°C hasta su utilización.

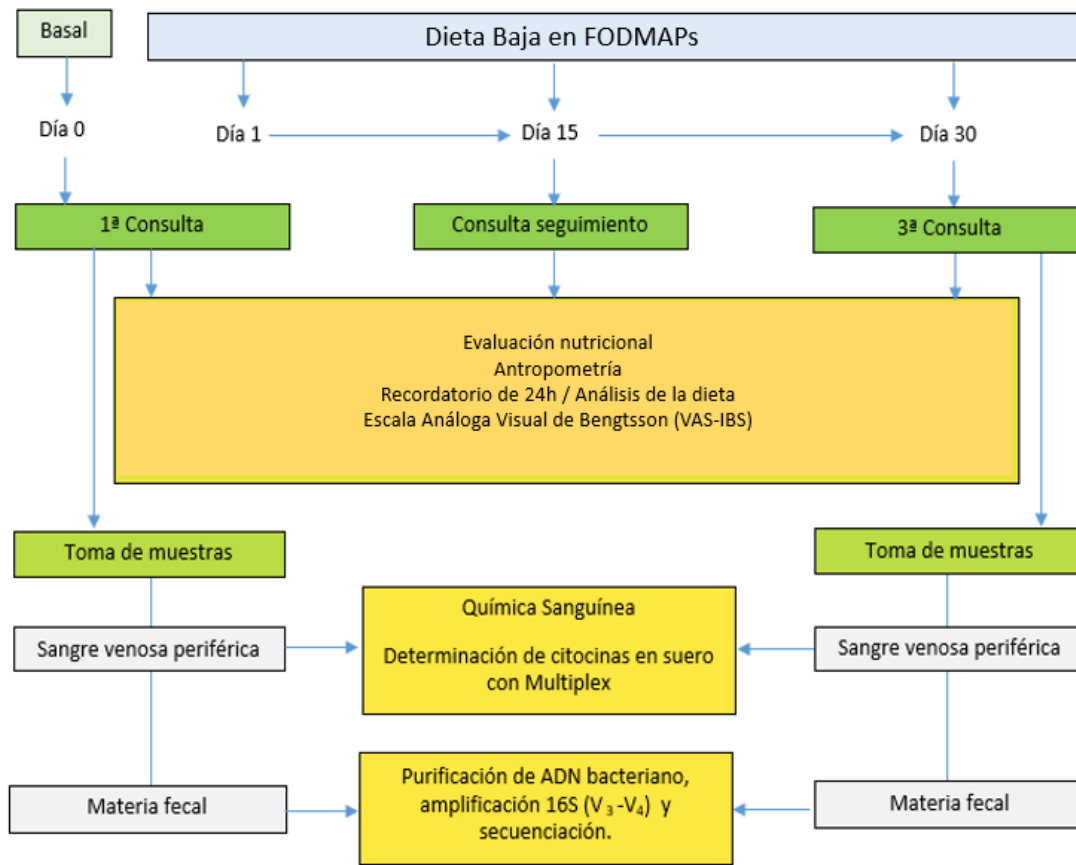
9.5. Cálculo de la muestra.

Para el cálculo de la muestra se empleó la fórmula de diferencia de medias:

$$n_A = (\sigma_A^2 + \sigma_B^2/\kappa) \left(\frac{Z_{1-\alpha} + Z_{1-\beta}}{\mu_A - \mu_B} \right)^2$$

La n se calculó con un poder estadístico β de 0.95 y un error α de 5%. Se contemplaron los resultados de un estudio piloto realizado en el INMEGEN en sujetos sanos y pacientes con SII dónde se buscaba observar diferencias en la composición microbiana entre ambos grupos. Para dicho cálculo de la muestra se consideró la abundancia de la familia bacteriana Erysipelotrichaceae, misma que en dicho estudio piloto correlacionó significativamente con el dolor abdominal y mostró ser menor en los controles sanos. Sujetos sanos (Grupo A), tuvieron abundancia relativa de 0.09 ± 0.13 mientras Los pacientes con SII (Grupo B) tuvieron abundancia relativa de 0.19 ± 0.14 . Calculándose una n de 29 pacientes más 25% por pérdidas dando 36 pacientes con SII.

9.6. Diagrama de flujo



10. ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS

10.1. Química clínica y determinación de citocinas.

Las muestras de sangre venosa periférica fueron recolectadas en tubos para suero Vacutainer y centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm, el suero fue separado y almacenado a -70 °C hasta su utilización. Las concentraciones de glucosa, triacilglicéridos y colesterol total en suero fueron determinadas mediante el autoanalizador Miura 200 y los kits (Diagnostics Systems, DyaSys). Se cuantificaron 8 citocinas (IFN- γ , IL-1ra, IL-1 α , IL-8, IP10, MIP1 α y TNF α) en las muestras de suero utilizando un sistema Multiplex (Milliplex, Millipore, USA).

10.2. Escala Análoga Visual.

La VAS-IBS diseñada y validada por Bengtsson M. et al, detecta diferencias en los cinco síntomas intestinales principales característicos del SII, considerando: “Dolor abdominal”, “Diarrea”, “Constipación”, “Distención y Flatulencias” y “Vómito y Nausea”. Los pacientes registraron en el VAS-IBS la gravedad de cada elemento en una escala de 100 mm de largo (“Malestar muy severo 0 a “sin malestar en absoluto” 100. Esta escala se considera eficaz cuando la mejoría global es del 50% en los síntomas (37) **(ANEXO 4)**.

10.3. Evaluación del estado de Nutrición.

Se evaluó el estado de nutrición usando técnicas antropométricas, signos clínicos y variables dietéticas registradas en la historia clínica nutricional. Se pesó y midió a los participantes en una báscula clínica con estadímetro, modelo EL, marca Velab, se midieron panículos adiposos con un plicómetro Lange, se midieron circunferencias con una cinta antropométrica Lufkin. Todo lo anterior de acuerdo con los protocolos antropométricos de la *International Society for de Advancement of Kinanthropometry* (ISAK). Se estimó el porcentaje de grasa corporal de los pacientes, con la fórmula Siri para densidad corporal a través de las mediciones antropométricas: peso, talla, los pliegues

cutáneos tricípital, bicípital, suprailíaco, subescapular y la circunferencia de muñeca, también se midieron las circunferencias de cintura y cadera. Y se recabó información de la dieta de los pacientes, aplicando recordatorios de 24 horas en cada consulta.

10.4. Análisis de la dieta.

La información de la dieta obtenida a través de recordatorios de 24 horas validados para población mexicana se empleó en la estimación de consumo de nutrimentos usando el software NutriKcal. Obteniéndose: consumo de alimentos equivalentes del Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes (SMAE), energía (kcal), gramos de proteína, hidratos de carbono y fibra, microgramos de ácido fólico, miligramos de colesterol, retinol, Vitamina C, hierro, calcio y sodio.

10.5. Purificación de DNA bacteriano, amplificación y secuenciación.

Se instruyó a los pacientes con un protocolo escrito para el adecuado manejo y almacenamiento de heces, mismas que serían entregadas al inicio y final del tratamiento. Una fracción de las muestras fecales entregadas por los pacientes se transfirió a tubos de centrifugado de 1.5 ml, cuidando que su contenido se mantuviera en 180-220 mg. Posteriormente, fueron almacenadas a -70°C hasta el momento de su utilización. Las heces fueron sometidas a extracción de DNA, usando el kit de Qiagen, QiAmp DNA Stool Mini Kit, que utiliza membranas de sílice, para la purificación de DNA genómico, bacteriano, viral o parasítico, de muestras de heces frescas o congeladas. El DNA purificado fue eluido en 100 µL de Buffer AL de acuerdo con las especificaciones del fabricante.

El DNA purificado fue cuantificado por espectrofotometría UV visible de espectro completo en un Nanodrop 2000c, calculando el cociente de Densidad Óptica (OD) OD_{260}/OD_{280} para determinar su pureza. La integridad del DNA fue determinada, haciendo una electroforesis en un gel de agarosa al 2%. El DNA en el gel fue teñido con Redgel Nucleic Acid Gel Stain y visualizado en un equipo ChemiDoc XRS+ con el software Image Lab.

Se generaron fragmentos de 460 pb a partir de 100 ng de DNA de cada muestra, amplificándose las regiones hipervariables V₃-V₄ del gen 16SrRNA, utilizando el Master Mix Platinum Multiplex PCR y los primers *Fwd* 5' TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGTCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCTACGGGNGGCWGCAG-3'; *Rev*: 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3' en un termociclador ABI Geneamp 9700, las condiciones de PCR utilizadas fueron las siguientes:

Fase		Temperatura	Tiempo
Desnaturalización inicial		95 °C	3 minutos
25 ciclos	Desnaturalización	95 °C	30 segundos
	Alineamiento	55 °C	30 segundos
	Elongación	72° C	30 segundos

Los amplicones fueron purificados utilizando el kit QIAquick PCR purification Kit de QIAGEN, posteriormente fueron secuenciados según la metodología de alto rendimiento de la plataforma Illumina usando el Kit MiSeq Reagent v3, para preparación de librerías de secuenciación metagenómica de 16S, en la unidad de secuenciación del INMEGEN. Según el protocolo de preparación de librerías, se amplificaron las regiones hipervariables V₃-V₄ en un ciclo de PCR limitado y se agregaron los adaptadores de secuenciación y códigos de barras de doble índice al amplicón objetivo. Las bibliotecas se agruparon para su secuenciación utilizando los índices de Nextera XT. Usando lecturas pareadas de 250 pb, los extremos de cada par de lecturas se sobreponen, para generar lecturas completas de alta calidad de la región V₃-V₄, en una corrida de 56 horas. El resultado de corrida de MiSeq es de aproximadamente 24-30 millones de lecturas paired-end.

10.6. Aspectos éticos

Este proyecto mantuvo un apego estricto con el “Reglamento de la Ley General de la Salud en Materia de Investigación para la Salud” (78) la Declaración de Helsinki (79) y los lineamientos reportados por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (80).

Los aspectos éticos de la investigación en seres humanos dispuestos en el Título Segundo del “Reglamento de la Ley General de la Salud en Materia de Investigación para la Salud”, nos permiten

clasificar a este proyecto como de riesgo mínimo para los sujetos de investigación aquí mencionados, como se detalla en el artículo 17 índice II del Capítulo I.

El proyecto fue aprobado y registrado con el # 086.2015. Los participantes fueron informados de manera verbal de los procedimientos realizados en este proyecto antes de su iniciación y consentimiento, para el cual, debieron de firmar una “Carta de Consentimiento Informado” (**ANEXO 5**).

11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

11.1. Análisis bioinformático.

Para el análisis bioinformático a partir de las secuencias obtenidas del 16SrRNA, se utilizó la plataforma Quantitative Insights Into Microbial Ecology 2 (QIIME2) versión 2018.4. Primero se generó un archivo Metadata.tsv, para importar las secuencias crudas pareadas obtenidas con MiSeq. Los códigos de barras fueron removidos de las secuencias con la instrucción demux emp-paired. Posteriormente, para el control de calidad de las secuencias y la construcción de la tabla de características (Feature table (Frequency)) se usó la instrucción dada2 denoise-paired. A partir de la tabla de características se obtuvo un resumen con la instrucción feature-table summarize y se generó un árbol filogenético para los posteriores análisis de diversidad usando phylogeny align-to-tree-mafft-fasttree. Se generaron las pruebas estadísticas de diversidad α y β mediante las siguientes instrucciones diversity core-metrics-phylogenetic, diversity alpha-group-significance, diversity beta-group-significance y diversity alpha-rarefaction.

Se asignó la taxonomía a las secuencias a partir de la tabla de características, usando un clasificador Bayesiano pre-entrenado en la base Greengenes 13_8 para el gen 16SrRNA y la instrucción feature-classifier classify-sklearn. Se filtraron datos de respondedores y no respondedores con feature-table filter-samples para construir artefactos de composición (Feature table (Composition)), con el método de imputación composition add-pseudocount. Los análisis de abundancia diferencial ANCOM se hicieron a partir de los artefactos de composición usando la instrucción composition ancom.

11.2. Análisis estadístico.

Se analizó la normalidad de los datos. Las variables cuantitativas continuas (datos antropométricos y bioquímicos) variables con distribución paramétrica se presentaron como media, \pm desviación estándar (DE), y en mediana y percentil 25 y 75 aquellas con distribución no paramétrica. Para las variables cualitativas se emplearon frecuencias y porcentajes. Para evaluar las diferencias entre los grupos de estudio por tipo de respuesta, se aplicó la prueba de suma de rangos de Wilcoxon o la prueba T para muestras independientes. Para evaluar diferencias antes y después de la intervención se aplicó la prueba de suma de rangos con signo de Wilcoxon o la prueba T de Student para muestras relacionadas según el criterio de homocedasticidad y la normalidad de los datos. En todas las pruebas se asumió la significancia estadística siendo el valor de probabilidad (P) menor de 0.05. Se clasificó a los pacientes respondedores (RP) y no respondedores (NR) por subtipo de SII de acuerdo a los valores registrados en la VAS-IBS, se estandarizaron las variables por desviación estándar. Se calcularon las diferencias en abundancia de géneros bacterianos, marcadores inflamatorios y valores de la VAS-IBS antes y después de la DBF. Se hicieron Análisis de Componentes Principales (PCA) para observar el comportamiento de los marcadores inflamatorios séricos y los géneros bacterianos fermentadores de Hidratos de Carbono en los grupos de RP y NR antes y después de la DBF. Se consideraron los géneros bacterianos y marcadores inflamatorios séricos con más alto coeficiente negativo del primer componente principal para la construcción de una función discriminante mediante un Análisis Discriminante Lineal (LDA), finalmente se construyó una tabla de contingencia para clasificar a los pacientes con SII, RP y NR a la dieta con bajo contenido de FODMAPs. Los análisis estadísticos se realizaron en el programa estadístico R versión 3.4.3, STATA 13 e IBM SPSS Statistics 23.

12. RESULTADOS

12.1. Características de la muestra

Se incluyeron a 32 participantes con SII. Posteriormente, se clasificó a los participantes como respondedores o no respondedores de acuerdo con la VAS-IBS, utilizando los siguientes criterios (Tabla 1).

Tabla 1. Criterios de clasificación por tipo de respuesta de acuerdo con la VAS-IBS.		
Subtipo	Respondedores	No respondedores
SII-C	Cambio en el valor “Constipación” ≥ 1 cm	Aquellos que no cumplen las condiciones por subtipo.
SII-D	Cambio en el valor “Diarrea” ≥ 1 cm	
SII-M	Cambio en los valores “Constipación” y “Diarrea” ≥ 1 cm	Sin cambio en el síntoma principal.

El 68.75% de los participantes fueron respondedores (RP: n=22) dicho grupo compuesto por 29 mujeres (90.62%) y 3 hombres (9.37%). El 31.25% fueron No Respondedores (NR: n=10) y dicho grupo se conformó por 9(90%) mujeres y 1(10%) hombre. El grupo de los RP comprendía sujetos con SII-C (n=16), SII-D (n=2), SII-M (n=4), y el de NR sujetos con SII-C (n=6) y SII-M (n=4).

La mediana para edad fue de 42.5 (28-52) para RP y 32.5 (27-44) para NR. El peso fue de 69.6 \pm 17.3 y 68.16+ -9.08 kg para RP y NR, respectivamente antes de la DBF y de 69.05 \pm 16.1y 67.43 \pm 8.37 kg para RP y NR, respectivamente después de la DBF. El IMC fue de 27.65 \pm 6.23 en RP y de 25.05 \pm 2.66 kg/m² en NR antes de la DBF y de 27.45 \pm 5.74 en RP y 24.77 \pm 2.38 en NR después de la DBF. El porcentaje de grasa corporal antes de la DBF fue de 32.27 \pm 5.95 y 33.519 \pm 5.11 en RP y NR respectivamente. No se encontraron diferencias en las características antropométricas entre RP y NR, excepto por el porcentaje de grasa corporal después de la DBF que fue de 36.21 \pm 5.93 para RP y 32.93 \pm 4.39 par NR. Las concentraciones de glucosa, triacilglicéridos y colesterol permanecieron dentro de los parámetros normales y sin cambio a lo largo de la intervención. Los parámetros antropométricos, y la química clínica se presentan en la Tabla 2.

Los valores registrados en la VAS-IBS de los RP y NR antes y después de la DBF se presentan en la Tabla 3. Los sujetos RP reflejaron una mejora en todos los síntomas de la VAS-IBS que alcanzó la significancia estadística. Por otro lado, en los NR el cambio en la sintomatología sólo abarcó los síntomas “Constipación” (P=0.013) y “Distensión y flatulencia” (P=0.009), el resto de los síntomas permanecieron sin cambio.

Tabla 2. Características de la muestra antes y después de la DBF				
	Respondedores		No Respondedores	
n (%)	32 (100%)			
	22 (68.75%)		10(31.25%)	
Edad (años)	42.5(28-52)		32.5(27-44)	
Sexo n (%)	Mujeres 29 (90.62%) Hombres 3 (9.37%).			
Mujeres (%)	20 (90.9%)		9(90%)	
Hombres (%)	2 (9.09%)		1(10%)	
Altura (cm)	158.31± (6.07)		164.8±5.61	
Subtipo SII				
Constipación (SII-C)	16(72.7%)		6(60%)	
Diarrea (SII-D)	2(9.09%)		-	
Mixto (SII-M)	4(18.18%)		4(40%)	
Tiempo	Antes		Después	
	Respondedores	No Respondedores	Respondedores	No Respondedores
Características antropométricas				
Peso (kg)	69.6±17.3	68.16+ -9.08	69.05±16.1	67.43 ± 8.37
Índice de Masa Corporal (kg / m2)	27.65±6.23	25.05 ± 2.66	27.45±5.74	24.77±2.38
Circunferencia de cintura (cm)	88.89±14.2	84.57± 7.47	87.94±13.74	83.83±6.34
Grasa Corporal (%)	32.27±5.95	33.519±5.11	36.21±5.93	32.93±4.39*
Circunferencia de cadera (cm)	99(94.5-104.7)	101.35(95.5-104.3)	100(93-104)	99.85(97-102)
Índice Cintura Cadera	0.86±0.09	0.84±0.05	0.85±0.08	0.81±0.04
Química Sanguínea (mg/dL)				
Glucosa	81.22±10.73	71.84±18.63	78.15±13.8	73.66±13.29
Triacilglicéridos	133(93-166)	89(81-138)	128(77-153)	100(91-124)
Colesterol	191.09±41.37	202.4±27.9	186.04±42.87	192.33±16.68
Datos presentados como media ± D.E, Mediana con percentil 25-75, o como frecuencia y porcentaje. Prueba estadística T de Student para muestras independientes con variables estandarizadas, comparando por tipo de respuesta Antes de la DBF				

Tabla 3. Valores de la Escala Visual Análoga (VAS-IBS). Puntuación (cm) antes y después de DBF.			
Respondedores (n=22)	Antes	Después	Valor P
Dolor abdominal	3.55(1.92-5)	9.5(8-9.8)	<0.0001
Diarrea	8.65(7.35-9.8)	9.95(9.32-10)	0.003
Constipación	2.8(1.75-4.97)	9.65(8.85-10)	<0.0001
Distensión y flatulencia	1.85(0.6-3)	9.5(8.37-9.75)	<0.0001
Vómito y náusea	9.95(9.5-9.82)	10(9.82-10)	0.014
No respondedores (n=10)			
Dolor abdominal	6.25(2.75-8.75)	8 (7.25-9.3)	0.221
Diarrea	6.8(7.25-9.3)	6.8(4.4-9.5)	0.483
Constipación	2.3(0.6-5.02)	7.85(5.75-9.72)	0.013
Distensión y flatulencia	6.25(1.4-7.35)	8(6.57-8.27)	0.009
Vómito y náusea	10(9.5-10)	10(9.5-10)	0.249
<small>Datos presentados como media ± D.E, Mediana con IC 95% o como frecuencia y porcentaje. Prueba estadística T de Student para muestras relacionadas para variables de distribución normal. Prueba estadística Wilcoxon para muestras relacionadas para variables no paramétricas de los valores Antes DBF y Después DBF</small>			

12.2. Análisis de la dieta

La dieta tiene una importante contribución a la salud al proveer de nutrientes y modular la composición de las comunidades microbianas residentes en el tracto digestivo (81). Por tanto, se analizó la dieta de los pacientes RP y NR a través de la información obtenida en los Recordatorios de 24 horas y se buscaron diferencias en el consumo de alimentos equivalentes, ingesta calórica, macronutrientes y micronutrientes antes y después de la DBF, que pudiesen dar indicios respecto al tipo de respuesta o la composición de la microbiota intestinal de los participantes.

El consumo de alimentos en los sujetos RP y NR antes y después de la DBF se muestra en la Tabla 4. La dieta de los sujetos RP antes de la DBF (RPA) se caracterizó por un mayor consumo de carnes y cereales, y un bajo consumo de verduras, leguminosas y leche, los sujetos RPA reportaron consumir de forma “moderada” azúcares y grasas. Después de la intervención con la DBF, se observó disminución estadísticamente significativa en el consumo de equivalentes grasa (después 1.815 (1.30-3.15) vs antes 3.805 (3.25-6.11, P=0.05)) (Gráfica 6A). Respecto a los sujetos NR, su dieta antes de la intervención se caracterizó por un mayor consumo en carnes y cereales, bajo consumo de

leche y bajo o nulo consumo de leguminosas y una mayor ingesta de equivalentes de verduras de 3.44 (0.65-10.23) a 2.19 (1.74-4.05) y azúcares de 2.1 (0.645-4.60) a 1.52 (1.19-4.04), respecto a los sujetos RPA, sin ser esta diferencia estadísticamente significativa. En los pacientes NR después de la DBF (NRD), no se observaron diferencias estadísticamente significativas en el consumo de equivalentes. No obstante, se incrementó la ingesta de verduras y se disminuyó el consumo de grasas en los NRD respecto a los NRA.

12.2.1. Ingesta calórica y consumo de macronutrientos

La ingesta calórica, de macronutrientos, colesterol y fibra en RP y NR antes y después de la DBF se reporta en la Tabla 4.

La ingesta calórica en los sujetos RP fue de 1459 (1195.25-2068.5) a 1436.5 (1244-1656) Kcal/día antes y después de la intervención respectivamente. La ingesta calórica en los sujetos NRA fue de 1748 (1306-1895) Kcal, superior a la del grupo de RP antes y después de la DBF. No obstante, disminuyó el consumo calórico en los NRD de 1288 (938.25-1637.75) respecto a los NRA y el grupo de RP a lo largo de la intervención. Sin embargo, estas diferencias no tuvieron significancia estadística. La dieta de los sujetos RP y NR antes y después de la DBF se aproximó a la distribución normal de macronutrientos, pero se caracterizó por ser baja en fibra, siendo cercana a la mitad de la Ingesta Diaria Recomendada (IDR) para adultos de acuerdo con la FAO/OMS. Respecto al consumo de macronutrientos y de colesterol, no se encontraron diferencias significativas intragrupal, intergrupales o por el tiempo.

12.2.2. Consumo de micronutrientos en RP y NR antes y después de la DBF.

La estimación de consumo de micronutrientos se muestra en la Tabla 4.

Los sujetos RP presentan una ingesta de Vitaminas A, y C cercana a lo recomendado para el grupo de edad, con baja ingesta de ácido fólico, hierro y calcio y alto consumo de sodio. Se encontró incremento en el consumo de Vitamina A en los RPD siendo de 1402 (1094.66-4239.88) mcg respecto a los RPA con 828 (340.39-206.05) mcg (P= 0.044) (Gráfico 1).

Aunque no se encontraron diferencias significativas, el consumo de Vitamina A antes de la intervención en los sujetos NR fue mayor respecto a los sujetos RP, lo mismo sucede para la ingesta de hierro y calcio. Al comparar el antes vs el después de la intervención, no se encontraron diferencias en la ingesta de micronutrientes en los sujetos NR. Sin embargo, después de la intervención los sujetos NR tuvieron mayor ingesta de Vitamina A y sodio y menor consumo de vitamina C, ácido fólico y de hierro. La ingesta de sodio fue mayor en el grupo de NR que en el grupo de RP antes y después de la DBF.

Tabla 4. Análisis de la dieta entre RP y NR antes y después de la DBF

	Respondedores		No respondedores	
	Antes	Después	Antes	Después
Kcal/día	1459 (1195.25-2068.5)	1436.5 (1244-1656)	1748 (1306-1895)	1288 (938.25-1637.75)
Proteína (g)	72.5 (54.7-93.4)	65.35 (59-76.15)	73.2 (58.3-112.9)	72.45 (52.85-104.17)
Lípidos (g)	52.68 (43.19-85.77)	53.65 (30.19-63.79)	66.94 (49.39-80.67)	38.71 (27.94-66.17)
Hidratos C. (g)	173.3 (129.55-251.05)	192.75 (162.72-212.27)	178.3 (156.5-228.6)	161.25 (131.47-126.27)
Colesterol (mg)	206 (143.5-340.5)	124.5 (102.25-285.25)	173 (154-216)	130.5 (94-336)
Fibra (g)	13 (8-20.3)	13.7 (9.32-20.7)	14.4 (11.6-26.6)	10.3 (8.26-13.25)
Vitamina A (mcg)	828 (340.39-206.05)	1402 (1094.66-4239.88)*	1010 (214.34-3685.88)	1279.5 (729.6-2149.64)
Vitamina C (mg)	75 (58.17-119.87)	78.35 (64.73-149.13)	84.4 (37.46-129.18)	41.5 (16.87-118.27)
Ácido Fólico (mcg)	129.2 (96.46-193.99)	130.25 (70.65-371.14)	218.3 (97.9-540.6)	119.7 (59.81-289.33)
Hierro (mg)	9.94 (8.77-13.24)	10.775 (7.95-18.97)	16.09 (7.39-22.57)	8.54 (5.55-11.84)
Calcio (mg)	629.5 (513.83-804.06)	545 (440.19-896.89)	902 (500.73-1258.37)	573.5 (301.08-838.41)
	Respondedores		No respondedores	

	Antes	Después	Antes	Después
Sodio (mg)	1771 (1410.24-2919.02)	1475.5 (816.49-3009.77)	2607 (1670.9-2921.0)	2884 (-370.39-8487.39)
Número de equivalentes por día (#/día)				
Azúcar	1.525 (0-3.76)	0.59 (0-3.61)	2.1 (0.46-3.5)	0 (0-1.94)
Carne	6.5 (4.17-8.43)	5.85 (3.46-6.68)	6.98 (5.22-7.11)	7.515 (4.87-9.25)
Cereal	6.16 (3.73-6.98)	7.56 (5.05-8.42)	6.07 (4.18-6.31)	5.215 (2.92-6.3)
Frutas	1.66 (78.75-2.18)	1.58 (0.68-2.1)	1.5 (0-2.31)	1.06 (0.64-1.88)
Grasa	3.8 (2.13-6.92)	1.815 (0.63-3.58) *	3.96 (2.82-4.87)	2.65 (1.04-3.99)
Leche	0 (0-0.35)	0 (0-0.82)	0.95 (0.05-0.95)	0 (0-0.23) *
Leguminosas	0 (0-0.09)	0 (0-0)	0 (0-0)	0(0-0)
Verduras	2.19 (1.55-3.65)	2.22 (0.9-6.155)	3.44 (1.65-4.44)	4.75 (3.18-5.76)
Etanol	0 (0-0)	0 (0-1.7)	0 (0-0)	0 (0-0)

Datos presentados como mediana, y percentil 25 y 75.
Prueba estadística U- de Mann-Whitney para variables no paramétricas de muestras independientes (P<0.05) ®
Prueba estadística Wilcoxon signada para variables no paramétricas de muestras relacionadas (P<0.05) *

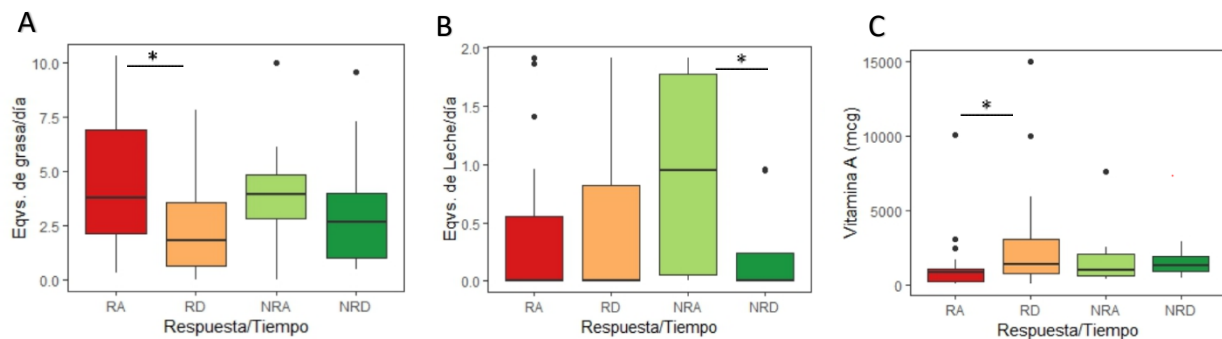


Gráfico 1. Cambios en el consumo de equivalentes y vitamina C en RP y NR antes y después de la DBF.

A) Diferencias en el consumo de equivalentes de grasa al día entre RP y NR. **B)** Diferencias en el consumo de equivalentes de leche al día entre RP y NR. **C)** Diferencias en la ingesta de vitamina C entre RP y NR.

Grupos: RA =Respondedor Antes, RD = Respondedor Después, NRA = No Respondedor Antes, NRD = No respondedor Después.

12.3. Comparación de la microbiota intestinal de los pacientes respondedores y los no respondedores antes de la intervención.

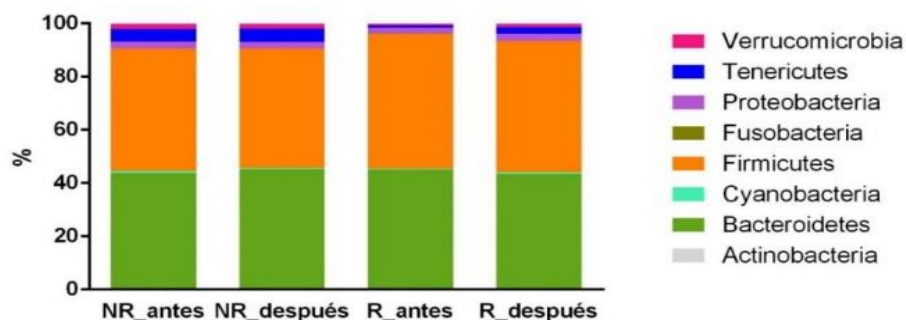
Debido a que, diferencias taxonómicas en la composición del microbiota intestinal de los RP y NR antes de la intervención podrían influir en la respuesta de los pacientes a la DBF, se comparó la microbiota intestinal de los pacientes antes de la intervención dieto-terapéutica entre RP y NR.

El análisis bioinformático se realizó a través de las secuencias obtenidas de 32 pacientes. Tras ejecutar el control de calidad de secuencias y la remoción de quimeras, con la herramienta DADA2, se obtuvieron 1, 795, 602 lecturas, con un promedio de 27, 206 de lecturas totales por muestra. Agrupando lecturas únicas de las muestras individuales, se identificó la presencia de 6, 469 variantes de secuencia de amplicones (ASVs). La gráfica de acumulación de especies mostró que la riqueza genética se aproximaba a la saturación en función del tamaño de la muestra, lo que indica que la cantidad de muestras era suficiente para resolver la mayoría de los géneros y buena para capturar la diversidad microbiana (**ANEXO 6**). Posteriormente se analizó la riqueza y la uniformidad de la microbiota intestinal en pacientes RP en comparación con los pacientes NR. Se buscaron diferencias intra e intergrupales, a partir de índices de alfa diversidad incluyendo OTUs observados, Shannon y diversidad filogenética (PD) y Pleiou_e (**ANEXO 7**). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en dichas métricas (Gráfica 1.A-C). Los pacientes RP y NR antes y después de la intervención fueron diversos de acuerdo con el índice de Shannon (Gráfica 1.A). La similitud en la estructura de las comunidades microbianas fue comparada con un análisis de beta diversidad, mediante un análisis de coordenadas principales (PCoA) basado en weighted-UniFrac y unweighted UniFrac, para observar una comparación completa de comunidades microbianas, sin embargo, no fue posible observar la separación de los grupos (**ANEXO 8**). El análisis PERMANOVA con 999 permutaciones, no mostró cambios en la beta diversidad intra o intergrupales (**ANEXO 9**). El análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en la distancia de Jaccard mostró una nula separación entre NR y RP antes y después dieta (**ANEXO 10**).

12.3.1. Composición a nivel de Filo

Las comunidades microbianas de los pacientes RP y NR se caracterizaron por 8 filos representativos: Firmicutes, Bacteroidetes, Tenericutes, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Fusobacteria y Actinobacteria (Gráfica 2). Se generó un volcano plot con una prueba T de Student

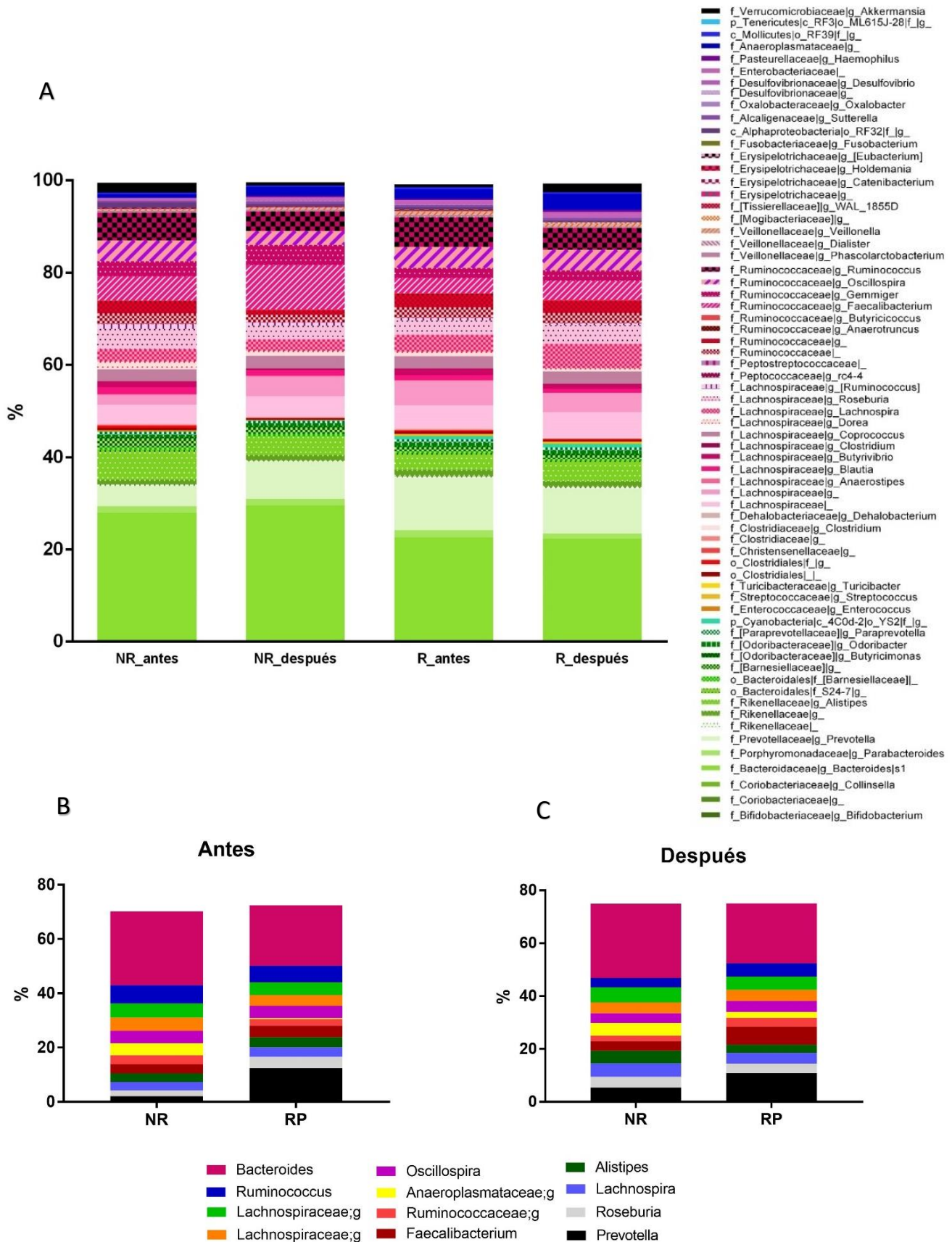
y un FDR ajustado por el método Benjamini-Hochberg entre los sujetos RP y NR antes y después de la DBF (**ANEXO 11**). No se identificaron diferencias en filos bacterianos.



Gráfica 2. Composición a nivel de género, de la microbiota intestinal en RP y NR antes y

12.3.2. Composición a nivel de género

Se caracterizaron los patrones de abundancia relativa de géneros bacterianos considerando a los géneros arriba del 1% de abundancia relativa en ambos grupos, lo que resultó en 143 distintos géneros. Las comunidades microbianas de los pacientes RP antes de la intervención se caracterizaron principalmente por la presencia de los géneros, Bacteroides, Prevotella, Ruminococcus, un género desconocido de la familia Lachnospiraceae y Oscillospira. Por otro lado, los NR antes de la intervención, se caracterizaron principalmente por la presencia de Bacteroides, Ruminococcus, dos géneros no identificados de la familia Lachnospiraceae y Oscillospira.

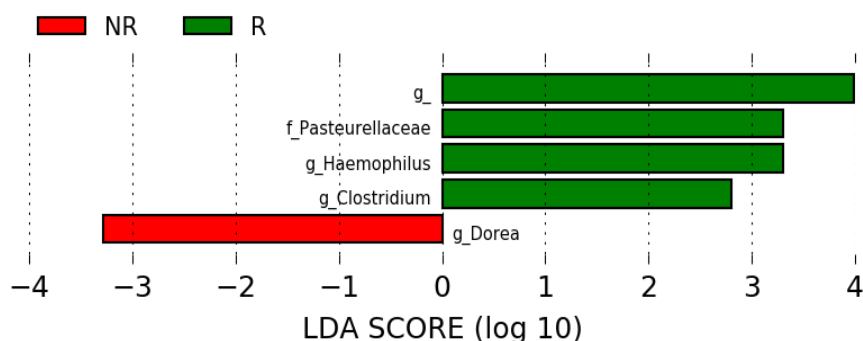


Gráfica 3. Composición a nivel de género antes y después de la DBF: A) Composición de la microbiota intestinal en RP y NR antes y después de la Dieta Baja en FODMAPs. B) Géneros más abundantes en RP y NR antes de la DBF. C) Géneros más abundantes en RP y NR después de la DBF 36

Después de intervención los RP se caracterizaron por principalmente por la presencia de Bacteroides, Prevotella, Oscillospira, un género bacteriano de la familia Lachnospiraceae y Lachnospira. Mientras que los NR se caracterizaron por la presencia de Bacteroides, un género desconocido de Lachnospiraceae, Prevotella, Lachnospira y un género de la familia Anaeroplasmataceae (Gráfica 3).

12.3.3. Análisis del tamaño del efecto del LDA (LefSe).

Posteriormente, se estudiaron los filotipos específicos que responden a la DBF utilizando el algoritmo de tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LDA) (LEfSe), identificando taxones más abundantes en el grupo de RP en comparación con NR (Gráfica 4). Se descubrieron cinco filotipos a nivel de género como posibles biomarcadores, que distinguen la microbiota intestinal entre los pacientes RP y NR a la DBF. Cuatro de los filotipos fueron identificados en NR, estos fueron *Clostridium*, *Haemophilus*, y dos géneros no identificados de las familias Pasteurellaceae y Lachnospiraceae. Por otro lado, en los NR se identificó al género *Dorea*. El histograma de Tamaño del efecto LDA LEfSe con un valor α de 0.1 para prueba Kruskal-Wallis se presenta en el ANEXO 12



Gráfica 4. Análisis del tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LDA) (LEfSe) de las diferencias en la microbiota intestinal entre RP y NR antes de la DBF. El histograma muestra las puntuaciones LDA calculadas para las diferencias en la abundancia a nivel de género entre los RP y NR a la dieta, con un umbral logarítmico de 2. Los valores absolutos del tamaño del efecto, indican la escala de la diferencia entre 2 grupos independientemente de la positividad o negatividad. Los colores representan qué grupo de taxones era más abundante en comparación con el otro grupo. Las puntuaciones de LDA de los RP fueron positivas, mientras que la diferencia en los NR fue negativa. Respondedores antes= RP No respondedores antes = NR.

Se buscaron diferencias en los marcadores inflamatorios séricos entre RP y NR previo a la intervención, los valores se muestran en la Tabla 5. Se encontraron diferencias significativas en las concentraciones de IL-8 de 14.58 (8.84-90.2) y 28.25 (20.46-57.94) pmol/ μ l, en RP y NR, respectivamente ($P= <0.0001$). Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticamente

significativas en las concentraciones séricas de marcadores inflamatorios entre RP y NR después de la intervención, aunque las concentraciones de IL-8 se mantuvieron superiores en NR respecto a los RP después de la DBF. Se buscaron diferencias en los marcadores inflamatorios séricos antes vs después de la DBF en los pacientes RP y los NR. No se encontraron diferencias significativas en ninguno de los marcadores séricos antes y después de la DBF.

Los pacientes RP mantuvieron a lo largo de la intervención bajas concentraciones séricas de IL-1 α e IL-1A, respecto a NR. No obstante, los NR tuvieron menores concentraciones de IL-1RA después de la intervención, antes (76.58 (58.58-251.29)) vs después (54.1 (31.46-130.82)), a diferencia de los RP dónde subieron dichas concentraciones al término de esta.

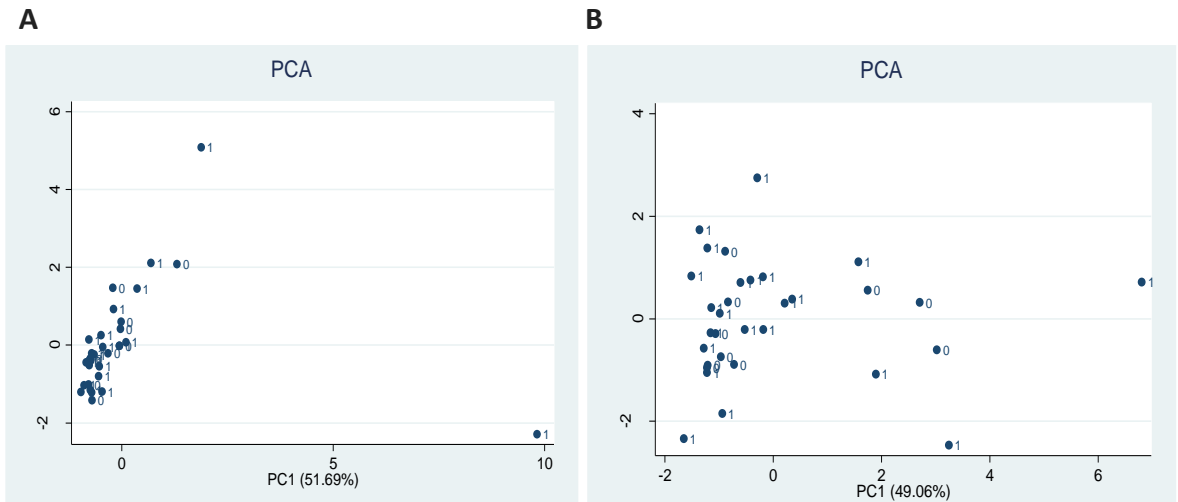
Como análisis exploratorio, se hizo un análisis de componentes principales entre RP y NR antes y otro entre RP y NR después de la DBF. Aunque no se observó separación entre los grupos por tipo de respuesta, antes de la DBF los primeros tres componentes explicaron el 51.69%, el 25.5% y el 14.16% de la variabilidad de los datos, explicando de manera conjunta el 92.53% de la variabilidad. Después de la DBF tampoco se observó separación entre los grupos por el tipo de respuesta, sin embargo, los primeros tres componentes explicaron el 49.06%, 18.64% y el 12.63% de la variabilidad y de manera conjunta el 80.33% (Gráfica 5).

	Respondedores (n=22)		No respondedores (n=10)	
	Antes	Después	Antes	Después
IFN γ	25.05(12.5-33.88)	19.33(12.22-36.99)	26.05(11.4-36.76)	20.09(10.1-36.25)
IL-8	14.58(8.84-90.2)	22.58(7.33-103.2)	28.25(20.46-57.94)*	45.96(11.68-83.51)
IP-10	319.08(250.6-535.8)	412.98(307.8-483.1)	274.2(227.2-332.0)	357.9 (334.3-391.1)
MIP-1α	11.67(4.69-24)	8.91(4.39-42)	19.56(9.54-32.53)	10.92(5.82-31.16)
TNF α	24.25(12.17-33.02)	27.48(14.62-33.02)	23.54(7.95-30.45)	18.88(7.95-30.45)
IL-1RA	32.82(8.27-137.87)	45.3(8.3-82.41)	76.58(58.58-251.29)	54.1(31.46-130.82)
IL-1α	9.28(9.28-85.51)	9.28(9.28-63.73)	45.53(15.64-97.37)	29.62(9.28-117.01)

Datos presentados como mediana, y percentil 25 y 75.

Prueba estadística U- de Mann-Whitney para variables no paramétricas de muestras independientes (P<0.05) *

Prueba estadística Wilcoxon para variables no paramétricas (P<0.05) *

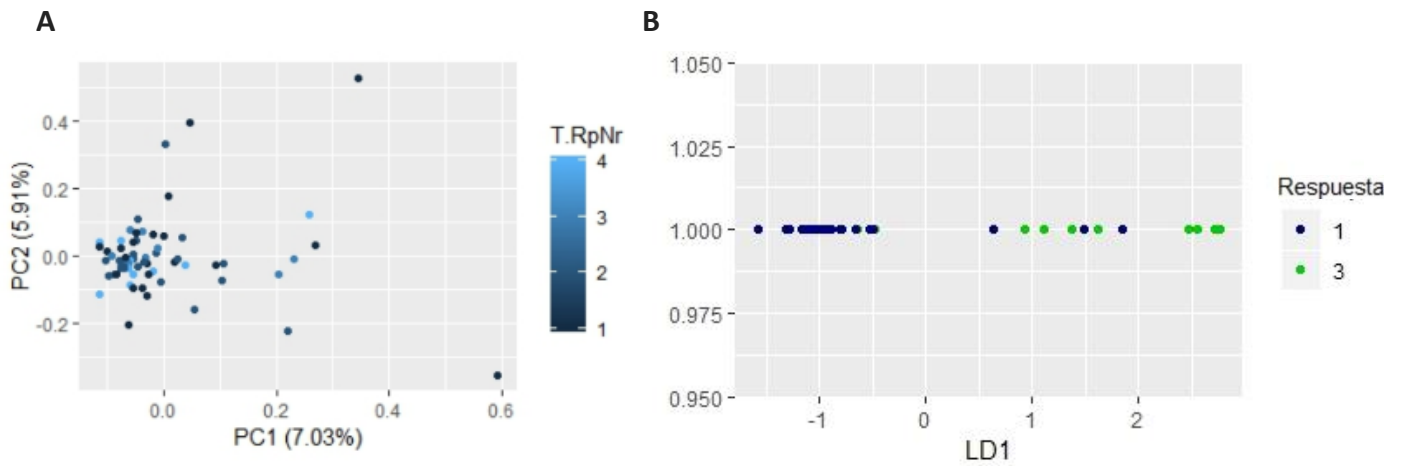


Gráfica 5. Análisis de Componentes Principales de marcadores inflamatorios séricos antes y después de la DBF por tipo de respuesta. A) Marcadores inflamatorios séricos en pacientes RP y NR antes de la DBF. B) Marcadores inflamatorios séricos en pacientes RP y NR después de la DBF. B) LDA de géneros bacterianos fermentadores de hidratos de carbono y marcadores inflamatorios séricos en pacientes RP y NR antes de la DBF. Grupos: RP = 0; NR= 1

12.5. Análisis de Componentes Principales y Análisis Discriminante Lineal

Para explorar la capacidad de discriminación de los marcadores bacterianos e inflamatorios para distinguir entre respondedores y no respondedores, se consideraron, la abundancia de bacterias fermentadoras de HC y las concentraciones séricas de marcadores proinflamatorios de RP y NR, antes y después de la DBF. Con esto se realizó un análisis de componentes principales (PCA) (Gráfica 6). No se observó segregación entre los grupos, el Componente Principal 1 (PC1) tuvo una contribución del 7.03%, mientras que el PC2 contribuyó en 5.91% a la variación de los datos (**ANEXO 13**).

Se utilizó un Análisis Discriminante Lineal (LDA) para construir una tabla de contingencia y así clasificar a los pacientes con SII respondedores y no respondedores a la DBF usando la abundancia de todas las bacterias fermentadoras de HC antes de la DBF en RP y NR (**ANEXO 14**). Dando como resultado un 90.9% de verdaderos positivos, es decir, clasificados correctamente como respondedores, 0.09 % de falsos positivos, clasificados incorrectamente como respondedores, y un 80% de verdaderos negativos, clasificados correctamente como no respondedores (Tabla 6).



Gráfica 6. Análisis de Componentes Principales y Análisis Discriminante Lineal. A) PCA de géneros bacterianos fermentadores de hidratos de carbono y marcadores inflamatorios séricos en pacientes RP y NR antes y después de la DBF. T.RpNr: Tiempo/respuesta; Grupos: RA = 1; RD = 2; NRA=3; NRD = 4. B) LDA de géneros bacterianos fermentadores de hidratos de carbono y marcadores inflamatorios séricos en pacientes RP y NR antes de la DBF. Grupos: RA = 1; NRA=3.

Tabla 6. Tabla de contingencia. Análisis Discriminante Lineal con cambio en la abundancia de géneros bacterianos y marcadores inflamatorios séricos.

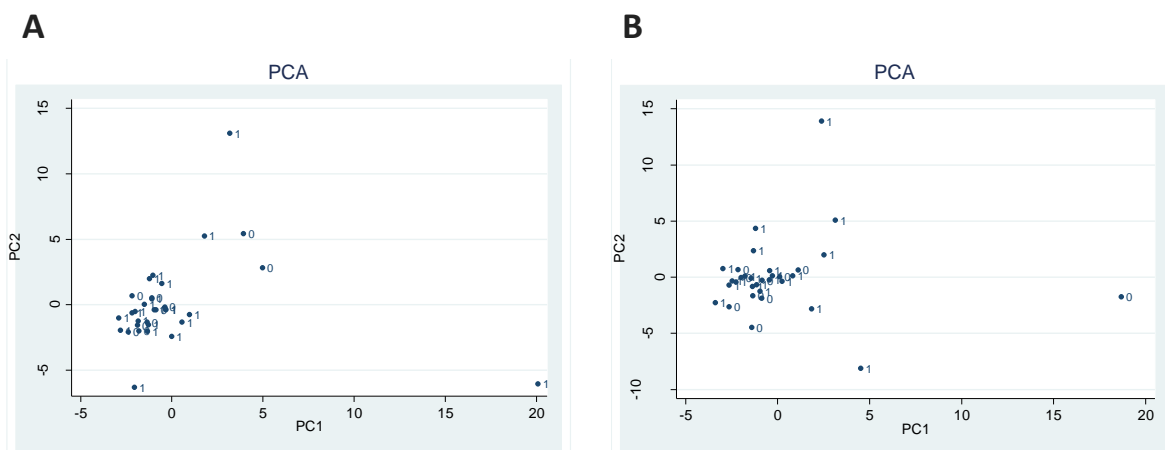
Verdaderos/ Respuesta	Clasificados		Total
	No respondedor	Respondedor	
No Respondedor	8(80%)	2(20%)	22(100%)
Respondedor	2(9.09%)	20 (90.9%)	10(100%)
Total	10(31.25)	22(68.75%)	32(100%)

Tabla de contingencia. Clases predichas mediante el Análisis Discriminante Lineal para RP y NR antes de la dieta baja en FODMAPs considerando géneros bacterianos y marcadores inflamatorios.

Con la finalidad de reducir el número de variables para la función discriminante, se hizo un PCA con las bacterias fermentadoras de HC y los marcadores inflamatorios séricos antes de la DBF, y se consideraron las variables con el coeficiente negativo más alto dentro del primer componente principal para integrarlas en un LDA, el primer componente contribuyó al 10.88% a la variabilidad de los datos, y el segundo al 7.5% (Gráfica 6.A.). Se consideraron 17 variables; los taxones *Bacteroides*, *Sutterella*, *Parabacteroides*, *Odoribacter*, Rikenellaceae, *Faecalibacterium*, BRNAesiellaceae, rf32, *Lachnospira*, Lachnospiraceae, Erysipelotrichaceae, *Clostridium*,

Peptostreptococcaceae, Victivallaceae y *Victivallis* y los marcadores inflamatorios IP-10 e IFN- γ para la construcción de una función lineal. Esta clasificó al 100% de los pacientes NR y al 86.36% de los RP correctamente (Tabla 7).

Para saber si después de la intervención de 4 semanas con la dieta baja en FODMAPs, los pacientes respondedores continuaban siendo disimilares, se hizo un PCA con las bacterias fermentadoras de HC y los marcadores inflamatorios séricos después de la DBF, y se consideraron las variables con el coeficiente negativo más alto dentro del primer componente y se integraron en un LDA, el primer componente contribuyó al 10.35% a la variabilidad de los datos, y el segundo al 8% (Gráfica 6.B.). Se consideraron 14 variables; los taxones *Campylobacter*, *Phascolarctobacterium*, *Leptotrichia*, *Clostridium*, Gemellaceae, *Haemophilus*, *Prevotella*, *Veillonella*, *Roseburia*, *Bacteroides*, *Paraprevotella* y los marcadores inflamatorios TNF α , IL-1 α y MIP-1 α para la construcción de una función lineal. Esta clasificó al 90% de los pacientes NR y al 77.27% de los RP correctamente (Tabla 8).



Gráfica 6. Análisis de Componentes Principales y Análisis Discriminante Lineal. A) PCA de géneros bacterianos fermentadores de hidratos de carbono y marcadores inflamatorios séricos en pacientes RP y NR antes de la DBF. Grupos: RA = 1; RD = 2; NRA=3; NRD = 4. **B)** PCA de géneros bacterianos fermentadores de hidratos de carbono y marcadores inflamatorios séricos en pacientes RP y NR después de la DBF. NR = 0, RP = 1

Tabla 7. Tabla de contingencia. Análisis Discriminante Lineal con cambio en la abundancia de géneros bacterianos y marcadores inflamatorios séricos.

Verdaderos/ Respuesta	Clasificados		Total
	No Respondedor	Respondedor	
No Respondedor	10(100%)	0(0%)	10(100%)
Respondedor	3(13.64%)	19(86.36%)	22(100%)
Total	13(40.63%)	19(59.38%)	32(100%)

Clases predichas mediante el Análisis Discriminante Lineal para RP y NR antes de la dieta baja en FODMAPs considerando géneros bacterianos fermentadores de HC y marcadores inflamatorios.

Tabla 8. Tabla de contingencia. Análisis Discriminante Lineal con cambio en la abundancia de géneros bacterianos y marcadores inflamatorios séricos.

Verdaderos/ Respuesta	Clasificados No respondedor	Clasificados Respondedor	Total
No Respondedor	9(90%)	1(10%)	10(100%)
Respondedor	5(22.73%)	17(77.27%)	22(100%)
Total	14(43.75%)	18(56.25%)	32(100%)

Clases predichas mediante el Análisis Discriminante Lineal para RP y NR después de la dieta baja en FODMAPs considerando géneros bacterianos fermentadores de HC y marcadores inflamatorios

13. DISCUSIÓN

El objetivo de este proyecto fue identificar bacterias fermentadoras de hidratos de carbono y marcadores inflamatorios séricos que ayudarán a discriminar a los pacientes con SII no respondedores (NR) de los sujetos respondedores (RP) a una dieta baja en FODMAPs.

Se clasificó a los participantes como RP o NR de acuerdo a los valores registrados en la Escala Análoga Visual (VAS-IBS) después del consumo de una dieta baja en FODMAPs. De acuerdo con esta clasificación el 68.75% de los participantes fueron RP. El grupo RP estuvo conformado por pacientes de los tres subtipos y el grupo NR estuvo conformado por pacientes del subtipo SII-C y SII-M. En este estudio, los sujetos RP reflejaron una mejora significativa en todos los síntomas de la VAS-IBS. Por otro lado, en los sujetos NR el cambio en la sintomatología sólo abarcó los síntomas de “Constipación” y “Distensión y flatulencia”, el resto de los síntomas permanecieron sin cambio. Aunque no está claro si este cambio en la sintomatología resulta de la restricción de FODMAPs o de la eliminación de un solo componente, como por ejemplo la lactosa (56).

Respecto a la α y β diversidad no se encontraron diferencias entre los sujetos RP vs los sujetos NR, lo anterior concuerda con otros estudios, donde tampoco se observan diferencias en la α y β diversidad en respuesta a la DBF en pacientes con SII (65).

Las comunidades microbianas de los pacientes RP y NR se caracterizaron por la presencia de los filos Firmicutes (49% en ambos grupos), Bacteroidetes (46% y 40%, respectivamente), Tenericutes, Proteobacteria, Verrucomicrobia, Cyanobacteria, Fusobacteria y Actinobacteria, sin encontrarse diferencias entre los sujetos RP y NR antes y después de la intervención.

Antes del consumo de la DBF, la microbiota intestinal de ambos grupos se caracterizó por la presencia de Bacteroides, Ruminococcus, Oscillospira y géneros no identificados dentro de la familia Lachnospiraceae. Los Ruminococcus se han relacionado a la degradación de la capa mucosa del intestino, lo que se asocia a la infiltración de Streptococcus spp o Staphylococcus aureus, llevando a la activación de la respuesta inmune en pacientes con SII (76), por otro lado la familia de Lachnospiraceae, es una familia de clostridios que incluye los principales constituyentes del microbioma del TGI de los mamíferos (82) y ha sido reconocida como desencadenante de la reactividad inmunológica en pacientes con enfermedad de Crohn y subtipos de SII (83).

Los pacientes RP antes del consumo de la DBF se caracterizaron por la presencia del género Prevotella. Este género se ha correlacionado con la severidad de los síntomas del SII y ha sido asociado principalmente al subtipo SII-D (84, 85). Al ser un taxón abundante en los pacientes RP después del consumo de la DBF se sugiere que este taxon podría no ser responsable de la aparición o exacerbación de los síntomas en este grupo de pacientes. De forma interesante, la abundancia de este taxon se incrementó en los sujetos NR después del consumo de la DBF, lo que podría indicar que este taxón no responde a la restricción de FODMAP en la dieta o que debido a los cambios en otros miembros de la microbiota a falta de HC fermentables, se promueve su proliferación (86).

Debido a que la restricción de FODMAPs se acompaña de la disminución en la fermentación sacarolítica y el incremento de la fermentación proteolítica (71) se estudiaron los filotipos específicos que responden a la DBF utilizando el Análisis Discriminante Lineal. Los pacientes clasificados como RP y los NR, se diferenciaron por la presencia de Clostridium, Haemophilus, y dos géneros no identificados de las familias Pasteurellaceae y Lachnospiraceae. La familia Pasteurellaceae son bacterias gram-, anaeróbicos facultativos, fermentadoras de glucosa, estrictamente comensales o bien, patógenos oportunistas. Es la única familia constituyente del orden Pasteurellales y abarca, los géneros Pasteurella, Actinobacillus y Haemophilus (87). La mayoría de las especies reducen los nitratos a nitritos (87). La familia Pasteurellaceae ha sido principalmente estudiada por la importancia de muchos de sus miembros como patógenos, sin embargo, su relación con el anfitrión humano, como miembro de la microbiota intestinal aún es poco claro.

Por otro lado, en los NR se identificó al género *Dorea*, un género bacteriano gram + de la familia de Lachnospiraceae, de los principales productores de gas en el intestino humano, sus productos finales a partir de la fermentación de la glucosa son el hidrógeno y el dióxido de carbono. Se ha encontrado aumento en la abundancia de *Dorea spp*, tanto en pacientes pediátricos como en

adultos con SII (19, 88) lo que probablemente podría explicar la distensión, experimentada por la mayoría de estos pacientes. Los FODMAPs, al ser fermentados por la microbiota colónica, incrementan la producción de gas, específicamente de hidrógeno, el cual se ha asociado con dolor abdominal y flatulencia en los sujetos con SII. Por otro lado, los miembros de las agrupaciones de Clostridium XIVa y IV (p. Ej., Dorea spp., Lachnospiraceae, Ruminococcus spp., Faecalibacterium spp. y Roseburia spp.), están disminuidos personas con EII y colitis aguda, lo que sugiere que estos organismos participan el mantenimiento de la homeostasis intestinal (89).

Para entender la función de la microbiota en la fisiopatología del SII, se han propuesto distintos mecanismos, dentro de estos uno señala que las alteraciones en su composición y actividad metabólica, activan la respuesta inmune en la mucosa intestinal, creciente evidencia implica que la inflamación de bajo grado y disfunción del sistema inmune innato, ocasionan disfunción de la barrera epitelial e incremento en la permeabilidad. Por tanto, se cuantificaron 8 citocinas en suero por Multiplex, buscando diferencias entre RP y NR previo a la intervención dieto-terapéutica. En este estudio, antes de la DBF, las concentraciones séricas de IL-8 fueron significativamente mayores en el grupo de NR respecto al grupo de RP. Lo que podría sugerir que en los pacientes NR existe un incremento en la actividad de células productoras de IL-8, como macrófagos activados y células epiteliales, que podrían mediante esta quimiocina dirigir la infiltración de neutrófilos a la mucosa intestinal. No se encontraron diferencias en las concentraciones séricas de marcadores inflamatorios entre RP y NR después de la intervención.

El cómo estas diferencias en la microbiota intestinal, pueden influir en mecanismos fisiopatológicos relacionados al SII no puede ser inferido del presente estudio. Sin embargo, considerando los hallazgos antes mencionados, estos distintos taxones podrían asociarse con alteraciones inmunológicas en el anfitrión.

La efectividad clínica de un régimen de alimentación debe compararse con el impacto que tiene en la ingesta adecuada de nutrimentos. La dieta de los sujetos RP y NR antes y después de la DBF se aproximó a la distribución normal de macronutrimentos. Por otro lado, la dieta de los sujetos RP y NR se caracterizó por ser baja en fibra, siendo cercana a la mitad de la Ingesta Diaria Recomendada (IDR) para adultos de acuerdo con las recomendaciones de la FAO/OMS. Las dietas de bajas en fibra conducen a menor producción de SCFA y a un menor número de células Treg (90). Se sabe que el butirato limita la inflamación intestinal al promover la formación de Tregs (91). Este aumento se

atribuye a: la inhibición de las desacetilasas de histonas (92) y a la activación del receptor Gpr109a en células dendríticas y macrófagos para promover la diferenciación de las células T en Treg (93). La dieta de ambos grupos antes de la DBF se caracterizó por ser abundante en carnes y cereales, con un bajo consumo de leguminosas y leche, así como por el consumo moderado de azúcares y grasas. Se ha sugerido que el consumo de dietas altas en grasas se asocia menor concentración de SCFA totales, enriquecimiento fecal de ácido araquidónico, de la vía de biosíntesis de los lipopolisacáridos y con el incremento de mediadores proinflamatorios en plasma (94, 95). En este estudio, después de la intervención con la DBF, se observó disminución significativa en el consumo de equivalentes grasa en los sujetos RP. Debido a esto, no podemos descartar la posibilidad de que la reducción en la ingesta de grasa contribuya a la mejora de los pacientes, al influir en la microbiota intestinal y la respuesta inflamatoria.

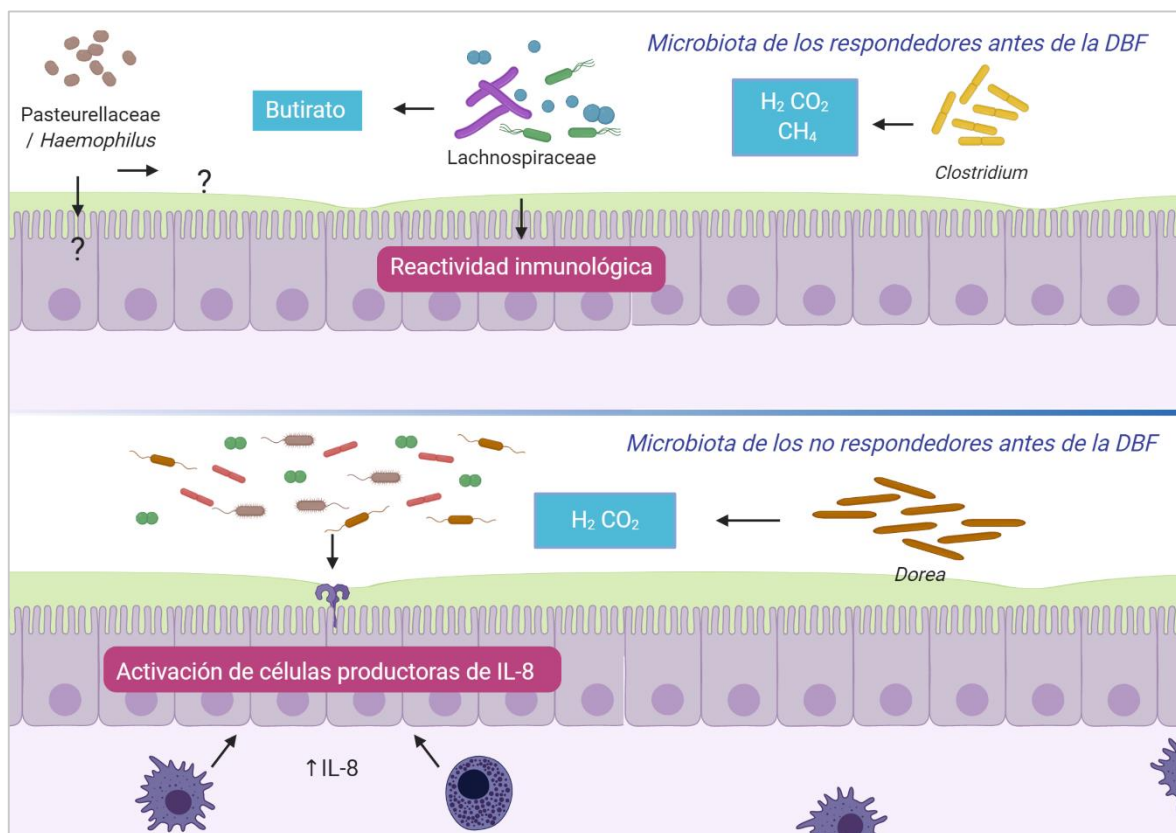


Figura 3. Microbiota intestinal de los pacientes con SII respondedores y no respondedores a la DBF antes del tratamiento. Los pacientes RP a la DBF se caracterizaron por el enriquecimiento de *Clostridium*, bacterias anaeróbicas que fermentan una amplia variedad de fuentes de carbono, miembros de Lachnospiraceae, importantes productores de butirato de la microbiota intestinal y miembros de Pasteurellaceae como *Haemophilus*. Por otro lado, los NR se caracterizaron por la presencia del género *Dorea*, uno de los principales productores de hidrógeno y dióxido de carbono en el intestino y por el incremento en las concentraciones séricas de IL-8.

La DBF, elimina muchos alimentos condicionando la ingesta insuficiente de micronutrientes como el calcio, hierro, zinc, folato, vitaminas B y D, antioxidantes naturales y fibras dietéticas (96). En este estudio, los sujetos RP tuvieron menor ingesta de ácido fólico, hierro y calcio y mayor consumo de sodio, antes y después de la DBF. Por otro lado, antes de la DBF, los sujetos NR tenían una ingesta adecuada de micronutrientes, y después de la DBF tuvieron un consumo deficiente de ácido fólico, hierro y calcio. Es importante destacar que la evaluación de la ingesta de nutrientes y la diversificación de la dieta en los períodos secuenciales posteriores a la reintroducción de FODMAP son importantes para establecer si la dieta baja en FODMAP presenta algún riesgo nutricional para el SII a largo plazo (56). Estos resultados también destacan la importancia de limitar el periodo de restricción de FODMAPs evitando así deficiencias de micronutrientes a largo plazo y sus repercusiones a la salud.

Como método de análisis de datos exploratorio, se utilizó un Análisis de Componentes Principales, donde, se consideraron, la abundancia de bacterias fermentadoras de hidratos de carbono y las concentraciones séricas de marcadores proinflamatorios de RP y NR, antes y después de la DBF. No se observó segregación entre los grupos. Posteriormente, se consideró, la abundancia de bacterias fermentadoras de hidratos de carbono y las concentraciones séricas de marcadores proinflamatorios de RP y NR para hacer un Análisis Discriminante Lineal y construir una tabla de contingencia.

El PCA y el LDA son comúnmente utilizadas para la clasificación de datos y la reducción de la dimensionalidad. El Análisis Discriminante Lineal es útil, en el caso en el que las frecuencias dentro de la clase son desiguales. Este método maximiza la relación entre la varianza entre clases y la varianza dentro de la clase en cualquier conjunto de datos en particular, garantizando así la máxima separabilidad. Se decidió implementar un modelo LDA para proporcionar una mejor clasificación en comparación con el análisis de componentes principales. La principal diferencia entre el LDA y el PCA es que el PCA hace una mejor clasificación de las características y el LDA la clasificación de datos. En el PCA, la forma y la ubicación de los conjuntos de datos originales cambian cuando se transforman en un espacio diferente, mientras que LDA no cambia la ubicación, sino que solo intenta proporcionar más separabilidad de clases y dibujar una región de decisión entre dichas clases. EL Análisis Discriminante lineal clasificó al 100% de los pacientes NR y al 86.36% de los RP correctamente.

14. CONCLUSIONES

- Las comunidades microbianas en los pacientes con SII fueron similares entre RP y NR y se mantuvieron sin cambios en α y β diversidad después de la DBF.
- Utilizando el algoritmo de tamaño del efecto del Análisis Discriminante Lineal (LDA) (LEfSe). Los pacientes clasificados como RP y los NR se diferenciaron por la presencia de cinco marcadores bacterianos. Cuatro de los filotipos fueron identificados en RP, estos fueron *Clostridium*, *Haemophilus*, y dos géneros no identificados de las familias Pasteurellaceae y Lachnospiraceae, en los NR se identificó al género *Dorea*.
- Antes de la DBF, las concentraciones séricas de IL-8 fueron superiores en el grupo de NR respecto al grupo de RP. Sugiriendo que en los pacientes RP hay un incremento en la actividad de las productoras de IL-8, cómo células epiteliales y en la infiltración de neutrófilos en la mucosa intestinal.
- Miembros del género *Clostridium*, pueden ser en parte responsables de la generación de los síntomas, debido a la acumulación de sus productos de fermentación, este grupo de bacterias puede ser por tanto más sensible a la restricción de FODMAPs, lo que podría impactar en su producción total de gases y otros productos metabólicos.
- En los NR antes de la DBF, especies productoras de butirato de la familia Lachnospiraceae podían representar una ventaja o una amenaza para el anfitrión, ayudando al mantenimiento de la integridad del epitelio intestinal o bien despertando la respuesta inmune en la mucosa intestinal. Sin embargo, la dieta antes y después de la DBF se caracterizó por ser baja en fibra, lo que podría condicionar la producción de butirato, limitando sus potenciales efectos tróficos e inmunoreguladores.
- La familia Pasteurellaceae, cuyos miembros se caracterizan por ser simbioses obligados, frecuentemente patógenos, ha sido estudiada por su relevancia clínica. Sin embargo, su papel como miembro de la microbiota intestinal aún es poco claro.
- En los NR se identificó al género *Dorea*, sabiendo que miembros del género *Dorea*, utilizan glucosa como sustrato, generando gases como producto de su fermentación, podemos llegar a suponer que la restricción de FODMAPs en la dieta podría representar una ventaja para la adaptación de esta bacteria y su establecimiento de nicho, desplazando a otras bacterias que dependen de estos para proliferación y establecimiento en el intestino.

- Se demostraron diferencias en los perfiles bacterianos y las concentraciones séricas de IL-8 en RP y NR antes de la DBF, y se demostró la utilidad de la abundancia de géneros bacterianos y marcadores inflamatorios séricos integrados en el Análisis Discriminante Lineal para la identificación de RP y NR a una DBF.

15. LIMITANTES Y PERSPECTIVAS

Entre las limitantes de este estudio, se encuentran el limitado tamaño de muestra y la heterogeneidad entre la distribución de subtipos de SII dentro de los grupos respondedores o no respondedores a la DBF, ya que a pesar de que se buscaron posibles biomarcadores aplicables a todos los subtipos, la predominancia de subtipos dentro de los grupos pudo haber enmascarado taxones bacterianos asociados a la respuesta en todos los subtipos. No obstante, como se mencionó anteriormente; el SII es una entidad de etiología multifactorial donde convergen diversos factores, ya sean propios del anfitrión, como genéticos e inmuno-entero-endócrinos y ambientales, o bien alteraciones en la microbiota intestinal, por lo que la respuesta a la DBF también podría estar condicionada por algún otro de estos factores, los cuales no fueron abarcados en su totalidad dentro de este estudio, al no ser el objetivo de este.

En este estudio, se identificó a los pacientes con SII que respondieran a una dieta con bajo contenido de FODMAP integrando con un LDA la abundancia de géneros bacterianos fermentadores de hidratos de carbono y marcadores inflamatorios séricos antes de la DBF, dando como resultado la correcta identificación 86.3% de los pacientes respondedores y 100% de los no respondedores. Estos resultados sugieren que el medio inflamatorio promovido por citocinas y la abundancia de bacterias fermentadoras de hidratos de carbono o bien la interacción entre los miembros de la microbiota y el sistema inmune, podrían intervenir en el tipo de respuesta de los pacientes a la restricción de FODMAP en la dieta.

Sin embargo, los niveles de citocinas en sitios reales de inflamación en el intestino desempeñan un papel importante en la respuesta y estos procesos inflamatorios locales podrían revelarse sólo parcialmente a nivel sistémico. Puede ser que citocinas de la inmunidad innata y adaptativa están restringidas a los sitios tisulares de la inflamación, tienen vidas medias relativamente cortas o se muestran en circulación solo en condiciones avanzadas (97), factores que pueden afectar la utilidad de los marcadores séricos para la identificación de respondedores en este estudio.

Sin embargo, podría explorarse posteriormente la utilidad de los biomarcadores que diferenciaron a RP de NR en el análisis LefSe, como herramientas para la identificación de pacientes con SII respondedores a una DBF en una muestra distinta, de mayor tamaño y con otro grupo de pacientes que representen

menor heterogeneidad de subtipos de SII, dentro de los grupos de respondedores y no respondedores, e incluso con esta nueva muestra repetir el Análisis del Tamaño del efecto con el objetivo de mejorar la identificación de biomarcadores para predecir el tipo de respuesta y buscar una validación posterior.

16. REFERENCIAS

1. Lopetuso LR, Petito V, Graziani C, Schiavoni E, Paroni Sterbini F, Poscia A, et al. Gut Microbiota in Health, Diverticular Disease, Irritable Bowel Syndrome, and Inflammatory Bowel Diseases: Time for Microbial Marker of Gastrointestinal Disorders. *Dig Dis*. 2018;36(1):56-65.
2. Sperber AD, Dumitrascu D, Fukudo S, Gerson C, Ghoshal UC, Gwee KA, et al. The global prevalence of IBS in adults remains elusive due to the heterogeneity of studies: a Rome Foundation working team literature review. *Gut*. 2017;66(6):1075-82.
3. Schmulson M, Vargas JA, Lopez-Colombo A, Remes-Troche JM, Lopez-Alvarenga JC. [Prevalence and clinical characteristics of the IBS subtypes according to the Rome III criteria in patients from a clinical, multicentric trial. A report from the Mexican IBS Working Group]. *Rev Gastroenterol Mex*. 2010;75(4):427-38.
4. Valeur J, Smastuen MC, Knudsen T, Lied GA, Roseth AG. Exploring Gut Microbiota Composition as an Indicator of Clinical Response to Dietary FODMAP Restriction in Patients with Irritable Bowel Syndrome. *Dig Dis Sci*. 2018;63(2):429-36.
5. Drossman DA, Hasler WL. Rome IV-Functional GI Disorders: Disorders of Gut-Brain Interaction. *Gastroenterology*. 2016;150(6):1257-61.
6. Singh R, Salem A, Nanavati J, Mullin GE. The Role of Diet in the Treatment of Irritable Bowel Syndrome: A Systematic Review. *Gastroenterol Clin North Am*. 2018;47(1):107-37.
7. Ford AC, Lacy BE, Talley NJ. Irritable Bowel Syndrome. *N Engl J Med*. 2017;376(26):2566-78.
8. Staudacher HM, Irving PM, Lomer MC, Whelan K. Mechanisms and efficacy of dietary FODMAP restriction in IBS. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014;11(4):256-66.
9. Bennet SM, Ohman L, Simren M. Gut microbiota as potential orchestrators of irritable bowel syndrome. *Gut Liver*. 2015;9(3):318-31.
10. Michael Fried K-AG, Igor Khalif, Pali Hungin, Greger Lindberg, Zaigham Abbas, Luis Bustos Fernández, Shobna J. Bhatia, Max Schmulson, Carolina Olano, Anton Le Mair. Síndrome de Intestino Irritable: una Perspectiva Mundial Directrices Mundiales de la Organización Mundial de Gastroenterología 2015.
11. Halkjaer SI, Christensen AH, Lo BZS, Browne PD, Gunther S, Hansen LH, et al. Faecal microbiota transplantation alters gut microbiota in patients with irritable bowel syndrome: results from a randomised, double-blind placebo-controlled study. *Gut*. 2018;67(12):2107-15.
12. Sebastian Domingo JJ. The new Rome criteria (IV) of functional digestive disorders in clinical practice. *Med Clin (Barc)*. 2017;148(10):464-8.
13. Amieva-Balmori M, Meixueiro-Daza A, Cantón P. Síndrome de intestino irritable en México. Estudio nacional utilizando cuestionario modular Roma III. *Rev Gastroenterol Mex*. 2014;79(supl 2):2.

14. Engsbro AL, Begtrup LM, Kjeldsen J, Larsen PV, de Muckadell OS, Jarbol DE, et al. Patients suspected of irritable bowel syndrome--cross-sectional study exploring the sensitivity of Rome III criteria in primary care. *Am J Gastroenterol*. 2013;108(6):972-80.
15. Schmulson M, Lopez-Colombo A, Mendoza-Gomez A. The Rome III Adult Questionnaire in Spanish-Mexico has a low sensitivity for identifying IBS and higher sensitivity for uninvestigated dyspepsia. *Gastroenterology*. 2012;142(suppl 1).
16. Schmulson M, Vargas JA, López-Colombo A, RemesTroche JM, López-Alvarenga JC. Prevalence and clinical characteristics of the IBS subtypes according to the Rome III criteria in patients from a clinical, multicentric trial. A report from the Mexican IBS Working Group. *Revista de Gastroenterología de México* 2010;75(4):11.
17. Chumpitazi BP, Self MM, Czyzewski DI, Cejka S, Swank PR, Shulman RJ. Bristol Stool Form Scale reliability and agreement decreases when determining Rome III stool form designations. *Neurogastroenterol Motil*. 2016;28(3):443-8.
18. Menees S, Chey W. The gut microbiome and irritable bowel syndrome. *F1000Res*. 2018;7.
19. Rajilic-Stojanovic M, Biagi E, Heilig HG, Kajander K, Kekkonen RA, Tims S, et al. Global and deep molecular analysis of microbiota signatures in fecal samples from patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology*. 2011;141(5):1792-801.
20. Group NHW, Peterson J, Garges S, Giovanni M, McInnes P, Wang L, et al. The NIH Human Microbiome Project. *Genome Res*. 2009;19(12):2317-23.
21. Louis P, Hold GL, Flint HJ. The gut microbiota, bacterial metabolites and colorectal cancer. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(10):661-72.
22. Almonacid DE, Kraal L, Ossandon FJ, Budovskaya YV, Cardenas JP, Bik EM, et al. 16S rRNA gene sequencing and healthy reference ranges for 28 clinically relevant microbial taxa from the human gut microbiome. *PLoS One*. 2017;12(5):e0176555.
23. Hussa EA, Goodrich-Blair H. It takes a village: ecological and fitness impacts of multipartite mutualism. *Annu Rev Microbiol*. 2013;67:161-78.
24. Weiss GA, Henet T. Mechanisms and consequences of intestinal dysbiosis. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74(16):2959-77.
25. Lazar V, Ditu LM, Pircalabioru GG, Gheorghe I, Curutiu C, Holban AM, et al. Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer. *Front Immunol*. 2018;9:1830.
26. Young SNSVB. Gastrointestinal Microbial Ecology With Perspectives on Health and Disease. In: Said HM, editor. *Physiology of the Gastrointestinal Tract*: Elsevier Inc 2018.
27. Del Campo-Moreno R, Alarcon-Cavero T, D'Auria G, Delgado-Palacio S, Ferrer-Martinez M. Microbiota and Human Health: characterization techniques and transference. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2018;36(4):241-5.
28. Holmes E, Li JV, Marchesi JR, Nicholson JK. Gut microbiota composition and activity in relation to host metabolic phenotype and disease risk. *Cell Metab*. 2012;16(5):559-64.

29. Macfarlane GT, Macfarlane S. Bacteria, colonic fermentation, and gastrointestinal health. *J AOAC Int.* 2012;95(1):50-60.
30. Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol.* 2014;121:91-119.
31. Morrison DJ, Preston T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. *Gut Microbes.* 2016;7(3):189-200.
32. Clarridge JE, 3rd. Impact of 16S rRNA gene sequence analysis for identification of bacteria on clinical microbiology and infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004;17(4):840-62, table of contents.
33. Yang B, Wang Y, Qian PY. Sensitivity and correlation of hypervariable regions in 16S rRNA genes in phylogenetic analysis. *BMC Bioinformatics.* 2016;17:135.
34. Huse SM, Ye Y, Zhou Y, Fodor AA. A core human microbiome as viewed through 16S rRNA sequence clusters. *PLoS One.* 2012;7(6):e34242.
35. Chen Z, Hui PC, Hui M, Yeoh YK, Wong PY, Chan MCW, et al. Impact of Preservation Method and 16S rRNA Hypervariable Region on Gut Microbiota Profiling. *mSystems.* 2019;4(1).
36. Patel JB. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol Diagn.* 2001;6(4):313-21.
37. Janda JM, Abbott SL. 16S rRNA gene sequencing for bacterial identification in the diagnostic laboratory: pluses, perils, and pitfalls. *J Clin Microbiol.* 2007;45(9):2761-4.
38. Ahluwalia B, Moraes L, Magnusson MK, Ohman L. Immunopathogenesis of inflammatory bowel disease and mechanisms of biological therapies. *Scand J Gastroenterol.* 2018;53(4):379-89.
39. Scaldaferrri F, Pizzoferrato M, Gerardi V, Lopetuso L, Gasbarrini A. The gut barrier: new acquisitions and therapeutic approaches. *J Clin Gastroenterol.* 2012;46 Suppl:S12-7.
40. Peterson LW, Artis D. Intestinal epithelial cells: regulators of barrier function and immune homeostasis. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(3):141-53.
41. Salvo Romero E, Alonso Cotoner C, Pardo Camacho C, Casado Bedmar M, Vicario M. The intestinal barrier function and its involvement in digestive disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 2015;107(11):686-96.
42. Gallo RL, Hooper LV. Epithelial antimicrobial defence of the skin and intestine. *Nat Rev Immunol.* 2012;12(7):503-16.
43. Zundler S, Schillinger D, Fischer A, Atreya R, Lopez-Posadas R, Watson A, et al. Blockade of alphaEbeta7 integrin suppresses accumulation of CD8(+) and Th9 lymphocytes from patients with IBD in the inflamed gut in vivo. *Gut.* 2017;66(11):1936-48.
44. Mowat AM, Agace WW. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nat Rev Immunol.* 2014;14(10):667-85.
45. Cianci R, Franza L, Schinzari G, Rossi E, Ianiro G, Tortora G, et al. The Interplay between Immunity and Microbiota at Intestinal Immunological Niche: The Case of Cancer. *Int J Mol Sci.* 2019;20(3).

46. Mabbott NA, Donaldson DS, Ohno H, Williams IR, Mahajan A. Microfold (M) cells: important immunosurveillance posts in the intestinal epithelium. *Mucosal Immunol.* 2013;6(4):666-77.
47. Lazaridis N, Germanidis G. Current insights into the innate immune system dysfunction in irritable bowel syndrome. *Ann Gastroenterol.* 2018;31(2):171-87.
48. Bertiaux-Vandaele N, Youmba SB, Belmonte L, Leclaire S, Antonietti M, Gourcerol G, et al. The expression and the cellular distribution of the tight junction proteins are altered in irritable bowel syndrome patients with differences according to the disease subtype. *Am J Gastroenterol.* 2011;106(12):2165-73.
49. Wilcz-Villega E, McClean S, O'Sullivan M. Reduced E-cadherin expression is associated with abdominal pain and symptom duration in a study of alternating and diarrhea predominant IBS. *Neurogastroenterol Motil.* 2014;26(3):316-25.
50. Darkoh C, Comer L, Zewdie G, Harold S, Snyder N, Dupont HL. Chemotactic chemokines are important in the pathogenesis of irritable bowel syndrome. *PLoS One.* 2014;9(3):e93144.
51. Barbara G, Cremon C, Carini G, Bellacosa L, Zecchi L, De Giorgio R, et al. The immune system in irritable bowel syndrome. *J Neurogastroenterol Motil.* 2011;17(4):349-59.
52. Belmonte L, Beutheu Youmba S, Bertiaux-Vandaele N, Antonietti M, Leclaire S, Zalar A, et al. Role of toll like receptors in irritable bowel syndrome: differential mucosal immune activation according to the disease subtype. *PLoS One.* 2012;7(8):e42777.
53. Pike BL, Paden KA, Alcala AN, Jaep KM, Gormley RP, Maue AC, et al. Immunological Biomarkers in Postinfectious Irritable Bowel Syndrome. *J Travel Med.* 2015;22(4):242-50.
54. Chen J, Zhang Y, Deng Z. Imbalanced shift of cytokine expression between T helper 1 and T helper 2 (Th1/Th2) in intestinal mucosa of patients with post-infectious irritable bowel syndrome. *BMC Gastroenterol.* 2012;12:91.
55. Schmulson M, Pulido-London D, Rodriguez O, Morales-Rochlin N, Martinez-Garcia R, Gutierrez-Ruiz MC, et al. Lower serum IL-10 is an independent predictor of IBS among volunteers in Mexico. *Am J Gastroenterol.* 2012;107(5):747-53.
56. Staudacher HM, Whelan K. The low FODMAP diet: recent advances in understanding its mechanisms and efficacy in IBS. *Gut.* 2017;66(8):1517-27.
57. Evans PR, Piesse C, Bak YT, Kellow JE. Fructose-sorbitol malabsorption and symptom provocation in irritable bowel syndrome: relationship to enteric hypersensitivity and dysmotility. *Scand J Gastroenterol.* 1998;33(11):1158-63.
58. Gudmand-Hoyer E. The clinical significance of disaccharide maldigestion. *Am J Clin Nutr.* 1994;59(3 Suppl):735S-41S.
59. Shepherd SJ, Parker FC, Muir JG, Gibson PR. Dietary triggers of abdominal symptoms in patients with irritable bowel syndrome: randomized placebo-controlled evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2008;6(7):765-71.
60. Elia M, Cummings JH. Physiological aspects of energy metabolism and gastrointestinal effects of carbohydrates. *Eur J Clin Nutr.* 2007;61 Suppl 1:S40-74.

61. Scott KP, Gratz SW, Sheridan PO, Flint HJ, Duncan SH. The influence of diet on the gut microbiota. *Pharmacol Res.* 2013;69(1):52-60.
62. Hernot DC, Boileau TW, Bauer LL, Middelbos IS, Murphy MR, Swanson KS, et al. In vitro fermentation profiles, gas production rates, and microbiota modulation as affected by certain fructans, galactooligosaccharides, and polydextrose. *J Agric Food Chem.* 2009;57(4):1354-61.
63. Major G, Pritchard S, Murray K, Alappadan JP, Hoad CL, Marciani L, et al. Colon Hypersensitivity to Distension, Rather Than Excessive Gas Production, Produces Carbohydrate-Related Symptoms in Individuals With Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterology.* 2017;152(1):124-33 e2.
64. Murray K, Wilkinson-Smith V, Hoad C, Costigan C, Cox E, Lam C, et al. Differential effects of FODMAPs (fermentable oligo-, di-, mono-saccharides and polyols) on small and large intestinal contents in healthy subjects shown by MRI. *Am J Gastroenterol.* 2014;109(1):110-9.
65. McIntosh K, Reed DE, Schneider T, Dang F, Keshteli AH, De Palma G, et al. FODMAPs alter symptoms and the metabolome of patients with IBS: a randomised controlled trial. *Gut.* 2017;66(7):1241-51.
66. Madsen JL, Linnet J, Rumessen JJ. Effect of nonabsorbed amounts of a fructose-sorbitol mixture on small intestinal transit in healthy volunteers. *Dig Dis Sci.* 2006;51(1):147-53.
67. Tana C, Umesaki Y, Imaoka A, Handa T, Kanazawa M, Fukudo S. Altered profiles of intestinal microbiota and organic acids may be the origin of symptoms in irritable bowel syndrome. *Neurogastroenterol Motil.* 2010;22(5):512-9, e114-5.
68. Staudacher HM, Lomer MCE, Farquharson FM, Louis P, Fava F, Franciosi E, et al. A Diet Low in FODMAPs Reduces Symptoms in Patients With Irritable Bowel Syndrome and A Probiotic Restores Bifidobacterium Species: A Randomized Controlled Trial. *Gastroenterology.* 2017;153(4):936-47.
69. Ringel-Kulka T, Choi CH, Tamas D, Kim A, Maier DM, Scott K, et al. Altered Colonic Bacterial Fermentation as a Potential Pathophysiological Factor in Irritable Bowel Syndrome. *Am J Gastroenterol.* 2015;110(9):1339-46.
70. Millet S, Van Oeckel MJ, Aluwe M, Delezie E, De Brabander DL. Prediction of in vivo short-chain fatty acid production in hindgut fermenting mammals: problems and pitfalls. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2010;50(7):605-19.
71. Valeur J, Roseth AG, Knudsen T, Malmstrom GH, Fiennes JT, Midtvedt T, et al. Fecal Fermentation in Irritable Bowel Syndrome: Influence of Dietary Restriction of Fermentable Oligosaccharides, Disaccharides, Monosaccharides and Polyols. *Digestion.* 2016;94(1):50-6.
72. Bohn L, Storsrud S, Liljebo T, Collin L, Lindfors P, Tornblom H, et al. Diet low in FODMAPs reduces symptoms of irritable bowel syndrome as well as traditional dietary advice: a randomized controlled trial. *Gastroenterology.* 2015;149(6):1399-407 e2.
73. Altobelli E, Del Negro V, Angeletti PM, Latella G. Low-FODMAP Diet Improves Irritable Bowel Syndrome Symptoms: A Meta-Analysis. *Nutrients.* 2017;9(9).
74. Staudacher HM, Whelan K, Irving PM, Lomer MC. Comparison of symptom response following advice for a diet low in fermentable carbohydrates (FODMAPs) versus standard dietary advice in patients with irritable bowel syndrome. *J Hum Nutr Diet.* 2011;24(5):487-95.

75. Mitchell H, Porter J, Gibson PR, Barrett J, Garg M. Review article: implementation of a diet low in FODMAPs for patients with irritable bowel syndrome-directions for future research. *Aliment Pharmacol Ther.* 2019;49(2):124-39.
76. Bennet SMP, Bohn L, Storsrud S, Liljebo T, Collin L, Lindfors P, et al. Multivariate modelling of faecal bacterial profiles of patients with IBS predicts responsiveness to a diet low in FODMAPs. *Gut.* 2018;67(5):872-81.
77. Chumpitazi BP, Cope JL, Hollister EB, Tsai CM, McMeans AR, Luna RA, et al. 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(4):418-27.
78. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud, (1984).
79. Ethical principles of medical research involving human subjects., (2014).
80. Council for International Organizations of Medical S, (2010.).
81. Hoffmann C, Zimmermann A, Hinney A, Volckmar AL, Jarrett HW, Fromme T, et al. A novel SP1/SP3 dependent intronic enhancer governing transcription of the UCP3 gene in brown adipocytes. *PLoS One.* 2013;8(12):e83426.
82. Meehan CJ, Beiko RG. A phylogenomic view of ecological specialization in the Lachnospiraceae, a family of digestive tract-associated bacteria. *Genome Biol Evol.* 2014;6(3):703-13.
83. Schoepfer AM, Schaffer T, Mueller S, Flogerzi B, Vassella E, Seibold-Schmid B, et al. Phenotypic associations of Crohn's disease with antibodies to flagellins A4-Fla2 and Fla-X, ASCA, p-ANCA, PAB, and NOD2 mutations in a Swiss Cohort. *Inflamm Bowel Dis.* 2009;15(9):1358-67.
84. Vandeputte D, Falony G, Vieira-Silva S, Tito RY, Joossens M, Raes J. Stool consistency is strongly associated with gut microbiota richness and composition, enterotypes and bacterial growth rates. *Gut.* 2016;65(1):57-62.
85. Su T, Liu R, Lee A, Long Y, Du L, Lai S, et al. Altered Intestinal Microbiota with Increased Abundance of *Prevotella* Is Associated with High Risk of Diarrhea-Predominant Irritable Bowel Syndrome. *Gastroenterol Res Pract.* 2018;2018:6961783.
86. Li XZY. Atlas of oral microbiology Atlas of oral microbiology London, UK Academic Press; 2015.
87. Charles B. Clifford KRP-CSJB. Bacterial Infections of Laboratory Mice. The laboratory mouse. London: Academic Press/Elsevier; 2012.
88. Saulnier DM, Riehle K, Mistretta TA, Diaz MA, Mandal D, Raza S, et al. Gastrointestinal microbiome signatures of pediatric patients with irritable bowel syndrome. *Gastroenterology.* 2011;141(5):1782-91.
89. Zhang SL, Wang SN, Miao CY. Influence of Microbiota on Intestinal Immune System in Ulcerative Colitis and Its Intervention. *Front Immunol.* 2017;8:1674.
90. Zeng H, Chi H. Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol.* 2015;36(1):3-12.
91. Furusawa Y, Obata Y, Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, et al. Commensal microbe-derived butyrate induces the differentiation of colonic regulatory T cells. *Nature.* 2013;504(7480):446-50.








92. Arpaia N, Campbell C, Fan X, Dikiy S, van der Veecken J, deRoos P, et al. Metabolites produced by commensal bacteria promote peripheral regulatory T-cell generation. *Nature*. 2013;504(7480):451-5.
93. Singh N, Gurav A, Sivaprakasam S, Brady E, Padia R, Shi H, et al. Activation of Gpr109a, receptor for niacin and the commensal metabolite butyrate, suppresses colonic inflammation and carcinogenesis. *Immunity*. 2014;40(1):128-39.
94. Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, Rey FE, Knight R, Gordon JI. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice. *Sci Transl Med*. 2009;1(6):6ra14.
95. Wan Y, Wang F, Yuan J, Li J, Jiang D, Zhang J, et al. Effects of dietary fat on gut microbiota and faecal metabolites, and their relationship with cardiometabolic risk factors: a 6-month randomised controlled-feeding trial. *Gut*. 2019.
96. Ooi SL, Correa D, Pak SC. Probiotics, prebiotics, and low FODMAP diet for irritable bowel syndrome - What is the current evidence? *Complement Ther Med*. 2019;43:73-80.
97. Korolkova OY, Myers JN, Pellom ST, Wang L, M'Koma AE. Characterization of Serum Cytokine Profile in Predominantly Colonic Inflammatory Bowel Disease to Delineate Ulcerative and Crohn's Colitides. *Clin Med Insights Gastroenterol*. 2015;8:29-44.
98. Blake MR, Raker JM, Whelan K. Validity and reliability of the Bristol Stool Form Scale in healthy adults and patients with diarrhoea-predominant irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2016;44(7):693-703.
99. Minguez Perez M, Benages Martinez A. The Bristol scale - a useful system to assess stool form? *Rev Esp Enferm Dig*. 2009;101(5):305-11.

17. ANEXOS

ANEXO 1

ESCALA DE BRISTOL

La escala de Bristol es una tabla visual diseñada para clasificar la forma de las heces en siete grupos. La Fundación Roma recomienda su uso para clasificar los subtipos del SII de acuerdo con los nuevos criterios de Roma IV y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos recomienda que se use al evaluar la defecación anormal como punto final primario de ensayos de SII-D (98). La escala es que permite al paciente ver un dibujo con la forma de las heces y una explicación minuciosa de la consistencia y forma, con ejemplos fácilmente reconocibles. El paciente únicamente tiene que seleccionar el tipo de heces que, por el dibujo y la descripción, más se aproxima a la forma y consistencia de las heces observadas tras la deposición. Mediante esta escala se ha demostrado que la forma de las heces se correlaciona bien con el tiempo de tránsito intestinal tanto en pacientes con síndrome del intestino irritable como en sujetos sanos (99).

	Tipo 1 Trozos duros separados, como nueces, que pasan con dificultad
	Tipo 2 Con forma de salchicha, pero compuesta de fragmentos duros apilados
	Tipo 3 Como una salchicha, pero con grietas en la superficie
	Tipo 4 Como una salchicha, lisa y suave
	Tipo 5 Trozos pastosos con bordes bien definidos
	Tipo 6 Pedazos blandos y esponjosos con bordes irregulares
	Tipo 7 Acuosa, sin pedazos sólidos, totalmente líquida

- Tipos 1 y 2: Heces anormalmente duras. En conjunto con otros síntomas sugieren constipación.
- Tipos 3 a 5: Heces normales.
- Tipos 6 y 7: Heces anormalmente disminuidas en consistencia o líquidas.

ANEXO 2

CLASIFICACIÓN DE ALIMENTOS SEGÚN CONTENIDO DE FODMAP Y SU RECOMENDACIÓN EN SII

	SEGUROS	CON CUIDADO	EVITAR
VERDURAS	Zanahoria, tomates cherry, ciboulette, pepino, berenjena, endivias, jengibre, poroto verde, pepinillo, espinaca, cebollín, tomates, zapallo italiano y pimentón verde.	Lechuga, aceituna, palta, betarraga, brócoli, repollo Brusela, coliflor, apio, arvejas, champiñones y chucrut.	Alcachofa, espárragos, repollo, ajo, puerros, cebolla, salsa y pasta de tomate, porotos, garbanzos, lentejas y habas.
FRUTAS	Plátano, moras, melón, pomelo, kiwi, limón, mandarina, naranja, maracuyá, piña y frambuesa.	Frutilla y uva.	Manzana, damasco, cerezas, frutas secas, jugos de fruta, mango, nectarines, durazno, peras, caqui, ciruela y sandía.
ALMIDONES	Papa y arroz blanco.	Camote, pastas, cous cous y avena.	Grandes cantidades de trigo integral, cereales integrales, galletas. Queques, pasteles y arroz integral.
NUECES	X	Macadamia, piñones, sésamo, semillas de girasol, semillas de calabaza y nueces.	Almendras, pistachos, avellanas y maní.
LÁCTEOS	Mantequilla, margarina. Quesos brie, camembert, ricotta, mozzarella y parmesano.	Queso maduro o mantecosos. Queso crema, crema.	Queso fresco, yoghurt, leche y helados.
PROTEÍNAS	Carne, pollo, pescados y mariscos, huevos y quinoa.		Salsas, caldos, aderezos, adobo. Embutidos. Carnes procesadas.
GRASAS	Mantequilla y aceite de oliva	Palta	Aderezos para ensaladas
AZÚCARES	x	Chocolate amargo. Cacao en polvo	Jarabe de maíz, agave, miel, dulces sin azúcares, azúcares artificiales.
BEBIDAS Y ALCOHOL	Agua, té (cantidad moderada e infusiones).	Té con frutas, vinos secos, café, gin, whiskey, vodka.	Vinos dulces, cerveza, jugo de frutas, bebidas gaseosas y ron.

Anexo 2. CLASIFICACIÓN DE ALIMENTOS SEGÚN CONTENIDO DE FODMAP Y SU RECOMENDACIÓN EN SII SEGUROS CON CUIDADO. Tomado de: Figueroa C, Rev. Med. Clin. Condes, 2015.

ANEXO 3.

Listado de alimentos equivalentes con bajo contenido de FODMAPs

CARNES Y HUEVO



Bajo y Mediano Contenido en grasa

Atún empacado en agua	1/4 de lata
Bistec de res	(✓)
Clara de huevo	2 piezas
Fajitas de pollo	(✓)
Huevo	1 pieza
Lomo de cerdo	(✓)
Milanesa de cerdo	(✓)
Milanesa de pollo	(✓)
Milanesa de res	(✓)
Mojarra	(✓)
Muslo sin piel	1 pieza med
Pechuga de pavo	3 rebanadas
Pechuga de pollo	1/4 pieza
Pescado blanco	
Pierna de pollo sin piel	1 pieza
Pulpa de ternera	(✓)
Sardinas en aceite	1 pieza

(✓) Tamaño credencial

VERDURA



Chayote	1/2 taza
Espinaca	1/2 taza
Flor de calabaza	1/2 taza
Jitomate	1 pieza
Tomate	1/2 pieza
Pepino	2 tazas
Quelite	100 g
Zanahoria	1/2 taza
Verdolaga	1/2 taza
Puré de tomate	1/4 taza

FRUTA



Kiwi	1 1/2 pieza
Mandarina	2 piezas med
Plátano	1/2 pieza
Naranja	2 piezas
Piña	1 taza
Toronja	1/2 pieza

CEREALES Y TUBÉRCULOS



SIN GRASA

Amaranto	1/2 taza
Arroz al vapor	1/ taza
Elote	1/2 taza
Maiz palomero	1/2 taza
Palomitas sin grasa	3 tazas
Papa	1 pieza
Tortilla	1 pieza

CON GRASA

Papas fritas	4 piezas
Tamal	1/2 pieza

GRASAS A



Aceite s vegetales	1 cdita
--------------------	---------

GUÍA DE ALIMENTACIÓN

Nombre: _____

Grupo	Eq.
Carne, Huevo y Queso	
Verduras	
Frutas	
Cereales y Tubérculos	
• Sin grasa	
• Con grasa	
Grasas	

Observaciones:

ANEXO 4

ESCALA VISUAL ANALOGA PARA EL SÍNDROME DE ÍNTESTINO IRRITABLE (VAS-IBS)

A continuación, encontrará cinco líneas dispuestas horizontalmente, en las cuáles usted marcará con un bolígrafo su percepción entorno a la severidad de sus molestias intestinales, desde hace una semana. (MARQUE CON UNA LINEA UNA SOLA RESPUESTA POR PREGUNTA).

¿Qué tan perturbado/a se ha sentido desde la semana pasada acerca de su?

Dolor abdominal

Mucho  Nada

Diarrea

Mucho  Nada

Constipación

Mucho  Nada

Distensión y flatulencia

Mucho  Nada

Vómito y náusea

Mucho  Nada

¿Han influido sus problemas gastrointestinales en su vida diaria? sí no

¿En la última semana usted ha sentido urgencia en la defecación? sí no

¿Durante la última semana ha sentido que su intestino no ha sido vaciado completamente después de ir al baño? sí no

ANEXO 5

CONSENTIMIENTO INFORMADO NUTRICIÓN



MEXICO D.F., A _____ DE _____ DE 20__

C-PACIENTE _____ EXPEDIENTE _____

SEXO _____ EDAD _____

SE ME INFORMA SOBRE EL DIAGNOSTICO, PRONOSTICO Y PLAN DE MANEJO DE MI PADECIMIENTO, ASI COMO DE LOS POSIBLES RIESGOS Y/O COMPLICACIONES DE ESTE.

COMPRENDO EL CONTENIDO DE ESTE DOCUMENTO, RECIBIENDO LA INFORMACION EN FORMA CLARA Y SENCILLA, SIENDO RESUELTAS MIS DUDAS, POR ESO MANIFIESTO QUE ESTOY SATISFECHO Y DECIDO LLEVAR A CABO EL PROTOCOLO DE ESTUDIO SUGERIDO, ASI COMO DE REALIZAR LAS ACCIONES QUE SE ENCUENTREN INDICADAS PARA EL DIAGNOSTICO Y EL ALCANCE DE LOS POSIBLES RIESGOS, PARA LO CUAL DOY AUTORIZACION PLENA A LA LIC. JACQUELINE URIBE GARCÍA, PARA LA ATENCIÓN DE MI SALUD COMPROMETIÉNDOME EN LAS DISPOSICIONES Y REGLAMENTOS DE LA INSTITUCIÓN.

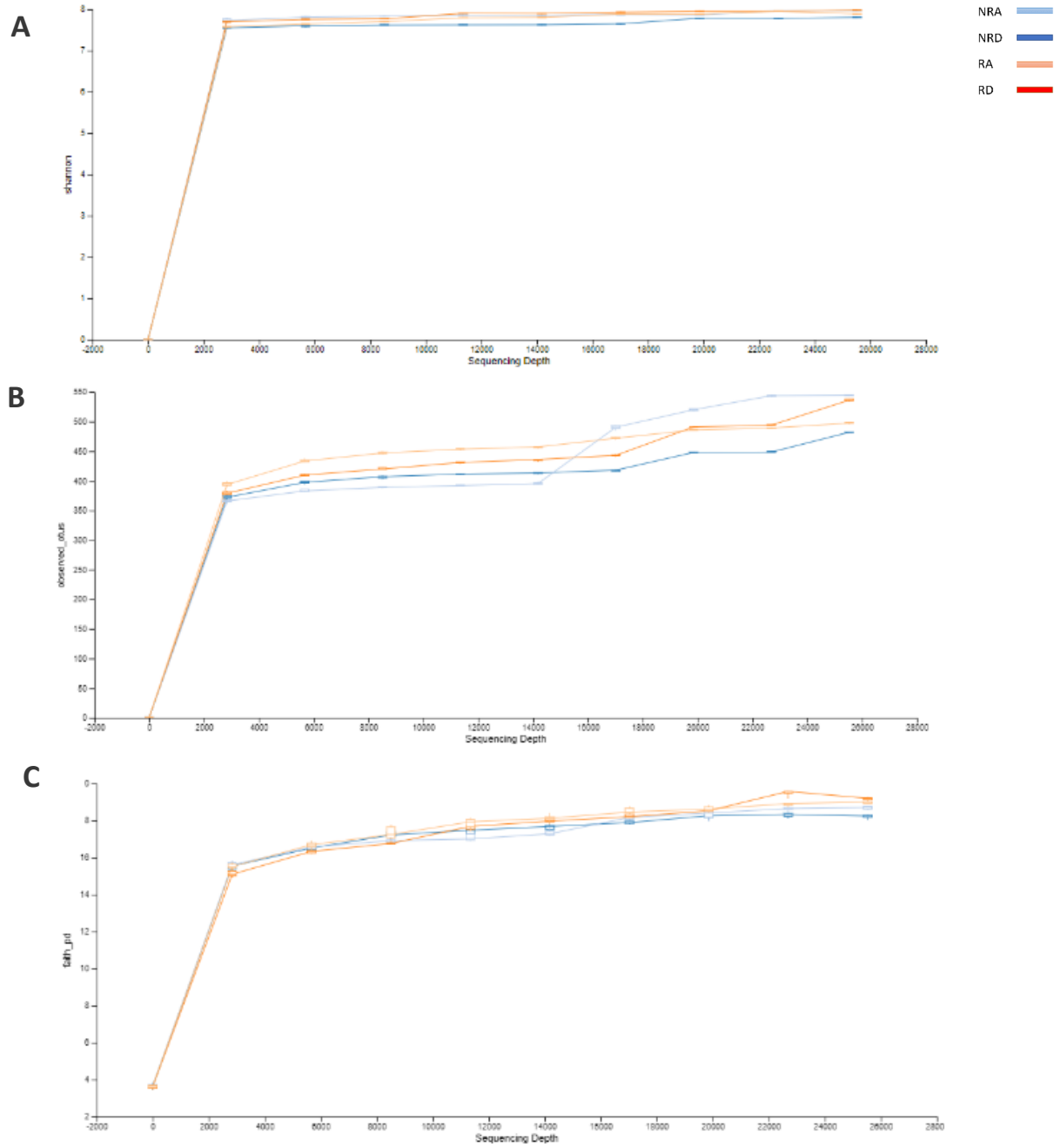
ENTIENDO TAMBIÉN QUE TENGO LA PLENA LIBERTAD DE REVOCAR LA PRESENTE AUTORIZACIÓN EN EL MOMENTO QUE YO DESEE. POR LO QUE ESTANDO CONFORME CON LA INFORMACIÓN QUE SE ME HA PROPORCIONADO DOY MI CONSENTIMIENTO LIBRE Y VOLUNTARIO PARA QUE SE REALICE EL PROCEDIMIENTO.

NOMBRE Y FIRMA DEL PACIENTE

NOMBRE Y FIRMA DEL TESTIGO

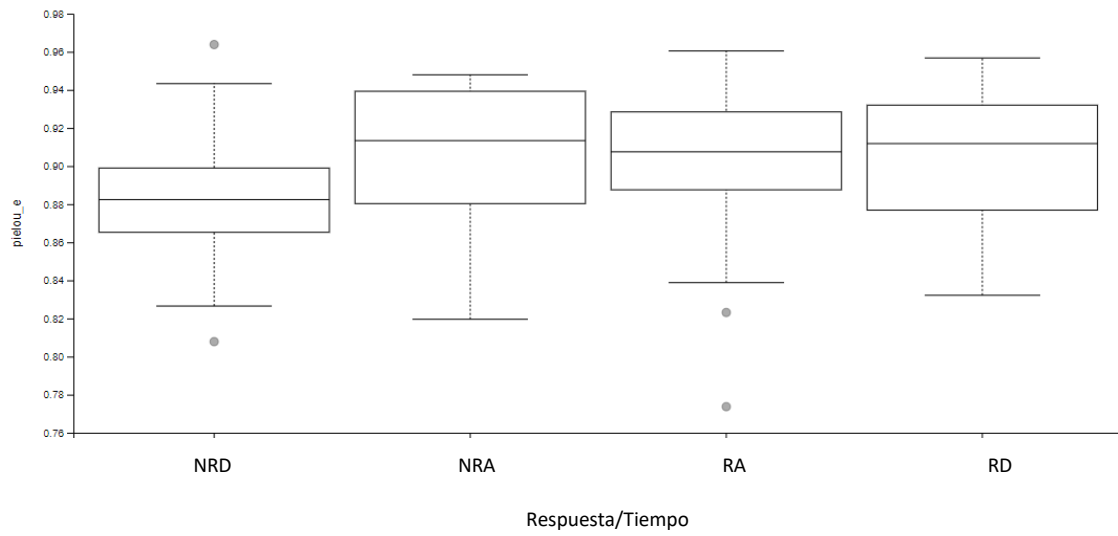
NOMBRE Y FIRMA DEL
RESPONSABLE DEL PROTOCOLO

ANEXO 6



Curvas de rarefacción. Curvas de rarefacción A) Shannon. B) OTUs observados. C) Faith PD, entre RP y NR antes y después de la DBF. RA: Respondedores Antes, RD: Respondedores después, NRA: No respondedores antes, NRD: No respondedores después.

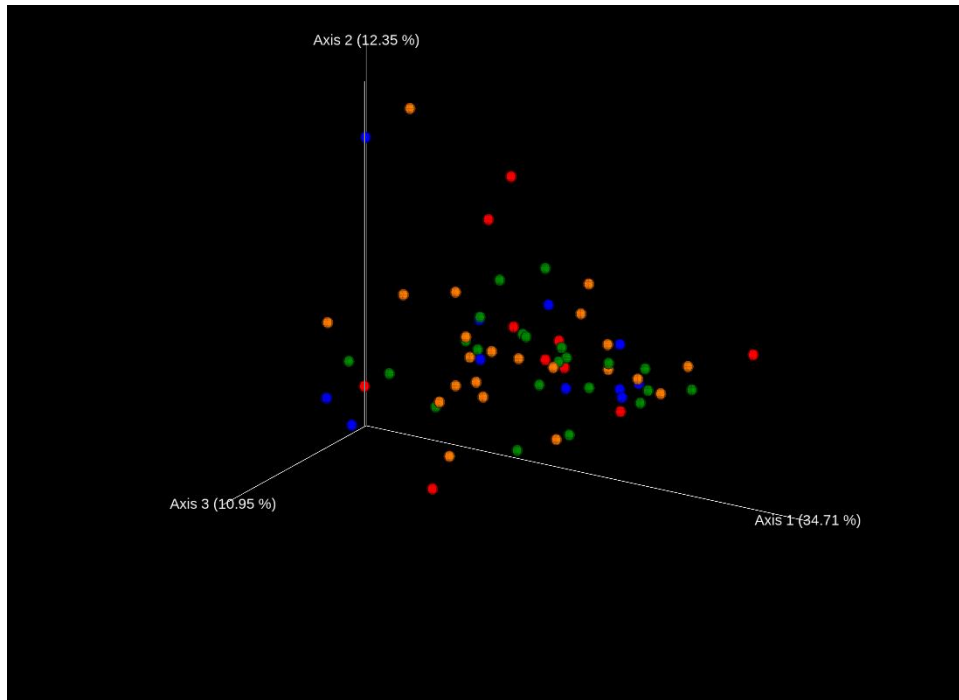
ANEXO 7



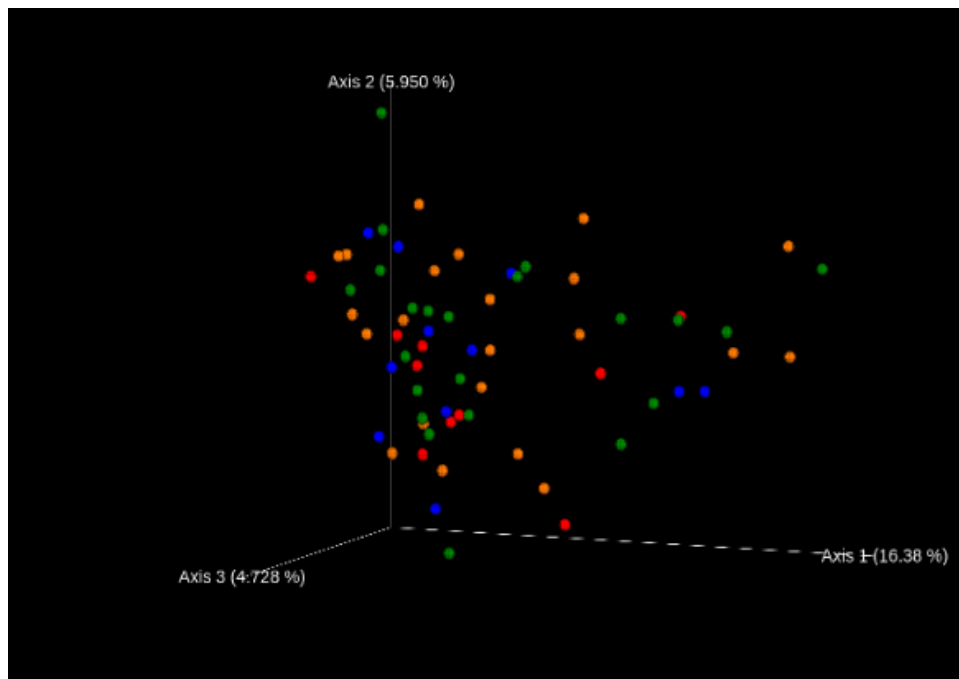
Diferencias intergrupales en alfa diversidad por el índice Pleiou_e entre RP y NR. RA: Respondedores Antes, RD: Respondedores después, NRA: No respondedores antes, NRD: No respondedores después.

ANEXO 8

A



B



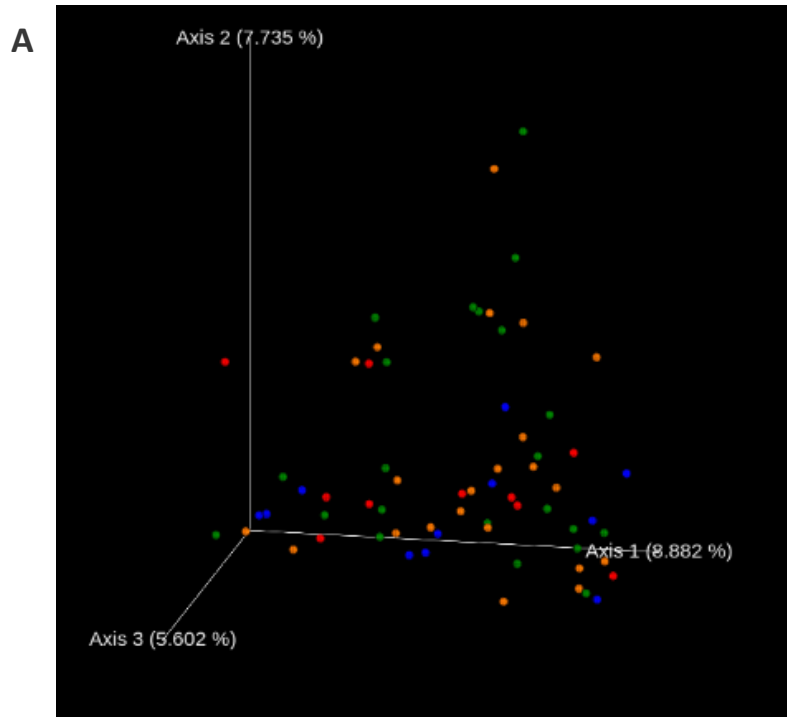
PCoA basado en distancias UniFrac en RP y NR antes y después de la DBF. A) Análisis Weighted UniFrac entre RP y NR. B) Análisis Unweighted UniFrac entre RP y NR. RA: (Verde) Respondedores Antes, RD: (Naranja) Respondedores después, NRA: (Azul) No respondedores antes, NRD: No respondedores después (Rojo).

Anexo 9. Análisis PERMANOVA entre RP y NR antes de la DBF

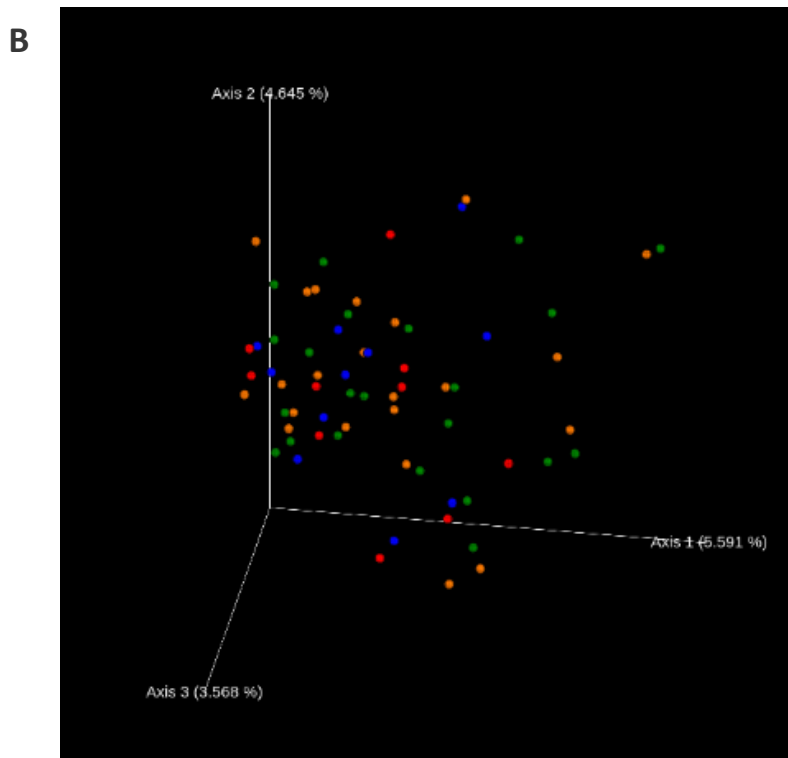
Grupo 1	Grupo 2	Tamaño de la muestra	Permutaciones	pseudo-F	Valor <i>p</i>	Valor <i>q</i>
NRD	NRA	20	999	0.5260	997	1.0
NRD	RD	32	999	0.8703	697	1.0
NRD	RA	32	999	0.8868	662	1.0
NRA	RD	32	999	0.7252	929	1.0
NRA	RA	32	999	0.6335	993	1.0
RD	RA	44	999	0.4438	1.0	1.0

PCoA Análisis PERMANOVA entre RP y NR antes de la DBF RA: Respondedores Antes, RD: Respondedores después, NRA. No respondedores antes, NRD: No respondedores después.

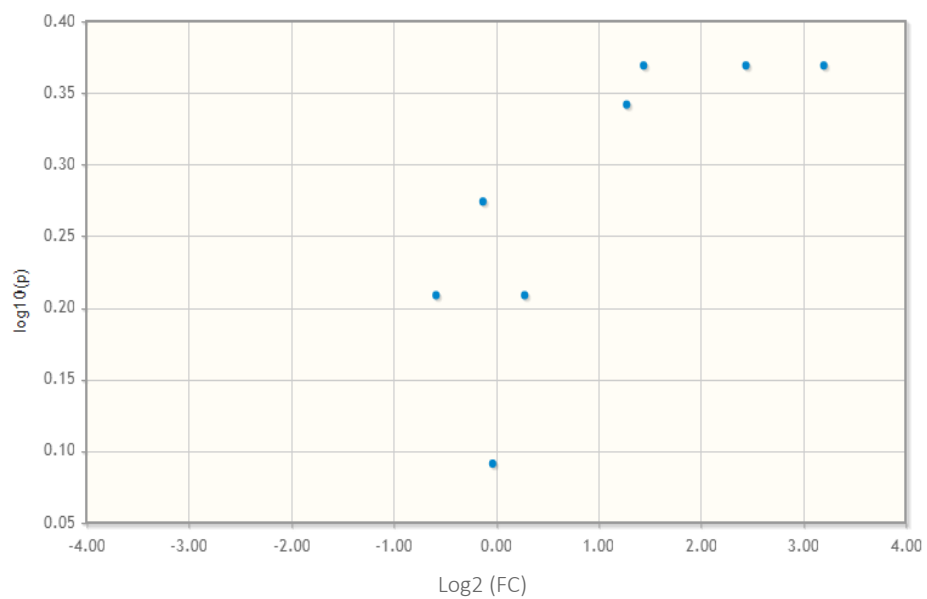
ANEXO 10



PCoA basado en Jaccard y Bray Curtis en RP y NR antes y después de la DBF. A) Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en la distancia de Jaccard entre RP y NR. B) Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) basado en la distancia de disimilitud de Bray Curtis entre RP y NR. RA: (Verde) Respondedores Antes, RD: (Naranja) Respondedores después, NRA. (Azul) No respondedores antes, NRD: No respondedores después (Rojo).

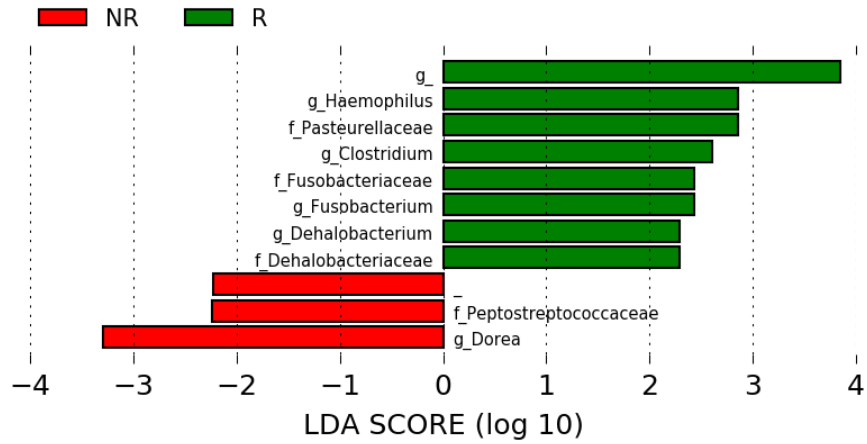


ANEXO 11



Prueba de volcán de abundancia relativa de los filos bacterianos en RP y NR antes de la DBF.

ANEXO 12



Análisis del tamaño del efecto del análisis discriminante lineal (LDA) (LEfSe) de las diferencias en la microbiota intestinal entre RP y NR antes de la DBF. El histograma muestra las puntuaciones LDA calculadas para las diferencias en la abundancia a nivel de género entre los RP y NR a la dieta, con un umbral logarítmico de 2 y error α de 0.1. Los valores absolutos del tamaño del efecto indican la escala de la diferencia entre 2 grupos independientemente de la positividad o negatividad. Los colores representan qué grupo de taxones era más abundante en comparación con el otro grupo. Las puntuaciones de LDA de los RP fueron positivas, mientras que la diferencia en los NR fue negativa. Respondedores antes= RP No respondedores antes = NR.

ANEXO 13

Análisis de componentes principales. Géneros fermentadores de HC y marcadores inflamatorios séricos antes y después de la DBF. Eigenvectores de los componentes principales PC1 y PC2.

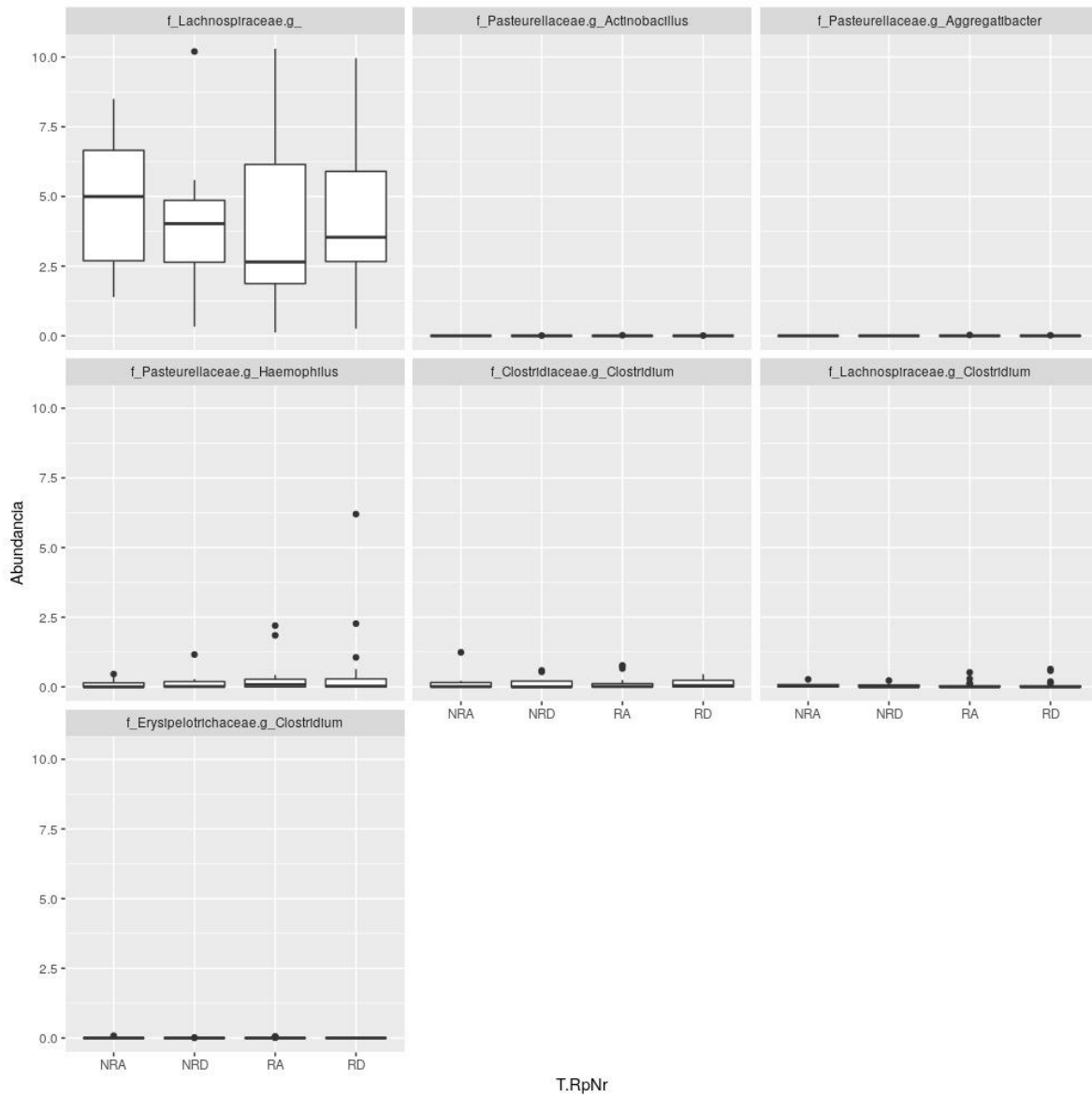
Variable	PC1	PC2
f_Mogibacteriaceae.g_	0.226	0.023
f_Ruminococcaceae._	0.215	0.040
o_Clostridiales.f.g_	0.209	0.126
f_Synergistaceae.g_Synergistes	0.204	-0.119
c_Mollicutes.o_RF39.f.g_	0.192	-0.084
f_Erysipelotrichaceae.g_p.75.a5	0.192	-0.145
f_Paraprevotellaceae.g_CF231	0.190	-0.123
f_Fusobacteriaceae.g_Cetobacterium	0.190	-0.123
f_Erysipelotrichaceae.g_Bulleidia	0.185	-0.105
f_Erysipelotrichaceae.g_Catenibacterium	0.183	-0.141
f_Ruminococcaceae.g_	0.175	-0.058
f_Coriobacteriaceae.g_Slackia	0.174	-0.051
f_Ruminococcaceae.g_Oscillospira	0.171	0.110
f_Coriobacteriaceae.g_	0.165	-0.025
o_Clostridiales._._	0.165	-0.055
f_Leuconostocaceae.g_Leuconostoc	0.162	-0.119
f_Coriobacteriaceae.g_Collinsella	0.153	-0.034
f_Eubacteriaceae.g_Anaerofustis	0.144	-0.015
f_Christensenellaceae.g_	0.137	0.093
f_Paraprevotellaceae.g_	0.132	-0.074
p_Tenericutes.c_RF3.o_ML615J.28.f.g_	0.129	0.199
f_Ruminococcaceae.g_Ruminococcus	0.122	0.058
f_Enterococcaceae.g_Enterococcus	0.115	0.109
f_Bifidobacteriaceae.g_Bifidobacterium	0.113	0.133
o_Bacteroidales.f_S24.7.g_	0.112	-0.032
f_Cerasicoccaceae.g_	0.112	-0.085
o_Lactobacillales._._	0.109	0.185
f_Ruminococcaceae.g_Gemmiger	0.108	0.001
f_Erysipelotrichaceae.g_Coprobacillus	0.107	0.187
IL8	0.104	0.192
f_Erysipelotrichaceae.g_Holdemania	0.103	0.204
MIP1A	0.103	0.201
TNFA	0.101	0.177

Variable	PC1	PC2
f_Coriobacteriaceae.g_Adlercreutzia	0.098	0.025
f_Clostridiaceae.g_Clostridium	0.085	-0.113
f_Rikenellaceae.g_Rikenella	0.085	0.046
f_Rikenellaceae.g_AF12	0.085	0.046
f_Bifidobacteriaceae.g_Scardovia	0.085	0.009
f_Lactobacillaceae._	0.085	0.009
f_Streptococcaceae._	0.085	0.009
f_Peptococcaceae.g_Peptococcus	0.071	-0.078
f_Comamonadaceae.g_Comamonas	0.066	0.104
f_Rikenellaceae._	0.065	0.070
f_Rikenellaceae.g_Alistipes	0.064	0.074
f_Lachnospiraceae.g_Dorea	0.058	0.020
f_Coriobacteriaceae.g_Eggerthella	0.058	-0.020
f_Lachnospiraceae.g_Coproccoccus	0.053	-0.068
f_Streptococcaceae.g_Streptococcus	0.051	-0.022
c_Alphaproteobacteria._._._	0.048	0.008
f_Desulfovibrionaceae._	0.038	0.047
f_Lachnospiraceae.g_Ruminococcus.	0.038	0.110
o_Lactobacillales.f.g_	0.033	0.029
f_Streptococcaceae.g_	0.033	-0.024
p_Proteobacteria._._._	0.033	-0.024
f_Lachnospiraceae.g_Clostridium	0.033	0.106
f_Erysipelotrichaceae.g_Eubacterium	0.033	-0.073
f_Clostridiaceae.g_SMB53	0.032	-0.040
f_Ruminococcaceae.g_Anaerotruncus	0.032	0.187
f_Veillonellaceae.g_Veillonella	0.031	-0.011
les.f_Lactobacillaceae.g_Lactobacillus	0.028	0.021
f_Leuconostocaceae.g_Weissella	0.027	-0.018
f_Streptococcaceae.g_Lactococcus	0.024	-0.038
f_Clostridiaceae.g_	0.023	-0.066
IL1Ra	0.021	0.193
f_Lachnospiraceae.g_Oribacterium	0.018	-0.091
f_Verrucomicrobiaceae.g_Akkermansia	0.018	0.013
f_Caldicellulosiruptoraceae.g_Caldicellulosiruptor	0.014	0.138
IL1A	0.011	0.207
f_Pasteurellaceae.g_Haemophilus	0.007	-0.019
f_Ruminococcaceae.g_Anaerofilum	0.006	0.141
f_Oxalobacteraceae.g_Oxalobacter	0.006	0.140
f_Veillonellaceae.g_Megasphaera	0.005	-0.077
f_Fusobacteriaceae.g_Fusobacterium	0.003	0.109

Variable	PC1	PC2
f_Aeromonadaceae.g_Aeromonas	0.000	0.117
Bacteria.p_TM7.c_TM7.3.o_CW040.f_.g_	0.000	-0.019
f_Moraxellaceae.g_Acinetobacter	0.000	0.116
f_Paraprevotellaceae.g_Prevotella.	-0.001	-0.052
f_Burkholderiaceae.g_Lautropia	-0.001	0.019
f_Neisseriaceae._	-0.001	0.019
f_Neisseriaceae.g_Eikenella	-0.001	0.019
f_Lachnospiraceae.g_Blautia	-0.001	0.019
o_Bacteroidales.f_Barnesiellaceae._	-0.003	-0.035
f_Erysipelotrichaceae.g_	-0.003	-0.021
f_Veillonellaceae.g_Mitsuokella	-0.003	-0.041
f_Ruminococcaceae.g_Butyricoccus	-0.005	-0.020
f_Erysipelotrichaceae.g_RFN20	-0.009	-0.070
f_Turicibacteraceae.g_Turicibacter	-0.009	-0.056
f_Clostridiaceae._	-0.011	0.001
f_Peptostreptococcaceae.g_Peptostreptococcus	-0.011	0.031
f_Porphyrimonadaceae.g_Porphyrimonas	-0.011	0.114
f_Bifidobacteriaceae.g_Gardnerella	-0.011	0.027
f_Synergistaceae.g_Cloacibacillus	-0.012	0.026
f_Lachnospiraceae.g_Roseburia	-0.013	-0.092
f_Coriobacteriaceae._	-0.013	-0.033
f_Barnesiellaceae.g_Barnesiella	-0.014	-0.011
f_Veillonellaceae._	-0.015	0.039
o_Clostridiales.f_Peptococcaceae.g_	-0.015	0.104
f_Coriobacteriaceae.g_Atopobium	-0.016	-0.024
f_Mycoplasmataceae.g_Mycoplasma	-0.016	0.024
f_Psychromonadaceae.g_Psychromonas	-0.017	0.015
f_Victivallaceae.g_	-0.018	0.002
f_Sphingomonadaceae.g_Sphingomonas	-0.018	0.002
f_Lachnospiraceae.g_Anaerostipes	-0.018	0.064
f_Tissierellaceae.g_WAL_1855D	-0.018	0.053
f_Pasteurellaceae.g_Aggregatibacter	-0.018	0.004
f_Erysipelotrichaceae.g_Clostridium	-0.019	0.100
f_Prevotellaceae.g_Prevotella	-0.020	-0.131
f_Veillonellaceae.g_Acidaminococcus	-0.021	-0.072

Variable	PC1	PC2
f_Tissierellaceae.g_1.68	-0.024	0.017
f_Peptostreptococcaceae.g_Clostridium.	-0.025	-0.004
f_Leptotrichiaceae.g_Leptotrichia	-0.025	0.009
f_Lachnospiraceae.g_Lachnobacterium	-0.027	0.072
IP10	-0.028	-0.059
f_Pasteurellaceae.g_Actinobacillus	-0.029	-0.055
f_Lachnospiraceae.g_Butyrivibrio	-0.030	-0.020
f_Lachnospiraceae._	-0.030	0.001
f_Tissierellaceae.g_	-0.033	0.004
f_Clostridiaceae.g_Sarcina	-0.033	-0.004
f_Pseudomonadaceae.g_Pseudomonas	-0.033	-0.003
f_Peptococcaceae.g_rc4.4	-0.033	0.007
f_Comamonadaceae._	-0.035	-0.038
f_Victivallaceae._	-0.037	0.023
Bacteria.p_TM7.c_TM7.3.o_f.g_	-0.039	-0.039
f_Rikenellaceae.g_	-0.039	0.150
f_Veillonellaceae.g_Phascolarctobacterium	-0.040	-0.017
f_Veillonellaceae.g_Megamonas	-0.042	-0.003
f_Aerococcaceae.g_Aerococcus	-0.042	-0.012
f_Erysipelotrichaceae._	-0.046	0.026
f_Victivallaceae.g_Victivallis	-0.047	-0.017
f_Odoribacteraceae.g_Butyricimonas	-0.053	-0.008
f_Paraprevotellaceae.g_Paraprevotella	-0.053	0.014
f_Peptostreptococcaceae._	-0.054	-0.089
f_Lachnospiraceae.g_Lachnospira	-0.056	-0.049
f_Ruminococcaceae.g_Faecalibacterium	-0.056	-0.021
f_Anaeroplasmataceae.g_	-0.057	-0.043
f_Barnesiellaceae.g_	-0.060	0.062
IFNY	-0.065	0.130
c_Alphaproteobacteria.o_RF32.f.g_	-0.067	0.022
f_Lachnospiraceae.g_	-0.068	0.006
f_Porphyrimonadaceae.g_Parabacteroides	-0.071	0.139
f_Odoribacteraceae.g_Odoribacter	-0.080	0.081
f_Bacteroidaceae.g_Bacteroides.s1	-0.121	0.109

ANEXO 14



Abundancia relativa de taxones bacterianos identificados en el Análisis del Tamaño del efecto LefSe entre RP antes y después de la DBF. RA: Respondedores Antes, RD: Respondedores después, NRA: No respondedores antes, NRD: No respondedores después.